

[参考文献]

- [1] Li Qiong, Shu Yi-qiong, Lai Hui-hong, et al. Clinical Observation on Zhengnan Xifeng Decoction in Treating Peri-Menopausal Syndrome [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2003, 9(1): 63-66.
- [2] 张勤, 李力, 谭雯文, 等. 股骨颈上部区域与腰椎及双侧股骨上端骨密度的相关性研究[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(20): 3695-3697.
- [3] Qian LQ, Wang B, Niu JY, et al. Assessment of the Clinical Effect of Chinese Medicine Therapy Combined with Psychological Intervention for Treatment of Patients of Peri-menopausal Syndrome Complicated with Hyperlipidemia [J]. Chin J Integr Med, 2010, 16(2): 124-130.
- [4] He Jin-sen, Liao Jian-qin, An Xiao-ying, et al. Clinical Efficacy Analysis on Treatment of Peri-menopausal Syndrome with Electroacupuncture [J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2006, 4(2): 108-111.
- [5] 关素珍, 尹金鹏, 潘妍, 等. 归芍地黄汤合生脉散治疗围绝经期综合征临床研究[J]. 中药材, 2015, 38(1): 206-208.
- [6] 徐丹, 郑洁莉, 谢波, 等. 复方左归胶囊治疗围绝经期综合征 160 例疗效观察[J]. 中医临床研究, 2014, 6(19): 7-9.
- [7] 赵杰. 中药治疗围绝经期综合征的临床效果及缓解情况分析[J]. 中国医药指南, 2016, 14(5): 206.
- [8] 魏珍珍, 苗明三. 补肾阳中药治疗围绝经期综合征特点分析[J]. 中医学报, 2013, 28(11): 1688-1691.
- [9] 杨敏, 李灿东, 李红, 等. 围绝经期综合征中医证素与性激素水平的相关研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 2: 366-368.
- [10] 严炜. 女性围绝经期综合征中医证型与性激素关系的研究[J]. 福建中医学院学报, 2004, 14(3): 1-4.
- [11] 李亚珍, 杨欣. 性激素对骨细胞功能的调节[J]. 中国妇产科临床杂志, 2006, 7(4): 313-314.
- [12] Gao QT, Choi RC, Cheung AW, et al. Danggui Buxue Tang-A Chinese herbal decoction activates the phosphorylations of extracellular signal-regulated kinase and estrogen receptor alpha in cultured MCF-7 cells [J]. FEBS Lett, 2007, 581(2): 233-240.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)

葛根素对成骨细胞增殖、分化及 I 型胶原 mRNA 表达的影响

王晓晖, 罗向霞, 史晓伟, 张定华

甘肃省中医院内分泌科, 甘肃 兰州 730050

[摘要] 目的: 探讨葛根素 (Pue) 对高糖培养的成骨细胞增殖、分化及 I 型胶原 mRNA (Coll mRNA) 表达的影响, 为临床治疗糖尿病骨质疏松症提供实验依据。方法: 取出生 24 h 内的 SD 大鼠的颅骨, 体外分离培养成骨细胞, 待细胞形态稳定后, 取对数生长期的成骨细胞, 随机分为正常组、高糖组 (葡萄糖浓度 22 mmol/L)、葛根素各浓度组 (葛根素浓度分别为 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L)、高糖加葛根素各浓度组, 每组设 8 个复孔, 分别培养 48 h, 隔天换液并加药。测定成骨细胞的增殖能力、细胞内 ALP 活性以及 Coll mRNA 表达情况。结果: 与正常组比较, 葛根素各浓度组细胞增殖、细胞 ALP 活性、细胞 Coll mRNA 表达均显著增高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 高糖组、高糖+葛根素各浓度组明显低于正常组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与高糖组比较, 高糖+葛根素各浓度组细胞增殖、细胞 ALP 活性、细胞 Coll mRNA 表达均显著增高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 高糖情况下抑制成骨细胞的增殖、分化和 I 型胶原表达, 但加入葛根素后能提高成骨细胞的增殖、分化和 I 型胶原表达, 说明葛根素对糖尿病骨质疏松症有治疗作用。

