

三七三醇皂苷对 MC3T3-E1 细胞分化和凋亡的影响

沈 阳¹, 季 晖^{1*}, 李绍平², 丁丽菊¹, 张珍珍¹(¹ 中国药科大学药理学教研室, 南京 210009; ² 澳门大学中华医学研究所, 澳门)

摘 要 观察了三七三醇皂苷 (PTS) 对小鼠胚胎成骨细胞 MC3T3-E1 成骨功能、间质矿化及凋亡的影响, 并初步探讨其作用机制。MTT 法显示 PTS 对成骨细胞增殖没有明显的影响; 对硝基苯磷酸盐法 (PNPP) 显示, 成骨细胞分化早期, 高浓度 PTS 可使碱性磷酸酶活性增高, 其中 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组效应最强, 且这一作用可被雌激素受体阻断剂 ICI 182780 所阻断; RT-PCR 实验证实, 较高浓度 PTS 可显著增强骨钙素的基因表达; Von Kossa 染色法显示, 连续给药处理细胞 28 d, PTS 各组矿化结节形成数量均有增多趋势; 用流式细胞仪检测 PTS 对血清饥饿诱导的成骨细胞凋亡的影响, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PTS 凋亡细胞百分率明显下降。结果表明, PTS 具有促进成骨细胞分化、矿化和抑制凋亡的活性, 且其促分化作用可能与雌激素样作用有关, 提示 PTS 具有潜在的抗骨质疏松作用。

关键词 三七三醇皂苷; 成骨细胞; 分化; 凋亡

中图分类号 R965 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2010)03-0273-05

Effects of panaxatriol saponins on the differentiation and apoptosis of MC3T3-E1 cells

SHEN Yang¹, JI Hui^{1*}, LI Shao-ping², DING Li-ju¹, ZHANG Zhen-zhen¹¹ Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;² Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macau, China

Abstract The purpose of this paper was to study the effects of panaxatriol saponins (PTS) on osteoblasts mineralization and apoptosis. MTT, *p*-nitrophenyl phosphate, RT-PCR and Von Kossa staining was used to observe the effects of PTS on cell viability, alkaline phosphatase (ALP) activity, osteocalcin (OC) mRNA expression and mineralization of MC3T3-E1 cells. The serum deprivation-induced apoptosis of osteoblasts was determined by flow cytometry. Compared with the control group, there was no significant difference of cell viability in all experimental groups. Higher doses of PTS could improve ALP activity obviously compared with the control group during early differentiation phase of MC3T3-E1 cells, among which 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PTS had the strongest promoting effect. However, the stimulating effect of ALP activity of MC3T3-E1 cells by PTS was blocked by estrogen receptor antagonist ICI 182780. After 21 days of treatment, higher doses of PTS could markedly increase the mRNA expression of OC. Besides, the number of mineralized nodules increased at different levels in MC3T3-E1 cells after 28-day incubation with different concentrations of PTS. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PTS could significantly inhibit serum deprivation-induced apoptosis of MC3T3-E1 cells. All these suggested that PTS could effectively promote the differentiation and mineralization of osteoblasts and inhibit their apoptosis and might act as an estrogen agonist in MC3T3-E1 cells, potentially capable of being developed as anti-osteoporosis agents.

Key words panaxatriol saponins; osteoblast; differentiation; apoptosis

骨质疏松是以骨量减少, 骨微结构损害导致骨折脆性增加和骨折危险性增大为特征的一种疾病, 多发病于绝经后妇女, 其发病原因与雌激素水平下降

导致骨吸收与骨形成失衡有关。因此雌激素替代疗法成为治疗和预防绝经后骨质疏松的有效手段, 但是此种疗法会增加患者患乳腺癌和心脏疾病的

风险,限制了它在临床的长期使用^[1]。因此,寻找安全、有效的天然活性物质已经成为抗骨质疏松药物研发的热点^[2]。

五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen (Araliaceae) 是我国所特有的珍贵药材,其最早就是应用于外科创伤和骨折治疗。药理实验证实三七的活性成分——三七总皂苷可以促进成骨细胞增殖分化,增强骨髓间质干细胞和骨髓基质细胞的体外成骨潜能^[3-5]。三七三醇皂苷 (panaxatriol saponins PTS) 是三七总皂苷的主要活性组分,本文观察了 PTS 对成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖、分化、矿化和凋亡作用,并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料

