

· 基础研究 ·

# 黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖的影响及作用机制研究

王刘玉, 万全会, 陈军

(南阳市第二人民医院, 河南 南阳 473003)

**摘要** 目的:探讨黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖的影响及作用机制。方法:将培养的第 3 代 MC-3T3-E1 成骨细胞分为黄芪多糖低、中、高浓度组及黄芪多糖联合抑制剂干预组、对照组,黄芪多糖低、中、高浓度组分别用含有  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪多糖的 DMEM 培养基进行培养,黄芪多糖联合抑制剂干预组用含有  $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪多糖和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Compound C 的 DMEM 培养基进行培养,对照组用 DMEM 培养基进行培养。干预 24 h 后,检测细胞增殖活力及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、B 淋巴细胞瘤-2(B-lymphoblastoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-related X protein, BAX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, Caspase)-3、磷酸化腺苷一磷酸活化蛋白激酶(phosphorylated AMP-activated protein kinase, p-AMPK)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)等基因的蛋白表达情况。结果:①MC-3T3-E1 成骨细胞增殖活力检测结果。黄芪多糖中、高浓度组细胞增殖活力均大于对照组( $\text{LSD-}t = 6.708, P = 0.000$ ;  $\text{LSD-}t = 8.221, P = 0.000$ )和黄芪多糖联合抑制剂干预组( $\text{LSD-}t = 2.314, P = 0.049$ ;  $\text{LSD-}t = 5.286, P = 0.001$ ),黄芪多糖高浓度组细胞增殖活力大于黄芪多糖低、中浓度组( $\text{LSD-}t = 5.579, P = 0.001$ ;  $\text{LSD-}t = 4.423, P = 0.010$ )。②MC-3T3-E1 成骨细胞成骨标志基因蛋白表达检测结果。黄芪多糖低、中、高浓度组细胞 ALP、OCN 的蛋白表达量均高于对照组(ALP:  $\text{LSD-}t = 3.528, P = 0.008$ ;  $\text{LSD-}t = 4.417, P = 0.002$ ;  $\text{LSD-}t = 6.822, P = 0.000$ ; OCN:  $\text{LSD-}t = 3.153, P = 0.014$ ;  $\text{LSD-}t = 6.485, P = 0.000$ ;  $\text{LSD-}t = 6.543, P = 0.000$ )和黄芪多糖联合抑制剂干预组(ALP:  $\text{LSD-}t = 2.414, P = 0.042$ ;  $\text{LSD-}t = 3.155, P = 0.013$ ;  $\text{LSD-}t = 5.892, P = 0.000$ ; OCN:  $\text{LSD-}t = 2.339, P = 0.047$ ;  $\text{LSD-}t = 5.926, P = 0.000$ ;  $\text{LSD-}t = 14.546, P = 0.000$ ),黄芪多糖高浓度组细胞 ALP、OCN 的蛋白表达量高于黄芪多糖低、中浓度组(ALP:  $\text{LSD-}t = 3.727, P = 0.006$ ;  $\text{LSD-}t = 3.702, P = 0.006$ ; OCN:  $\text{LSD-}t = 4.737, P = 0.001$ ;  $\text{LSD-}t = 2.625, P = 0.031$ )。③MC-3T3-E1 成骨细胞线粒体凋亡途径相关基因蛋白表达检测结果。黄芪多糖中、高浓度组细胞 Bcl-2 的蛋白表达量均高于对照组( $\text{LSD-}t = 5.238, P = 0.001$ ;  $\text{LSD-}t = 9.618, P = 0.000$ )和黄芪多糖联合抑制剂干预组( $\text{LSD-}t = 3.821, P = 0.006$ ;  $\text{LSD-}t = 8.246, P = 0.000$ ),黄芪多糖高浓度组细胞 Bcl-2 的蛋白表达量高于黄芪多糖低、中浓度组( $\text{LSD-}t = 8.875, P = 0.001$ ;  $\text{LSD-}t = 6.102, P = 0.000$ );黄芪多糖中、高浓度组细胞 BAX、Caspase-3 的蛋白表达量均低于对照组(BAX:  $\text{LSD-}t = 5.285, P = 0.001$ ;  $\text{LSD-}t = 7.340, P = 0.000$ ; Caspase-3:  $\text{LSD-}t = 3.654, P = 0.006$ ;  $\text{LSD-}t = 6.875, P = 0.000$ )和黄芪多糖联合抑制剂干预组(BAX:  $\text{LSD-}t = 3.654, P = 0.006$ ;  $\text{LSD-}t = 6.875, P = 0.000$ ; Caspase-3:  $\text{LSD-}t = 2.940, P = 0.019$ ;  $\text{LSD-}t = 6.314, P = 0.000$ ),黄芪多糖高浓度组细胞 BAX、Caspase-3 的蛋白表达量均低于黄芪多糖低、中浓度组(BAX:  $\text{LSD-}t = 7.442, P = 0.001$ ;  $\text{LSD-}t = 3.690, P = 0.006$ ; Caspase-3:  $\text{LSD-}t = 4.496, P = 0.002$ ;  $\text{LSD-}t = 4.642, P = 0.002$ )。④MC-3T3-E1 成骨细胞 AMPK/eNOS 信号通路相关基因蛋白表达检测结果。黄芪多糖低、中、高浓度组细胞 p-AMPK、eNOS 的蛋白表达量均高于对照组(p-AMPK:  $\text{LSD-}t = 3.082, P = 0.015$ ;  $\text{LSD-}t = 4.546, P = 0.002$ ;  $\text{LSD-}t = 5.064, P = 0.001$ ; eNOS:  $\text{LSD-}t = 3.395, P = 0.009$ ;  $\text{LSD-}t = 5.873, P = 0.000$ ;  $\text{LSD-}t = 7.327, P = 0.000$ )和黄芪多糖联合抑制剂干预组(p-AMPK:  $\text{LSD-}t = 5.819, P = 0.000$ ;  $\text{LSD-}t = 6.731, P = 0.000$ ;  $\text{LSD-}t = 6.961, P = 0.000$ ; eNOS:  $\text{LSD-}t = 4.851, P = 0.001$ ;  $\text{LSD-}t = 7.761, P = 0.000$ ;  $\text{LSD-}t = 8.200, P = 0.000$ )。黄芪多糖高浓度组细胞 p-AMPK、eNOS 的蛋白表达量高于黄芪多糖低浓度组( $\text{LSD-}t = 3.200, P = 0.013$ ;  $\text{LSD-}t = 4.985, P = 0.001$ )。结论:黄芪多糖能够促进 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖,且该作用具有一定的浓度依赖性,其作用机制可能与调控线粒体凋亡途径及 AMPK/eNOS 信号通路有关。

