

· 基础研究 ·

大戟苷抑制大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化*

杨 蕾^{1,2} 王娟飞^{1,2} 李晓帆³ 王乃利³ 蔡国平^{1,2,△}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084 2 清华大学深圳研究生院生命学部 广东 深圳 518055 ;

3 深圳清华大学研究生院深圳市创新中药及天然药物研究重点实验室 广东 深圳 518057)

摘要 目的 观察泽漆主要活性成分大戟苷(euphornin)对大鼠骨髓间充质干细胞(rMSC)成骨分化的影响。方法 :从大鼠股骨中分离培养 rMSC 并诱导其成骨分化。用 MTT 法检测细胞增殖情况 ,通过茜素红染色 ,碱性磷酸酶(ALP)活性检测和钙含量测定分别定性、定量地判断其在成骨分化中的效果。实时定量 PCR(Q-PCR)检测主要成骨标志因子骨桥蛋白(OPN)和一型胶原蛋白(COL-)及主要转录因子骨形成蛋白 2(BMP2)、Runt 相关转录因子 2(Runx2)和 Osterix(Osx)mRNA 的表达。结果 大戟苷能剂量依赖性地抑制 rMSC 成骨分化 ,并一定程度地抑制其细胞增殖。COL- 和 OPN 的表达在第 4、8 天分别有显著下降。BMP2、Runx2 和 Osx 等关键转录因子的表达也被明显抑制。结论 :大戟苷能抑制 rMSC 成骨分化 ,其作用主要是通过抑制 BMP 通路相关因子的表达而实现的。

关键词 泽漆 rMSC 大戟苷 成骨分化

中图分类号 Q95-3 Q813 R318 R329.2 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2012)22-4201-04

Euphornin Suppresses Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells*

YANG Lei^{1,2}, WANG Juan-fei^{1,2}, LI Xiao-fan³, WANG Nai-li³, CAI Guo-ping^{1,2,△}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084;

2 Life Science Division, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, 518055;

3 Key Lab for New Drugs Research of Traditional Chinese Medicine in Shenzhen, Research Institute of Tsinghua University in Shenzhen, Shenzhen, 518057)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of euphornin, an active component from Euphorbia Helioscopia L, on the osteogenic differentiation in rat mesenchymal stem cells (rMSC). **Methods:** rMSC were isolated from rat femurs, cultured and induced into osteoblasts. MTT assay was applied to detect the role of euphornin on cell proliferation. Alkaline phosphatase (ALP) assay and calcium content measurement were assigned to quantify the suppressed osteogenesis and alizarin reds (ARS) staining was conducted to visualize it. Quantitative real-time PCR (Q-PCR) was used to evaluate the mRNA expression of marker genes in osteogenesis and master regulators in BMP pathway. **Results:** Euphornin suppressed osteogenesis of rMSC in a dose-dependent manner, and suppressed its proliferation to some extent. In euphornin-treated cells, the expression of type collagen (COL-) and osteopontin (OPN) were down-regulated at mRNA level on Day 4 and 8 respectively. The mRNA expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP2), Runt-related transcription factor-2 (Runx2), and osterix (Osx) also decreased. **Conclusions:** Euphornin suppresses the osteogenic differentiation of rMSC. The suppression role might be exerted by down-regulating the expression of key transcriptional factors in BMP pathway.

Key words: Euphorbia Helioscopia L; rMSC; Euphornin; Osteogenic differentiation

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q813, R318, R329.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)22-4201-04

前言

泽漆(Euphorbia Helioscopia L.) ,又名猫眼草,始载于《神农本草经》,苦 ,微寒 ,据《本草纲目》记载 ,泽漆有利水消肿、消痰退热、散结杀虫等功效。临床用于治疗腹水、水肿、肺结核、颈淋巴结核、痰多喘咳、癣疮 ,民间还用于治疗宫颈癌、食道癌等 ,并

具有一定疗效。大戟苷是泽漆主要活性成分二萜酯类中的一种(结构式见 Fig.1)。有研究发现它对部分细胞有毒性^[1-4] ,而 Barla 等发现它能作为有效的血管减压剂^[5]。此外 ,虽然二萜类化合物可以作为有效的 P- 糖蛋白抑制剂抵抗细胞的多药耐药性 ,大戟苷在这方面的作用并不明显^[6]。总之 ,目前对大戟苷的功能研究比较少 ,而且都停留在初步检测上 ,并没有任何深入的机理