1.1 药品与试剂

三七三醇皂苷 (纯度大于 86%; 澳门大学中华医学研究所); MTT, Triton X-100 (美国 Amresco 公司); β -甘油磷酸钠、维生素 C (美国 Sigma 公司); ICI 182780 (英国 Tocris 公司); α -MEM 培养基 (美国 Hyclone 公司); 新生牛血清 (FBS 美国 Gibco 公司); MC3T3-E1 细胞 (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心); 碱性磷酸酶 (ALP)、考马斯亮蓝测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (美国 BD Pharmingen 公司)。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

MODE1680 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); BD FACS Cantotm 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MC3T3-E1 细胞用含体积分数 10% FBS 的 α -MEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的条件下培养。每 3 天更换一次培养基。待细胞铺满培养瓶时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,计数后作传代培养。

2.2 PTS 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

指数生长期的 MC3T3-E1 细胞按每毫升 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板,每孔 100 μ L。24 h 后换以含 1% 新生牛血清的 α -MEM 培养液,同时加入不同浓度的 PTS,每组 6 孔,对照组给予

等体积 PBS。继续培养 48 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μ L,4 h 后小心吸弃培养液,再在每孔加入 DMSO 150 μ L,于 570 nm 波长处测各孔吸收度,结果用 A_{570} 表示。实验重复 3 次。

2.3 PTS 对 MC3T3-E1 细胞内 ALP 活性的影响

细胞按每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种于 24 孔板,每孔 1 mL,10% FBS 的 α -MEM 培养液培养 24 h 后换以 5% FBS α -MEM 培养液,同时加入 50 μ g/mL 维生素 C 及 10 mmol/L β -甘油磷酸钠,每组 6 孔,2 d 换液 1 次。分别于培养第 7 天及第 14 天换以 1% FBS α -MEM 培养液,24 h 后加入不同浓度 PTS,每组 6 孔,对照组给予等体积的 PBS。给药后继续培养 48 h 吸弃培养液,加入 1% Triton X-100 溶液 200 μ L,置 4 °C 冰箱中放置 1 h 以裂解细胞,离心取上清然后按 ALP 检测试剂盒及考马斯亮蓝蛋白定量法分别测定 ALP 和蛋白含量,并计算出细胞内 ALP 的活性。

细胞按每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种于 24 孔板,每孔 1 mL,10% FBS 的 α -MEM 培养液培养 24 h 后换以 5% FBS α -MEM 培养液,同时加入 50 μ g/mL 维生素 C 及 10 mmol/L β -甘油磷酸钠,每组 6 孔,2 d 换液 1 次。于培养第 14 天换以 1% FBS α -MEM 培养液,24 h 后细胞以 1 μ mol/L 雌激素受体拮抗剂 ICI 182780 预处理 1 h,加入 10 μ g/mL PTS,每组 6 孔,对照组给予等体积的 PBS。试剂盒测定并计算细胞内 ALP 的活性。

2.4 PTS 对 MC3T3-E1 细胞骨钙素 (osteocalcin, OC) mRNA 表达的影响

细胞按每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板,每孔 2 mL,10% FBS 的 α -MEM 培养液培养 24 h 后加入不同浓度 PTS,同时换以含 50 μ g/mL 维生素 C 及 10 mmol/L β -甘油磷酸钠的 5% FBS α -MEM 培养液,每 2 天换液 1 次。培养 21 d 后,去掉培养液,提取总 RNA,用紫外分光光度仪检测 260 nm 和 280 nm 处的吸收度以估计总 RNA 的量和纯度。逆转录过程按 RT-PCR 试剂盒说明书操作。OC 引物上游 5'-CTG GCC CTG GCT GCG CTC TGT-3',引物下游 5'-GGT CCT AAA TAG TGA TAC CGA GAT GC-3'。PCR 反应条件为 95 °C,预变性 2 min,然后 94 °C,30 s;55 °C,30 s;72 °C,30 s;30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳,全自动凝胶成像系统进行扫描,OC

