

· 论 著 ·

木通皂苷 D 促进糖皮质激素环境下小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化

张志达^{1,3} 沈耿杨^{2,3} 任辉^{2,3} 余翔^{1,3} 尚奇^{1,3} 黄锦菁^{1,3} 招文华^{1,3} 余佩沅^{1,3} 詹玫琦^{1,3} 梁德^{2,3}
杨志东² 江晓兵^{2,3*}

1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学第一附属医院脊柱骨科, 广东 广州 510405

3. 广州中医药大学岭南医学研究中心, 广东 广州 510405

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 04-0529-05

摘要: **目的** 观察木通皂苷 D(ASD)对糖皮质激素(GC)环境下小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化的影响及其机制。**方法** 体外培养小鼠 BMSCs,实验分为三组,分别用成骨诱导培养基(OBI)、OBI+地塞米松(DEXA, 0.1 $\mu\text{mol/L}$)、OBI+DEXA (0.1 $\mu\text{mol/L}$)+ASD (10 $\mu\text{mol/L}$)干预。ALP 试剂盒检测 ALP 活性,茜素红染色检测矿化情况,qRT-PCR 检测成骨因子 Runx2、骨钙素(OCN)及 Smad1、Smad5 mRNA 表达,Western blot 检测 Smad1/5 磷酸化水平及 Smad1/5/8 总蛋白表达。**结果** OBI+DEXA组 ALP 活性明显较 OBI 组低($P<0.001$),OBI+DEXA+ASD 组 ALP 活性明显较 OBI+DEXA 升高($P<0.01$)。OBI+DEXA 干预组成骨相关因子 Runx2、OCN、Smad1 和 Smad5 mRNA 表达较 OBI 组均明显下调($P<0.01$),OBI+DEXA+ASD 组 Runx2、OCN、Smad1 和 Smad5 mRNA 表达较 OBI+DEXA 干预组明显上调($P<0.01$ 和 $P<0.05$)。三组 Smad1/5/8 总蛋白表达差异无统计学意义,OBI+DEXA 干预组 pSmad1/5 较 OBI 干预组表达降低,OBI+DEXA+ASD 干预组 pSmad1/5 表达较 OBI+DEXA 干预组增加。**结论** ASD 可促进 GC 环境下小鼠 BMSCs 成骨分化,其机制可能与激活 BMP/Smad 信号通路有关。

关键词: 中医中药;糖皮质激素性骨质疏松;木通皂苷 D;骨髓间充质干细胞;成骨分化;BMP/Smad 信号通路

Akebia saponin D promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under glucocorticoid condition in mice

ZHANG Zhida^{1,3}, SHEN Gengyang^{2,3}, REN Hui^{2,3}, YU Xiang^{1,3}, SHANG Qi^{1,3}, HUANG Jinjing^{1,3}, ZHAO Wenhua^{1,3}, YU Peiyuan^{1,3}, ZHAN Meiqi^{1,3}, LIANG De^{2,3}, YANG Zhidong², JIANG Xiaobing^{2,3*}

1. The First Clinical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Department of Spinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

3. Lingnan Medical Research Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

* Corresponding author: JIANG Xiaobing, Email: spinedrjxb@sina.com

Abstract: Objective To investigate the effect of akebia saponin D (ASD) on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) under glucocorticoid (GC) condition in mice. **Methods** Mice BMSCs were cultured in vitro. BMSCs were divided into three groups, and were induced by osteoblastic differentiation induction (OBI), OBI + DEXA (0.1 $\mu\text{mol/L}$), and OBI + DEXA (0.1 $\mu\text{mol/L}$) + ASD (10 $\mu\text{mol/L}$), respectively. ALP activity was examined with ALP kit. Alizarin red staining was performed to determine the status of mineralization. qRT-PCR was performed to examine the mRNA

基金项目: 国家自然科学基金(81674000, 81674000, 81674000);广东省高等学校珠江学者岗位计划资助项目(2018年度);中华中医药学会 2017—2019 年度青年人才托举工程项目中华中医药学会立项项目 A 类(CACM-2017-QNRC1-01);广东省自然科学基金(2016A030313645);广东省科学技术厅(2016A020226006);广州市珠江科技新星(201710010078);广东省中医药局科研项目(20180330134046, 20161136);中国博士后科学基金面上资助(2017M610271);广州中医药大学第一临床医学院优秀博士学位论文培育项目(YB201602, YB201702);广州中医药大学第一附属医院“创新强院”工程科研项目(2017QN08, 2017TD08)