[关键词] 葛根素; 成骨细胞; 增殖; 分化; I 型胶原; 新生 SD 大鼠; 细胞实验

[中图分类号] R285 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2016) 11-0221-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.11.094

[收稿日期] 2016-06-12

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目 (1308RJZA136)

[作者简介] 王晓晖 (1970-), 女, 副主任医师, 研究方向: 内分泌及代谢性疾病。

Effect of Puerarin on Proliferation and Differentiation of Osteoblastic Cells and Expression of Type I Collagen mRNA

WANG Xiaohui, LUO Xiangxia, SHI Xiaowei, ZHANG Dinghua

Abstract: Objective: To discuss the effect of puerarin on proliferation and differentiation of osteoblastic cells cultured in high glucose and the expression of type I collagen mRNA, and provide experimental basis for the clinical treatment of diabetes and osteoporosis. Methods: Cranium of newborn SD rats within 24 hours was obtained, isolated and cultured in vitro until becoming osteoblasts cells. When the forms of cells became stable, osteoblasts cells in exponential growth period were selected and divided into normal glucose group, high glucose group (22 mmol/L glucose), the puerarin of different concentrations group (concentrations of puerarin being respectively 10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L) and high glucose combined with puerarin of different concentrations group. For each group, 8 parallel holes were designed and all groups were cultured for 48 hours, adding medicine to each group after medium change the next day. Measured the ability of proliferation of osteoblastic cells, activity of alkaline phosphate (ALP) in cells and expression of Coll I mRNA. Results: Comparing with normal glucose group, OD level, activity of ALP in cells as well as expression of Coll I mRNA of the puerarin of different concentrations group were increased obviously ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and those of high glucose group and high glucose combined with puerarin of different concentrations group were significantly lower than those of normal glucose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Comparing with high glucose group, OD level, activity of ALP in cells and expression of Coll I mRNA in cells of high glucose combined with puerarin of different concentrations group were all raised obviously, displaying significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion: Under the condition of high glucose, the proliferation and differentiation of osteoblastic cells and expression of type I collagen mRNA will be inhibited, but after adding with puerarin, the efficacy can be improved, which suggests that puerarin has therapeutic effect on diabetes and osteoporosis.

Keywords: Puerarin; Osteoblastic cells; Proliferation; Differentiation; Type I collagen; Newborn SD rats; Cell culture

目前全世界大约有2亿人患骨质疏松症,在继发性骨质疏松症中,内分泌性骨质疏松症是重要的类型^[1]。糖尿病性骨质疏松症(Diabetic osteoporosis, DOP)是指糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者并发骨量减少和骨组织的显微结构遭到破坏,骨脆性增加,容易发生骨折的一种全身代谢性病,是DM发生在骨骼系统的慢性并发症^[2],目前尚无有效治疗方案。研究发现,葛根中含有多种异黄酮成分,包括葛根素(Puerarin, Pue)、大豆苷和大豆黄酮等,这些成分有明显的降糖、降脂作用^[3],同时改善患者骨质代谢,对于骨质疏松有明显的防治作用。临床观察表明葛根素可明显减轻糖尿病骨质疏松症状^[4],但其治疗机制未明。为此,本研究拟通过培养成骨细胞,添加不同浓度葛根素,观察其对高糖环境下成骨细胞的增殖、分化及I型胶原mRNA表达的影响,研究其可能的作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 新生24h的SD大鼠10只(甘肃省中医药大学动物实验室提供,合格证编号:2014315)。

1.2 实验仪器 CO₂恒温培养箱(美国Thermo公司),超净工作台(中国杭州净化设备厂),GeneAmp全自动PCR仪(美国ABI公司),酶标仪(日本Bio-RAD Model 550),细胞培养瓶及培养板(美国Costar公司),紫外分光光度计(上海天美仪器

