

佛手柑内酯对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响

耿丹丹, 赵博, 王建华*

河北医科大学药学院 河北省实验动物重点实验室, 石家庄 050017

摘要:为研究佛手柑内酯对大鼠成骨细胞增殖、分化的影响。原代培养新生大鼠颅骨细胞,利用 MTT 法、微量酶标法、酶联免疫吸附法(ELISA)、qPCR 等方法分别测定不同浓度佛手柑内酯对大鼠成骨细胞增殖,碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(BGP)、I 型胶原 mRNA(Collagen I mRNA)表达的影响。结果显示,与对照组相比,佛手柑内酯作用于细胞 24、48、72 h 均对成骨细胞的增殖有促进作用($P < 0.05$);作用 48、72 h 均能促进 ALP、BGP、Collagen I mRNA 表达($P < 0.05$)。表明佛手柑内酯可促进大鼠成骨细胞的增殖和分化,为防治骨质疏松症的新药研究提供理论依据。

关键词:成骨细胞;增殖;分化;佛手柑内酯

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.9.019

Effects of Bergapten on Proliferation and Differentiation of Cultured Osteoblasts *in vitro*

GENG Dan-dan, ZHAO Bo, WANG Jian-hua*

Faculty of Pharmacy, Hebei Medical University; Hebei Key Lab of Laboratory Animal Science, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: To study the effects of bergapten (5-MOP) on proliferation and differentiation of cultured osteoblasts *in vitro*, MTT, microtitration assay, enzyme-linked immunosorbent method (ELISA) and qPCR were used separately to observe the proliferation, the activity of ALP and the content of osteocalcin and mRNA expression of collagen I of osteoblasts cultured *in vitro* with bergapten (5-MOP) of different concentrations in it for different incubation periods. The effect of promoting proliferation of rat osteoblasts cells *in vitro* after 24 h and 48 h and 72 h was more marked by the groups of bergapten (5-MOP) compared with the control group. The activity of alkaline phosphatase (ALP) and secretion of osteocalcin (BGP) and mRNA expression of collagen I were stimulated by bergapten (5-MOP) after 48 h and 72 h incubation. It was demonstrated that bergapten (5-MOP) had the effects on stimulating the proliferation and differentiation of cultured osteoblasts *in vitro*.

Key words: osteoblast; proliferation; differentiation; bergapten

骨质疏松症是老年人及绝经后妇女常见的一种慢性疾病,绝经后骨质疏松症为绝经后妇女好发的疾病,主要原因为雌激素减少,临床上用雌激素替代疗法(ERT)治疗虽疗效显著,但是,骨质疏松症为一种慢性的骨代谢性疾病,患者需长期服用药物治疗此病,雌激素副作用明显,长期服用会诱发子宫内膜癌、血管栓塞等疾病,本课题组一直致力于植物雌激素类化合物对骨质疏松作用的研究,通过体内和体外实验均证明植物雌激素类化合物可用于防治骨质

疏松症^[1,2]。佛手柑内酯,为香豆素类植物雌激素,存在于无花果、佛手、羌活等果实中,早在几十年前就被国外运用于皮肤病的治疗(如白癜风),近年来,有研究发现佛手柑内酯可在体外抑制肿瘤细胞,如研究发现,佛手柑内酯能破坏鼻咽癌细胞线粒体功能而诱导其凋亡^[3],此外对于其他肿瘤细胞的作用也先后被研究人员证明,如胃癌、肝癌、乳腺癌等^[4]。本实验拟研究其对大鼠成骨细胞增殖及分化的影响,为研制防治骨质疏松症药物提供理论依据。

收稿日期:2017-03-30 接受日期:2017-07-06

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2009001072);河北省科学技术研究与发展计划项目(河北省科技支撑计划项目 09276418D-14);河北省中医药管理局课题(2007116)

* 通信作者 Tel:86-311-86265628; E-mail:smith_Wang2000@126.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 系新生(24 h 内)乳鼠 6 只,清洁级(由河北

医科大学实验动物中心提供,合格证号:1611170)。

1.2 实验仪器

倒置显微镜(日本 Olympus 公司),BCD-236 型-20 °C 冰箱(海尔公司),SUNRISE TW 型酶标仪(奥地利 Tecan 公司),定量-PCR 仪(CFX96,博乐),PCR 扩增仪(奥地利)等。

