杜仲提取组分对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞的影响*

阳之韵[1]，兰 波[2]，刘 亭[3]，李勇军[3]，陈 孝[4]**
(1. 中山大学 药学院，广东 广州 510080；2. 贵州省人民医院，贵州 贵阳 550002；3. 贵州医科大学 药物制剂重点实验室，贵州 贵阳 550004；4. 中山大学附属第一医院，广东 广州 510080)

[摘 要] **目的**：研究杜仲中各成分对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞增殖、成骨细胞保护素(DPG)与核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL)比值的影响。**方法**：对杜仲皮进行组分提取，得到 A 组分(水洗脱液)、b 组分(20% 乙醇洗脱液)和 C 组分(40% 乙醇洗脱液)；对照组 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞加入 DMEM/F-2 培养基(Hyclon)培养，给药组分别加入浓度为 200、100、50、25 和 12.5 mg/L 含 A、B、C 组分的培养基培养；采用 MTT 法检测 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞增殖情况；ELISA 法检测 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞 OPG 及 RANKL 活性，紫外分光光度法检测 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性。**结果**：与对照组比较，给药 24 h 后，100 和 200 mg/L C 组分给药组的 OD 值明显增高($P<0.05$)；与对照组比较，给药 48 h 后，200 mg/LC 组 ALP 的活性以及 OPG 与 RANKL 比值明显增高，差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论**：杜仲 40% 乙醇提取组分能明显上调 OPG 与 RANKL 比值，并能促进 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞的增殖。

[关键词] 杜仲；成骨细胞；骨保护素；碱性磷酸酶
[中图分类号] R284.3；R329.2 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)05-0553-04
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.05.013

Influence of Eucommia Extracts on MC3T3-E1 Subclone 14 Osteoblast

YANG Zhiyun[1], LAN Bo[2], LING Ting[3], LI Yongjun[3], CHEN Xiao[4]
(*1. School of Pharmacy, Zhongshan University, Guangzhou 510080, Guangdong, China; 2. Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China; 3. Key Laboratory of Pharmaceutical Preparations, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. the First Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510080, Guangdong, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To screen effective components of Eucommia ulmoides for studying their effents on the proliferation of osteoblasts and ratio of OPG/RANKL in MC3T3-E1 Subclone 14 osteoblasts. **Methods**: Extracting component of Eucommia, and dividing into A group(water washing liquid), B group (20% ethanol washing liquid) and C group (40% ethanol washing liquid); control group MC3T3-E1 Subclone 14 osteoblasts was added with DMEM/F-2 culture medium(Hyclon), other groups were added with A,B,C components at the concentration of 200, 100, 50, 25 and 12.5 mg/L; MTT detection method to detect cell proliferation; the activity of OPG and RANKL are detected by ELISA; UV spectrophotometry was adopted to detect the ALP activity of MC3T3-E1 Subclone 14 osteoblasts. **Results**: Comparing with control group, 24 hr after medication, OD value of 100 and 200 mg/L C group significantly increased($P<0.05$); comparing with control group, 48 hr after medication, ALP activity and OPG/RANKL ratio of 200 mg/L C group significantly increased, differences were statistically significant($P<0.05$). **Conclusion**: 40% ethanol Eucommia ulmoides Oliv extract can up

*[基金项目]贵州省科技重大专项[黔科合重大专项字(2012)6009 号]；贵州省中药现代化专项项目[黔科合中药字(2013)5062 号]
**通信作者 E-mail：474220755@qq.com
网络出版时间：2017－5－18 网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170518.2227.025.html

regulate the OPG/RANKL ratio, and enhance osteoblast proliferation.

[**Key words**] *Eucommia ulmoides Oliv*; osteoblasts; osteoprote-gerin; alkaline phosphatase

杜仲(*Eucommia ulmoides Oliv.*)是杜仲科植物杜仲的干燥树皮,外表面淡棕色或灰褐色,内表面暗紫色,是我国名贵的中药材[1]。研究发现,杜仲中含有木质素类、黄酮类、环烯醚萜类、本丙素类和氨基酸类等化学成分,具有补肝肾、抗衰老、增强骨密度、治疗骨质疏松和头晕目眩等药理作用[2]。骨质疏松是一种以低骨量和骨组织微结构改变为特征,导致人体骨脆性升高并伴有全身性骨量流失的代谢性疾病,常见于老年人和绝经妇女,已成为当今社会亟待解决的医疗问题之一[3-5]。造成骨质疏松症的原因是骨吸收与骨形成的平衡被打破,导致无法维持正常骨量。在人的生命过程中,人体骨组织在不断的进行骨重建以维持正常的骨量及修复受伤骨组织,而在骨重建的过程中成骨细胞骨保护素(osteoprote-gerin,OPG)核因子 kB 受体活化因子配体(ligandof receptor activator of nf-KB,RANKL)是维持骨重建动态平衡的重要系统,该系统可抑制破骨细胞的生成。本实验通过杜仲不同组分作用于 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞后,观察 RANKL 与 OPG 的变化,为进一步研究杜仲治疗骨质疏松提供实验基础。

