

网络出版时间: 2019-5-30 10:50 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190527.1648.006.html>

淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞增殖分化的影响及机制研究

安 庆^{1,2}, 刘国雄¹, Bikash Kumar Sah¹, 周 霖¹, 庾 伟¹, 曹 洪¹

摘要 目的 研究淫羊藿苷(ICA)对小鼠颅顶前成骨细胞(MC3T3-E1)增殖、分化的影响,以及骨形态发生蛋白2(BMP-2)/Smads信号通路在成骨细胞增殖、分化中的作用。方法 用含不同浓度ICA(0、10、20、40 ng/ml)的完全培养液分别培养MC3T3-E1细胞48、72、96 h。HE染色法观察ICA对MC3T3-E1细胞形态的影响;分别用CCK-8及碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒检测ICA对MC3T3-E1细胞增殖活性和细胞ALP活性的影响;Western blot检测ICA对MC3T3-E1细胞BMP-2、骨形态发生蛋白2受体(BMPR-2)、Smad4和Smad1/5/8蛋白表达水平的影响。向细胞培养液中加入BMP抑制剂头蛋白(Noggin, 100 ng/ml)阻断BMP-2/Smads信号通路后,再次检测上述各实验指标的变化。结果 ICA

对MC3T3-E1细胞形态无明显影响;ICA(10、20 ng/ml)可增强MC3T3-E1细胞增殖活性(P 均 <0.01)。ICA(10、20 ng/ml)可增强MC3T3-E1细胞ALP活性(P 均 <0.01)。阻断BMP-2/Smads信号通路后,ICA促细胞增殖作用($P<0.01$)及促分化作用($P<0.01$)明显下降。ICA(10、20 ng/ml)可提高MC3T3-E1细胞BMP-2、BMPR-2、Smad4和Smad1/5/8蛋白表达水平(P 均 <0.01)。当阻断BMP-2/Smads信号通路后,ICA促BMP-2、BMPR-2、Smad4和Smad1/5/8蛋白表达作用均受到抑制。结论 ICA对MC3T3-E1细胞形态无明显影响,ICA可能是通过上调MC3T3-E1前体成骨细胞BMP-2蛋白的表达,激活BMP-2/Smads信号通路,启动下游成骨相关基因的表达,从而促进细胞的增殖、分化。

关键词 淫羊藿苷; 成骨细胞; BMP-2; Smads

中图分类号 R 336

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)06-0893-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.012

2019-03-05 接收

基金项目 国家自然科学基金(编号:81602867);湖北省自然科学基金面上项目(编号:2018CFB524);湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(编号:B2018110)

作者单位: ¹湖北医药学院附属人民医院(十堰市人民医院)创伤骨科,十堰 442000

²利辛县人民医院骨科,利辛 236700

作者简介: 安 庆,男,硕士研究生;

曹 洪,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: 33556511@qq.com

淫羊藿苷(icariin, ICA)分子式: $C_{33}H_{40}O_{15}$, 分子量: 676, 是抗骨质疏松中药淫羊藿的有效成分之一^[1]。研究^[2]表明,ICA可促进骨形成、抑制骨吸收,提高骨密度及影响骨代谢指标,具有明显的抗骨质疏松作用。然而,对其作用机制及分子机制方面

Regulatory effect of miR-145-5p targeting FGF5 on apoptosis and oxidative stress induced by ischemia/reperfusion injury

Yan Haiqing, Yue Xuejing, Gui Yongkun, et al

(Dept of Neurology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University,
Henan Key Laboratory of Neural Regeneration, Xinxiang 453100)

Abstract **Objective** To investigate the regulatory effects of miR-145-5p on *in vitro* ischemia/reperfusion (I/R) injury of neurons and to explore their mechanisms. **Methods** The cell I/R injury model was established by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R). The target relationship between miR-145-5p and FGF5 was verified by luciferase reporting experiment. The effects of miR-145-5p on apoptosis and oxidative stress in neuronal cell HT22 were detected by RT-PCR, flow cytometry and western blot. **Results** The results showed that the apoptosis rate and oxidative stress injury were significantly increased in the OGD/R treatment for 6 h, 12 h, and 24 h compared with the group without OGD/R treatment (Normoxia). In OGD/R model, miR-145-5p inhibitor transfection reduced apoptosis and oxidative stress of HT22 cells. However, FGF5 siRNA transfected cells reversed this effect. In the process of brain I/R injury simulated by OGD/R, miR-145-5p promoted apoptosis and injury of neuronal cells by targeting FGF5. **Conclusion** This study provides a new therapeutic target for the treatment of ischemic stroke. **Key words** miR-145-5p; FGF5; ischemia/reperfusion injury; OGD/R model