* 基金项目 深圳基础研究项目([2011]168)

作者简介 杨蕾(1983-) ,女 ,博士研究生 ,细胞生物学 ,E-mail yl_scarlette@163.com

△通讯作者 蔡国平 ,E-mail caigp@sz.tsinghua.edu.cn

(收稿日期 2012-01-23 接受日期 2012-02-18)

研究。本实验首次发现它能抑制大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化,并对其机理进行了进一步探索。

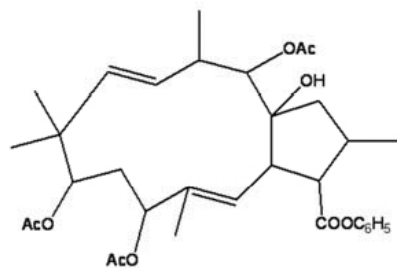


图1 大戟苷结构式

Fig.1 Structure of Euphorbia

1 材料与方法

1.1 材料

Sprague-Dawley 大鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。胰酶和 α MEM 购自 Gibco 公司,胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司,茜素红 (ARS)、L- 抗坏血酸、地塞米松 (DEX)和 β - 甘油磷酸钠购于 Sigma 公司, RNA 提取液、Prime-Script 逆转录试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq™ 定量 PCR 试剂盒购自 Takara 公司。钙含量测定试剂盒购自 BioAssay Systems 公司。碱性磷酸酶(ALP)试剂盒购自南京建成生物技术有限公司。RIPA 细胞裂解液和 BCA 蛋白浓度测定盒购自碧云天生物技术有限公司。引物都由 Invitrogen 公司合成。大戟苷如^[7]所述制备(纯度达到 95%-99%),用二甲亚砜溶解成 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,使用时用培养基稀释。

1.2 方法

1.2.1 rMSC 的分离、培养和成骨诱导 取 8-10 周的大鼠断颈,取股骨,用针筒吸取培养基(含 10%胎牛血清的 α MEM)将骨髓冲洗下来,在 37°C 5% CO_2 的培养箱里培养 4 天。吸走培养基里未贴壁的细胞并用 PBS 洗,之后细胞每两天换液。在达到 70-80%汇合率时用胰酶消化,传代或者冻存。

将第三代的 rMSC 以 2.5×10^5 个/孔种到 12 孔板中,汇合率达到 70-80%时开始换用含成骨诱导剂 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L- 抗坏血酸和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β - 甘油磷酸钠)的培养基进行成骨诱导。每三天换一次液直至出现明显的成骨分化迹象。期间培养液里加入不同浓度的大戟苷以检测其对 rMSC 成骨分化作用的影响。

1.2.2 细胞增殖 将 rMSC 细胞以 5×10^3 个/孔种入 96 孔板。24 小时后将培养基换成含成骨诱导剂的培养基,并分别加入 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大戟苷。不加任何化合物的细胞作为阴性对照。分别培养 1、2、3 天后将培养基换成 MTT 溶液 ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT, 5%胎牛血清/DMEM) 37°C 培养 4 小时后弃去培养基,每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO,摇床上震荡 10 分钟,用紫外分光光度计测其在 490 nm 处的吸光值。

1.2.3 茜素红染色 诱导 14 天后,细胞用 PBS 洗涤 3 次,加入体积分数为 0.1 的福尔马林固定 15 分钟,用 2%的 ARS(pH4.1)室温染色 10 分钟。用 PBS 洗去浮色,并用相机和显微镜拍照。

1.2.4 ALP 活性检测 在开始诱导后的第 2、8、14 天,细胞用 PBS 洗涤,并用 RIPA 细胞裂解液裂解冰上裂解 20 分钟,10000 转/分钟 10 分钟收集上清,按照试剂盒的要求检测 ALP 和总蛋白含量,最终以 ALP 值除以蛋白质浓度的结果进行统计学分析。

1.2.5 钙含量检测 在成骨诱导后第 12 天,细胞用 PBS 洗涤后,在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 中孵育 24 小时。上清按试剂盒要求测定钙含量。去除 HCl 的细胞用 PBS 洗涤后用含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, 0.1% SDS 的裂解液裂解,测得总蛋白含量。最终以钙含量除以蛋白质浓度的结果进行统计学分析。