1　材料方法

1.1　材料

MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞(订购于中科院上海细胞库),杜仲提取物(实验室制备)、DMEM/F-2 培养基(Hyclon)、FBS 胎牛血清(Gibco)、胰蛋白酶(Hyclon)、MTT 溶液、碱性磷酸酶测试盒(南京建成生物工程研究所)、Mouse Osteoprotegerin(OPG)ELISA Kit(上海蓝基生物科技有限公司)、Mouse Receptor activator of Nuclear Factor kB Ligand(RANKL)ELISA KitRANKL 试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司)、无水乙醇(分析纯,成都科龙化工试剂长)。杜仲皮由贵州医科大学龙庆德副教授鉴定为杜仲科植物杜仲(*Eucommia ulmoides Oliv.*)的干燥树皮,大孔树枝由天津海光化工提供。

1.2　方法

1.2.1　杜仲成分提取　杜仲皮剪碎,用 70% 的乙醇浸泡 8 h(料液比 1∶10)后煎煮提取 2 次,每次煎煮 2 h,抽滤并合并滤液,滤液浓缩至 1 kg/L 后上大孔树脂柱,分别用水、20% 乙醇或 40% 乙醇洗脱,得到 A 组分(水洗脱液)、b 组分(20% 乙醇洗脱液)和 C 组分(40% 乙醇洗脱液),以上 3 个组分均浓缩至膏状备用。称取 A、B、C 组分浸膏分别溶解于 DMSO 溶液,终浓度为 200 g/L,储存备用。

1.2.2　分组与细胞增殖检测　MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞按 5×10^3 个/mL 密度接种于 96 孔板,培养箱培养 24 h 后,弃去培养液,对照组加入培养基,给药组分别加入浓度为 200、100、50、25 和 12.5 mg/L 含 A、B、C 组分的培养基,每个浓度设 6 个重孔,培养箱培养 24 h 后每孔加入2.5 g/L 的 MTT 溶液 10 μL,继续培养 4 h 后弃去培养液。每孔加入 DMSO 溶液 100 μL 后,于酶联免疫检测仪 490nm 波长处检测对照组以及给药组各孔的荧光值吸光度值。

1.2.3　碱性磷酸酶(ALP)检测　按 ALP 测试盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行 ALP 检测,所得结果用 OD 值表示。

1.2.4　骨保护素(OPG)检测　MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞按 5×10^3 个/mL 密度接种于 24 孔板,培养箱培养 24 h 后,弃去培养液,对照组加入培养基,给药组加入浓度为 200、100、50 和 25 mg/L的含组分 C 的培养基,培养 24 h 弃去培养液后用胰酶消化离心取细胞沉淀。用 PBS 缓冲液清洗 3 遍后用少量 PBS 缓冲液重悬细胞,采用反复冻融法裂解细胞膜,5 000 r/min离心 15 min 取上清,-20 ℃或 -80 ℃分装保存备用。按 Mouse Receptor OPG Elisa Kit 试剂盒说明书进行 OPG 活性检测,结果用 OD 值表示。

1.2.5　RANKL 检测　用分装完毕已裂解的样品,按 Mouse Receptor activator of Nuclear Factor kB Ligand(RANKL)Elisa KitMouse Receptor OPG Elisa Kit 试剂盒说明书进行 RANKL 活性的检测,结果用 OD 值表示。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　细胞增殖检测

给药 24 h 后,50、100 和 200 mg/L C 组分给药组均能促进 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞的增殖,其中 100 和 200 mg/L C 组分给药组的 OD 值

明显增高,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),提示杜仲提取物 C 组分对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞具有促进增殖的作用。见图 1 和图 2。

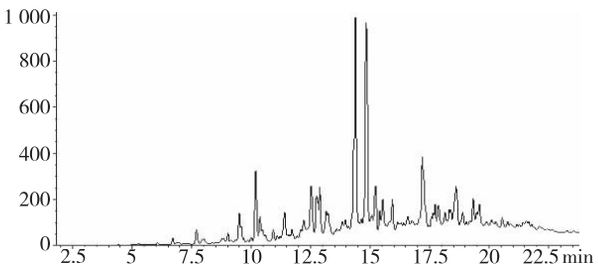
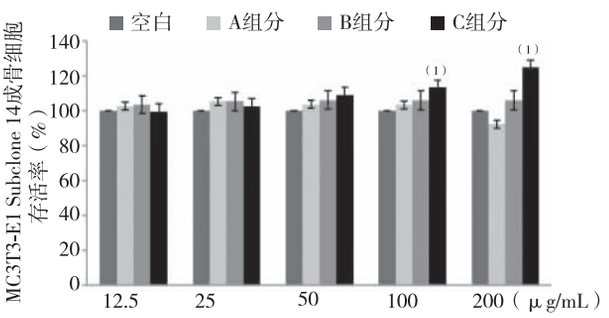