的研究仍不够全面^[3],故 ICA 在预防骨质疏松方面仍需要更深入地研究。该实验以小鼠颅顶前成骨细胞亚克隆 14(mouse embryo osteoblast precursor cells, MC3T3-E1 subclone 14) 为细胞模型,研究 ICA 对其细胞形态、细胞增殖活性以及细胞碱性磷酸酶(acid phosphatase, ALP) 活性的影响,同时研究骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) BMP-2/(small mothers against decapentaplegic, Smad) Smads 信号通路在其中的作用,为 ICA 治疗骨质疏松等骨代谢疾病提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂 小鼠颅顶前成骨细胞亚克隆 14 (MC3T3-E1 subclone 14) 细胞购自中国科学院上海细胞库; 高糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS) 购自美国 HyClone 公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒购于上海碧云天生物科技公司; CCK-8 试剂盒购于日本同仁化学研究所; ALP 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 头蛋白(noggin) 购自美国 R&D 公司, 目录号: 1967-NG-025; 兔多克隆抗体 BMP-2(ab14933)、兔多克隆抗体骨形态发生蛋白 2 受体(bone morphogenetic protein receptor-2, BMPR-2) (ab96826)、兔单克隆抗体 Smad4 (ab40759) 均购自英国 Abcam 公司; 兔多克隆抗体 Smad1/5/8/9 (NB100-56443) 购自美国 Novus 公司。ICA 标准品购自中国药品生物制品北京检定所, 目录号: T2855 纯度为 99%(HPLC 检验)。

1.2 方法

1.2.1 淫羊藿苷储备液 取 2 mg ICA 加入 2 ml DMSO 中制成 1 mg/ml 的储备液保存于 -20 ℃。根据实验要求, 用细胞培养液稀释储备液制成含不同浓度 ICA (0、10、20、40 ng/ml) 的培养液备用。

1.2.2 细胞培养 MC3T3-E1 细胞完全培养液为含 10% FBS 的高糖 DMEM, 培养环境为 37 ℃、5% CO₂ 培养箱。根据实验要求, 向各实验组中加入含不同浓度 ICA (0、10、20、40 ng/ml) 的培养液, 每 2 d 换液 1 次。

1.2.3 细胞苏木精-伊红(HE) 染色 取第 3 代 MC3T3-E1 细胞接种于 24 孔板, 用完全培养液培养 24 h 后更换含不同浓度 ICA (0、10、20、40 ng/ml) 的培养液, 分别培养 48、72、96 h。HE 染色法对 MC3T3-E1 细胞进行染色, 并在倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.4 检测细胞增殖活性 CCK-8 法检测 MC3T3-

E1 细胞的增殖活性。将第 3 代 MC3T3-E1 细胞接种于 96 孔板, 细胞培养方法同 HE 染色部分。根据 CCK-8 操作说明向每孔中加入 10 μ l 检测液, 用酶联免疫检测仪于 450 nm 波长检测每孔细胞光密度值 (optical density, OD) 并计算出每组细胞相对增殖活性。

1.2.5 检测细胞 ALP 活性 ALP 检测试剂盒检测 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性。取第 3 代 MC3T3-E1 细胞接种于 6 孔板, 细胞培养方法同 HE 染色部分。根据试剂盒操作说明裂解并离心细胞后取上清液, 用酶联免疫检测仪于 405 nm 波长检测上清液 OD 并计算出各组细胞 ALP 相对活性。