1.3 实验主要试剂

佛手柑内酯(bergapten, 5-MOP, 5-Methoxypsoralen,成都曼思特生物科技有限公司,批号:484-20-8);胰蛋白酶、DMEM 培养基、Triton X-100(均为 Solarbio);胎牛血清购于四季青公司;II 型胶原酶(Sigma 公司);碱性磷酸酶试剂盒(南京建成试剂公司,批号:20161217)、BCA 蛋白测定试剂盒(Solarbio,批号:20150519);噻唑蓝(MTT, Sigma 公司);骨钙素酶联免疫定量试剂盒(上海西唐科技公司,批号 1610213);二甲基亚砜(DMSO,天津市大茂化学试剂厂);反转录试剂盒(北京艾德莱生物技术有限公司,批号:272236AH);Rezol(赛百盛公司);DEPC(碧云天生物技术研究所:R0021);SYBR Premix Ex Taq™ II (TakaRa Bio Company,批号:A9103-1)。

1.4 新生大鼠颅盖骨成骨细胞的分离培养

取新生 24 h 内 SD 大鼠 6 只,在无菌条件下取出其颅盖骨,用 PBS 冲洗,剔除多余组织,转移至盛有胰蛋白酶的培养皿消化 3 min 左右,骨片移至 0.1% 胶原酶 II 中,并将其剪成 1~3 mm 大小的骨粒室温消化 45 min 后,分散于 100 mL 的培养瓶中,加入 40% 胎牛血清的 DMEM 在 CO₂ 培养箱中培养 4~5 d,弃去骨粒,待细胞布满瓶壁,用 20% 胎牛血清的 DMEM 传代培养至第五代,分别给予佛手柑内酯处理细胞,测定成骨细胞的增殖与分化。

1.5 大鼠成骨细胞鉴定-碱性磷酸酶染色

将培养至第五代的细胞取一瓶,接种于有盖玻片的六孔板中,48 h 后待细胞贴壁铺满板底,按照试剂盒说明书,配制工作液,PBS 冲洗盖玻片 3 次,在 4% 戊二醛固定 10 min,三蒸水冲洗 3 次,于工作液 37 °C 染色 30 min,三蒸水洗 3 遍,用放有甘油明胶的载玻片制成装片,放于倒置显微镜下观察并成像。

1.6 细胞增殖实验

细胞传代至第五代时,在培养瓶中加入胰蛋白酶消化制备细胞悬液,在三块 96 孔培养板中每孔分别加入含 2×10^4 个细胞的细胞悬液,于 10% 血清的 DMEM 中培养至细胞融合 80% 时,将培养基吸弃,换加含不同浓度的佛手柑内酯(10^{-6} ~ 10^{-9} mol/L)无

血清培养基,分别培养 24、48、72 h。在相对应的时间内,取出 96 孔板,每孔加入 20 μ L 的 MTT 溶液,继续在 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中孵育 4 h 后,吸弃培养基,加入 150 μ L 的 DMSO 溶液,振荡使其充分混匀,放置 10 min 后,用酶标仪在 490 nm 波长下测定每孔吸光度。

1.7 细胞分化实验

1.7.1 收集标本

培养至第五代的细胞,吸弃培养基用 0.25% 胰蛋白酶消化成细胞悬液,用适量培养基稀释至终浓度,24 孔培养板中每孔 500 μ L 细胞悬液,常规培养至细胞 80% 融合,弃去培养基,按照空白、 10^{-8} mol/L5-MOP 组、 0.3×10^{-8} mol/L5-MOP 组、 10^{-9} mol/L5-MOP 组、 0.3×10^{-9} mol/L5-MOP 组加药处理,每组 8 个副孔,用含药无血清培养基分别培养 48、72 h,吸取相应时间培养板中的培养基用于骨钙素的测定。细胞用 PBS 冲洗数次,每孔加入 250 μ L 0.1% Triton \times 100,10 min 后,收集每孔细胞裂解液用于碱性磷酸酶的测定。碱性磷酸酶的测定采用微量酶标法试剂盒测定,蛋白含量用 BCA 法测定。