与对应内标 GAPDH 的电泳带灰度的比值为半定量结果。实验重复 3 次。

2.5 PTS 对 MC3T3-E1 细胞矿化结节形成的影响

培养细胞用 Von Kossa 染色法检测矿化结节。细胞按每毫升 1×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 10% FBS 的 α -MEM 培养液培养 24 h 后加入不同浓度 PTS 同时换以含 $50 \mu\text{g/mL}$ 维生素 C 及 10 mmol/L β -甘油磷酸钠的 5% FBS α -MEM 培养液, 每组 6 孔, 2 d 换液 1 次。培养至第 28 天时, 细胞先用冰 PBS 洗两遍, 加入新鲜配制的 5% 硝酸银溶液后置于紫外灯下照射 1 h 细胞用蒸馏水洗 3 遍, 加入 5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 固定 5 min, 蒸馏水洗两遍, 1% 中性红染色 5 min 蒸馏水洗两遍后镜下观察并照相记录矿化结节形成情况。实验重复 3 次。

2.6 PTS 对血清饥饿诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响

细胞按每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 10% FBS 的 α -MEM 培养液培养 24 h 后换以不含血清的 α -MEM 培养液, 同时加入不同浓度 PTS 以等量的 1% FBS α -MEM 培养液作为正常对照组 (normal), 不含血清的 α -MEM 培养液作为血清饥饿组 (control)。培养 48 h 后, 离心收集 1×10^6 个细胞用冰 PBS 洗, 加入 Annexin V / FITC 和 PI 用流式细胞仪检测分析细胞的凋亡比例。实验重复 3 次。

2.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行组间差异显著性检验。

3 结 果

3.1 PTS 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

体外培养的成骨细胞培养液中加入 0.1, 1, $10 \mu\text{g/mL}$ PTS 对成骨细胞的增殖没有显著的影响 (表 1)。

Table 1 Effects of panaxatriol saponins (PTS) on proliferation of MC3T3-E1 cells ($\bar{x} \pm s$ $n = 6$)

Group	<i>c</i> / ($\mu\text{g/mL}$)	Relative proliferation/%
Control		100.00 $\pm$ 8.99
PTS	0.1	105.22 $\pm$ 7.78
	1	111.36 $\pm$ 5.47
	10	105.80 $\pm$ 7.84

3.2 PTS 对 MC3T3-E1 细胞内 ALP 活性的影响

如表 2 所示, 不同浓度 PTS 在作用于成骨细胞

第 7 天和第 14 天后可以显著地提高成骨细胞内 ALP 的活性。PTS 作用 7 d 后, 与对照组相比, $10 \mu\text{g/mL}$ PTS 能够显著增加 ALP 活性 ($P < 0.05$)。PTS 作用 14 d 后, 与对照组相比, $1 \mu\text{g/mL}$ 和 $10 \mu\text{g/mL}$ PTS 均可明显提高 ALP 活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。对处于成熟期的成骨细胞, PTS 能促进其分泌 ALP, 进而促进骨骼钙化。

Table 2 Effect of PTS on the alkaline phosphatase (ALP) activity of MC3T3-E1 cells ($\bar{x} \pm s$ $n = 6$)

Group	<i>c</i> / ($\mu\text{g/mL}$)	Relative activity/%	
		7	14 d
Control		100.00 $\pm$ 9.84	100.00 $\pm$ 16.21
PTS	0.1	107.91 $\pm$ 8.33	110.02 $\pm$ 9.72
	1	113.56 $\pm$ 11.21	116.97 $\pm$ 5.99
	10	119.50 $\pm$ 10.87 [*]	133.56 $\pm$ 13.87 [*]

^{*} $P < 0.05$ ^{*} $P < 0.01$ vs control group

3.3 雌激素受体阻断剂 ICI182780 对 PTS 增加成骨细胞 ALP 活性的影响

如图 1 所示, 成骨细胞诱导分化 14 d 后, $10 \mu\text{g/mL}$ PTS 促成骨细胞 ALP 分泌的作用可被 $1 \mu\text{mol/L}$ ICI182780 所阻断。