1.2.6 Western blot 将 MC3T3-E1 培养的细胞接种于 10 cm 培养皿, 细胞培养方法同 HE 染色部分: ① 细胞经 RIPA 裂解后, 离心取上清液; ② 用 BCA 法检测上清液蛋白质浓度; ③ 分别用 5% 的浓缩胶和 12% 分离胶分离蛋白质; ④ 分别孵育一抗 BMP-2 (1 : 1 000), BMPR-2 (1 : 1 000), Smad4 (1 : 1 000), Smad1/5/8/9 (1 : 200) 和 β -actin (1 : 1 000) 和二抗后显色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间均数比较采用 One-Way ANOVA 方差分析。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICA 对 MC3T3-E1 细胞形态的影响 倒置显微镜下见 48、72h 组细胞形态饱满, 呈多角形或梭形, 各 ICA 浓度间细胞形态无明显差异。见图 1、2。

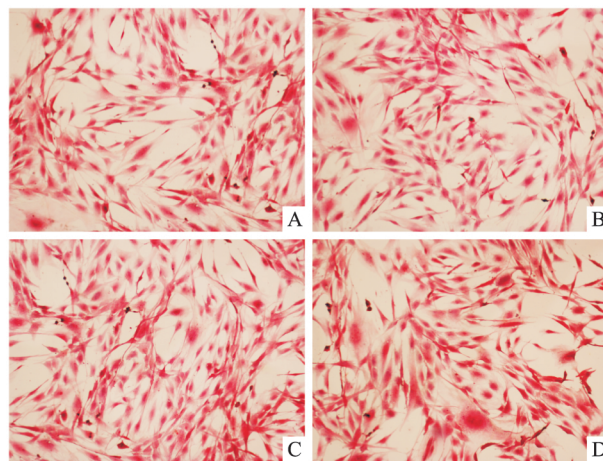


图 1 ICA 对 MC3T3-E1 细胞形态的影响(48 h) HE $\times$ 100

A: 0 ng/ml ICA; B: 10 ng/ml ICA; C: 20 ng/ml ICA; D: 40 ng/ml ICA

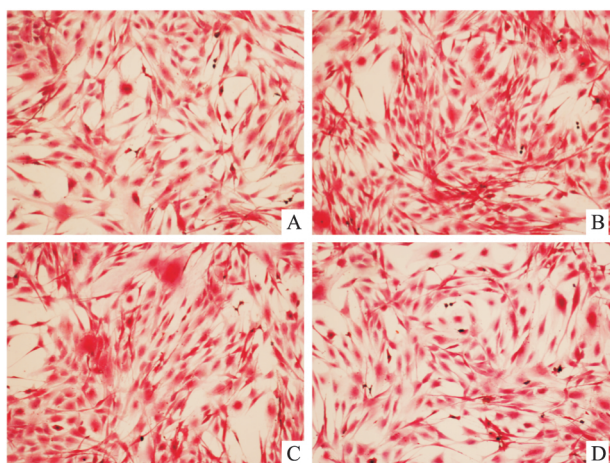


图2 ICA对MC3T3-E1细胞形态的影响(72 h) HE × 100

A: 0 ng/ml ICA; B: 10 ng/ml ICA; C: 20 ng/ml ICA; D: 40 ng/ml ICA

96 h 组镜下见细胞排列紧密,部分细胞伸出突起,胞质丰富,细胞核较清晰,各 ICA 浓度间细胞亦无明显差异。见图 3。结果提示 ICA 对 MC3T3-E1 细胞形态无明显影响。