**关键词** 骨质疏松;成骨细胞;细胞增殖;黄芪多糖;信号传导

## Effects and mechanism of Astragaloside on proliferation of MC-3T3-E1 cells: an experimental study

WANG Liuyu, WAN Quanhui, CHEN Jun

Nanyang Second General Hospital, Nanyang 473003, Henan, China

**ABSTRACT** **Objective:** To investigate the effects and mechanism of Astragaloside on proliferation of MC-3T3-E1 cells. **Methods:** The

MC-3T3-E1 cells were cultured, and the third-generation cells were collected and divided into Astragalan low-concentration group, Astragalan medium-concentration group, Astragalan high-concentration group, Astragalan combined inhibitor intervention group and control group. The MC-3T3-E1 cells in control group were cultured in normal Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), the ones in Astragalan low-, medium- and high-concentration group were cultured in DMEM supplemented with Astragalan with concentration of 0.1, 1.0 and 10 mol/L respectively, and the ones in Astragalan combined inhibitor intervention group were cultured in DMEM supplemented with Astragalan and Compound C with concentration of 10 mol/L and 10  $\mu$ mol/L respectively. After 24-hour culture, the MC-3T3-E1 cells proliferation activity and the protein expression levels of alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN), B-lymphoblastoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-related X protein (BAX), cysteine aspartic acid specific protease (Caspase)-3, phosphorylated AMP-activated protein kinase (p-AMPK) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were detected. **Results:** ①The MC-3T3-E1 cells proliferation activity was higher in Astragalan middle- and high-concentration group compared to control group (LSD- $t$  = 6.708,  $P$  = 0.000; LSD- $t$  = 8.221,  $P$  = 0.000) and Astragalan combined inhibitor intervention group (LSD- $t$  = 2.314,  $P$  = 0.049; LSD- $t$  = 5.286,  $P$  = 0.001), and was higher in Astragalan high-concentration group compared to Astragalan low- and middle-concentration group (LSD- $t$  = 5.579,  $P$  = 0.001; LSD- $t$  = 4.423,  $P$  = 0.010). ②The protein expression levels of ALP and OCN were higher in Astragalan low-, middle- and high-concentration group compared to control group (ALP: LSD- $t$  = 3.528,  $P$  = 0.008; LSD- $t$  = 4.417,  $P$  = 0.002; LSD- $t$  = 6.822,  $P$  = 0.000; OCN: LSD- $t$  = 3.153,  $P$  = 0.014; LSD- $t$  = 6.485,  $P$  = 0.000; LSD- $t$  = 6.543,  $P$  = 0.000) and Astragalan combined inhibitor intervention group (ALP: LSD- $t$  = 2.414,  $P$  = 0.042; LSD- $t$  = 3.155,  $P$  = 0.013; LSD- $t$  = 5.892,  $P$  = 0.000; OCN: LSD- $t$  = 2.339,  $P$  = 0.047; LSD- $t$  = 5.926,  $P$  = 0.000; LSD- $t$  = 14.546,  $P$  = 0.000), and was higher in Astragalan high-concentration group compared to Astragalan low- and middle-concentration group (ALP: LSD- $t$  = 3.727,  $P$  = 0.006; LSD- $t$  = 3.702,  $P$  = 0.006; OCN: LSD- $t$  = 4.737,  $P$  = 0.001; LSD- $t$  = 2.625,  $P$  = 0.031). ③The protein expression level of Bcl-2 was higher in Astragalan middle- and high-concentration group compared to control group (LSD- $t$  = 5.238,  $P$  = 0.001; LSD- $t$  = 9.618,  $P$  = 0.000) and Astragalan combined inhibitor intervention group (LSD- $t$  = 3.821,  $P$  = 0.006; LSD- $t$  = 8.246,  $P$  = 0.000), and was higher in Astragalan high-concentration group compared to Astragalan low- and middle-concentration group (LSD- $t$  = 8.875,  $P$  = 0.001; LSD- $t$  = 6.102,  $P$  = 0.000). The protein expression levels of BAX and Caspase-3 were lower in Astragalan middle- and high-concentration group compared to control group (BAX: LSD- $t$  = 5.285,  $P$  = 0.001; LSD- $t$  = 7.340,  $P$  = 0.000; Caspase-3: LSD- $t$  = 3.654,  $P$  = 0.006; LSD- $t$  = 6.875,  $P$  = 0.000) and Astragalan combined inhibitor intervention group (BAX: LSD- $t$  = 3.654,  $P$  = 0.006; LSD- $t$  = 6.875,  $P$  = 0.000; Caspase-3: LSD- $t$  = 2.940,  $P$  = 0.019; LSD- $t$  = 6.314,  $P$  = 0.000), and was lower in Astragalan high-concentration group compared to Astragalan low- and middle-concentration group (BAX: LSD- $t$  = 7.442,  $P$  = 0.001; LSD- $t$  = 3.690,  $P$  = 0.006; Caspase-3: LSD- $t$  = 4.496,  $P$  = 0.002; LSD- $t$  = 4.642,  $P$  = 0.002). ④The protein expression levels of p-AMPK and eNOS were higher in Astragalan low-, middle- and high-concentration group compared to control group (p-AMPK: LSD- $t$  = 3.082,  $P$  = 0.015; LSD- $t$  = 4.546,  $P$  = 0.002; LSD- $t$  = 5.064,  $P$  = 0.001; eNOS: LSD- $t$  = 3.395,  $P$  = 0.009; LSD- $t$  = 5.873,  $P$  = 0.000; LSD- $t$  = 7.327,  $P$  = 0.000) and Astragalan combined inhibitor intervention group (p-AMPK: LSD- $t$  = 5.819,  $P$  = 0.000; LSD- $t$  = 6.731,  $P$  = 0.000; LSD- $t$  = 6.961,  $P$  = 0.000; eNOS: LSD- $t$  = 4.851,  $P$  = 0.001; LSD- $t$  = 7.761,  $P$  = 0.000; LSD- $t$  = 8.200,  $P$  = 0.000), and was higher in Astragalan high-concentration group compared to Astragalan low-concentration group (LSD- $t$  = 3.200,  $P$  = 0.013; LSD- $t$  = 4.985,  $P$  = 0.001). **Conclusion:** Astragalan can promote the proliferation of MC-3T3-E1 cells, which exhibits a certain concentration-dependence, and its mechanism may be related to the regulation of mitochondrial-mediated apoptosis pathway and AMPK/eNOS signaling pathway.