公司),CK-40型OLYMPUS倒置光相差显微镜(日本OLYMPUS公司)。

1.3 实验试剂 葛根素(中国药品生物制品检定所),MEM干粉培养基(GIBCO公司),小牛血清(杭州四季青公司),胰蛋白酶(上海华美公司),四甲基偶氮唑盐(美国Sigma公司),对硝基苯磷酸二钠盐(南京建成生物工程研究所),PCR引物(大连宝生物生物工程有限公司),逆转录聚合酶链反应试剂盒(大连宝生物生物工程有限公司两步法试剂盒DRR014A),RNA提取试剂盒RNAiso Reagent(大连宝生物生物工程有限公司两步法试剂盒D312)。

2 实验方法

2.1 成骨细胞的培养 取出生24h内的SD大鼠的颅骨,彻底剥离骨膜等软组织,置入含DMEM培养液的培养皿中,修剪成1~3mm³大小的骨片,加入胰酶在37℃环境下振荡消化2~3min,再加入等体积的含15%胎牛血清DMEM终止消化。吹打细胞,收集消化液,在4℃,1000r/min条件下离心10min使细胞沉淀。沉淀细胞放置于含15%胎牛血清DMEM培养基(含青霉素100U/mL、链霉素100μg/mL)的培养皿内,并以约 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养瓶中,37℃、5%CO₂培养箱内培养,每2~3天换液1次。

2.2 形态学观察 培养48h后将贴壁细胞用4%多聚甲醛固

定,然后PBS洗涤3次,常规HE染色,在显微镜下观察成骨细胞形态。同时按比例配制BCIP/NBT染色工作液,48孔板每孔加100 μL上述BCIP/NBT染色液,室温避光孵育5~30 min,直至显色至预期深浅,去除工作液,用蒸馏水洗涤终止显色。在倒置显微镜下,计数每孔成骨细胞样细胞数,并计数细胞ALP染色阳性率。

2.3 细胞的分组及给药 待细胞形态稳定后,取对数生长期的成骨细胞,每孔200 μL加入96孔细胞培养板中。随机分为正常组、高糖组(葡萄糖浓度22 mmol/L)、葛根素各浓度组(葛根素浓度分别为 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L)、高糖加葛根素各浓度组,每组设8个复孔,分别培养48 h,隔天换液并加药。

2.4 MTT法检测成骨细胞增殖能力 细胞传至第1代用0.25%的胰蛋白酶和0.02% EDTA消化计数后,用含10%小牛血清MEM培养基以 2×10^3 /孔密度接种于96孔板内,37℃,5% CO₂培养箱中培养,24 h后镜下观察细胞贴壁稳定后,去掉上清液进行细胞分组及给药72 h后,用MTT法分析细胞增殖情况,结果以酶联免疫检测仪在490 nm波长处读取酶活性测得OD值表示。

2.5 PNPP法检测成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性 细胞的培养及给药方法同2.4,给药结束后,用对硝基苯酚磷酸二钠(PNPP)法分析细胞内碱性磷酸酶活性情况,结果以酶标仪在405 nm波长处读取酶活性测得OD值表示。

2.6 RT-PCR方法检测成骨细胞型胶原mRNA(Coll mRNA)的表达 细胞传至第1代用0.25%的胰蛋白酶和0.02% EDTA消化计数后,用含10%小牛血清MEM培养基以 5×10^4 /孔密度以每瓶5 mL加入100 mL培养瓶,37℃,5% CO₂培养箱中培养,24 h后镜下观察细胞贴壁稳定后再培养10天,去掉上清液,加入Trizol试剂提取总RNA,37℃反转录反应15 min,85℃反转录酶的失活反应5 s,后4℃ 1 h,逆转录得到cDNA。用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测Coll mRNA的相对表达量。Coll mRNA的引物序列:上游引物TACAGCACGCTTGTGGATG,下游引物TTGGGATGGAGGGAGTTTA,片段大小为320 bp。内参基因GAPDH引物是:上游TGAACGGGAAGCTCACTGG,下游TCCACCACCTGTTGCTGTA,片段大小为200 bp。RT-PCR的反应条件为:94℃预变性10s;94℃变性5s,退火30s,共40循环;溶解曲线94℃60s,57.6℃30s,94℃30s,1个循环。经1.7%琼脂糖凝胶电泳分离。分离产物用YLN-2000凝胶成像分析系统分析吸光度,以GAPDH作内参,以目的基因吸光度比内参基因吸光度代表目的基因的相对含量。