* 通信作者: 江晓兵, Email: spinedrjxb@sina.com

expression of osteogenic factors Runx2, osteocalcin (OCN), Smad1, and Smad5. The phosphorylation level of Smad1/5 and expression of total Smad1/5/8 protein were examined using Western blotting. **Results** Compared to that in OBI group, ALP activity decreased in OBI + DEXA group ($P < 0.001$), but increased in OBI + DEXA (0.1 $\mu\text{mol/L}$) + ASD group ($P < 0.01$). Relative expression of osteogenesis related factors Runx2, OCN, Smad1, and Smad5 mRNAs were down-regulated in OBI + DEXA group versus OBI, but were up-regulated in OBI + DEXA + ASD group compared to OBI + DEXA group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). There was no obvious difference in level of Smad1/5/8 total protein between any two groups. pSmad1/5 level was obviously lower in OBI+DEXA (0.1 $\mu\text{mol/L}$) group than in OBI group. It was strikingly higher in OBI + DEXA + ASD group than in OBI + DEXA group. **Conclusion** ASD promotes osteogenic differentiation of mice BMSCs under GC condition probably through activating BMP/Smad signaling pathway.

Key words: Chinese traditional medicine; glucocorticoid-induced osteoporosis; akebia saponin D; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; BMP/Smad signaling pathway

糖皮质激素 (glucocorticoids, GCs) 具有良好的抗炎、抗过敏、抑制免疫等作用, 广泛应用于临床。但长期、超生理剂量摄入 GCs 可引发骨质疏松。GCs 摄入是导致继发性骨质疏松最常见的因素^[1]。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 可向成骨细胞、脂肪细胞等多方向分化, 直接影响骨形成, 调节骨量。GCs 可抑制 BMSC 成骨分化、促进 BMSCs 成脂分化^[2]。木通皂苷 D (akebia saponin D, ASD) 又称川续断皂苷 VI, 是川续断的主要活性成分^[3], 研究显示 ASD 可促进 BMSCs 向成骨细胞分化^[4]。BMP/Smad 信号通路可调控成骨细胞的全部过程, 其功能障碍可引起骨形成减少^[5]。因此, 本研究拟通过研究 ASD 对在 GC 环境下小鼠 BMSC 成骨分化的影响, 为今后 ASD 在防治 GIOP 中的开发应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞提取、培养与传代

8 周龄健康 C57BL/6 小鼠脱颈法处死, 70% 酒精浸泡消毒 5 min, 切开髋关节周围的皮肤, 用无菌的解剖剪刀和镊子从每只小鼠后肢分离出股骨和胫骨, 去除皮肤、肌肉肌腱等软组织, 将干净的骨头放在培养皿中。无菌剪刀剪除每根骨的两端, 暴露骨髓腔, 用 1 mL 注射器抽取冲洗培养基 (49 mL α -MEM+1 mL FBS+0.5 mL P/S) 冲出骨髓至 15 mL 离心管。室温下以 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 室温下将细胞悬浮于 5 mL 红细胞裂解缓冲液中 5 min。用 10 mL 冲洗培养基再洗细胞 1 次并离心, 用 1 mL 冲洗培养基重新悬浮细胞, 计算细胞数量。细胞至于体积分数 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 75% 的培养箱中恒温培养。72 h 更换生长培养基 (45 mL α -MEM+5 mL FBS+0.5 mL P/S), 之后每 3 d 更换 1 次培养基, 待细胞 80%~90% 融合后传代, 用胰蛋白酶消化

细胞至大部分细胞重新悬浮, 再加入培养基终止胰蛋白酶消化作用, 1 000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 用培养基重悬细胞后移至新的培养瓶中培养。传至第 3 代后进行成骨诱导。