**Keywords** osteoporosis; osteoblasts; cell proliferation; astragalan; signal transduction

骨质疏松症是以骨量丢失、骨微结构破坏为特征的临床常见骨病,骨质疏松症患者骨骼脆性的增加会使骨折风险增加,不仅影响患者的生活质量,也增加了家庭和社会的经济负担。骨质疏松症的发病涉及多因素、多环节、多机制,其中成骨细胞的增殖和分化受到抑制是造成骨量丢失、骨微结构破坏的重要环节<sup>[1-2]</sup>。因此,调节成骨细胞增殖和分化也被认为是治疗骨质疏松症的重要研究方向。近年来,中药汤剂

在骨质疏松症治疗中的价值受到了越来越多的关注。黄芪是具有补气升阳、益卫固表作用的一味中药,是多种具有补骨作用的中药方剂的重要组成药物<sup>[3-6]</sup>。黄芪多糖是黄芪中的多糖类活性成分,相关研究发现黄芪多糖能够促进间充质干细胞的成骨分化<sup>[7]</sup>,调控成骨细胞中维生素 D 受体、1 $\alpha$ -羟化酶、24-羟化酶的表达<sup>[8-9]</sup>。为了进一步探讨黄芪多糖对成骨细胞增殖的影响及作用机制,我们以 MC-3T3-E1 成骨细胞为

实验对象进行了相关研究,现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验材料** MC-3T3-E1 成骨细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

**1.2 实验试剂** DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Hyclone 公司,黄芪多糖、腺苷一磷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)抑制剂 Compound C(美国 Sigma 公司),MTS 细胞活力检测试剂盒(美国 Promega 公司),放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒(上海碧云天生物科技公司),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、B 淋巴细胞瘤-2(B-lymphoblastoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-related X protein, BAX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, Caspase)-3、磷酸化 AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)一抗及辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白 G 二抗(美国 Abcam 公司),增强型化学发光显影液(美国 Thermo 公司)。

**1.3 实验仪器** HERAcell 240 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司), Synergy LX 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司), ChemiDoc MP 化学显影仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 MC-3T3-E1 成骨细胞培养方法** 用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 MC-3T3-E1 成骨细胞,待细胞铺满培养瓶底面 90% 后,用胰蛋白酶进行消化,按照 1:3 的比例进行传代。传代后的细胞继续贴壁培养和消化传代,收集第 3 代细胞,接种于培养板中进行分组及干预处理。

**2.2 分组及干预方法** 将收集的第 3 代 MC-3T3-E1 成骨细胞,分别接种于 96 孔和 12 孔培养板,各接种 25 孔,各分为黄芪多糖低、中、高浓度组及黄芪多糖联合抑制剂干预组、对照组,每组各 5 孔。黄芪多糖低、中、高浓度组分别用含有  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪多糖的 DMEM 培养基进行培养,黄芪多糖联合抑制剂干预组用含有  $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪多糖和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Compound C 的 DMEM 培养基进行培养,对照组用 DMEM 培养基进行培养。

