

## · 基础研究 ·

## 蛇床子素对新生大鼠成骨细胞增殖的影响及相关机制研究

李玲慧<sup>1,2</sup>, 丁道芳<sup>1,2</sup>, 杜国庆<sup>1,2</sup>, 龚浩<sup>3</sup>, 王辉昊<sup>1,2</sup>, 詹红生<sup>1</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海 201203; 2. 上海市中医药研究院骨伤科研究所, 上海 201203; 3. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

**【摘要】** 目的: 探讨蛇床子素对体外培养的大鼠成骨细胞增殖的影响及机制。方法: 新生 SD 大鼠 10 只, 脱颈处死后取出颅盖骨, 剪成约 1 mm×1 mm 的碎片, 采用胰酶预消化 15 min, 继以 0.1% I 型胶原酶 37℃ 消化 2 次, 每次 1 h, 所得细胞混匀后置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 恒温培养。细胞培养 48 h、28 d 后行 ALP 染色和矿化结节染色以进行成骨性鉴定。细胞随机分为 5 组, 分别加入终浓度为 100、50、25、12.5、0 μmol/L 的蛇床子素进行干预。24、48、72 h 后采用 CCK-8 法检测细胞增殖率, 并通过 Western Blot 方法检测加药 1 周后 PCNA、β-catenin 蛋白表达量。结果: 镜下观察细胞形态不规则, 具有典型的成骨细胞形态; ALP 染色及矿化结节染色均为阳性。CCK-8 检测发现 100 μmol/L 的蛇床子素干预 24 h 后即可抑制成骨细胞生长, 50 μmol/L 和 25 μmol/L 的蛇床子素于加药后 48 h 开始抑制成骨细胞生长, 12.5 μmol/L 蛇床子素对成骨细胞的增殖无显著影响。Western Blot 检测结果显示 PCNA 及 β-catenin 随蛇床子素浓度增加而表达下调。结论: 100、50、25 μmol/L 各个浓度的蛇床子素可抑制成骨细胞增殖, 12.5 μmol/L 蛇床子素对细胞的增殖特性无显著影响。蛇床子素抑制成骨细胞增殖的作用可能是通过干扰 Wnt/β-catenin 信号通路而实现的。

**【关键词】** 蛇床子; 成骨细胞; 大鼠; 细胞增殖

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.05.017

**Effect of osthole on proliferation of neonatal rat osteoblast and the relative mechanism research** LI Ling-hui, DING Dao-fang, DU Guo-qing, GONG Hao, WANG Hui-hao, and ZHAN Hong-sheng\*. \*Shi's Center of Orthopaedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of osthole on proliferation of neonatal rat osteoblast and the mechanism. **Methods:** Ten 24 hours old SD rats were executed by dislocating. The cranium of rats were removed and cut into blocks of 1 mm×1 mm size. After digested by trypsin for 15 min, the cranium were digested by type I collagenase for one hour two times. The mixed cells were cultured in thermostat incubator with 5% CO<sub>2</sub> under the condition of 37 °C. To identify the cells, ALP staining and alizarin red staining were performed after cultured 48 h and 28 d. The osteoblasts were randomly divided into five groups. Cells were treated with osthole at concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 0 μmol/L. CCK-8 method was used to evaluate the proliferation after 24 h, 48 h and 72 h. The expression of PCNA and β-catenin protein were detected through the method of Western Blot after one week. **Results:** The cells had irregular shapes and showed typical features of osteoblast. The results of ALP staining and alizarin red staining were both positive. CCK-8 detection showed that the osthole with final concentration of 100 μmol/L inhibited the proliferation of osteoblast after 24 h, while the osthole with final concentrations of 50 μmol/L and 25 μmol/L displayed the inhibition effect after 48 h. The osthole of 12.5 μmol/L had no obvious influence on the proliferation of osteoblast. The result of Western Blot showed that osthole reduced the expression of PCNA and β-catenin protein in a dose-dependent manner. **Conclusion:** The osthole with final concentrations of 100, 50, 25 μmol/L inhibited the proliferation of osteoblast ( $P < 0.05$ ). The osthole with final concentrations of 12.5 μmol/L had no obvious influence on the proliferation of osteoblast ( $P > 0.05$ ). These findings demonstrate that osthole may inhibit the proliferation of osteoblast by regulating the Wnt/β-catenin signaling in osteoblast.