1.7.2 碱性磷酸酶的测定和计算

根据碱性磷酸酶测定试剂盒(微量酶标法)说明进行测定,用蛋白含量校正,碱性磷酸酶含量用金氏单位/克蛋白表示。

1.7.3 骨钙素的测定

按照骨钙素酶联免疫吸附法试剂盒说明进行测定,结果以 ng/mL 表示。

1.7.4 qPCR 测定成骨细胞中 Collagen I mRNA 的表达

直接在培养板中加入 TRNzol 裂解细胞,每孔加入 1 mL TRNzol,静置 10 min,用取样器反复吹打几次移入 1.5 mL 离心管中;每使用 1 mL TRNzol 加入 0.2 mL 氯仿,盖好管盖,上下剧烈震荡 50 次;4 °C 12000 rpm 离心 15 min,取上层水相(约 600 μ L)转移到无 RNA 酶的离心管中,在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇,混匀,冰上静置 25 min,4 °C 12000 rpm 离心 10 min,去上清,离心后在管侧和管底形成胶状沉淀;加入 1 mL 75% 乙醇(DEPC 水处理过的水配制)洗涤沉淀;4 °C 5000 rpm 离心 3 min,倒出液体;室温放置晾干(2~3 min),加入 30 μ L RNase-free ddH₂O,反复吹打至 RNA 溶解。将其反转录成 cDNA 后,按照 Real Time-PCR 体系反应,进行定量。所用引物为, I 型胶原 Primer1: 5-AGCAGACGG-

GAGTTTCACCTC-3 Primer2: 5-TGTCTTCTTGGC-CAIGCGTCA-3', 扩增产物为 193bp;

β -actin Primer3 :5'-GAGACCTTCAAGACCCCAGCC-3' Primer4:5'-TCGGGGCAICGGAACCGCTCA-3' 扩增产物为 443bp。

1.8 统计学分析方法

采用 SPSS21.0 统计软件分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间进行单因素方差分析 (ANOVA), 两

两比较, 方差齐时采用 Dunnett' t 检验, 方差不齐的采用 Tamhane's T2 检验。

2 实验结果

2.1 细胞碱性磷酸酶染色

碱性磷酸酶染色时, 细胞上呈大面积紫色, 证明细胞中有大量的碱性磷酸酶, 从而证实此细胞为大鼠成骨细胞 (见图 1)。

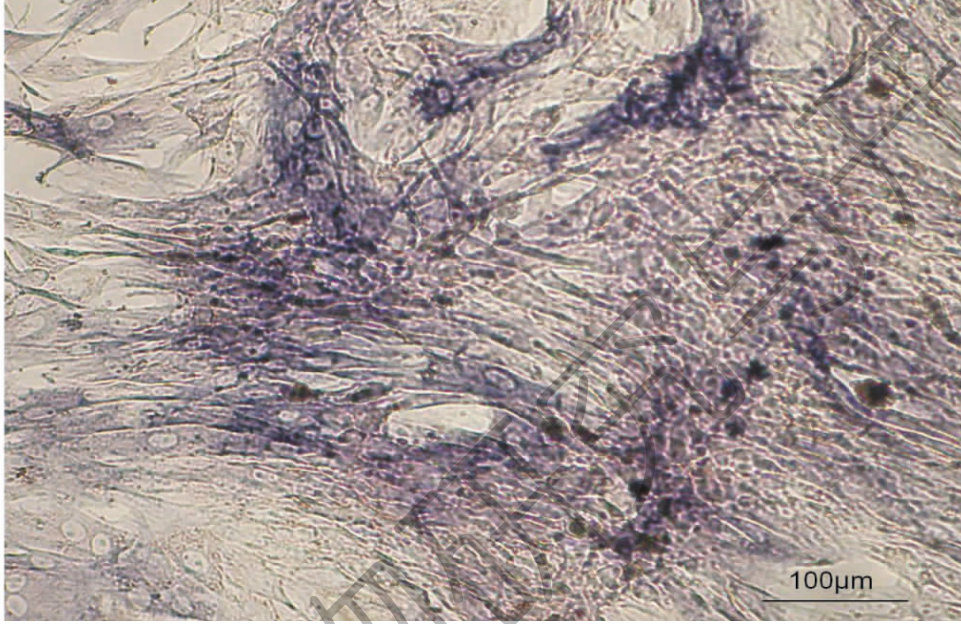


图 1 碱性磷酸酶染色成像图 (400 ×)

Fig. 1 Alkaline phosphatase staining (400 ×)

2.2 MTT 法测定佛手柑内酯对大鼠成骨细胞增殖的影响

与对照组比较, 不同浓度佛手柑内酯作用于成骨细胞 24、48、72 h 后, 均表现为佛手柑内酯浓度为 1.0×10^{-9} mol/L 时, 可促进成骨细胞的增殖 ($P < 0.05$), 其中 48 h 时促增殖作用最为显著 ($P < 0.001$) (见表 1)。