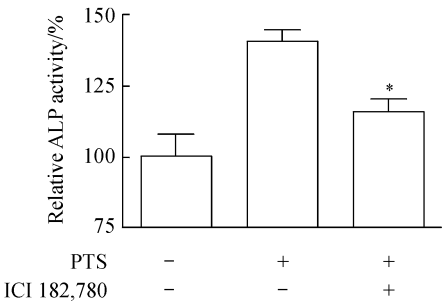


Figure 1 Effects of ICI182780 on ALP activity of MC3T3-E1 cells in the presence of $10 \mu\text{g/mL}$ PTS ($\bar{x} \pm s$ $n = 6$)

^{*} $P < 0.05$ vs PTS group

3.4 PTS 对 MC3T3-E1 细胞 OC mRNA 表达的影响

半定量 RT-PCR 结果显示, 与对照组相比, PTS 作用成骨细胞 21 d 后, 随着 PTS 作用浓度的增加, OC mRNA 的表达量也逐渐的增加。 $10 \mu\text{g/mL}$ PTS 均可显著提高 OC mRNA 的表达 ($P < 0.01$) (图 2)。

3.5 PTS 对 MC3T3-E1 细胞矿化结节形成的影响

MC3T3-E1 细胞在含有 $50 \mu\text{g/mL}$ 维生素 C、 10 mmol/L β -甘油磷酸钠的培养液中培养 28 d 可见细胞基质矿化结节生成, 染色后呈现大小、形态不一的阳性结节 (见图 3)。 $10 \mu\text{g/mL}$ PTS 组矿化结节数明显多于对照组。

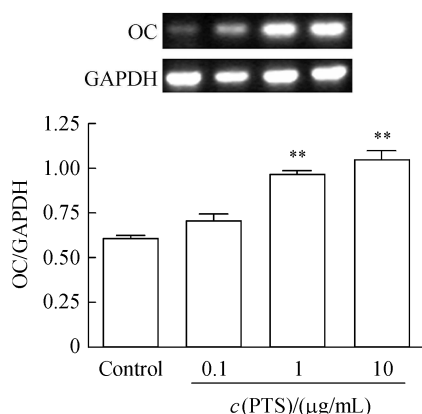


Figure 2 Effects of PTS on the expression of OC mRNA in MC3T3-E1 cells after continuous treatment with PTS and control vehicle for 21 d ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

** $P < 0.01$ vs control group

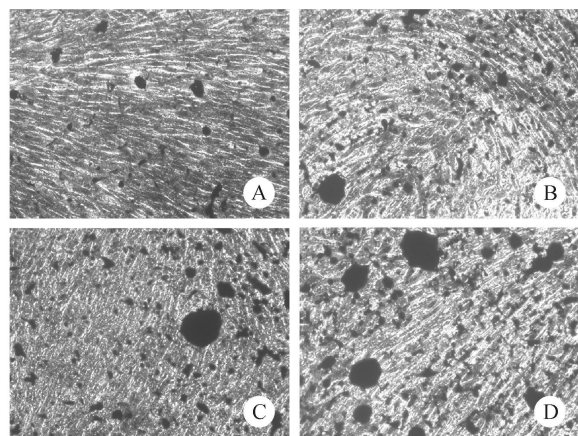


Figure 3 Effects of PTS on mineralization of osteoblast MC3T3-E1 cells dyed with Von Kossa staining ($\times 200$)

A: Control B: PTS (0.1 μg/mL); C: PTS (1 μg/mL); D: PTS (10 μg/mL)

3.6 PTS对血清饥饿诱导的 MC3T3-E1细胞凋亡的影响

由表 3 可知,血清饥饿诱导培养 48 h 后, PTS 在 0.1~10 μg/mL 剂量范围内,早期凋亡细胞百分率随着作用剂量的增加而减少,与对照组相比,1,10 μg/mL PTS 凋亡细胞百分率明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