**KEYWORDS** Fructus cnidii; Osteoblasts; Rats; Cell proliferation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(5):419-422 www.zggszz.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81073114, 81001527, 81102603, 81173621); “中医骨伤科学”国家重点学科(编号: 100508); 上海领军人才项目(编号: 041); 上海高校“中医脊柱病损研究”创新团队建设项目(编号: 2009-26); 上海市科委重点项目(编号: 09dZ1973800, 08411950300, 11DZ1973400, 11XD1404600)

Fund program: Provided by the National Natural Science Foundation of China (No. 81073114, 81001527, 81102603, 81173621)

通讯作者: 詹红生 E-mail: zhanhongsheng2010@163.com

蛇床子为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 干燥成熟的果实, 具有燥湿祛风、温肾壮阳的作用。现代研究证实, 蛇床子素具有抗心律失常、抗肿瘤细胞增殖、抗氧化预防骨质疏松等广泛的药理学作用<sup>[1-3]</sup>。近年来, 相关研究表明蛇床子素可通过增加成骨细胞数量而发挥促进成骨的作用<sup>[4-5]</sup>; 同时, 也有报道认为蛇床子素在各浓度均能抑制成骨细胞的增殖<sup>[6]</sup>。本文从细胞、蛋白等多个水平展开研究, 以明确蛇床子素对新生大鼠成骨细胞增殖功能的影响及作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物、试剂及仪器** 新生 SD 大鼠 10 只, 清洁级, 雌雄不限, 由上海中医药大学实验动物中心提供。蛇床子素购自中国药品生物制品检定所。H-DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰酶均购自 Gibco 公司; Collagenase I、茜素红、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、Tris 碱、SDS、AP、TEMED 购自 Sigma 公司; NBT/BCIP 染色液 (Pierce 公司); 双抗 (Biowest 公司); PCNA、 $\beta$ -catenin 抗体 (CST); 倒置荧光显微镜 (Olympus-IX71); CO<sub>2</sub> 培养箱 (HERA cell 150); 生物安全柜 (美国 Labconco 公司)。

**1.2 成骨细胞的分离与培养** 将 10 只新生 SD 大鼠于 70%乙醇中浸泡 10 min 以清洁体表。颈椎脱臼处死后揭去头顶皮肤, 取下颅盖骨, 置于 PBS 中清洗 3 次以清除骨膜、血管等结缔组织。将洗净的颅盖骨剪成 1 mm×1 mm 的小碎片, 加入 5 ml 0.25%胰蛋白酶溶液, 37℃预消化 15 min 以清除骨膜、血管等纤维组织。弃消化液后以 0.1% I 型胶原酶 37℃消化 1 h。将含细胞的消化液在 1 000 r/min 下离心 8 min, 弃掉上清液, 沉淀的细胞团块用 H-DMEM 培养液 (含 10%FBS 及双抗) 吹打混匀。剩余骨片加入 5 ml 新的胶原酶继续消化 1 h, 重复以上步骤 1 次。将 2 次消化所得细胞混匀、计数, 接种于 10 cm<sup>2</sup> 细胞培养皿中, 置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。24 h 后换液 1 次, 此后隔天换液。倒置相差显微镜下观察细胞长至皿底的 80%左右时以 0.25%胰蛋白酶消化细胞并传代培养。所有用于指标检测的细胞均随机分为 5 组, 分别加入终浓度为 100、50、25、12.5 和 0  $\mu$ mol/L (即对照组) 的蛇床子素进行干预。