1.2 主要仪器、试剂及药物

研究型正置荧光生物显微镜 (OLYMPUS 公司, 日本)、T100 梯度 PCR 仪、CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)、全波长酶标仪 (Thermo, 美国)、电泳仪 (BIO-RAD, 美国)、垂直板电泳装置 (BIO-RAD, 美国)、Tanon-2500R 型全自动数码凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国) 等。

α -MEM 培养基 (Gibco 公司, 美国), 胎牛血清 (FBS; Gibco 公司, 美国), 胰蛋白酶 (Gibco 公司, 美国), C57BL/6 小鼠 BMSCs 成骨诱导分化培养基 [α -MEM 基础上含 10% FBS+1% Penicillin-Streptomycin 双抗+50 $\mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸+10 mmol/L β -甘油磷酸钠; 赛业 (苏州) 生物科技有限公司, 中国], 碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测试剂盒 (Roche 公司, 瑞士), 茜素红 S (Roche 公司, 瑞士), Trizol (Invitrogen 公司, 美国), RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT Master Mix、荧光定量 SYBR [®] Premix ExTaq TM II 试剂盒 (TAKARA, 日本), Runx2、OCN、Smad1、Smad5 引物 (Life 公司, 美国), 抗-Smad1/5/8 抗体 (1:500; CST 公司, 美国), 抗磷酸化 Smad1/5 (pSmad1/5) 抗体 (1:500; CST 公司, 美国); 醋酸地塞米松片 (Sigma 公司, 美国); ASD (Sigma 公司, 美国) 等。

1.3 实验方法

1.3.1 药物干预: 细胞分别用成骨诱导培养基 (OBI)、OBI+DEXA (0.1 $\mu\text{mol/L}$)、OBI+DEXA (0.1 $\mu\text{mol/L}$) + ASD (10 $\mu\text{mol/L}$) 干预, 分别进行碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定, 茜素红染色检测成骨早期矿化情况; 定量实时荧光 PCR (qRT-PCR) 检测成骨因

子骨钙素 (osteocalcin, OCN)、Runx2 以及 Smad 信号通路 Smad1、Smad5 的表达, Western blot 检测 Smad 信号通路 Smad1/5 磷酸化水平和 Smad1/5/8 总蛋白水平。

1.3.2 ALP 活性检测: 药物干预 5 d 后收集细胞培养液上清, 测定 ALP 活性, 具体步骤方法参照试剂盒操作。

1.3.3 茜素红染色检测成骨矿化情况: 药物干预 14 d 后取出 1 块 12 孔板, 吸去培养基, PBS (1×) 清洗 2 遍, 加入 95% 戊二醛溶液固定, 4° 过夜, 40 mmol/L 茜素红染色 15 min, 水洗 3 次, PBS (1×) 洗涤 15 min 后, 拍照洗脱茜素红测 OD 值。

1.3.4 qRT-PCR 检测续断皂苷对 DEXA 环境下成骨因子 mRNA 表达的影响: 药物干预 5 d 后, 用异硫氰酸胍 (Trizol) 法提取细胞总 RNA, RNA 酶消化并反转录, qRT-PCR 反应引物: Runx2: GACCAGTC TTACCCCTCCTA 和 GDEXAAGTGTCTCATCTGAAA; OCN: CTCTCTCTDEXATCACTCTDEXAT 和 GACTGA GDEXATCCAAGGTAG; Smad1: DEXATTCGTGAA GGGTTGGGG 和 CGGATGAAATAGGATTGTGGGG; Smad5: TTGTTTCAGACTAGGAAGTDEXAAAC 和 GADEXATGADEXAAAAGTCTCTGAT。反应条件: 95 °C, 3 min 变性; 95 °C, 30 s; 60 °C, 40 s, 共 40 个循环。

1.3.5 Western blot 检测 ASD 对 DEXA 环境下 Smad 信号蛋白表达的影响: 药物干预 14 d 后, 加入 RIPA 细胞裂解液 300 μL, 冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 检测蛋白浓度, 用等量 2-上样缓冲液 (2-SDS-PAGE Sample/Loading Buffer) 混匀煮沸 10 min, 提取 20 μg 的蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转至 PVDF 膜上, 室温下封闭 1 h, 一抗室温孵育 2 h 后, TBST 洗膜 3 次 (10 min/次), 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次 (10 min/次), DAB 试剂盒显色曝光拍照。