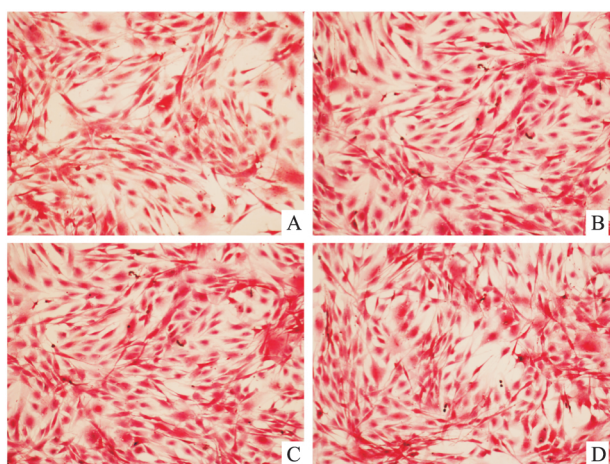


图3 ICA对MC3T3-E1细胞形态的影响(96 h) HE × 100

A: 0 ng/ml ICA; B: 10 ng/ml ICA; C: 20 ng/ml ICA; D: 40 ng/ml ICA

2.2 ICA 对 MC3T3-E1 细胞增殖活性的影响 各组在培养 48、72、96 h 后,10、20 ng/ml ICA 组细胞增殖活性较对照组(ICA 0 ng/ml)显著增强(P 均 < 0.01),其中 20 ng/ml ICA 组细胞活性更强,并且于 96 h 时细胞增殖活性达到最高,而 40 ng/ml ICA 组细胞活性与对照组比较差异无统计学意义,见图 4A。向细胞中加入 Noggin,观察 ICA(20 ng/ml)与 Noggin(100 ng/ml)共同培养 MC3T3-E1 细胞 72 h 后对细胞增殖活性的影响。结果显示各指标在各组间差异有统计学意义($F = 102.7$, $P < 0.01$)。与 ICA(20 ng/ml)组比较,ICA + Noggin 组细胞增殖活性明显受到抑制($P < 0.01$);与 ICA(0 ng/ml)组相比差异无统

计学意义,见图 4B。

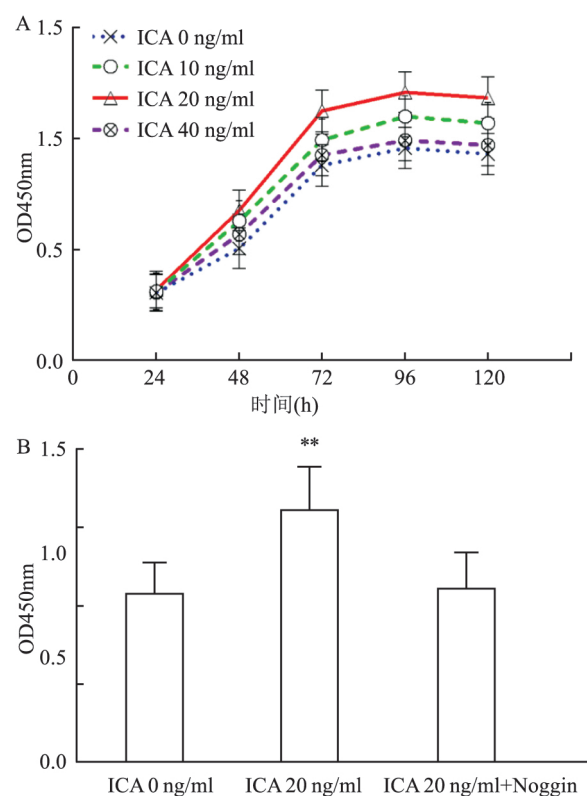


图4 ICA对MC3T3-E1细胞增殖活力的影响及阻断 BMP/Smads 信号通路后的变化

A: ICA 对 MC3T3-E1 细胞增殖活力的影响; B: 阻断 BMP/Smads 信号通路后 ICA 对 MC3T3-E1 细胞增殖活性的影响; 与 0 ng/ml ICA 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 ICA 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响

各组在培养 48、72、96 h 后,10 和 20 ng/ml ICA 组细胞 ALP 活性较对照组显著增高(P 均 < 0.01),40 ng/ml ICA 组细胞 ALP 活性与对照组比较差异无统计学意义,见图 5A。向细胞中加入 Noggin,观察 ICA(20 ng/ml)与 Noggin(100 ng/ml)共同培养 MC3T3-E1 细胞 72 h 后对细胞 ALP 活性的影响。结果显示各指标在各组间差异有统计学意义($F = 26.10$, $P < 0.01$)。与 ICA(20 ng/ml)组比较,ICA + Noggin 组细胞 ALP 活性受到抑制($P < 0.01$);与 ICA(0 ng/ml)组相比差异无统计学意义,见图 5B。