4 讨论

成骨细胞是骨组织中最重要细胞,它对骨形成和维持正常骨量非常关键。成骨细胞的分化主要经历分裂增殖、基质成熟和矿化这 3 个连续的过程^[6]。

Table 3 Effects of PTS on apoptosis of MC3T3-E1 cells deprived from serum ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Group	c / (μg/mL)	Apoptotic plus necrotic cells/%	Early apoptosis cells/%
Normal		5.9±2.1**	3.6±0.7*
Control		27.2±2.5	12.6±1.0
PTS	0.1	22.0±3.6	9.4±1.7
	1	21.8±4.4	8.3±1.1*
	10	16.5±4.5*	5.4±1.2*

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

ALP 是成骨细胞分化成熟的早期标志,ALP 可以催化有机磷酸盐的水解从而增强矿化作用^[7]。ALP 检测结果显示 PTS 在成骨细胞分化 7 d 和 14 d 时均可促进 ALP 的分泌,但是 PTS 在 7 d 时对 ALP 活性的促进作用没有 14 d 时明显,提示 PTS 可以增强成骨细胞的早期分化而且 PTS 的作用时间也是影响骨基质矿化的一个重要因素。OC 是成骨细胞合成的一种非胶原蛋白,主要分布于细胞外基质,OC 是成骨细胞分化成熟的晚期标志,对骨钙化和矿化具有非常重要的作用。RT-PCR 试验证实,1,10 μg/mL PTS 可以上调成骨细胞 OC 的基因表达,表明 PTS 能够增强成骨细胞晚期分化。

Von Kossa 染色是用于评估钙沉积的常用方法。成骨细胞矿化结果显示,较高浓度 PTS 矿化结节形成的数量和大小较对照组均有不同程度的增加。表明 PTS 可以增加钙沉积,提高胞外钙含量。

有资料显示成骨细胞和破骨细胞异常凋亡是骨形成、骨吸收脱耦联而导致骨质疏松发生的又一重要机制^[8]。本实验观察了 PTS 是否具有抑制血清饥饿法诱导体外培养成骨细胞凋亡的作用。结果显示,1,10 μg/mL PTS 能够有效的抑制成骨细胞凋亡。凋亡的成骨细胞减少则意味着有活性的成骨细胞增多,会有更多成骨细胞填充到破骨细胞所形成的骨吸收陷窝中,从而抑制破骨细胞的骨吸收活性^[9]。

PTS 是三七皂苷的主要活性组分,PTS 主要由三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1 和人参皂苷 Re 所组成。有资料显示人参皂苷 Rg1 和人参皂苷 Re 具有植物雌激素样作用^[10-11]。为研究 PTS 促成骨细胞分化的作用是否与其植物雌激素样作用有关,本实验选用雌激素受体阻断剂 ICI 182780 来阻断成骨细胞上的雌激素受体,结果显示 PTS 的促成骨细胞分化作用被抑制,提示 PTS 对成骨细胞的促成分化作用可能与雌激素受体激动有关。

本实验表明 PTS 可以促进碱性磷酸酶分泌, 增加骨钙素的基因表达, 增强成骨细胞的矿化以及抑制成骨凋亡, 通过作用于成骨细胞的分化、矿化、凋亡等多个环节而促进骨形成, 发挥其骨保护作用。而且 PTS 的促成骨细胞分化作用可以被雌激素受体阻断剂所阻断, 提示 PTS 可能是通过作用于成骨细胞上的雌激素受体而发挥其抗骨质疏松的作用。但是 PTS 中究竟是哪种成分发挥了骨保护作用还需要进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Orija B, Mehta A. Hormone replacement therapy: current controversies[J]. *Clin Endocrinol*, 2003 **59**(5): 657.

[2] Ren P, Ji H, Shao Q, *et al*. Protective effects of sodium daidzein sulfonate on trabecular bone in ovariectomized rats[J]. *Pharmacology*, 2007, **79**(3): 129–136.

[3] 吴丽萍 (Wu LP), 陶天遵 (Tao TZ), 石义刚 (Shi YG), 等. 三七总甙对成骨细胞增殖、分化及 OPG 表达影响的研究[J]. 中国骨质疏松杂志 (*Chin J Osteoporosis*), 2004 **10**(2): 239–243.