**2.3 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖活力检测方法** 培养 24 h 后,于 96 孔培养板内,分别加入  $20 \mu\text{L}$  MTS 试剂,置于培养箱中继续培养 4 h。取出培养板后,充分震荡,在酶标仪上测定各样品于 490 nm 波长处的吸光值。

**2.4 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖相关基因蛋白表达检测方法** 培养 24 h 后,弃去 12 孔培养板内的培养基,加入 RIPA 裂解液裂解细胞,离心后提取总蛋白。采用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度,每个样品取  $30 \mu\text{g}$  总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后,将凝胶上的蛋白湿转至硝酸纤维素膜,用 5% 脱脂牛奶在室温封闭 2 h,加入 ALP、OCN、Bcl-2、BAX、Caspase-3、p-AMPK、eNOS 一抗,于  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜;洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白 G 二抗,于室温孵育 2 h;加入增强型化学发光显影液。于化学显影仪中显影、拍照,用 imageJ 软件分析蛋白条带灰度值,以  $\beta$ -肌动蛋白为参考,计算各蛋白的相对表达量。

**2.5 数据统计方法** 采用 SPSS20.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。细胞增殖活力及 ALP、OCN、Bcl-2、BAX、Caspase-3、p-AMPK、eNOS 蛋白表达量的组间比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验;检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

**3.1 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖活力检测结果** 黄芪多糖低、中、高浓度组及黄芪多糖联合抑制剂干预组、对照组细胞增殖活力比较,组间差异有统计学意义( $0.59 \pm 0.06$ ,  $0.71 \pm 0.08$ ,  $0.97 \pm 0.14$ ,  $0.60 \pm 0.07$ ,  $0.41 \pm 0.06$ ,  $F = 28.832$ ,  $P = 0.000$ )。黄芪多糖低、中、高浓度组细胞增殖活力及黄芪多糖联合抑制剂干预组均大于对照组(LSD-*t* = 4.743,  $P = 0.002$ ; LSD-*t* = 6.708,  $P = 0.000$ ; LSD-*t* = 8.221,  $P = 0.000$ ; LSD-*t* = 4.608,  $P = 0.002$ );黄芪多糖低浓度组细胞增殖活力与黄芪多糖联合抑制剂干预组比较,差异无统计学意义(LSD-*t* = 0.243,  $P = 0.811$ ),黄芪多糖中、高浓度组细胞增殖活力均大于黄芪多糖联合抑制剂干预组(LSD-*t* = 2.314,  $P = 0.049$ ; LSD-*t* = 5.286,  $P = 0.001$ );黄芪多糖低、中浓度组细胞增殖活力均小于黄芪多糖高浓度组(LSD-*t* = 5.579,  $P = 0.001$ ; LSD-*t* = 4.423,  $P = 0.010$ );黄芪多糖低浓度组细胞增殖活力

小于黄芪多糖中浓度组( $LSD-t=2.683, P=0.028$ )。

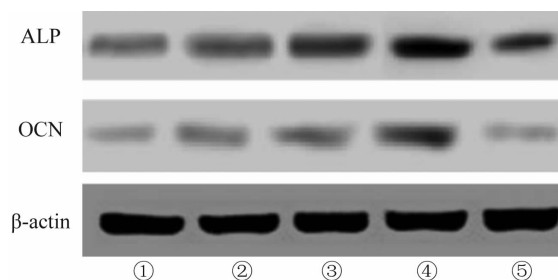
### 3.2 MC-3T3-E1 成骨细胞成骨标志基因蛋白表达

**检测结果** 5 组细胞 ALP、OCN 的蛋白表达量比较, 组间差异均有统计学意义。黄芪多糖低、中、高浓度组细胞 ALP、OCN 的蛋白表达量均高于对照组 (ALP:  $LSD-t=3.528, P=0.008$ ;  $LSD-t=4.417, P=0.002$ ;  $LSD-t=6.822, P=0.000$ ; OCN:  $LSD-t=3.153, P=0.014$ ;  $LSD-t=6.485, P=0.000$ ;  $LSD-t=6.543, P=0.000$ ) 和黄芪多糖联合抑制剂干预组 (ALP:  $LSD-t=2.414, P=0.042$ ;  $LSD-t=3.155, P=0.013$ ;  $LSD-t=5.892, P=0.000$ ; OCN:  $LSD-t=2.339, P=0.047$ ;  $LSD-t=5.926, P=0.000$ ;  $LSD-t=14.546, P=0.000$ ), 黄芪多糖联合抑制剂干预组细胞 ALP、OCN 的蛋白表达量与对照组比较, 差异均无统计学意义 ( $LSD-t=1.186, P=0.270$ ;  $LSD-t=1.145, P=0.285$ ); 黄芪多糖低、中浓度组细胞 ALP、OCN 的蛋白表达量均低于黄芪多糖高浓度组 (ALP:  $LSD-t=3.727, P=0.006$ ;  $LSD-t=3.702, P=0.006$ ; OCN:  $LSD-t=4.737, P=0.001$ ;  $LSD-t=2.625, P=0.031$ ); 黄芪多糖低浓度组细胞 ALP 的蛋白表达量与黄芪多糖中浓度组比较, 差异无统计学意义 ( $LSD-t=0.392, P=0.705$ ), 黄芪多糖低浓度组细胞 OCN 的蛋白表达量低于黄芪多糖中浓度组 ( $LSD-t=3.366, P=0.010$ )。见图 1、表 1。

