

• 口腔生物学与口腔材料学研究 •

丹参素对牙槽骨成骨细胞细胞核因子- κ B 受体活化因子配体/骨保护素表达的影响研究

张晓燕* 刘运新 吴铁

(广东医科大学 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的:探讨丹参素对大鼠牙槽骨成骨细胞的细胞核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)和骨保护素(osteoprotegerin, OPG)表达的影响。方法:采用体外牙槽骨成骨细胞培养,用含不同浓度(0.10、0.50、1.00、5.00 mg/L)的丹参素血清分别作用于第4代牙槽骨成骨细胞,培养1、3和5 d后,分别通过噻唑蓝(methyl thiazol tetrazolium, MTT)、逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和 Western blot 法检测成骨细胞增殖率、OPG 和 RANKL mRNA 及蛋白表达水平。结果:丹参素对牙槽骨成骨细胞增殖的影响随药物浓度和时间变化而改变,其中含 5.00 mg/L 丹参素的血清作用 3 d 后牙槽骨成骨细胞增殖率最高,OPG mRNA 和蛋白表达增加($P < 0.05$)。结论:丹参素能通过增加 OPG mRNA 和蛋白表达进而促进牙槽骨成骨细胞增殖。

[关键词] 成骨细胞 细胞核因子- κ B 受体活化因子配体/骨保护素 牙槽骨 骨质疏松 丹参素

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)09—0894—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.09.018

Effects of Tanshinol on RANKL/OPG of Alveolar Osteoblasts. ZHANG Xiaoyan*, LIU Yunxin, WU Tie. Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of tanshinol on the RANKL/OPG expression of alveolar osteoblasts. **Methods:** Alveolar osteoblasts of SD rats were cultured by primary cell culture. The alveolar osteoblasts of the fourth generation were treated with different concentrations (0.01, 0.10, 0.50, 1.00, 5.00 mg/L) of tanshinol serum. The proliferation rate of osteoblasts and the mRNA and protein expression levels of OPG and RANKL were detected by MTT, RT-PCR, and western blotting after the use of different concentrations of tanshinol serum on 1 d, 3 d, and 5 d, respectively. **Results:** The effect of tanshinol on the proliferation of alveolar osteoblasts varied with concentration and time of drugs. The proliferation rate was the highest when the alveolar osteoblasts were treated with 5 mg/L tanshinol at day 3. Compared with the control group, OPG mRNA and protein expression increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tanshinol could promote the proliferation of alveolar osteoblasts by increasing the expression of OPG mRNA and protein.

[Key words] osteoblast OPG/RANKL alveolar bone osteoporosis tanshinol

统计表明,人类步入 21 世纪的同时也步入了老龄化社会,预测 2050 年全世界 60 岁以上的老年人口数量将占总人口数的 21%。老年社会的来临使牙槽骨骨质疏松患者越来越多,牙槽骨骨质疏松可导致一系列口腔问题,如骨量和骨密度下降^[1]、牙折、龋齿、牙种植失败、牙槽嵴吸收、牙松动、牙脱落

和牙周病^[2,3]等,而这些口腔问题是影响老年人咀嚼、发音及保持面部协调美观和功能的主要因素。在老龄化社会,牙槽骨骨质疏松的患病率和发病率不断升高,随之导致的口腔问题也越来越多,所以想维护老年人口腔健康,提高生活质量,防治牙槽骨骨质疏松是至关重要的。

胰岛素样生长因子 I (insulin-like growth factor I, IGF-I) 是骨骼中含量最丰富的生长因子之一,是调节成骨细胞功能和代谢的重要因子,也是成骨细胞促有丝分裂剂,能促进成骨细胞增殖和分化^[4,5]。本课题组一直致力于寻找防治牙槽骨骨质

基金项目 广东省科技计划项目(编号:2013B021800071)

广东省中医药局项目(编号:20121114)