2.7 统计学方法 采用SPSS 15.0统计软件进行数据的分析,定量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验。

3 结果

3.1 成骨细胞形态学观察及鉴定 见图1和图2。倒置显微

镜下观察,原代培养第3天的大鼠成骨细胞呈三角形、多边形、长梭形,胞浆丰富,胞核较圆,轮廓清晰。ALP定性染色对其进行鉴定,可见成骨细胞胞浆蓝染,呈阳性。

3.2 各组成骨细胞增殖结果比较 见表1。与正常组比较,葛根素各浓度组OD值均显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);高糖组、高糖+葛根素各浓度组明显低于正常组,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与高糖组比较,高糖+葛根素各浓度组OD值均显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

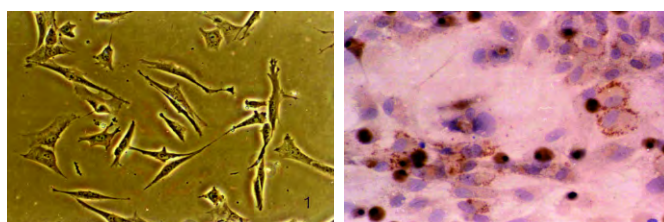


图1 成骨细胞形态(40×) 图2 ALP化学染色(40×)

表1 各组成骨细胞增殖结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

| 组别 | 浓度(mol/L) | OD值 |
|------------|-----------|---------------|
| 正常组 | | 0.561 ± 0.063 |
| 高糖组 | | 0.245 ± 0.018 |
| 葛根素各浓度组 | 10^{-8} | 0.745 ± 0.085 |
| | 10^{-7} | 0.737 ± 0.030 |
| | 10^{-6} | 0.735 ± 0.016 |
| 高糖+葛根素各浓度组 | 10^{-8} | 0.442 ± 0.025 |
| | 10^{-7} | 0.436 ± 0.036 |
| | 10^{-6} | 0.429 ± 0.045 |

与正常组比较,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$;与高糖组比较,③ $P < 0.05$,④ $P < 0.01$

3.3 各组成骨细胞ALP活性结果比较 见表2。与正常组比较,葛根素各浓度组细胞ALP活性显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);高糖组、高糖+葛根素各浓度组细胞ALP活性明显低于正常组,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与高糖组比较,高糖+葛根素各浓度组细胞ALP活性均显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3.4 各组成骨细胞Coll mRNA表达结果比较 见表3。与正常组比较,葛根素各浓度组细胞Coll mRNA表达显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);高糖组、高糖+葛根素各浓度组细胞Coll mRNA表达明显低于正常组,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与高糖组比较,高糖+葛根素各浓度组细胞Coll mRNA表达均显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 各组成骨细胞 ALP 活性结果比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 浓度(mol/L) | OD 值 |
|--------------|------------------|---------------|
| 正常组 | | 1.091 ± 0.041 |
| 高糖组 | | 0.54 ± 0.023 |
| 葛根素各浓度组 | 10 ⁻⁸ | 1.378 ± 0.026 |
| | 10 ⁻⁷ | 1.308 ± 0.026 |
| | 10 ⁻⁶ | 1.268 ± 0.030 |
| 高糖 + 葛根素各浓度组 | 10 ⁻⁸ | 0.665 ± 0.023 |
| | 10 ⁻⁷ | 0.609 ± 0.014 |
| | 10 ⁻⁶ | 0.621 ± 0.022 |

与正常组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与高糖组比较, ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$

表 3 各组成骨细胞 Coll mRNA 表达结果比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 浓度(mol/L) | OD 值 |
|--------------|------------------|---------------|
| 正常组 | | 0.801 ± 0.043 |
| 高糖组 | | 0.453 ± 0.032 |
| 葛根素各浓度组 | 10 ⁻⁸ | 1.154 ± 0.024 |
| | 10 ⁻⁷ | 0.958 ± 0.036 |
| | 10 ⁻⁶ | 0.864 ± 0.010 |
| 高糖 + 葛根素各浓度组 | 10 ⁻⁸ | 0.625 ± 0.023 |
| | 10 ⁻⁷ | 0.529 ± 0.024 |
| | 10 ⁻⁶ | 0.516 ± 0.022 |