### 3.3 MC-3T3-E1 成骨细胞线粒体凋亡途径相关基因蛋白表达检测结果

5 组细胞中 Bcl-2、BAX、Caspase-3 的蛋白表达量比较, 组间差异均有统计学意义。黄芪多糖低浓度组、黄芪多糖联合抑制剂干预组细胞 Bcl-2 的蛋白表达量与对照组比较, 差异均无统计学意义 ( $LSD-t=1.746, P=0.119$ ;  $LSD-t=0.859, P=0.415$ ), 黄芪多糖中、高浓度组细胞 Bcl-2 的蛋白表达量均高于对照组 ( $LSD-t=5.238, P=0.001$ ;  $LSD-t=9.618, P=0.000$ ) 和黄芪多糖联合抑制剂干预组

( $LSD-t=3.821, P=0.006$ ;  $LSD-t=8.246, P=0.000$ ); 黄芪多糖低浓度组细胞 Bcl-2 的蛋白表达量与黄芪多糖联合抑制剂干预组比较, 差异无统计学意义 ( $LSD-t=0.620, P=0.552$ ); 黄芪多糖低、中浓度组细胞 Bcl-2 的蛋白表达量均低于黄芪多糖高浓度组 ( $LSD-t=8.875, P=0.001$ ;  $LSD-t=6.102, P=0.000$ ); 黄芪多糖低浓度组细胞 Bcl-2 的蛋白表达量低于黄芪多糖中浓度组 ( $LSD-t=3.953, P=0.004$ )。



注: ALP 为碱性磷酸酶, OCN 为骨钙素,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, ①为对照组, ②为黄芪多糖低浓度组, ③为黄芪多糖中浓度组, ④为黄芪多糖高浓度组, ⑤为黄芪多糖联合抑制剂干预组。

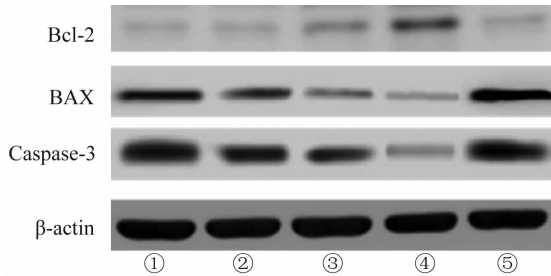
图 1 5 组 MC-3T3-E1 成骨细胞成骨标志基因蛋白表达蛋白印迹法检测结果

黄芪多糖低浓度组细胞 BAX 的蛋白表达量与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $LSD-t=1.881, P=0.097$ ), Caspase-3 的蛋白表达量低于对照组 ( $LSD-t=2.907, P=0.020$ ); 黄芪多糖中、高浓度组细胞 BAX、Caspase-3 的蛋白表达量均低于对照组 (BAX:  $LSD-t=5.285, P=0.001$ ;  $LSD-t=7.340, P=0.000$ ; Caspase-3:  $LSD-t=3.654, P=0.006$ ;  $LSD-t=6.875, P=0.000$ ) 和黄芪多糖联合抑制剂干预组 (BAX:  $LSD-t=3.654, P=0.006$ ;  $LSD-t=6.875, P=0.000$ ; Caspase-3:  $LSD-t=2.940, P=0.019$ ;  $LSD-t=6.314, P=0.000$ ), 黄芪多糖联合抑制剂干预组细胞 BAX、Caspase-3 的蛋白表达量与对照组比较, 差异均无统计学意义 ( $LSD-t=1.053, P=0.323$ ;  $LSD-t=0.714,$

表 1 5 组 MC-3T3-E1 成骨细胞成骨标志基因蛋白相对表达量

组别	样本量/孔	碱性磷酸酶( $\bar{x} \pm s$ )	骨钙素( $\bar{x} \pm s$ )
黄芪多糖低浓度组	5	$0.60 \pm 0.09$	$0.44 \pm 0.07$
黄芪多糖中浓度组	5	$0.62 \pm 0.07$	$0.60 \pm 0.08$
黄芪多糖高浓度组	5	$0.85 \pm 0.12$	$0.81 \pm 0.16$
黄芪多糖联合抑制剂干预组	5	$0.47 \pm 0.08$	$0.35 \pm 0.05$
对照组	5	$0.41 \pm 0.08$	$0.31 \pm 0.06$
F 值		14.353	19.567
P 值		0.000	0.003

$P=0.496$ ); 黄芪多糖低浓度组细胞 BAX 的蛋白表达量均低于黄芪多糖联合抑制剂干预组 ( $LSD-t=3.253, P=0.012$ ); Caspase-3 的蛋白表达量与黄芪多糖联合抑制剂干预组比较, 差异无统计学意义 ( $LSD-t=2.212, P=0.058$ ); 黄芪多糖低、中浓度组细胞 BAX、Caspase-3 的蛋白表达量均高于黄芪多糖高浓度组 (BAX:  $LSD-t=7.442, P=0.001$ ;  $LSD-t=3.690, P=0.006$ ; Caspase-3:  $LSD-t=4.496, P=0.002$ ;  $LSD-t=4.642, P=0.002$ ); 黄芪多糖低浓度组细胞 BAX 的蛋白表达量高于黄芪多糖中浓度组 ( $LSD-t=4.548, P=0.002$ ), 黄芪多糖低浓度组细胞 Caspase-3 的蛋白表达量与黄芪多糖中浓度组比较, 差异无统计学意义 ( $LSD-t=1.728, P=0.088$ )。见图 2、表 2。