## 1.3 观察指标与方法

### 1.3.1 成骨细胞鉴定

(1)碱性磷酸酶染色。第 2 代细胞以适当密度接种于 24 孔板, 48 h 后取出孔板于镜下观察。4%中性多聚甲醛固定 3 min, NBT/BCIP 染色液于室温下避光孵育 30 min, PBS 清洗 2 遍, 倒置相差显微镜下观察并摄片。

(2)茜素红染色。第 2 代细胞以适当密度接种于 6 孔板, 置于 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃恒温培养, 隔天换液 1 次。28 d 后取出细胞培养板, PBS 清洗 1 次, 95%乙醇固定 10 min。PBS 清洗 2 次, 每孔加入 1 ml 0.2%茜素红-Tris-HCl 避光孵育 30 min, PBS 清洗 1 次, 于倒置显微镜下摄片观察。

### 1.3.2 成骨细胞增殖指标检测

(1)CCK-8 法检测细胞增殖率。第 2 代细胞接种于 96 孔板, 加药 24、48、72 h 后采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒检测细胞增殖率, 具体操作按说明书进行。采用酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度值 (OD)。

(2)Western Blot 法检测 PCNA 表达。第 2 代细胞以适当密度接种于 6 孔板, 药物干预 1 周后裂解细胞, 将蛋白样品定量分装, 再经 SDS-PAGE 胶电泳后转膜, 封闭 1 h, 加入 PCNA 抗体孵育过夜, TBST 洗膜 3 次。加入二抗孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 化学发光法检测不同样品 PCNA 蛋白表达的情况。最后经计算机图像分析仪扫描并行灰度测定及分析。

(3)Western Blot 法检测  $\beta$ -catenin 表达。第 2 代细胞以适当密度接种于 6 孔板, 药物干预 1 周后裂解细胞, 将蛋白样品定量分装, 再经 SDS-PAGE 胶电泳后转膜, 封闭 1 h, 加入  $\beta$ -catenin 抗体孵育过夜, TBST 洗膜 3 次。加入二抗孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 化学发光法检测不同样品  $\beta$ -catenin 蛋白表达的情况。最后经计算机图像分析仪扫描并行灰度测定及分析。

**1.4 统计学处理** 所有实验均重复 3 次以上, 数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 成骨细胞鉴定** 第 2 代成骨细胞贴壁生长, 形态不规则, 有长短不一的突起, 胞浆丰富, 可见细胞核 (见图 1)。ALP 染色后显示, 阳性细胞呈蓝黑色, 细胞核呈圆形或卵圆形, 位于细胞中央, 胞质内亦可见蓝黑色深染颗粒 (见图 2)。细胞培养 28 d 后呈现重叠生长, 局部堆积成团块, 形成钙结节, 茜素红染色呈橘红色 (见图 3)。

### 2.2 成骨细胞增殖指标检测

**2.2.1 CCK-8 法检测细胞增殖率** CCK-8 检测结果显示 (见表 1): 加药 24 h 时, 100  $\mu$ mol/L 组 OD 值低于对照组, 其余 3 个加药组与对照组差异无统计学意义; 加药 48 h 时, 100、50、25  $\mu$ mol/L 组 OD 值低于对照组, 12.5  $\mu$ mol/L 组与对照组差异无统计学意义; 加药 72 h 时, 100、50  $\mu$ mol/L 组 OD 值较对照组