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 Graph Pad Prism

7.0 软件进行统计分析, 统计方法为单因素方差分析, 事后多重比较采用 Turkey 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用 Graph Pad Prism 7.0 进行数据图像处理。

2 结果

2.1 ALP 活性

ALP 活性见图 1。DEXA 环境下, 小鼠 BMSCs ALP 活性明显降低 ($P < 0.001$), ASD 明显增加了 DEXA 干预下 BMSCs 的成骨活性 ($P < 0.01$)。

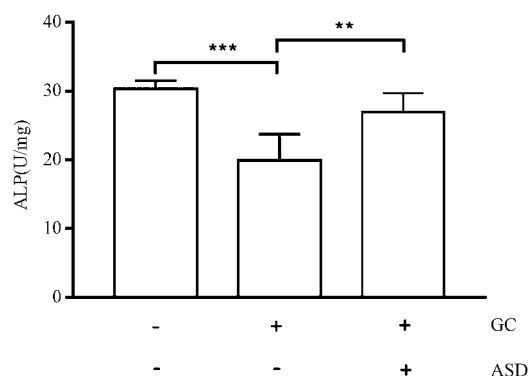


图 1 不同干预 BMSCs ALP 活性

Fig.1 ALP activity of BMSCs treated with different methods

2.2 茜素红染色

茜素红染色见图 2。与单纯成骨诱导比较, BMSCs 在 DEXA 干预下, 成骨矿化结节明显减少; 与 DEXA 干预比较, DEXA + ASD 干预明显增加了矿化。

2.3 不同干预下 Runx2、OCN、Smad1、Smad5 mRNA 表达水平

不同干预下 Runx2、OCN、Smad1、Smad5 mRNA 表达水平见图 3。与 OBI 比较, OBI + DEXA 干预组 Runx2、OCN、Smad1 和 Smad5 mRNA 表达均明显下调 ($P < 0.01$), OBI + DEXA + ASD 干预组 Runx2、OCN、Smad1 和 Smad5 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); OBI + DEXA + ASD 干预组较 OBI +