2.4 ICA 对 MC3T3-E1 细胞 BMP-2、BMPR-2、Smad1/5/8 和 Smad4 蛋白表达的影响 Western blot 分析 结果显示各指标在各组间差异有统计学意义($F = 98.22, 96.17, 146.35, 123.10$, $P < 0.01$)。各组在培养 48、72、96 h 后,10、20 ng/ml ICA 组细胞 BMP-2、BMPR-2、Smad1/5/8 和 Smad4 蛋白表达水平较对照组均显著增加(P 均 < 0.01)。40 ng/ml

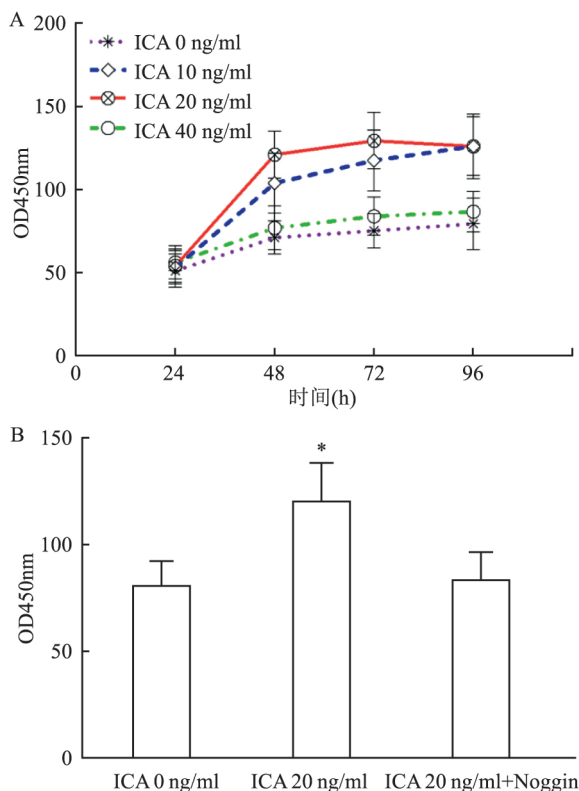


图5 ICA对MC3T3-E1细胞ALP活性的影响及阻断BMP/Smads信号通路后的变化

A: ICA对MC3T3-E1细胞ALP活性的影响; B: 阻断BMP/Smads信号通路后ICA对MC3T3-E1细胞ALP活性的影响; 与0 ng/ml ICA组比较: * $P < 0.05$

ICA组细胞上述蛋白表达水平少量增加,但与对照组相比差异无统计学意义,见图6。

2.5 Noggin对ICA促MC3T3-E1细胞BMP-2、

BMPR-2、Smad1/5/8和Smad4蛋白表达的影响

向细胞中加入Noggin(100 ng/ml),观察不同浓度ICA与Noggin共同培养48、72、96 h后对细胞BMP-2、BMPR-2、Smad1/5/8和Smad4蛋白表达的影响。结果显示各指标在各组间差异无统计学意义($F = 2.099, 1.731, 1.098, 1.951, P > 0.05$)。加入Noggin后,细胞BMP-2、BMPR-2、Smad1/5/8和Smad4蛋白表达水平与对照组差异无显著性,ICA对MC3T3-E1细胞BMP-2、BMPR-2、Smad1/5/8和Smad4蛋白表达的促进作用均受到抑制,见图7。

3 讨论

骨质疏松症是威胁中老年人健康的常见病和多发病。据统计,我国老年人骨质疏松症的发病率高达70%^[4]。骨质疏松易导致患者骨折,进一步会导致残疾、终身丧失独立生活能力甚至死亡。同时,患者生活质量的降低、死亡率的升高,会给家庭和社会带来沉重的负担^[5]。双磷酸盐是治疗骨质疏松的重要药物,但是最近的研究^[6]却发现长期服用双磷酸盐并不一定能降低骨质疏松症患者骨折的风险。雌激素是治疗绝经后骨质疏松的有效药物,然而长期使用人工合成的雌激素可能会增加子宫内膜癌、乳腺癌及深静脉血栓疾患的风险^[7]。因此,寻找一种更为安全有效的治疗骨质疏松的药物是防治的重要任务。