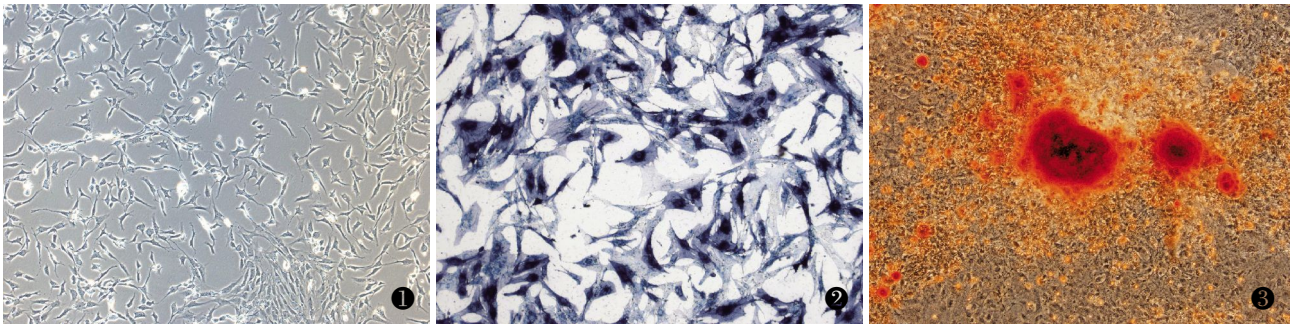


图1 第2代成骨细胞培养第3天,光镜下见细胞呈多角形生长,有长短不一的突起 图2 第2代成骨细胞培养第2天,ALP染色阳性,可见细胞膜、细胞质内有蓝色深染颗粒( $\times 100$ ) 图3 第2代成骨细胞培养第28天,茜素红染色阳性,细胞堆积生长,可见橘红色深染的矿化结节( $\times 100$ )

Fig.1 The second passage of osteoblasts was cultured for 3 days, the cells showed polygonal shape with long synapse Fig.2 Blue-black particle could be found in cytoplasm and envelope of the second passage of osteoblasts( $\times 100$ ) Fig.3 Calcium nodules could be stained in orange particles or massive precipitate( $\times 100$ )

表1 各组吸光度值 OD450 比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Comparison of absorbance value among the five groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	孔数(个)	24 h		48 h		72 h	
		OD450	P 值	OD450	P 值	OD450	P 值
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	6	0.976 $\pm$ 0.016	0.015	1.091 $\pm$ 0.030	3.95E-9	1.146 $\pm$ 0.038	3.69E-11
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	6	0.986 $\pm$ 0.013	0.077	1.158 $\pm$ 0.042	1.25E-6	1.350 $\pm$ 0.023	0.002
25 $\mu\text{mol/L}$ 组	6	1.015 $\pm$ 0.027	0.742	1.211 $\pm$ 0.037	2.63E-4	1.393 $\pm$ 0.015	0.135
12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	6	1.010 $\pm$ 0.024	0.976	1.238 $\pm$ 0.036	0.235	1.394 $\pm$ 0.039	0.149
对照组	6	1.011 $\pm$ 0.021	—	1.308 $\pm$ 0.029	—	1.426 $\pm$ 0.046	—

注:P 值为加药组与对照组比较

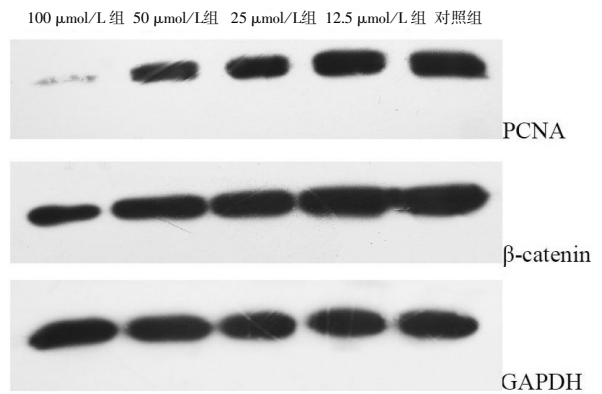
Note: P value is comparison between drug groups and control group

低, 25、12.5  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组比较差异无统计学意义。以上结果提示, 100  $\mu\text{mol/L}$  的蛇床子素干预 24 h 后即可抑制成骨细胞生长, 50、25  $\mu\text{mol/L}$  的蛇床子素于加药后 48 h 开始抑制成骨细胞生长, 而 12.5  $\mu\text{mol/L}$  蛇床子素对成骨细胞的增殖无显著影响。