1.2.6 Q-PCR 从细胞中提取 RNA,定量,并电泳确定其纯度。逆转录试剂盒合成的 cDNA 用 SYBR green 荧光定量试剂盒配成制造商所推荐的反应体系后在 PRISM 7300 (ABI) 上进行 Q-PCR 反应。反应条件为 95°C 30s 预变性, 95°C 5s; 60°C 31s; 72°C 20s; 一共扩增 40 个循环。目标基因 mRNA 的相对含量通过 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 的计算方法获得。所用引物序列见图 1。

表 1 Q-PCR 引物

Table 1 Primers for Q-PCR

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
OPN	CTCAAGGTCATCCAGTTG	TGTTTCCACGCTTGTTTCATC
COL-	AAGAATGGCGACCGTGGTGA	ACGATGACCCCTTTATGCCTCTGT
BMP2	AATAGTAGTTTCCAGCACCGA	AAAGCTCTCCCACTGACTTGT
GAPDH	TGGGTGTGAACACGAGAA	GGCATGGACTGTGGTCATGA
Runx2	CAACCACAGAACCACAAGTGC	CACTGACTCGGTTGGTCTCG
Osx	CAACTGGCTTTTCTGTGGCAA	TGGGTGCGCTGATGTTTGCT

1.2.7 统计分析 实验结果用($\bar{x} \pm s$)表示,对实验结果进行 t 检验 $P < 0.05$ 认为存在显著性差异。

2 结果

2.1 大戟苷抑制 rMSC 的增殖

MTT 结果(Fig.2)显示, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大戟苷对细胞增殖没有影响,而随着浓度增加, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大戟苷在第 3 天,10 和 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大戟苷在第 2、3 天都稍微抑制 rMSC 增殖。

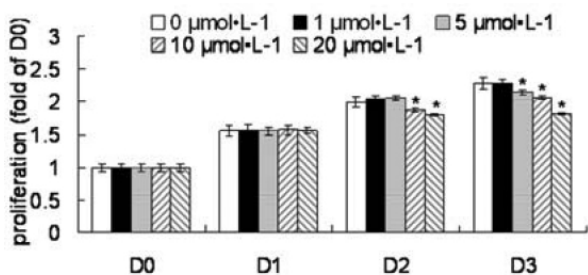


图2 大戟苷抑制 rMSC 增殖 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) MTT 实验检测细胞增殖情况 (* $P<0.05$ vs. $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig.2 Euphornin suppressed proliferation of rMSC ($\bar{x} \pm s$, $n=3$). rMSC proliferation was measured with MTT assay (* $P<0.05$ vs. $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.2 大戟苷抑制 rMSC 的成骨分化

ARS 染色图片 (Fig.3A)、ALP 活性定量检测 (Fig.3B) 和钙浓度测定结果 (Fig.3C) 显示,大戟苷剂量依赖性地抑制 rMSC 的成骨分化, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时在 D8 和 D14 天都有显著作用。结合图 2 中各个浓度大戟苷对增殖的影响, 本研究以 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为研究其机理的浓度并以相同体积分数的 DMSO 作为对照。