ICA具有较强的促进成骨细胞和骨髓间充质干细胞增殖、分化,发挥抗骨质疏松的能力^[8]。Song et

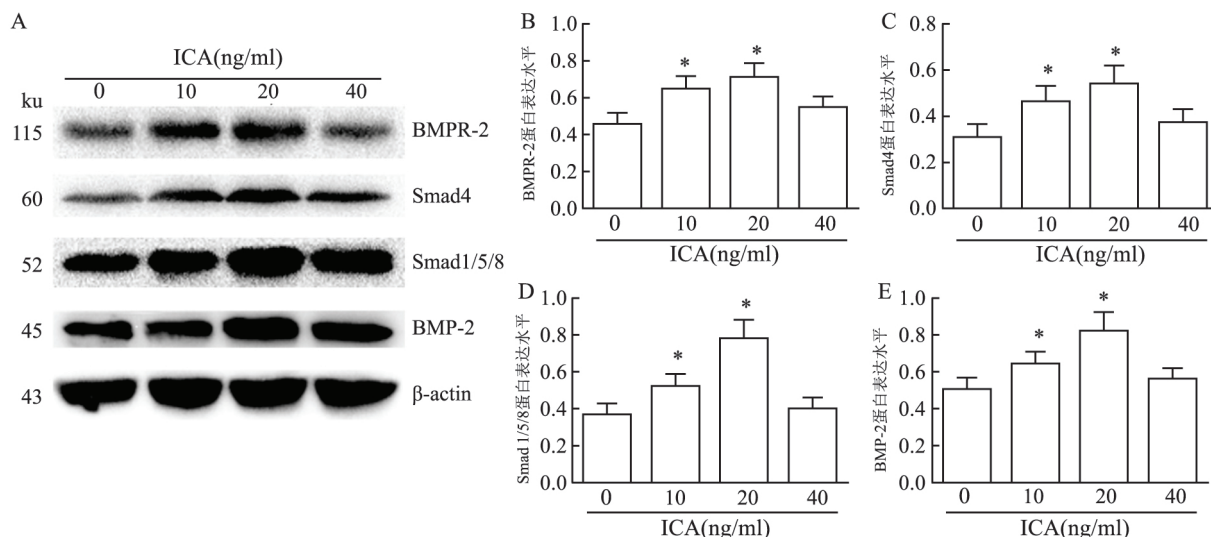


图6 ICA对MC3T3-E1细胞BMP-2、BMPR-2、Smad1/5/8和Smad4蛋白表达水平的影响
与0 ng/ml ICA组比较: * $P < 0.05$

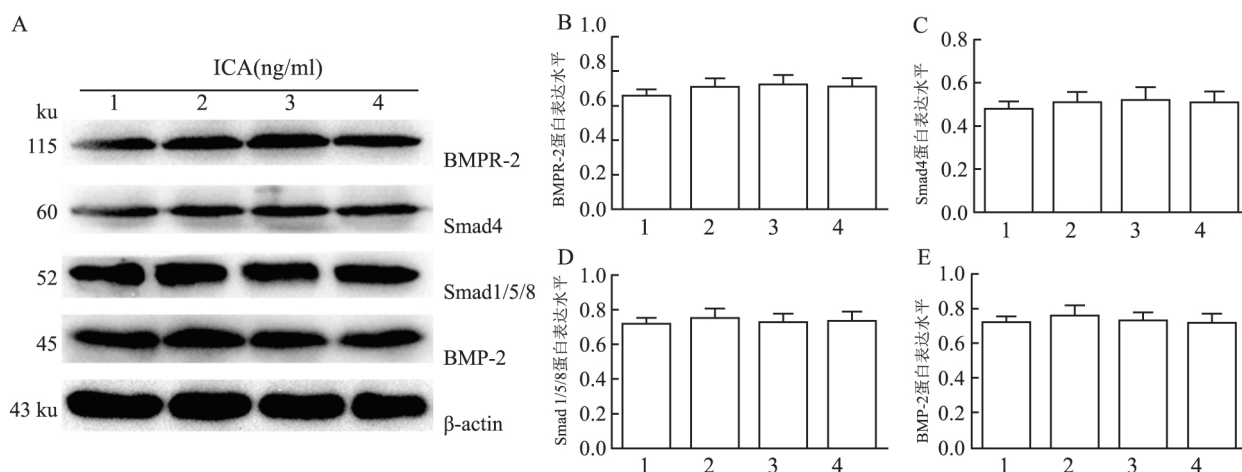


图7 Noggin 对 ICA 诱导的 BMP-2、BMPR-2、Smad1/5/8 和 Smad4 蛋白表达水平的影响

1: ICA 0 ng/ml + Noggin 组; 2: ICA 10 ng/ml + Noggin 组; 3: ICA 20 ng/ml + Noggin 组; 4: ICA 40 ng/ml + Noggin 组