**2.2.2 Western Blot 法检测 PCNA、 $\beta$ -catenin 蛋白表达量** Western Blot 结果显示(见图 4): GAPDH 蛋白条带宽度一致, 说明各组蛋白上样量相等; PCNA 及  $\beta$ -catenin 蛋白条带均随加药浓度的增加逐渐变窄, 提示蛇床子素可抑制 PCNA 和  $\beta$ -catenin 的表达, 且抑制程度呈剂量依赖趋势。100、50、25、12.5  $\mu\text{mol/L}$  组及对照组 PCNA 与内参 GAPDH 的灰度值比值依次增高(表 2), 4 个加药组的灰度比值均低于对照组;  $\beta$ -catenin 与内参 GAPDH 灰度值的比值随蛇床子素浓度增高而降低(表 2), 100、50、25  $\mu\text{mol/L}$  组灰度比值低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 12.5  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组比较差异无统计学意义。

### 3 讨论

中医学认为肾主骨生髓, 肾虚是骨质疏松症发病的主要病理基础。近年来, 国内学者在大量临床实践中发现补肾类中药对骨质疏松症的防治有确切疗



PCNA 及  $\beta$ -catenin 蛋白表达随蛇床子素浓度的增加而下调

Fig.4 Expression levels of PCNA and  $\beta$ -catenin protein were measured by Western blot. Osthole inhibited PCNA and  $\beta$ -catenin protein expression in a dose-dependent manner

效, 动物实验亦证实补肾中药蛇床子可显著降低骨转换、抑制骨吸收。然而, 蛇床子素治疗骨质疏松症的确切机制尚不清楚, 目前蛇床子素对成骨细胞增殖的研究存在争议<sup>[4-6]</sup>。故本实验专门针对蛇床子素在成骨细胞增殖方面的作用展开研究, 为日后进一步深入研究蛇床子素治疗骨质疏松症的机制奠定基础。

成骨细胞是参与骨形成和骨代谢过程的主要细胞, 能合成和分泌胶原、蛋白等基质, 并参与基质

表 2 各组 PCNA 及  $\beta$ -catenin 与内参 GAPDH 灰度值比值 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Ratios of PCNA/GAPDH and  $\beta$ -catenin/GAPDH of the five groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	PCNA/ GAPDH	与对照组 比较 P 值	$\beta$ -catenin/ GAPDH	与对照组 比较 P 值
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.029 $\pm$ 0.001	4.74E-14	0.668 $\pm$ 0.029	2.01E-7
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.447 $\pm$ 0.019	5.60E-11	1.175 $\pm$ 0.103	2.41E-4
25 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.605 $\pm$ 0.028	7.26E-9	1.396 $\pm$ 0.137	0.030
12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.817 $\pm$ 0.012	0.037	1.551 $\pm$ 0.058	0.683
对照组	0.851 $\pm$ 0.012	—	1.582 $\pm$ 0.079	—

钙化。ALP 是成骨细胞分泌的标志性酶,其活性的高表达是成骨细胞分化早期的特异性标志之一<sup>[7]</sup>。矿化结节的形成表明成骨细胞已分化成熟,是成骨细胞分化晚期的特征指标。本研究采用经典的成骨细胞体外培养方法,获得的细胞经碱性磷酸酶染色及矿化结节染色结果均显示为阳性,故可认为该细胞具有典型的成骨细胞表型。

成骨细胞的增殖是骨形成的基础。本实验中 3 个时间点的 CCK-8 检测结果显示,随着蛇床子素浓度的增加各组的活细胞数逐渐下降,100  $\mu\text{mol/L}$  的蛇床子素干预 24 h 后即可抑制成骨细胞生长,50、25  $\mu\text{mol/L}$  的蛇床子素于加药后 48 h 开始抑制成骨细胞生长,12.5  $\mu\text{mol/L}$  蛇床子素对成骨细胞的增殖无显著影响。蛇床子素对成骨细胞的抑制作用与药物浓度呈正相关:100  $\mu\text{mol/L}$  蛇床子素在各时间点对成骨细胞的抑制作用均为最强。PCNA 是一种仅在增殖细胞中表达的核内多肽,是检测细胞增殖活性最有效的标志之一<sup>[8]</sup>。本实验中随着加药浓度的增加 PCNA 的表达逐渐减弱,从蛋白表达的水平进一步证实了蛇床子素对细胞增殖的抑制,这与 CCK-8 检测结果基本一致。Wnt 信号通路调控许多生命过程,贯穿生物体生长、发育、疾病、衰老、死亡的整个过程,在动物中主要起着维持胚胎发育和细胞正常生长、增殖的作用。 $\beta$ -catenin 在这条信号通路中扮演着极其重要的角色,是整条通路的关键枢纽分子<sup>[9]</sup>。本研究结果显示蛇床子素可降低细胞  $\beta$ -catenin 蛋白的表达,这与 Tang 等<sup>[5]</sup>研究结论不一致,可能与实验条件及蛋白检测时间不同有关。综上,笔者推测蛇床子素可能是通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路而起到抑制细胞增殖的作用。