图 1　杜仲提取物 C 组分高效液相色谱结果

Fig. 1　HPLC chromatogram of C extract of Eucommia ulmoides component



(1) 与对照组相比,$P<0.05$

图 2　不同浓度的 A、B、C 组分对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞的增殖影响

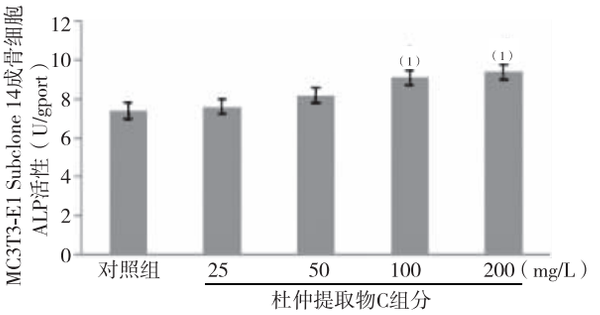
Fig. 2　Effect of A, B, C components with different concentration on proliferation of MC3T3-E1 Subclone 14 osteoblast

2.2　ALP 检测

给药 48 h 后,100、200 mg/L C 组分给药组能促进 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞的 ALP 分泌,且 200 mg/L 组 ALP 的活性与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

2.3　OPG/RANKL 比值

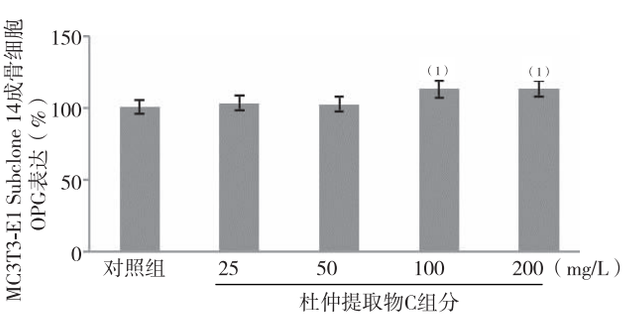
OPG 检测显示,给药 48 h 后,与对照组比较,100、200 mg/L C 组分给药组对 OPG 的促进明显,差异具有统计学意义($P<0.05$)。RANKL 检测给药 48 h 后,200 mg/L C 组分给药组 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞的 RANKL 水平明显低于对照组($P<0.05$),表明 C 组分对 RANKL 具有抑制作用;给药 48 h 后,200 mg/L C 组分给药组 OPG/RANKL 比值高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 4 ~ 图 6。



(1) 与对照组相比,$P<0.05$

图 3　不同浓度杜仲提取液 C 组分作用 48 h 后对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞 ALP 活性影响

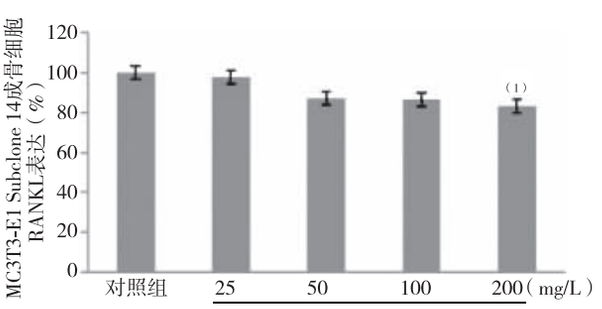
Fig. 3　Effect of different concentrations of C component on ALP activity of MC3T3-E1 Subclone 14 osteoblast after treated for 48 hours



(1) 与对照组相比,$P<0.05$

图 4　不同浓度 C 组分作用 48 h 后 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞 OPG 表达的影响

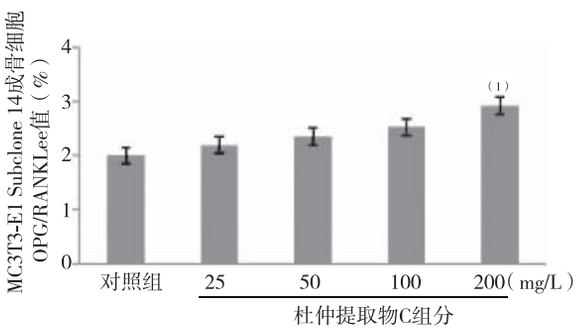
Fig. 4　Effect of different concentrations of C component on expression of OPG in MC3T3-E1 Subclone 14 osteoblasts after treated for 48 hours