作者简介 张晓燕(1978~),女,广东梅州人,博士,副教授,主要从事骨质疏松、炎症的研究。

* 通信作者 张晓燕, E-mail: zxyivy611@163.com

疏松药物的研究工作,前期研究发现丹参水溶性成分——丹参素能增加牙槽骨组织 IGF-I 的表达,防止去卵巢大鼠牙槽骨丢失^[6,7],提示丹参素能有效防止去卵巢大鼠牙槽骨丢失与其增加骨组织中 IGF-I 的表达、调节成骨细胞功能活性、促进骨形成有关。

RANKL/RANK/OPG 骨调节轴由细胞核因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)、细胞核因子- κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK) 和骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 组成。研究发现,许多激素和细胞因子通过直接或间接调节 RANKL/RANK/OPG 轴影响骨细胞生物活性^[8,9]。丹参素防治牙槽骨骨质疏松与其调节成骨细胞功能活性相关,为了进一步研究丹参素防治牙槽骨骨质疏松的机制,本研究通过探讨丹参素对牙槽骨细胞 RANKL/RANK/OPG 轴的影响,为丹参素防治牙槽骨骨质疏松的作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器 动物:出生 24 h 的 SD 大鼠。试剂:丹参素购自北京中国药品生物制品检定所;胰蛋白酶、Trizol Reagent、DMEM 和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Sigma 公司;抗 OPG 抗体和抗 RANKL 抗体购自 Abcam 公司;逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒购自 Promega 公司。仪器:台式微量高速离心机和高速冷冻离心机购自美国 Beckman 公司;PCR 仪购自德国 Biometra 公司;凝胶图象分析仪购自法国 Vilber Lourmat 公司;−80 °C 超低温冰箱和 CO₂ 培养箱购自美国 New Brunswick Scientific 公司;光学倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 牙槽骨成骨细胞培养 选取新生 SD 大鼠,处死后置于 75% 乙醇中浸泡 5 min,取下颌牙槽骨置于含青、链霉素的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中,剔除肌肉、筋膜及牙齿等组织,以 PBS 清洗 3 次,将其剪成约 1 mm² 的骨片;将骨片移入 0.25% 胰酶中,37 °C 消化 10 min,离心,弃上清,将消化剩余的骨片置于培养皿中,加入 DMEM 静置后吸弃上清,再加入 DMEM,静置后吸弃上清,反复 3 次。将培养皿中的骨片摊开,加入含 10% FBS 的 DMEM,在 5% CO₂、37 °C 恒温条件下培养,24 h 换培养液 1 次,细胞融合度达到 80% 时

进行传代。

1.2.2 牙槽骨成骨细胞增殖率的测定 细胞传至第 3 代,将细胞接种于 24 孔板内,分别将丹参素含药血清 (0.10、0.50、1.00、5.00 mg/L) 加入第 3 代培养的细胞中,对照组加入等体积不含药血清,24 h 换培养液 1 次。分别在相应的检测时间点,每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 g/L),37 °C 孵育 4 h;吸弃上清,每孔加入 180 μ L 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO),振荡 15 min,使结晶物充分溶解;吸取 100 μ L 溶液到 96 孔板新的孔内,测定各孔样品 490 nm 处 A 值。

1.2.3 牙槽骨成骨细胞 OPG/RANKL 蛋白表达检测 用预冷 PBS 清洗细胞 3 次,细胞刮刮脱细胞,收集至离心管,PBS 洗涤后,将细胞转移至洁净 Ep 管。在洗涤好的细胞中加入细胞裂解液,移液器反复吹打至蛋白析出。冰上静置 30 min,14000 r/min,4 °C 离心 15 min,上清即为细胞全蛋白提取物。以二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度检测法测定蛋白含量后置 −80 °C 冰箱保存备用。取 40 μ g 总蛋白,在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 后转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上,用 5% 脱脂牛奶 [溶剂为 Tris-HCl 缓冲液 (Tris- buffered saline Tween20, TBST) 溶液] 摇床封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜后在摇床上用 TBST 洗脱 3 次,加入二抗,摇床上室温孵育 1 h,用 TBST 摇床上洗脱 3 次,经化学发光底物显色,在凝胶成像系统中成像,图像分析读取条带灰度值。