与正常组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与高糖组比较, ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$

4 讨论

随着老龄化程度的加剧、饮食结构及生活习惯的改变, DM 发病率及检出率日趋增高, 预计 2025 年全球 DM 发病人数将超过 3 亿, 我国将达 3800 万^[6]。DM 作为一种代谢性疾病, 严重影响骨代谢和骨改建, 造成骨丧失, 是骨质疏松症的重要原因之一。DOP 作为 DM 的慢性并发症之一, 是一种以骨量减少、骨质微观结构退化为特征, 骨脆性增加, 易于发生骨折的全身性骨骼疾病。研究发现^[6], DM 患者骨质疏松症的发病率为 50% 左右, 并且随着年龄增加、胰岛功能衰竭, 合并 DOP 的危险性也随之增加。现如今, DOP 因其高发病率、致残率和致死率日益受到医学界的重视。大量研究表明, DOP 除与性别、年龄、病程等因素有关外, 与患者胰岛素不足、胰岛素生长因子-1 缺乏、晚期糖基化终末产物(AGEs) 积累等因素有关^[7]。

研究表明葛根素是中药葛根的主要成分之一, 它有类似于雌激素的化学结构。近些年葛根素的研究证实其可以作为防治

绝经后骨质疏松的药物, 起到雌激素样效应, 而且毒副作用相对较小^[8]。葛根素具有扩张心脑血管、增加心脑血管流量、抗动脉粥样硬化、调节血管内皮细胞功能、抗氧化、清除自由基和抑制缺血再灌注损伤等作用, 具有活血化瘀的功效, 在糖尿病的临床治疗中有一定的应用^[9]。本研究表明, 葛根素能明显改善高糖培养下成骨细胞的增殖和分化, 增加 ALP 活性, 促进 Coll mRNA 的表达, 减轻高糖环境对骨组织代谢及成骨细胞增殖分化的损伤, 起到保护作用。

综上所述, 本研究表明高血糖状态下, 破骨/成骨活性的平衡被破坏, 导致糖尿病骨质疏松的发生, 而葛根素的有效活性成分异黄酮可恢复上述平衡, 维持正常骨量和骨的生物学质量, 随着现代医药科学研究的不断深入, 以葛根为原料的植物雌激素成为研发治疗糖尿病性骨质疏松症新药更好的选择。

[参考文献]

- [1] Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: a still increasing prevalence[J]. Bone, 2006, 38(Suppl 1): 4-9.
- [2] Korpelainen R, Korpelainen J, Heikkinen J, et al. Lifelong risk factors for osteoporosis and fracture in elderly women with low body mass index a population-based study[J]. Bone, 2006, 39(2): 385-391.
- [3] 赵瑛, 李蔚, 祖莹, 等. 葛根素对实验性代谢综合征大鼠血脂影响的研究[J]. 中国中医药科技, 2007, 14(1): 29-30.
- [4] 晁海鹏, 孙玉明. 葛根素防治绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. 中国中医药信息, 2011, 28(1): 112-113.
- [5] 杨敏, 柳洁. 中国糖尿病防治现状[J]. 中国医学创新, 2014, 11(7): 149-151.
- [6] Jackuliak P, Payer J. Osteoporosis, fractures, and diabetes[J]. Int J Endocrinol, 2014: 820615.
- [7] Lin N, Zhang H, Su Q. Advanced glycation end-products induce injury to pancreatic beta cells through oxidative stress[J]. Diabetes Metab, 2012, 38(3): 250-257.
- [8] 杨勇晖, 陈平洋. 葛根素防治骨质疏松的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(3): 376-378.
- [9] Aoki A, Muneyuki T, Yoshida M, et al. Circulating osteocalcin is increased in early-stage diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 92(2): 181-186.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)