2.3 佛手柑内酯对大鼠成骨细胞分化的影响

2.3.1 佛手柑内酯对大鼠成骨细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活性的影响

与对照组比较, 不同浓度的佛手柑内酯作用于细胞 48 h 后, 0.3×10^{-8} mol/L, 1.0×10^{-9} mol/L 和 0.3×10^{-9} mol/L 浓度的佛手柑内酯对成骨细胞 ALP 的活性均有显著的增强作用 ($P < 0.001$), 作用 72 h 后, 1.0×10^{-9} mol/L 和 0.3×10^{-9} mol/L 浓度的佛手柑内酯均增强了 ALP 的活性, 且增强作用很明显 ($P < 0.001$) (见表 2)。

2.3.2 酶联免疫吸附法测定佛手柑内酯对大鼠成骨细胞骨钙素表达的影响

与对照组相比, 不同浓度的佛手柑内酯作用于细胞 48 h 后, 0.3×10^{-9} mol/L、 0.3×10^{-8} mol/L 浓度的佛手柑内酯可明显的促进成骨细胞骨钙素分泌, 表 1 佛手柑内酯作用 24、48、72 h 对大鼠成骨细胞增殖的影响 (吸光度, 均数 \pm 标准差, $n = 8$)

Table 1 Effect of bergapten on the proliferation of osteoblast in 24 h, 48 h and 72 h (OD, mean \pm SD, $n = 8$)

Concentration (mol/L)	Period of incubation (h)		
	24 h	48 h	72 h
0×10^0	0.250 \pm 0.160	0.219 \pm 0.016	0.220 \pm 0.005
1×10^{-6}	0.253 \pm 0.029	0.205 \pm 0.014	0.194 \pm 0.013
1×10^{-7}	0.228 \pm 0.023	0.186 \pm 0.009	0.191 \pm 0.013
1×10^{-8}	0.241 \pm 0.021	0.204 \pm 0.008	0.196 \pm 0.015
1×10^{-9}	0.276 \pm 0.008 *	0.258 \pm 0.009 * *	0.246 \pm 0.014 * *

注: 与空白组比较, * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$ 。

Note: compared with blank, * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$.

表2 佛手柑内酯作用 48 和 72 h 对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响 (金氏单位/克蛋白, 均数 ± 标准差, $n = 8$)

Table 2 Effect of bergapten on the ALP activity of osteoblast in 48 h and 72 h (King/gprot, mean ± SD, $n = 8$)

Concentration (mol/L)	Period of incubation (h)	
	48 h	72 h
0×10^0	2.200 ± 0.352	2.131 ± 0.242
1×10^{-8}	1.251 ± 0.431	1.691 ± 0.311
0.3×10^{-8}	4.771 ± 0.541 ***	1.953 ± 0.352
1×10^{-9}	4.606 ± 0.524 ***	4.758 ± 0.584 ***
0.3×10^{-9}	5.380 ± 0.796 ***	5.035 ± 0.761 ***

注:与空白组比较, *** $P < 0.001$ 。

Note: compared with blank, *** $P < 0.001$.

0.3×10^{-8} mol/L 组最为显著 ($P < 0.001$); 而给药处理 72 h 后, 1.0×10^{-8} mol/L 的佛手柑内酯对成骨细胞骨钙素的分泌有明显的促进作用 ($P < 0.001$) (见表 3)。

2.3.3 qPCR 测定佛手柑内酯对大鼠成骨细胞 collagen I mRNA 表达的影响

与对照组比较, 不同浓度的佛手柑内酯分别作用于大鼠成骨细胞 48 h、72 h 后, 由统计结果看出, 48 h 时, 0.3×10^{-8} mol/L 的佛手柑内酯对 collagen I mRNA 表达有明显的促进作用 ($P < 0.001$); 72 h 时, 0.3×10^{-9} mol/L 的对 collagenase I mRNA 表达有明显的促进作用 ($P < 0.001$) (见表 4)。

表3 佛手柑内酯作用 48 h 和 72 h 对成骨细胞骨钙素表达的影响 (ng/mL, 均数 ± 标准差, $n = 8$)