1.2.4 成骨细胞 OPG/RANKL mRNA 检测 加入 Trizol 裂解细胞,提取总 RNA,−20 °C 冻存备用。取 2.0 μ g 总 RNA,用逆转录试剂盒合成 cDNA,PCR 扩增,以 β -肌动蛋白 (β -actin) 为内参。根据 Genbank 上的大鼠 RANKL、OPG 和 β -actin 基因的碱基序列设计基因扩增引物。引物分别如下:OPG 上游引物:5'-CTGAGCTTGTGGAG-GATCAAA-3',OPG 下游引物 5'-TGGTGAAGCT-GTGCAAGAA-3',扩增片段为 145 bp;RANKL 上游引物 5'-TATGATGGAAGGTTCTGGCT-3',RANKL 下游引物 5'-AAGAGGACAGACT-GACTTTATGGG-3',扩增片段为 125 bp; β -actin 上游引物 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3', β -actin 下游引物 5'-GAGGCATACAGGGACAA-CACAG-3',扩增片段为 102 bp。以上引物序列由

华大基因公司合成。OPG 基因反应条件:50 ℃ 30 min;95 ℃ 2 min、95 ℃ 20 s、57 ℃ 30 s、68 ℃ 30 s, 39 个循环。RNAKL 基因反应条件:50 ℃ 30 min; 95 ℃ 2 min、95 ℃ 20 s、59 ℃ 30 s、68 ℃ 30 s,9 个循环。

1.3 统计学分析 运用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学分析。所有数据进行正态性检验。正态分布的多个样本均数的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参素对牙槽骨成骨细胞增殖的影响 由表 1 可知,牙槽骨成骨细胞增殖率随着丹参素的浓度增加(0.10、0.50、1.00、5.00 mg/L)而增加,丹参素促进牙槽骨成骨细胞增殖作用随时间延长明显增加,第 3 天达到峰值。其中,5.00 mg/L 丹参素作用 3 d 后牙槽骨成骨细胞增殖率最高。

表 1 丹参素对牙槽骨成骨细胞增殖的影响
Tab. 1 Effects of tanshinol on the proliferation of alveolar osteoblasts

浓度/ mg · L ⁻¹	1 d	3 d	5 d
对照组	0.12±0.11	0.22±0.11	0.16±0.11
0.10	0.69±0.44	9.90±0.09*	4.80±0.74*
0.50	5.31±0.42*	22.41±0.42*	16.82±0.47*
1.00	5.79±0.42*	28.82±0.15*	24.96±0.87*
5.00	10.61±0.40*	37.96±0.47*	30.66±0.47*

注:与对照组比较,* *P* < 0.05

2.2 丹参素对牙槽骨成骨细胞 RANKL 和 OPG 蛋白表达的影响 从图 1 和表 2 可见,与对照组比较,5.00 mg/L 丹参素作用于牙槽骨成骨细胞 3 d 后,牙槽骨成骨细胞 OPG 蛋白表达增加(*P* < 0.05)。从图 2 和表 2 可见,与对照组比较,

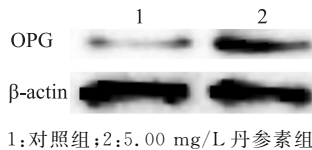


图 1 丹参素对牙槽骨成骨细胞 OPG 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of tanshinol on OPG protein expression of alveolar osteoblasts.

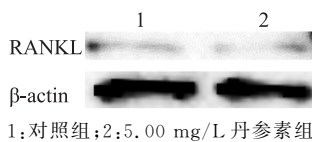


图 2 丹参素对牙槽骨成骨细胞 RANKL 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of tanshinol on RANKL protein expression of alveolar osteoblasts.