[4] 吉光荣 (Ji GR), 董清平 (Dong QP), 姚 猛 (Yao M), 等. 三七总甙对骨髓间质干细胞体外成骨潜能的影响[J]. 中医药

学报 (*Acta Chin Med Pharmacol*), 2007 **35**(5): 14–16.

[5] 李学东 (Li XD), 陈 斌 (Chen B), 郑创义 (Zheng CY), 等. 三七总皂甙通过 P38MAPK 信号通路促进大鼠骨髓基质细胞向成骨细胞的增殖、分化[J]. 中国伤残医学 (*Chin J Trauma Disabil Med*), 2009, **17**(4): 167–168.

[6] Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation[J]. *FASEB J*, 1990 **4**(13): 3 111–3 123.

[7] Kim YJ, Lee MH, Wozney JM, *et al*. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dkk5 and repressed by Msx2[J]. *J Biol Chem*, 2004 **279**(49): 50 773–50 780.

[8] Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis[J]. *Am J Med*, 2000, **108**(2): 153–164.

[9] Lindsay R, Hart DM, Aiken JM, *et al*. Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by estrogen: Evidence for an increased bone mass after delayed onset of estrogen treatment[J]. *Lancet* 1976, **307**(7 968): 1 038–1 041.

[10] Chan RY, Chen WF, Dong A, *et al*. Estrogen-like activity of ginsenoside Rg1 derived from *Panax notoginseng*[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002 **87**(8): 3 691–3 695.

[11] Bae EA, Shin JE, Kim DH. Metabolism of ginsenoside Re by human intestinal microflora and its estrogenic effect[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005 **28**(10): 1 903–1 908.

• 新趋势 •

全球新药研发市场的变化趋势

● 全球医药市场变革风起云涌

2009 年, 全球医药市场的增长率持续下跌, 而美国作为全球最大的医药市场也呈现下挫态势。与此形成巨大反差的新兴市场如中国、巴西、墨西哥等国, 2009 年其增幅高达 12% ~ 13%, 预计在未来 5 年内, 这些新兴市场将以 13% ~ 16% 的增幅继续保持高速增长态势。

今后, 全球医药市场将在新的发展模式下前进, 首先, 在 1985 ~ 2000 年期间, “重磅炸弹”药物的推出使得制药行业巨头们的市值上升了 85 倍, 从而成就了其不可撼动的市场地位。但是, 随之而来的是新药开发的举步维艰和拳头药物专利的逐年到期, 跨国制药巨头们已在积极调整其商业模式。

● 制药产业的全球化趋势

跨国制药企业在新兴市场频繁投资。越来越多的跨国制药企业纷纷在中国设立研发中心, 以实现与总部研发资源的优势对接。

● 并购使公司在治疗领域上产品竞争力提升, 产品多元化发展

医药市场的激烈竞争促使全球制药企业的并购此起彼伏, 导致医药市场集中度不断提高。企业并购的最终目的在于: 一是实现企业产品的多元化发展, 另一个则是增强公司所涉及治疗领域产品的竞争力, 多元化和专注治疗领域两种战略模式都有成功的范例。

● 研发的热点及方向

研发热点大多数集中在生物制品 (如疫苗)、抗糖尿病药、抗肿瘤药等领域。从药品的治疗角度来讲, 跨国制药企业关注的是那些具有明显优越性和竞争优势的产品; 从药品的作用机制来讲, 跨国制药公司则希望产品具有好的选择性或创新性的靶点; 而从新药的技术角度来讲, 他们则希望开发的产品能拥有创新的技术, 并能得到全面的专利保护。

此外, 随着生物技术药物开发的深入, 生物技术药物呈大幅增长态势。2008 年, 全球十大畅销药物排行榜上已有 5 个生物技术产品, 到 2014 年, 全球前六大畅销药物将均为生物技术药物, 而在全球前 100 位畅销药物中, 生物技术药物所占比例将超过 50%。

(医药经济报 本刊有删改)