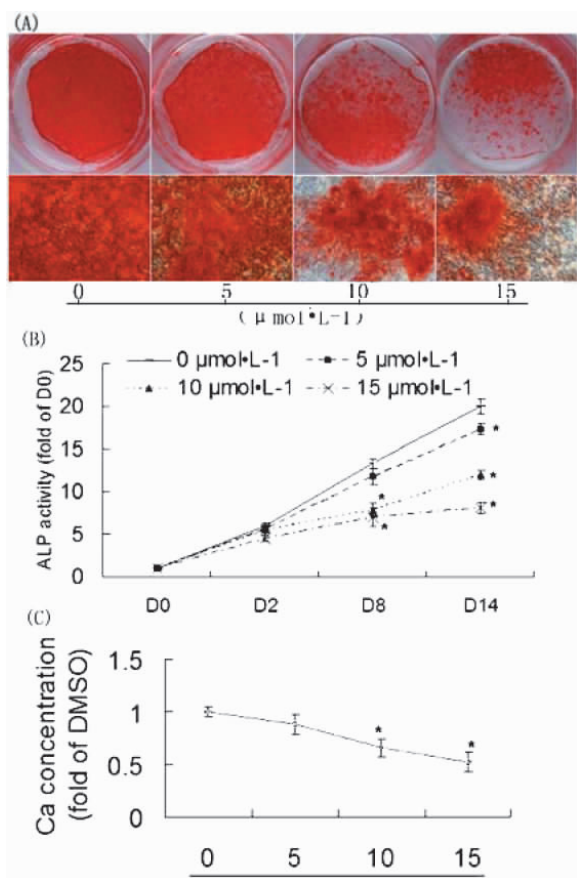


图3 大戟苷抑制 rMSC 的成骨分化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$): A 诱导第 14 天 rMSC 茜素红染色 上面 相机拍照;下面 显微镜拍照 (40 $\times$) B 碱性磷酸酶活性结果 C 第 14 天钙含量测定 (* $P<0.05$ vs. $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig.3 Euphornin suppressed osteogenic differentiation of rMSC ($\bar{x} \pm s$, $n=3$): A :ARS staining of rMSC on D14 Upper: photographed with camera. Lower: photographed with microscope (40 $\times$) ; B :ALP activity assay ; C :Calcium content assay on D14 (* $P<0.05$ vs. $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.3 大戟苷抑制 OPN 和 COL- 的表达

COL- 和 OPN 分别是细胞成骨分化前期和后期的标志基因。Q-PCR 结果检测发现大戟苷使 COL 在诱导分化第四天表达量下降了 70% 而 OPN 在第 8 天表达量下降了 40% (Fig.4A)。

2.4 大戟苷通过 BMP 通路抑制 rMSC 成骨分化

研究发现 BMP 通路中的关键因子 BMP2、Runx2 和 Osx 表达量在大戟苷处理诱导后第 8、12 天都有显著下降 (Fig.4B)。

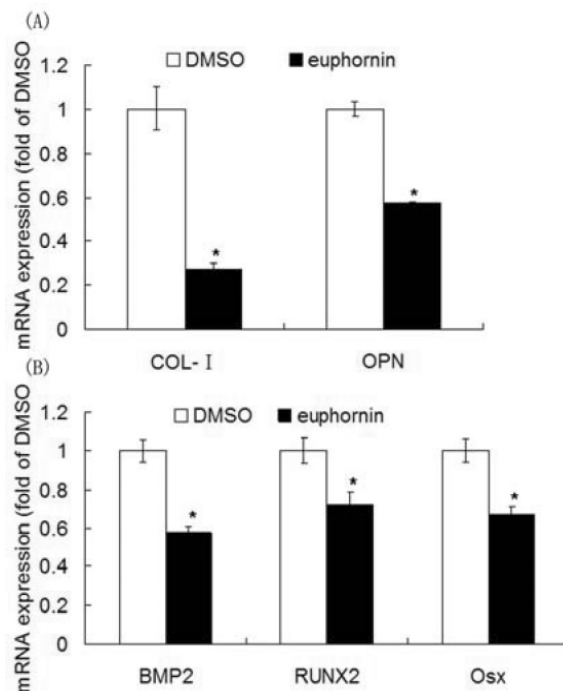


图4 大戟苷的处理抑制了成骨分化中标志基因和关键转录因子的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) 用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大戟苷成骨诱导 4 天 (COL-), 8 天 (OPN, BMP2) 或者 12 天 (Runx2 和 Osx) 后提取 RNA 用 Q-PCR 测量 mRNA 含量 control: 只用 DMSO 处理的细胞 (* $P<0.05$ vs. control)

Fig.4 The expression of marker genes and key transcriptional factors in osteogenic differentiation was down-regulated by euphornin treatment ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) Induced with $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ euphornin for 4 days (COL-), 8 days (OPN, BMP2), or 12 days (Runx2 and Osx), RNA was collected and Q-PCR was performed control: cells treated with DMSO (* $P<0.05$ vs. control)

3 讨论

骨髓间充质干细胞的成骨分化是骨形成和重建中最重要的部分。而它易于获取,具有增殖能力、分化能力,又有临床应用价值的特点,让它成为体外研究成骨分化的理想模型^[8,9]。本实验利用 rMSC 首次发现了大戟苷抑制成骨分化的特性。