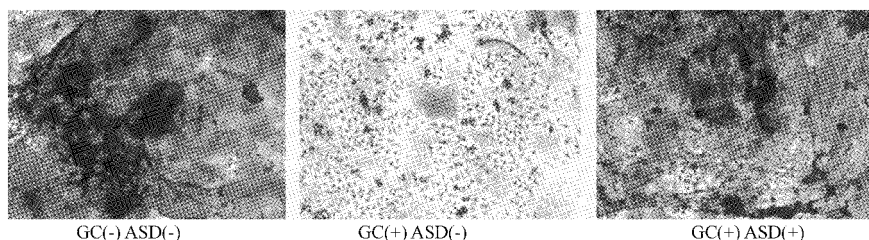


图 2 不同干预诱导成骨矿化情况

Fig.2 Osteogenic mineralization in different treatments

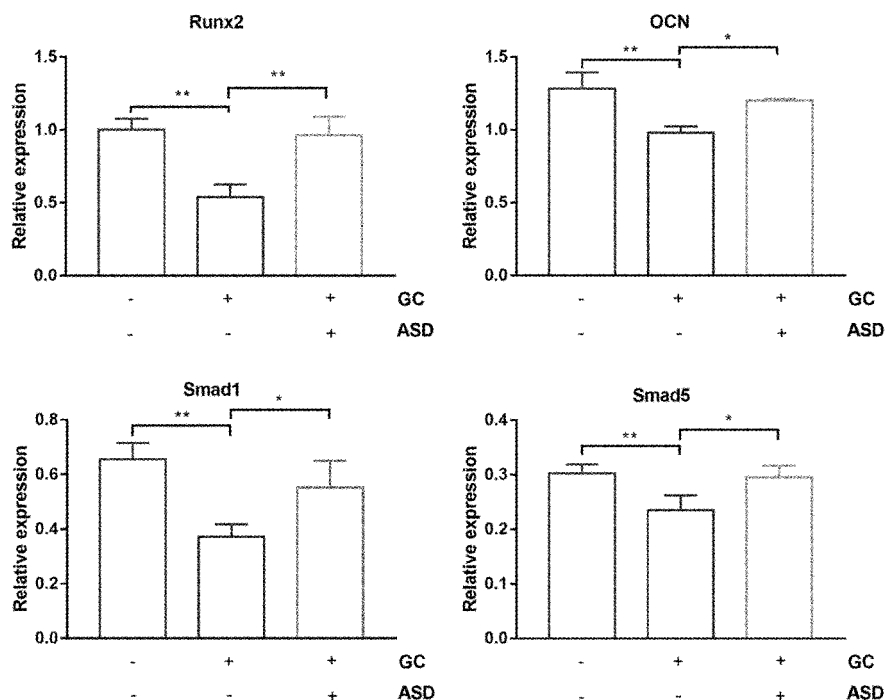


图 3 mRNA 相对表达水平

Fig.3 Relative expression levels of mRNAs

DEXA 干预组 Runx2、OCN、Smad1 和 Smad5 mRNA 表达明显上调 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。

2.4 不同干预下 Smad1/5 蛋白磷酸化水平

不同干预下 Smad1/5 蛋白磷酸化水平见图 4。与 OBI 组比较, OBI + DEXA 干预、OBI + DEXA + ASD 干预小鼠 BMSCs 后 Smad1/5/8 总蛋白表达无明显变化; OBI + DEXA 干预后磷酸化 Smad1/5 (pSmad1/5) 蛋白表达明显降低, ASD 可增加 DEXA 环境下 Smad1/5 蛋白的磷酸化水平。

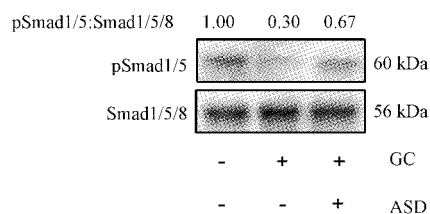


图 4 Smad1/5/8 和 pSmad1/5 蛋白表达情况

Fig.4 Expression of Smad1/5/8 and pSmad1/5 proteins

3 讨论

糖皮质激素性骨质疏松 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 是目前最常见的继发性骨质疏松^[1]。其发病机制仍未完全清楚, 近期发现 DEXA 可增加破骨细胞活性, 抑制成骨细胞增殖, 诱导成骨

细胞和骨细胞凋亡, 降低骨量^[6]。有研究也发现 DEXA 可抑制大鼠 BMSC 增殖和成骨分化^[7], 这与本研究的结果一致。需要指出, 虽然低剂量 (或浓度) DEXA 可促进成骨分化——在含维生素 C (或称抗坏血酸)、β-甘油磷酸盐的成骨诱导剂基础上添加微量 DEXA 是诱导成骨分化常用的方法, 亦有众多研究在诱导成骨分化时未添加 DEXA 而只添加维生素 C、β-甘油磷酸盐^[8-10], 本研究中诱导成骨的方法正是参照这些研究。

木通皂苷 D (akebia saponin D, ASD) 又称川续断皂苷 VI, 是川续断的主要活性成分, 具有治疗抗骨质疏松、糖尿病、高脂血症等药理作用^[11], 具有很高的研究和开发价值。虽然已有研究发现 ASD 可促进 BMSCs 成骨分化^[4, 12-13], 但相关研究仍较少, 且 ASD 对 DEXA 环境下 BMSCs 成骨分化的影响及其机制仍未见报道。ALP 主要分布在细胞膜, 是膜结合胞外酶^[14], 协助转运钙, 参与细胞成熟、钙化^[15], 是成骨细胞分化早期标志物^[16]。本研究中, ASD 干预 DEXA 环境下小鼠 BMSCs, 可明显增强 ALP 活性, 证实了 ASD 的促成骨分化的作用, 与上述既往研究结果类似。

OCN 是成骨细胞分化中期的重要标志物^[17], 也是调节骨质钙化的重要因子, 参与骨组织的正常

矿化^[18]。Runx2是BMSCs向成骨方向分化的首要决定因子,是成骨细胞分化早期主要骨基质基因表达的启动子^[19]。我们的研究结果显示,ASD上调了被DEXA抑制的OCN和Runx2表达,进一步证实了ASD促进成骨分化,提示其机制可能与靶向调控OCN和Runx2的表达有关。