al^[9] 研究表明, ICA 可通过上调 MC3T3-E1 细胞增殖细胞核抗原和细胞周期蛋白 E 基因的表达, 促进细胞增殖并抑制其凋亡。本实验结果显示, ICA 可促进 MC3T3-E1 细胞增殖, 并且其作用具有浓度依赖性特点。

ALP 是参与骨代谢的重要蛋白, 亦是成骨细胞分化成熟的早期标志之一^[10]。随着成骨细胞不断分化, ALP 活性也逐渐增强, 其活性大小可反映成骨细胞的分化水平。该实验结果显示, ICA 具有显著的促进 MC3T3-E1 细胞分化作用, 其作用亦具有浓度依赖性特点。

BMPs 是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 家族成员之一, 骨组织中含有丰富, 在骨的诱导和形成方面发挥重要作用^[11]。BMPs 促分化作用主要通过增加细胞内 ALP 活性、骨钙素和胶原蛋白的合成及分泌而发挥作用。BMP-2 被认为是 TGF- β 家族中活性最高且唯一能单独诱导成骨的因子, BMP-2 的高表达可以促进成骨细胞的增殖分化^[12]。SMADS 家族是 TGF- β 超家族的下游信号传导通路, Smad4 作为 SMADS 的公共递质在 SMAD 家族成员中十分重要, 是 TGF- β 家族成员在细胞内传导的必经之路。细胞外的 BMPs 与细胞膜上的 BMPR 结合后导致受体激酶的激活, 活化的受体会磷酸化细胞内的 Smad1/5/8, 其与 Smad4 形成复合物后进入到细胞核内, 结合到 DNA 序列上, 从而调节下游成骨相关基因的转录^[13]。该实验结果显示, ICA 可能通过上调 MC3T3-E1 细胞 BMP-2 蛋白的表达, 激活 BMP-2/Smads 信号通路, 启动下

游成骨相关基因的表达, 从而促进了 MC3T3-E1 细胞的增殖、分化。

Noggin 是 BMP 的抑制剂, 能够竞争性与 BMPs 受体结合, 下调 BMPs 的活性。为了进一步研究 BMP-2/Smads 信号通路在 MC3T3-E1 细胞增殖、分化中的作用, 向细胞中加入 BMP 抑制剂 Noggin (100 ng/ml), 再次观察上述指标的变化。结果显示, 加入 Noggin 后, ICA 对 MC3T3-E1 细胞增殖活性及 ALP 活性的促进作用均受到明显抑制。同时 ICA 对 BMP-2/Smads 信号通路中 BMP-2、BMPR-2、Smad4 和 Smad1/5/8 等相关蛋白表达的促进作用明显下降。以上结果显示, 阻断 BMP-2/Smads 信号通路可抑制 ICA 对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化的促进作用, 表明该信号通路在 MC3T3-E1 细胞的增殖、分化中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Cao H, Ke Y, Zhang Y, et al. Icaritin stimulates MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation through up-regulation of bone morphogenetic protein-2 [J]. Int J Mol Med, 2012, 29(3): 435-9.
- [2] Cao H, Zhang Y, Qian W, et al. Effect of icaritin on fracture healing in an ovariectomized rat model of osteoporosis [J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5): 2399-404.
- [3] Li C, Li Q, Mei Q, et al. Pharmacological effects and pharmacokinetic properties of icaritin, the major bioactive component in Herba Epimedii [J]. Life Sci, 2015, 126: 57-68.
- [4] 李祥雨, 姜劲挺, 李建国, 等. 骨质疏松症中药防治研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(2): 270-5.
- [5] Liu Y, Fu S, Bai Y, et al. Relationship between age, osteoporosis and coronary artery calcification detected by high-definition