大戟苷是由一个五元环和一个十二元环构成的假白榄烷型二萜类化合物,这类化合物在泽漆中含量较高,是其主要活性成分^[10]。本研究发现大戟苷随着浓度的升高会稍微抑制细胞的增殖。而 ALP 活性、钙含量和相应标志基因的检测表明大戟苷能够很明显地抑制 rMSC 成骨分化。因此,可能抑制增殖与抑制成骨分化间有一定的联系。

作为 TGF β 蛋白超家族成员, BMP 蛋白自 1971 年发现以来就被认为是成骨分化的关键促进因子^[11,12]。而作为其信号通

路的下游因子 Runx2 引导细胞向成骨成软骨方向发展,而 Osx 能最终诱导形成成骨细胞^[13]。因此三者都是成骨诱导过程中的关键转录调控因子,它们协同合作是控制细胞成骨分化的经典途径。大戟苷很可能也是通过这条途径抑制了 rMSC 的成骨分化。

总之,本研究首次发现大戟苷这种二萜类化合物对大鼠 MSC 成骨分化有明显抑制作用,可能可以应用于骨质增生等相关疾病的治疗,开辟了认识这类化合物的新途径,有利于更好地开发其资源。

参考文献(References)

- [1] Lu Z, Guan S, Li X, et al. Cytotoxic Diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*[J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(5): 873-876
- [2] Chen H, Wang Z, Yang L. Analysis of euphornin in *Euphorbia helioscopia* L. and its cytotoxicity to mice lung adenocarcinoma cells (LA795) [J]. *Nat Prod Res*, 2011, doi:10.1080/14786419, 2011, 622275
- [3] Tao HW, Hao XJ, Liu PP, et al. Cytotoxic macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*[J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(12): 1547-1551
- [4] 杨莉, 陈海霞, 高文远. 泽漆化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4): 575-577, 595
Yang Li, Chen Hai-xia, Gao Wen-yuan. Studies on the chemical constituents and its antitumor activities from *Euphorbia helioscopia* L[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2008, 20(4): 575-577, 595
- [5] Barla A, Birman H, Kultur S, et al. Secondary Metabolites from *Euphorbia helioscopia* and Their Vasodepressor Activity [J]. *Turk J Chem*, 2006, 30: 325-332
- [6] Corea G, Di Pietro A, Dumontet C, et al. Jatrophone diterpenes from *Euphorbia spp2* as modulators of multidrug resistance in cancer therapy[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2009, 8(2): 431
- [7] 李荣, 王珏, 吴慧星, 等. 猫眼草的抗氧化活性成分的分离鉴定与活性测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2011(1): 25-29
Li Rong, Wang Jue, Wu Hui-xing, et al. Isolation, identification and activity determination on antioxidative components from whole plant of *Euphorbia lunulata* Bge[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2011(1): 25-29
- [8] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy[J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(3): 301-316
- [9] Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl): 247-256
- [10] 张蓓蓓, 戴源, 廖志新. 大戟属植物的化学成分及药理活性研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2010(1): 99-106
Zhang Bei-bei, Dai Yuan, Liao Zhi-xin. New evolve of chemical composition and pharmacological research of *Euphorbia* L[J]. *J Southeast Univ (Med Sci Ed)*, 2010(1): 99-106
- [11] Urist MR, Strates BS. Bone Morphogenetic Protein [J]. *J Dent Res*, 1971, 50(6): 1392-1406
- [12] Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells[J]. *Gene*, 2006, 366(1): 51-57
- [13] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29
- (上接第 4215 页)
- [15] Nguyen VP, Chen SH, Trinh J, et al. Differential response of lymphatic, venous and arterial endothelial cells to angiopoietin-1 and angiopoietin-2[J]. *BMC cell biology*, 2007, 8: 10-14
- [16] Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 217(2): 157-153
- [17] Yamagishi S, Imaizumi T. Pericyte biology and diseases[J]. *Int J Tissue React*, 2005, 27(3): 125-135
- [18] Mori L, Bellini A, Stacey MA, et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow[J]. *Experimental cell research*, 2005, 304(1): 81-90
- [19] Riichiro Abe, Seamas CD, Tina P, et al. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites [J]. *Journal of Immunology*, 2003, 166(12): 7556-7562
- [20] Zumsteg A, Christofori G. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis[J]. *current opinion in oncology*, 2009, 21(1): 60-70
- [21] Roderick JP, Marie DB, Kurt H, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, 114(3): 438-446