5.00 mg/L 丹参素作用于牙槽骨成骨细胞 3 d 后,牙槽骨成骨细胞 RANKL 蛋白表达与对照组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.3 丹参素对牙槽骨成骨细胞 RANKL/OPG mRNA 的影响 由表 3 可知,与对照组比较,5.00 mg/L 丹参素作用于牙槽骨成骨细胞 3 d 后,牙槽骨成骨细胞 OPG mRNA 表达增加(*P* < 0.05);牙槽骨成骨细胞 RANKL mRNA 表达差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 2 丹参素对牙槽骨成骨细胞 OPG 和 RANKL 蛋白表达的影响
Tab. 2 Effects of tanshinol on the OPG and RANKL protein of alveolar osteoblasts

组别	RANKL	OPG
对照组	0.36±0.04	0.38±0.02
5.00 mg/L 丹参素组	0.35±0.04	0.61±0.02*

注:与对照组比较,* *P* < 0.05

表 3 丹参素对牙槽骨成骨细胞 OPG 和 RANKL mRNA 的影响
Tab. 3 Effects of tanshinol on the OPG and RANKL mRNA of alveolar osteoblasts

组别	RANKL	OPG
对照组	0.92±0.04	1.04±0.02
5.00 mg/L 丹参素组	0.96±0.05	2.22±0.08*

注:与对照组比较,* *P* < 0.05

3 讨论

老年社会中牙槽骨骨质疏松患者越来越多,牙槽骨骨质疏松可导致一系列口腔问题,如增加牙折、龋齿、牙周病、牙松动和牙脱落的发病率,降低口腔内人工牙种植的成功率。防治牙槽骨骨质疏松的药物可显著改善上述口腔问题,提高患者生活质量。防治牙槽骨骨质疏松是我们面临的严峻公共卫生问题,所以研发防治牙槽骨骨质疏松的药物具有重要的临床意义。

成骨细胞功能降低和破骨细胞功能亢进导致骨重建平衡失调,全身骨量降低,骨组织超微结构破坏,骨脆性增加,发生骨质疏松。骨重建过程中,成骨细胞是调控骨吸收的中心细胞,成骨细胞可分泌 OPG,OPG 能直接与 RANKL 竞争抑制 RANK 受体;同时,OPG 还可与 RANKL/RANK 结合形成三聚体,直接抑制 RANKL/RANK 的作用,进而抑制破骨细胞分化和成熟^[10],对 RANKL/RANK/OPG 轴的调节直接影响破骨细胞和成骨细胞功能,影响骨代谢。当缺乏 OPG 时机体发生骨质疏松,而应用 OPG 能提高骨强度和骨密度,防止骨丢失^[11];应用 RANKL 抗体对抗 RANKL 后,可抑制破骨细胞

分化和功能,降低骨转换,增加骨量、骨密度和骨强度^[12]。可见,引起 OPG 表达减少或者 RANKL 表达上升的因素都可导致骨质疏松发生,而增加 OPG 表达或抑制 RANKL 可防治骨质疏松。当前研究认为选择性影响 RANKL/RANK/OPG 轴是治疗骨质疏松的新策略。

丹参是防治心脑血管疾病的传统中药,近年的研究结果表明丹参具有调节骨代谢、防治骨质疏松的作用^[13,14]。丹参素是丹参的有效成分之一,本研究用不同浓度的丹参素作用于牙槽骨成骨细胞,在不同时间点检测牙槽骨成骨细胞增殖率,结果显示丹参素能提高牙槽骨成骨细胞的增殖率,这与之前的研究报道一致。同时,研究结果发现丹参素能提高牙槽骨成骨细胞 OPG mRNA 和蛋白表达。本课题组前期研究发现丹参素能增加牙槽骨组织中 IGF-Ⅰ 的表达,IGF-Ⅰ 对骨细胞功能影响与调节 RANKL/RANK/OPG 轴相关;IGF-Ⅰ 基因敲除大鼠骨组织中 RANKL 和 RANK 表达减少。这进一步提示丹参素防治骨质疏松可能与其调节 RANKL/RANK/OPG 轴有关。