本文初步探讨了蛇床子素对成骨细胞增殖作用

的影响,从细胞、蛋白等多水平证实蛇床子素并非通过增加成骨细胞数量而达到促进成骨的作用,这与明磊国等<sup>[6]</sup>的研究结论基本一致。基于中药蛇床子在骨质疏松症中的肯定疗效,笔者推测蛇床子素可能是通过调节某些信号通路而达到提高单个成骨细胞功能的目的,亦或是仅通过抑制破骨细胞功能而调节骨的转换,这将成为下一步研究的重点。

参考文献

- [1] Xu X,Zhang Y,Qu D,et al. Osthole induces G2/M arrest and apoptosis in lung cancer A549 cells by modulating PI3K/Akt pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res,2011,30:33.
- [2] Ojala T,Vuorela P,Vuorela H,et al. The coumarin Osthole attenuates the binding of thyrotropin-releasing hormone in rat pituitary GH4C1 cells[J]. Planta Med,2001,67(3):236-239.
- [3] 郭保凤,刘胜,叶依依,等. 中药提取物配伍对乳腺癌 MDA-MB-231BO 细胞侵袭作用的影响及其机制[J]. 中西医结合学报,2011,9(10):1110-1117.  
Guo BF,Liu S,Ye YY,et al. Inhibitory effects of Osthole,psoralen and aconitine on invasive activities of breast cancer MDA-MB-231BO cell line and the mechanisms[J]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao,2011,9(10):1110-1117. Chinese.
- [4] 张巧艳,秦路平,田野苹,等. 蛇床子素对新生大鼠颅盖骨成骨细胞功能的调节作用[J]. 中国药理学通报,2003,19(4):384-387.  
Zhang QY,Qin LP,Tian YP,et al. Regulating effect of Osthole on neonatal rat osteoblast[J]. Zhongguo Yao Li Xue Tong Bao,2003,19(4):384-387. Chinese.
- [5] Tang DZ,Hou W,Zhou Q,et al. Osthole stimulates osteoblast differentiation and bone formation by activation of beta-catenin-BMP signaling[J]. J Bone Miner Res,2010,25(6):1234-1245.
- [6] 明磊国,葛宝丰,陈克明,等. 蛇床子素对体外培养成骨细胞增殖与分化成熟的影响[J]. 中国骨伤,2010,23(9):688-691.  
Ming LG,Ge BF,Chen KM,et al. Effect of Osthol on the proliferation and differentiate of osteoblasts in vitro[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2010,23(9):688-691. Chinese with abstract in English.
- [7] Nguyen H,Qian JJ,Bhatnagar RS,et al. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels [J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,311(1):179-186.
- [8] Bessonov SN,Korablev AV,Korablev PA. Chondroblast proliferative activity study in forming big alar cartilage[J]. Stomatologiya (Mosk),2009,88(3):29-33.
- [9] Chen BY,Wang X,Chen LW,et al. Molecular targeting regulation of proliferation and differentiation of the bone marrow-derived mesenchymal stem cells or mesenchymal stromal cells[J]. Curr Drug Targets,2012,13(4):561-571.

(收稿日期:2012-08-31 本文编辑:连智华)