Table 3 Effect of bergapten on the BGP level of osteoblast in 48 h and 72 h (ng/mL, mean ± SD, $n = 8$)

Concentration (mol/L)	Period of incubation (h)	
	48 h	72 h
0×10^0	3.958 ± 0.939	5.789 ± 1.424
1×10^{-8}	3.331 ± 0.758	7.726 ± 0.321 ***
0.3×10^{-8}	5.964 ± 1.008 ***	3.695 ± 0.796
1×10^{-9}	4.104 ± 0.476	4.636 ± 0.687
0.3×10^{-9}	5.590 ± 0.999 **	3.044 ± 0.691

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: compared with blank, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3 讨论与结论

对于绝经后妇女骨质疏松患者, 应用雌激素治疗无疑是很好的药物, 但是, 临床发现, 长期使用雌激素类药物会增加患者罹患乳腺癌、血管栓塞等疾病的风险^[5], 且此类药物价格相对比较昂贵, 因此研制有效且符合大众消费水平的防治骨质疏松的药

表4 佛手柑内酯作用 48 和 72 h 对成骨细胞 I 型胶原 mRNA 表达的影响 (均数 ± 标准差, $n = 4$)

Table 4 Effect of Bergapten on the collagen I mRNA level of osteoblast in 48 h and 72 h (mean ± SD, $n = 4$)

Concentration (mol/L)	Period of incubation (h)	
	48 h	72 h
0×10^0	1.015 ± 0.199	0.789 ± 0.616
1×10^{-8}	1.041 ± 0.251	1.217 ± 0.816
0.3×10^{-8}	4.535 ± 0.756 ***	0.298 ± 0.215
1×10^{-9}	1.414 ± 0.352	0.542 ± 0.581
0.3×10^{-9}	1.179 ± 0.308	5.465 ± 1.366 ***

注:与空白组比较, *** $P < 0.001$ 。

Note: compared with blank, *** $P < 0.001$.

物有积极意义。

中医认为“肾藏精, 主骨, 骨生髓”^[6], 传统中药用于骨折和骨关节病的治疗已有千百年历史, 许多具有补肾活性的中草药也应用于骨质疏松的治疗, 近年, 如 Wang C 等人通过体外细胞实验研究发现葛根素对成骨细胞的增殖, 分化, 矿化有影响, 大剂量的葛根素可抑制骨形成, 小剂量的葛根素促进骨形成^[7]; 也有研究发现槲皮素和芦丁促进小鼠骨髓间充质干细胞分化^[8]; 贾玉民等人通过去卵巢大鼠模型的体内实验发现, 补肾健骨方对骨质疏松有防治作用, 其机制可能是通过促进成骨细胞增殖与分化, 抑制其凋亡^[9]。

佛手柑内酯, 又名 5-甲氧补骨脂素, 存在于无花果, 佛手, 羌活等果实中。碱性磷酸酶 (ALP), 是成骨细胞分化的早期标志物, 骨的形成依赖于碱性磷酸酶的合成及分泌, 它能分解有机磷酸, 释放无机磷而增加无机磷酸盐的形成促进骨矿化。骨钙素 (BGP), 即骨 Gla 蛋白, 为骨组织最丰富的非胶原蛋白, 其生理功能与骨转换有关, 为成骨细胞分化的晚期标志物。I 型胶原在成骨细胞的增殖期、分化期、矿化期等均有表达, 为骨组织中的重要成分^[10]。本课题组王建华等人通过体外原代培养大鼠成骨细胞研究发现, 8-甲氧补骨脂素能提高成骨细胞内碱性磷酸酶的活性, 从而对成骨细胞有促分化作用^[11]; 上海中医药大学课题组研究人员也证实补骨脂素能促进成骨细胞的分化, 且是通过 BMP 信号转导通路实现的^[12]。而佛手柑内酯 (5-甲氧补骨脂素) 对大鼠成骨细胞的增殖与分化的研究未见报道, 本文通过体外细胞培养实验研究其对成骨细胞生物活性的影响。结果表明, 1.0×10^{-9} mol/L 的佛手柑内酯作