参考文献

- [1] Habashneh R, Alchalabi H, Khader YS. Association between periodontal disease and osteoporosis in postmenopausal women in Jordan [J]. *Periodontol*, 2010, 81(11): 1613-1621.
- [2] Persson GR, Berglund J, Persson RE, et al. Prediction of hip and hand fractures in older persons with or without a diagnosis of periodontitis [J]. *Bone*, 2011, 48(3): 552-556.
- [3] Suresh S, Kumar TS, Saraswathy PK, et al. Periodontitis and bone mineral density among pre and post menopausal women; A comparative study [J]. *Indian Soc Periodontol*, 2010, 14(1): 30-34.
- [4] Kim S, Kang Y, Krueger CA, et al. Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin micro-

spheres enhances early osteoblastic differentiation [J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(5):1768-1777.

- [5] Zhang W, Shen X, Wan C, et al. Effects of insulin and insulin-like growth factor 1 on osteoblast proliferation and differentiation; differential signalling via Akt and ERK [J]. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30(4):297-302.
- [6] 张晓燕,崔燎,吴铁,等. 丹参素防治去卵巢大鼠牙槽骨骨量的丢失[J]. *口腔医学研究*, 2008, 24(2): 148-151.
- [7] 张晓燕,崔燎,吴铁,等. 丹参素对大鼠牙槽骨代谢的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(33): 6203-6206.
- [8] 韦颂观,陈慧鸿,庞博,等. RNAi 技术沉默大鼠骨髓间充质干细胞 OPG 基因对 RANKL/OPG 表达变化研究[J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(12): 254-1257.
- [9] Lin JM, Callon KE, Lin CQ, et al. Alteration of bone cell function by RANKL and OPG in different *in vitro* models [J]. *Eur J Clin Invest*, 2007, 37(5): 407-415.
- [10] Li X, Ominsky MS, Stolina M, et al. Increased RANK ligand in bone marrow of orchietomized rats and prevention of their bone loss by the RANK ligand inhibitor osteoprotegerin [J]. *Bone*, 2009, 45(4): 669-676.
- [11] Ominsky MS, Stouch B, Schroeder J, et al. Denosumab, a fully human RANKL antibody, reduced bone turnover markers and increased trabecular and cortical bone mass, density, and strength in ovariectomized cynomolgus monkeys [J]. *Bone*, 2011, 49(2): 162-173.
- [12] Genant HK, Engelke K, Hanley DA, et al. Denosumab improves density and strength parameters as measured by QCT of the radius in postmenopausal women with low bone mineral density [J]. *Bone*, 2010, 47(1): 131-139.
- [13] Yang Y, Su Y, Wang D, et al. Tanshinol attenuates the deleterious effects of oxidative stress on osteoblastic differentiation via Wnt/FoxO3a signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013:351895.
- [14] Cui L, Li T, Liu Y, et al. Salvianolic acid B prevents bone loss in prednisone-treated rats through stimulation of osteogenesis and bone marrow angiogenesis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34647.

[收稿日期:2018-11-13]

(本文编辑 关隽)

关于《口腔医学研究》启用在线投稿系统的启事

《口腔医学研究》杂志网址为 www.kqxyj.com,网站主要包括投稿与查询系统、编辑加工系统、专家远程审稿系统 3 部分。作者可以通过网站投稿并查询稿件处理情况,审稿专家可实现网上审稿。

作者投稿的步骤:登录《口腔医学研究》网站→点击左侧“作者投稿系统”→注册→填写个人资料→登陆“作者投稿系统”即可。初次注册可能需要花费一定时间,但注册成功后投稿和查询便可节约大量时间和精力,今后投稿无需再次注册。

此外,编辑部的有关公告和通知也将通过网站发布,编辑部联系电话:027-87686117, E-mail: kqxyj@163.com。