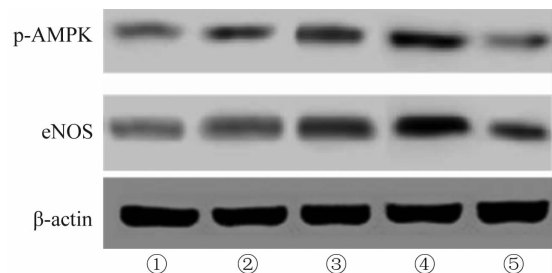


注: Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤-2, BAX 为 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白, Caspase-3 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, ①为对照组, ②为黄芪多糖低浓度组, ③为黄芪多糖中浓度组, ④为黄芪多糖高浓度组, ⑤为黄芪多糖联合抑制剂干预组。

图 2 5 组 MC-3T3-E1 成骨细胞线粒体凋亡途径相关基因蛋白表达蛋白印迹法检测结果

**3.4 MC-3T3-E1 成骨细胞 AMPK/eNOS 信号通路相关基因蛋白表达检测结果** 5 组细胞中 p-AMPK、eNOS 的蛋白表达量比较, 组间差异均有统计学意义。黄芪多糖低、中、高浓度组细胞 p-AMPK、eNOS 的蛋白表达量均高于对照组 (p-AMPK:  $LSD-t=3.082, P=$

$0.015$ ;  $LSD-t=4.546, P=0.002$ ;  $LSD-t=5.064, P=0.001$ ; eNOS:  $LSD-t=3.395, P=0.009$ ;  $LSD-t=5.873, P=0.000$ ;  $LSD-t=7.327, P=0.000$ ) 和黄芪多糖联合抑制剂干预组 (p-AMPK:  $LSD-t=5.819, P=0.000$ ;  $LSD-t=6.731, P=0.000$ ;  $LSD-t=6.961, P=0.000$ ; eNOS:  $LSD-t=4.851, P=0.001$ ;  $LSD-t=7.761, P=0.000$ ;  $LSD-t=8.200, P=0.000$ ), 黄芪多糖联合抑制剂干预组细胞 p-AMPK、eNOS 的蛋白表达量与对照组比较, 差异均无统计学意义 ( $LSD-t=1.893, P=0.095$ ;  $LSD-t=1.455, P=0.184$ ); 黄芪多糖中、高浓度组细胞 p-AMPK、eNOS 的蛋白表达量均高于黄芪低糖高浓度组 (p-AMPK:  $LSD-t=2.370, P=0.045$ ;  $LSD-t=3.200, P=0.013$ ; eNOS:  $LSD-t=2.910, P=0.020$ ;  $LSD-t=4.985, P=0.001$ ); 黄芪多糖中浓度组细胞 p-AMPK 的蛋白表达量与黄芪多糖高浓度组比较, 差异无统计学意义 ( $LSD-t=1.048, P=0.325$ ), 黄芪多糖中浓度组细胞 eNOS 的蛋白表达量低于黄芪多糖高浓度组 ( $LSD-t=2.564, P=0.033$ )。见图 3、表 3。



注: p-AMPK 为磷酸化腺苷一磷酸活化蛋白激酶, eNOS 为内皮型一氧化氮合酶,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, ①为对照组, ②为黄芪多糖低浓度组, ③为黄芪多糖中浓度组, ④为黄芪多糖高浓度组, ⑤为黄芪多糖联合抑制剂干预组。

图 3 5 组 MC-3T3-E1 成骨细胞磷酸化腺苷一磷酸活化蛋白激酶/内皮型一氧化氮合酶信号通路相关基因蛋白表达蛋白印迹法检测结果

表 2 5 组 MC-3T3-E1 成骨细胞线粒体凋亡途径相关基因蛋白相对表达量

组别	样本量/孔	B 淋巴细胞瘤-2 ( $\bar{x} \pm s$ )	B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 ( $\bar{x} \pm s$ )	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 ( $\bar{x} \pm s$ )
黄芪多糖低浓度组	5	$0.26 \pm 0.04$	$0.67 \pm 0.09$	$0.70 \pm 0.12$
黄芪多糖中浓度组	5	$0.36 \pm 0.04$	$0.45 \pm 0.06$	$0.66 \pm 0.09$
黄芪多糖高浓度组	5	$0.58 \pm 0.07$	$0.31 \pm 0.06$	$0.41 \pm 0.08$
黄芪多糖联合抑制剂干预组	5	$0.24 \pm 0.06$	$0.90 \pm 0.13$	$0.89 \pm 0.15$
对照组	5	$0.21 \pm 0.05$	$0.81 \pm 0.14$	$0.96 \pm 0.16$
F 值		31.972	23.328	12.112
P 值		0.000	0.000	0.000