用于成骨细胞 24、48 和 72 h 时能促进大鼠成骨细胞的增殖;而且不同浓度的佛手柑内酯作用于细胞 48 h 后, 0.3×10^{-8} mol/L、 1.0×10^{-9} mol/L 以及 0.3×10^{-9} mol/L 的佛手柑内酯可以提高成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)的活性, 0.3×10^{-8} mol/L 及 0.3×10^{-9} mol/L 的佛手柑内酯可以促进骨钙素(BGP)的合成, 0.3×10^{-8} mol/L 佛手柑内酯可促进 I 型胶原 mRNA 的表达;72 h 后 0.3×10^{-9} mol/L 及 1.0×10^{-9} mol/L 的佛手柑内酯可以提高成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)的活性, 1.0×10^{-8} mol/L 的佛手柑内酯促进骨钙素(BGP)的合成, 0.3×10^{-9} mol/L 佛手柑内酯可促进 I 型胶原 mRNA 的表达,说明佛手柑内酯对大鼠成骨细胞的增殖和分化均有促进作用,为今后研制防治骨质疏松症药物提供了理论依据,但其具体的作用机制及作用靶点,有待进一步研究。

参考文献

- 1 Wang JH (王建华), Wang Y (王艳), Pan YM (潘永梅). Effects of psoralen on proliferation and differentiation of cultured osteoblasts *in vitro*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 844-846.
- 2 Wang JH (王建华), Xin X (辛欣), Zhan WH (詹文红). Effects of phytoestrogens on expression of TGF- β signal transduction protein Smad4 of osteoblasts. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22: 575-577.
- 3 Lin BH (林碧华), Ma XJ (马晓娟), Wan SW (万树伟), *et al*. Bergapten induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res Prev Treat* (肿瘤防治研究), 2014, 41: 1163-1170.
- 4 Wang ZG (王志国), He D (何德), Jin H (金洪), *et al*. The

- research progress of the anticancer effect of Fig. *Progr Mod Biomed* (现代生物医学进展), 2010, 10: 2183-2186.
- 5 Liu JL (刘建立). Prevention of postmenopausal osteoporosis with HRT or ERT. *Intern J Endocrinol Metab* (国际内分泌代谢), 2006, 26: 230-232.
- 6 Zhuang AS (庄岸山), Zhan YW (詹雅薇), Lin YK (林勇凯), *et al*. Research progress of traditional Chinese medicine treatment of primary osteoporosis. *J Liaoning Univ TCM* (辽宁中医药大学学报), 2014, 16: 214-216.
- 7 Wang C, Meng MX, Tang XL, *et al*. The proliferation, differentiation, and mineralization effects of puerarin on osteoblasts *in vitro*. *Chin J Nat Med*, 2014, 12: 436-442.
- 8 Swati S, Rohini B, Partha R. Assessment of the role of flavonoids for inducing osteoblast differentiation in isolated mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Phyto-medicine*, 2013, 20: 683-690.
- 9 Jia YM (贾玉民), Xiang N (向南). Effects of Ejiabushen-jiangtu decoction on ovariec tomized osteoporosis model rats. *J Hubei Univ Chin Med* (湖北中医药大学学报), 2013, 15 (5): 8-11.
- 10 Wang HB (王海滨), He W (何伟), Yuan H (袁浩). Osteoblast and Collagenase I. *Chin J Tradit Med Traum Orthop* (中医骨伤科杂志), 2003, 11(3): 56-59.
- 11 Wang JH (王建华), Zhang HL (张红莲), Zhang JF (张军芳), *et al*. Effects of 8-methoxypsoralen on proliferation and differentiation of cultured osteoblasts *in vitro*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23: 927-930.
- 12 Tang D, Wei H, Quan Z, *et al*. Psoralen stimulates osteoblast differentiation through activation of BMP signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405: 256-261.

(上接第 1469 页)

- 3 Liu B, Ji SJ. Facile synthesis of 2-amino-1,4-naphthoquinones catalyzed by molecular iodine under ultrasonic irradiation. *Synthetic Communications*, 2008, 38: 1201-1211.
- 4 Li YJ (李郁锦), Yang JR (杨建荣), Gao JR (高建荣). The oxidative addition reaction of amino acid esters and 1,4-naphthalene quinone by iodine catalysis. *J Zhejiang Univ*

- Technol* (浙江工业大学学报), 2013, 41(1): 21-24.
- 5 Zeng ZX (曾昭贤), Bao DY (包定元), Xiao Y (肖逸), *et al*. A study of acute toxicity of mitoxantrone. *J West China Univ Med Sci* (华西医科大学学报), 1989, 20: 303-306.
- 6 Collins PM, Ferrier RJ, Berlin W. Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products. New York: Wiley Chichester, 1995.