- computerized tomography in Chinese elderly men[J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2018, 79: 8–12.
- [6] Ma S, Goh E L, Jin A, et al. Long-term effects of bisphosphonate therapy: perforations, microcracks and mechanical properties[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43399.
- [7] Azam S, Lange T, Huynh S, et al. Hormone replacement therapy, mammographic density, and breast cancer risk: a cohort study[J]. *Cancer Causes Control*, 2018, 29(6): 495–505.
- [8] Ma X N, Zhou J, Ge B F, et al. Icarin induces osteoblast differentiation and mineralization without dexamethasone *in vitro* [J]. *Planta Med*, 2013, 79(16): 1501–8.
- [9] Song L, Zhao J, Zhang X, et al. Icarin induces osteoblast proliferation, differentiation and mineralization through estrogen receptor-mediated ERK and JNK signal activation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 714(1–3): 15–22.
- [10] Witkowska-Sedek E, Stelmazczyk-Emmel A, Majcher A, et al. The relationship between alkaline phosphatase and bone alkaline phosphatase activity and the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis and vitamin D status in children with growth hormone deficiency[J]. *Acta Biochim Pol*, 2018, 65(2): 269–75.
- [11] Li Y, Hu W, Han G, et al. Involvement of bone morphogenetic protein-related pathways in the effect of aucubin on the promotion of osteoblast differentiation in MG63 cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 283: 51–8.
- [12] Egashira K, Sumita Y, Zhong W, et al. Bone marrow concentrate promotes bone regeneration with a suboptimal-dose of rhBMP-2[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e191099.
- [13] Antebi Y E, Linton J M, Klumpe H, et al. Combinatorial signal perception in the BMP pathway[J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1184–96.

Effects of icariin on proliferation and differentiation of MC3T3–E1 cells and its mechanism

An Qing^{1,2}, Liu Guoxiong¹, Bikash Kumar Sah¹, et al

¹*Dept of Orthopedic Surgery, People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine*

(People's Hospital of Shiyan City), Shiyan 442000;

²*Dept of Orthopedic Surgery, People's Hospital of Lixin County Lixin 236700]*

Abstract Objective To evaluate the role of icariin (ICA) in the proliferation and differentiation of MC3T3–E1 cells and to explore the effects of the BMP-2/Smads signal pathway on the proliferation and differentiation of the cells. **Methods** Icarin with different concentrations (0, 10, 20 and 40 ng/ml) was used to modify the pre-osteoblastic MC3T3–E1 cells for 48, 72 and 96 h, and the proliferation and morphology of the cells were evaluated by cell counting kit-8 (CCK-8) and microscopy, respectively. The levels of alkaline phosphatase (ALP) was evaluated by alkaline phosphatase assay kit. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), bone morphogenetic protein receptor-2 (BMPR-2), Smad4, Smad1/5/8 proteins expression levels were obtained by Western blot. After the BMP-2/Smads signal pathway was blocked by the BMP antagonist (Noggin) (100 ng/ml), the changes of the above indexes were detected again. **Results** In this study, we found that different concentrations of icariin have no effects on the morphology of MC3T3–E1 cells. CCK-8 assay showed that cell viability in the group with 10 and 20 ng/ml icariin was higher than those in the control group (ICA, 0 ng/ml). ALP assay showed that ALP viability in the groups with 10 and 20 ng/ml icariin was higher than those in the control group. Western blot analysis showed that expression levels of BMP-2, BMPR-2, Smad4 and Smad1/5/8 proteins in the 10 and 20 ng/ml icariin groups were higher than those in the control group. Blockage of BMP-2/Smads signaling inhibited the effect of icariin on the proliferation and differentiation. Furthermore, after the BMP-2/Smads signaling was blocked, icariin promoted expression levels of BMP-2, BMPR-2, Smad4 and Smad1/5/8 proteins as significantly decreased. **Conclusion** These results showed that icariin had no effect on the morphology of MC3T3–E1 cells. ICA may up-regulate the expression of BMP-2 protein in MC3T3–E1 precursor osteoblasts, activate BMP-2/Smads signaling pathway, and initiate the expression of downstream osteogenic related genes, thereby promoting cell proliferation and differentiation.

Key words icariin; MC3T3–E1 cells; BMP-2; Smads