表 3 5 组 MC-3T3-E1 成骨细胞磷酸化腺苷一磷酸活化蛋白激酶/内皮型一氧化氮合酶信号通路相关基因蛋白相对表达量

组别	样本量/孔	磷酸化腺苷一磷酸活化蛋白激酶	内皮型一氧化氮合酶
黄芪多糖低浓度组	5	0.67 ± 0.11	0.72 ± 0.13
黄芪多糖中浓度组	5	0.74 ± 0.14	0.84 ± 0.16
黄芪多糖高浓度组	5	0.80 ± 0.15	0.98 ± 0.15
黄芪多糖联合抑制剂干预组	5	0.42 ± 0.07	0.52 ± 0.06
对照组	5	0.51 ± 0.08	0.58 ± 0.07
<i>F</i> 值		16.437	26.163
<i>P</i> 值		0.000	0.000

#### 4 讨 论

成骨细胞的分化和增殖受到抑制是骨质疏松发生和发展过程中的重要病理环节。成骨细胞参与骨形成过程,其正常的分化与增殖能够保证机体的骨量及骨质量;而成骨细胞的分化和增殖受到抑制,则会导致机体骨量丢失、骨微结构改变,进而逐步发展为骨质疏松症。黄芪是补肾壮骨汤、益肾补骨汤等用于治疗骨质疏松症中药方剂中的君药。黄芪多糖是中药黄芪中的有效成分,具有促进细胞增殖、抑制炎症反应、减少自由基生成等多种生物学作用<sup>[10-13]</sup>。有研究<sup>[7,14-15]</sup>发现,黄芪多糖能够促进间充质干细胞的成骨分化。但对于黄芪多糖对成骨细胞增殖的影响尚未明确。我们采用不同浓度的黄芪多糖干预 MC-3T3-E1 成骨细胞,并检测 MC-3T3-E1 成骨细胞的增殖活力,结果显示,浓度为 10 mol · L<sup>-1</sup> 的黄芪多糖能够显著增强 MC-3T3-E1 成骨细胞的增殖活力,且 MC-3T3-E1 成骨细胞中成骨标志基因 ALP 及 OCN 的蛋白表达量随黄芪多糖浓度升高而显著增加。

成骨细胞增殖受到抑制与线粒体凋亡途径的过度激活关系密切。线粒体释放细胞色素 C 进入细胞浆,细胞色素 C 能够通过一系列的级联反应激活 Caspase-3,进而诱发细胞凋亡<sup>[16]</sup>。BAX 和 Bcl-2 是调控线粒体途径凋亡的重要蛋白,BAX 能通过促进线粒体释放细胞色素 C,进而诱发细胞凋亡;而 Bcl-2 则能够拮抗 BAX,抑制细胞色素 C 的释放及线粒体凋亡途径的激活<sup>[17-18]</sup>。相关研究发现,骨质疏松组织中 Bcl-2 的蛋白表达量减少,而 BAX、Caspase-3 的蛋白表达量升高<sup>[19-20]</sup>。我们研究发现,MC-3T3-E1 成骨细胞 Bcl-2 的蛋白表达量随黄芪多糖浓度升高而显著增加,而 BAX 和 Caspase-3 的蛋白表达量随黄芪多糖浓度升高而显著降低。因此,黄芪多糖可能通过抑制成骨细胞中线粒体凋亡途径的激活,进而减少成骨细胞凋亡。

AMPK/eNOS 信号通路参与调控细胞的增殖和凋

亡<sup>[21-22]</sup>。多项研究<sup>[23-25]</sup>发现,黄芪多糖能够通过激活 AMPK/eNOS 信号通路减轻细胞损伤。我们分析了不同浓度黄芪多糖干预后 MC-3T3-E1 成骨细胞 AMPK/eNOS 信号通路相关基因的蛋白表达,结果显示随黄芪多糖浓度增加,MC-3T3-E1 成骨细胞 p-AMPK 和 eNOS 的蛋白表达量显著增加,提示黄芪多糖能够促进成骨细胞中 AMPK/eNOS 信号通路的激活。为了进一步验证 AMPK/eNOS 信号通路黄芪多糖促进细胞增殖的关系,我们采用 AMPK 抑制剂 Compound C 联合 10 mol · L<sup>-1</sup> 的黄芪多糖干预 MC-3T3-E1 成骨细胞,结果显示,黄芪多糖联合抑制剂干预组细胞中 p-AMPK、eNOS 的蛋白表达量低于黄芪多糖高浓度组,而细胞增殖活力小于黄芪多糖高浓度组,ALP、OCN、Bcl-2 的蛋白表达量均低于黄芪多糖高浓度组,BAX、Caspase-3 的蛋白表达量均高于黄芪多糖高浓度组。因此,我们认为黄芪多糖对成骨细胞增殖的调控作用依赖于 AMPK/eNOS 信号通路的激活。

本研究结果表明,黄芪多糖能够促进 MC-3T3-E1 成骨细胞增殖,且该作用具有一定的浓度依赖性,其作用机制可能与调控线粒体凋亡途径及 AMPK/eNOS 信号通路有关。

#### 参考文献

- [1] JILKA R L, O' BRIEN C A. The role of osteocytes in age-related bone loss[J]. Curr Osteoporos Rep, 2016, 14(1): 16-25.
- [2] TSAO Y T, HUANG Y J, WU H H, et al. Osteocalcin mediates biomineralization during osteogenic maturation in human mesenchymal stromal cells[J]. Int J MolSci, 2017, 18(1): E159.
- [3] 邓宇, 刘奎, 陈廖斌. 补肾壮骨汤联合经皮椎体后凸成形术治疗老年骨质疏松性胸腰椎压缩性骨折[J]. 中医学报, 2017, 32(10): 1890-1894.
- [4] 李关鑫, 郑金尧, 冯伟利. 益肾补骨汤联合椎体成形术治疗老年骨质疏松性胸腰椎压缩骨折 76 例[J]. 中医研究, 2019, 32(3): 41-43.