(1) 与对照组相比,$P<0.05$

图 5　不同浓度 C 组分对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞 RANKL 表达的影响

Fig. 5　Effect of different concentrations of C component on expression of RANKL in MC3T3-E1 Subclone 14 osteoblasts after treated for 48 hours



(1)与对照组相比，$P<0.05$

图 6　不同浓度杜仲提取液 C 组分作用 48 h 后对 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞 OPG/RANKL 比值的影响

Fig. 6　Effect of different concentrations of C component on OPG/RANKL in MC3T3-E1 Subclone 14 osteoblasts after treated for 48 hours

3　讨论

骨质疏松症是骨吸收与骨形成平衡失调导致的骨量低下，以及骨组织结构异常的代谢性骨病[6]。OPG、RANK、RANKL 是近年来发现的用来调节骨吸收与骨形成以及成骨细胞与破骨细胞平衡的重要因子。RANKL 是影响骨吸收的关键因子，RANKL 的作用途径是通过与破骨细胞前体上的 RANK 相结合，激活 CN/NFAT，PKB 等通路，PKB 等通路可激活细胞生存从而抑制破骨细胞前体分化为成熟的破骨细胞。OPG 的作用是抑制骨吸收，其常高表达于成骨细胞。成骨细胞通过分泌 OPG 来和 RANKL 竞争性与 RANK 相结合，通过抑制 CN/NFAT 通路的激活并减少破骨细胞的生成来抑制骨吸收的过程。OPG、RANKL 的比值是决定人体骨量的关键，如果比值下降失衡，则会引起许多骨质的骨代谢的疾病[7-10]。而当 OPG 与 RANKL 比值上调即能降低破骨细胞的分化成熟，从而改善骨重建来达到治疗骨质疏松的目的。杜仲为贵州地产中药，亦是我国常用辅助抗骨质疏松的中药。大量的研究表明杜仲有效成分中的黄酮类和木质素类能治疗和改善骨质疏松具有疗效[11]。近年来，体内外实验均证明了杜仲对骨质疏松症具有明显的改善效果。

本实验结果显示，采用不同浓度的杜仲提取物 C 组分作用于 MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞，发现杜仲提取物 C 组分能促进细胞的增殖与分化，在高浓度时效果显著。本实验还进一步证明，C 组分在促进 OPG 分泌的同时还能抑制 RANKL 的表达，C 组分给药浓度为 200 mg/L 时，MC3T3-E1 Subclone 14 成骨细胞 OPG/RANKL 的比值明显增高，提示杜仲提取物 C 组分可以通过提高成骨细胞 OPG 分泌，同时也能降低 RANKL 的表达，从而抑制破骨细胞的成熟分化，达到治疗和改善骨质疏松的作用。但是杜仲提取物 C 组分中是何种化合物起到促进 OPG 分泌以及降低 RANKL 表达的还未知，仍需后续研究证实。

4　参考文献

[1] 中国药典[S]. 一部, 2015:165.
[2] 李锟,郝志友,张翠利,等. 杜仲化学成分研究[J]. 中药材, 2016(9):2016-2018.
[3] 陶怡,沈涛,马晖. 熟地黄及其不同配伍药对治疗糖尿病大鼠骨质疏松的药效比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012(8):249-251.
[4] Yen ML,Hsu PN,Liao HJ,et a1. TRAF-6 dependent signaling pathway is essential for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces osteoclast differentiation[J]. PLoS One, 2012(6):e38048.
[5] Baron R,Hesse E. Update on bone anabolics in osteoporosistreatment:rationale,current status and perspectives[J]. J Clio Endoerinol Metab, 2012(2):311-325.
[6] 陈赛楠, 廖乃顺, 陈文列,等. OPG/RANKL/RANK 系统在调控骨性关节炎软骨下骨骨重建中的作用[J]. 2013(4):214-216.
[7] 仲蕾蕾, 杨冰, 黄晓斌. 等. OPG/RANKL/RANK 系统在成骨细胞核和破骨细胞相互调节中的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2011(11):1011-1016.
[8] 杨雷,郭岱琦,柳海峰,等. 阿魏酸对大鼠成骨细胞增殖、碱性磷酸酶活性及骨保护素与骨活素 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2016(4):428-430.
[9] Motton S,Houvenaeghel G. Results of surgery after concurrent chemoradiotherapy in advanced cervical cancer:comparison of extended hysterectomy and extrafascial hysterectomj[J]. Int J Gynecol Cancer, 2010(2):268.
[10] Hosoo S, Koyama M, Kato M. The restorative effects of eucommia ulmoides oliver leaf extract on vascular function in spontaneously hypertensive rats[J]. Molecules, 2015(12):21971-21981.
[11] He X, Wang J, Li M. Eucommia ulmoides ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2014(1):78-92.

(2017-02-08 收稿,2017-03-26 修回)
中文编辑：文箐颖；英文编辑：赵　毅