BMP/Smad信号通路是调控成骨的重要通路。BMP受体介导BMP/Smad信号通路转导:磷酸化Smad1、Smad5和Smad8,使其形成复合物并与Smad4结合,转移入核,与其他转录因子如Runx2相互作用,启动成骨相关基因的转录^[20]。本研究中,DEXA干预下,Smad1、Smad5 mRNA表达均明显下调,而ASD可上调被DEXA抑制的Smad1、Smad5表达,提示ASD可靶向上调BMP/Smad信号通路中Smad1、Smad5元件表达;另外,DEXA或DEXA+ASD干预,Smad1/5/8总蛋白表达均无明显变化,而DEXA降低了pSmad1/5蛋白水平,ASD增加了被DEXA抑制的pSmad1/5表达,证实ASD可激活被DEXA抑制的BMP/Smad信号通路。

综上所述,ASD可促进DEXA环境下小鼠BMSCs成骨分化,其机制可能与激活BMP/Smad信号通路有关。

【参 考 文 献】

- [1] Compston J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update[J]. *Endocrine*, 2018, 61(1):7-16.
- [2] Huang Z, Cheng C, Cao B, et al. Icariin protects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2):694-706.
- [3] Wang Y, Shen J, Yang X, et al. Akebia saponin D reverses corticosterone hypersecretion in an Alzheimer's disease rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107:219-225.
- [4] 武密山,赵素芝,任立中,等. 川续断皂苷VI诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的研究[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(2):222-226.
- [5] 柴爽,王吉利,黄佳纯,等. 补肾健脾活血方对去卵巢大鼠 BMP2/Smad 信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20):129-133.
- [6] 程群,杜艳萍,李慧林,等. 阿仑膦酸钠和甲状旁腺素对糖皮质激素性骨丢失的作用[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2012, 5(3):205-213.
- [7] Huang Z, Cheng C, Cao B, et al. Icariin Protects against Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in Rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2):694-706.
- [8] Shu L, Zhang H, Boyce BF, et al. Ubiquitin E3 ligase Wwp1 negatively regulates osteoblast function by inhibiting osteoblast differentiation and migration [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(9):1925-1935.
- [9] Zhang H, Hilton MJ, Anolik JH, et al. NOTCH inhibits osteoblast formation in inflammatory arthritis via noncanonical NF-kappaB [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(7):3200-3214.
- [10] Sun W, Meednu N, Rosenberg A, et al. B cells inhibit bone formation in rheumatoid arthritis by suppressing osteoblast differentiation[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):5127.
- [11] Wang Y, Shen J, Yang X, et al. Akebia saponin D reverses corticosterone hypersecretion in an Alzheimer's disease rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107:219-225.
- [12] 黄媛,徐艳,易学良,等. 川续断皂苷VI通过JNK信号通路促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. *广州中医药大学学报*, 2018, 35(5):887-893.
- [13] Ke K, Li Q, Yang X, et al. Asperosaponin VI promotes bone marrow stromal cell osteogenic differentiation through the PI3K/AKT signaling pathway in an osteoporosis model[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:35233.
- [14] Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease[J]. *J Nippon Med Sch*, 2010, 77(1):4-12.
- [15] Howlett CR, Cave J, Williamson M, et al. Mineralization in vitro cultures of rabbit marrow stromal cells [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1986(213):251-263.
- [16] Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage[J]. *Biochem Cell Biol*, 1998, 76(6):899-910.
- [17] Sun YQ, Ashhurst DE. Osteogenic growth peptide enhances the rate of fracture healing in rabbits[J]. *Cell Biol Int*, 1998, 22(4):313-319.
- [18] Brown JP, Delmas PD, Malaval L, et al. Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis[J]. *Lancet*, 1984, 1(8386):1091-1093.
- [19] Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 658:43-49.
- [20] Xu L, Liu Y, Hou Y, et al. U0126 promotes osteogenesis of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by activating BMP/Smad signaling pathway [J]. *Cell Tissue Res*, 2015, 359(2):537-545.

(收稿日期:2019-01-28;修回日期:2019-04-16)