- [5] SHI J X, CAI X Q, ZHAO Z H, et al. Mechanism of Huangqi Sanxian Decoction inhibiting osteoclast differentiation based on network pharmacology [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 8769531.
- [6] 邓艳玲, 翁文玉, 招泽豪, 等. 黄芪三仙汤抗绝经后骨质疏松作用机制的研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(4): 898 – 907.
- [7] 王磊, 卢志伟, 许小敏, 等. 黄芪多糖对 X 线辐射骨髓间充质干细胞向成骨方向分化的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(12): 47 – 51.
- [8] 柴艺汇, 高洁, 田兴中, 等. 黄芪多糖对 MC-3T3-E1 成骨细胞 CYP27B, CYP24A mRNA 及蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 147 – 151.
- [9] 柴艺汇, 高洁, 陈云志, 等. 黄芪多糖对小鼠 MC-3T3-E1 成骨细胞维生素 D 受体 mRNA 及蛋白表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(6): 1281 – 1283.
- [10] LIU T, ZHANG M, NIU H, et al. Astragalus polysaccharide from Astragalus Melittin ameliorates inflammation via suppressing the activation of TLR-4/NF- $\kappa$ B p65 signal pathway and protects mice from CVB3-induced virus myocarditis [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 126: 179 – 186.
- [11] ZHOU J, ZHANG N, ZHAO L, et al. Astragalus polysaccharides and saponins alleviate liver injury and regulate gut microbiota in alcohol liver disease mice [J]. Foods, 2021, 10(11): 2688.
- [12] SUN Q, WU X, WANG H, et al. Protective effects of astragalus polysaccharides on oxidative stress in high glucose-induced or SOD2-silenced H9C2 cells based on PCR array analysis [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2019, 25(12): 2209 – 2220.
- [13] SUN S, YANG S, AN N, et al. Astragalus polysaccharides inhibits cardiomyocyte apoptosis during diabetic cardiomyopathy via the endoplasmic reticulum stress pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 28(238): 111857.
- [14] YANG F, YAN G, LI Y, et al. Astragalus polysaccharide attenuated iron overload-induced dysfunction of mesenchymal stem cells via suppressing mitochondrial ROS [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(4): 1369 – 1379.
- [15] LI Q, XING W, GONG X, et al. Astragalus polysaccharide promotes proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells by down-regulation of microRNA-152 [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115: 108927.
- [16] XU F, REN L, SONG M, et al. Fas-and mitochondria-mediated signaling pathway involved in osteoblast apoptosis induced by AlCl<sub>3</sub> [J]. Biol Trace Elem Res, 2018, 184(1): 173 – 185.
- [17] NIE Z, CHEN S, DENG S, et al. Gene expression profiling of osteoblasts subjected to dexamethasone-induced apoptosis with/without GSK3 $\beta$ -shRNA [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 506(1): 41 – 47.
- [18] IGUCHI M, HIROI M, KANEGAE H, et al. Costimulation of murine osteoblasts with interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  induces apoptosis through downregulation of Bcl-2 and release of cytochrome c from mitochondria [J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 3979606.
- [19] DENG S, NIE Z G, PENG P J, et al. Decrease of GSK3 $\beta$  Ser-9 phosphorylation induced osteoblast apoptosis in rat osteoarthritis model [J]. Curr Med Sci, 2019, 39(1): 75 – 80.
- [20] PANG T, GONG M, HAN J, et al. Relationship between osteoporosis and expression of Bcl-2 and CXCL12 [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2): 1293 – 1297.
- [21] KANAZAWA I, TAKENO A, TANAKA K I, et al. Osteoblast AMP-activated protein kinase regulates glucose metabolism and bone mass in adult mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(3): 1955 – 1961.
- [22] KUWANA M, WATANABE H, ABE S, et al. Expression of Mn-SOD, iNOS and eNOS mRNAs in osteoblasts from the maxilla of osteopetrotic mice [J]. Anat Histol Embryol, 2013, 142(2): 124 – 129.
- [23] 宋杰, 胡阳黔, 刘坚, 等. 黄芪多糖通过活化 AMPK-eNOS 信号通路减轻游离脂肪酸对人血管内皮细胞的损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(7): 1305 – 1308.
- [24] ZHANG R, QIN X, ZHANG T, et al. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes [J]. Molecules, 2018, 23(10): 2711.
- [25] TUO X, DENG Z, HUANG G, et al. Astragalus polysaccharide attenuates overexercise-induced myocardial injury via activating AMPK signaling pathway to suppress inflammation and oxidative stress [J]. An Acad Bras Cienc, 2021, 94(1): e20210314.

(收稿日期: 2022-05-29 本文编辑: 吕宁)