

本文引用: 刘 杰, 张慧霞, 韩 炜, 谢 荣, 郑 凯. 地黄苷 A 对成骨细胞增殖分化及 MCP-1/CCR2 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(4): 631-637.

地黄苷 A 对成骨细胞增殖分化及 MCP-1/CCR2 信号通路的影响

刘 杰*, 张慧霞, 韩 炜, 谢 荣, 郑 凯

新疆医科大学第六附属医院康复医学科, 新疆 乌鲁木齐 830002

〔摘要〕 **目的** 观察地黄苷 A 对成骨细胞增殖和分化能力的影响及其潜在分子作用机制。**方法** 以成骨细胞株 MC3T3-E1 细胞为体外细胞模型, 以不同浓度(0、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$)地黄苷 A 进行处理, 采用 CCK-8 法和细胞增殖溴脱氧尿苷(BrdU)荧光标记法检测 24、48、72 h 后不同浓度地黄苷 A 对成骨细胞增殖能力的影响。将细胞分为空白组(生理盐水)、地黄苷 A 组(10 $\mu\text{mol/L}$)、地黄苷 A+RS504393 组(10 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A+10 $\mu\text{g/mL}$ RS504393)。碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒检测成骨细胞的 ALP 活性, 采用 RT-qPCR 检测成骨细胞分化标志物骨钙素(OCN)、Runx 相关转录因子 2(Runx2)、成骨细胞特异性转录因子(Osx)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、CC 类趋化因子受体-2(CCR2)的 mRNA 表达量, Western blot 法检测 OCN、Runx2、Ox、MCP-1、CCR2 的蛋白表达。**结果** 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组、1 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组比较, 10 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组在培养 48、72 h 的 OD 值及 BrdU 荧光表达量增高($P<0.01$), 100 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组在培养 48、72 h 的 OD 值降低($P<0.05$); 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组比较, 100 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组在培养 48、72 h 的 OD 值降低($P<0.05$)。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组比较, 100 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组 BrdU 荧光表达量在 24、48、72 h 降低($P<0.01$)。与 1 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组比较, 100 $\mu\text{mol/L}$ 地黄苷 A 组 BrdU 荧光表达量在 48、72 h 降低($P<0.01$)。与空白组比较, 地黄苷 A 组 3、7、14 d 的 ALP 活性均增高($P<0.01$); 且随成骨细胞培养时间增长, ALP 活性持续增高($P<0.01$)。与地黄苷 A 组比较, 地黄苷 A+RS504393 组 3、7、14 d 的 ALP 活性均降低($P<0.01$); 且随成骨细胞培养时间增长, ALP 活性持续增高($P<0.05$)。与空白组比较, 地黄苷 A 组 OCN、Runx2、Ox、MCP-1、CCR2 的 mRNA 和蛋白表达量均升高($P<0.01$)。与地黄苷 A 组比较, 地黄苷 A+RS504393 组 OCN、Runx2、Ox、MCP-1、CCR2 的 mRNA 和蛋白表达量均降低 ($P<0.01$)。**结论** 地黄苷 A 能通过激活 MCP-1/CCR2 信号通路进而促进成骨细胞的增殖和分化。

〔关键词〕 地黄苷 A; 成骨细胞; 成骨分化; 单核细胞趋化蛋白-1; 类趋化因子受体-2

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.04.007

Effects of rehmannioside A on osteoblast proliferation, differentiation, and the MCP-1/CCR2 signaling pathway

LIU Jie*, ZHANG Huixia, HAN Wei, XIE Rong, ZHENG Kai

Department of Rehabilitation Medicine, The Sixth Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830002, China

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of rehmannioside A on the osteoblast proliferation, differentiation, and its

〔收稿日期〕 2024-11-03

〔基金项目〕 新疆维吾尔自治区重点研发科研项目(2022XJKJ009)。

〔通信作者〕 * 刘 杰, 男, 硕士, 副主任医师, E-mail: 18195805027@163.com。

potential molecular mechanisms. **Methods** Osteoblast cell line MC3T3-E1 was used as an in vitro model. Cells were treated with different concentrations of rehmannioside A (0, 1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$). The CCK-8 assay and bromodeoxyuridine (BrdU) fluorescence labeling method were employed to evaluate the effects of rehmannioside A on osteoblast proliferation at 24, 48, and 72 h post-treatment. Experimental groups were divided as follows: blank group (saline), rehmannioside A group (10 $\mu\text{mol/L}$), and rehmannioside A+RS504393 group (10 $\mu\text{mol/L}$ rehmannioside A+10 $\mu\text{g/mL}$ RS504393). Alkaline phosphatase (ALP) activity of osteoblasts was determined using an ALP assay kit. RT-qPCR was performed to measure mRNA expression levels of osteogenic differentiation markers—osteocalcin (OCN), Runt-related transcription factor 2 (Runx2), osterix (Osx), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and CC chemokine receptor-2 (CCR2). Western blot analysis was used to measure protein expressions of OCN, Runx2, Osx, MCP-1, and CCR2. **Results** Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ and 1 $\mu\text{mol/L}$ rehmannioside A groups, the 10 $\mu\text{mol/L}$ rehmannioside A group showed increased OD values and BrdU fluorescence expressions at 48 and 72 h ($P<0.01$), while the 100 $\mu\text{mol/L}$ rehmannioside A group exhibited decreased OD values at 48 and 72 h ($P<0.05$). Compared with the 10 $\mu\text{mol/L}$ rehmannioside A group, the 100 $\mu\text{mol/L}$ group had reduced OD values at 48 and 72 h ($P<0.05$). Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$ rehmannioside A groups, the 100 $\mu\text{mol/L}$ group showed decreased BrdU fluorescence expressions at 24, 48, and 72 h ($P<0.01$). Compared with the 1 $\mu\text{mol/L}$ group, the 100 $\mu\text{mol/L}$ group exhibited reduced BrdU fluorescence expressions at 48 and 72 h ($P<0.01$). Compared with the blank group, the rehmannioside A group demonstrated increased ALP activity at 3, 7, and 14 days ($P<0.01$), with ALP activity progressively increasing over the prolonged culture time of osteoblasts ($P<0.01$). However, compared with the rehmannioside A group, the rehmannioside A+RS504393 group showed decreased ALP activity at 3, 7, and 14 days ($P<0.01$), with ALP activity progressively increasing over the prolonged culture time of osteoblasts ($P<0.05$). Compared with the blank group, the rehmannioside A group exhibited elevated mRNA and protein expression levels of OCN, Runx2, Osx, MCP-1, and CCR2 ($P<0.01$). Compared with the rehmannioside A group, the rehmannioside A+RS504393 group showed reduced mRNA and protein expressions of OCN, Runx2, Osx, MCP-1, and CCR2 ($P<0.01$). **Conclusion** Rehmannioside A can promote osteoblast proliferation and differentiation by activating the MCP-1/CCR2 signaling pathway.

[**Keywords**] rehmannioside A; osteoblasts; osteogenic differentiation; monocyte chemoattractant protein-1; CC chemokine receptor-2

骨质疏松是老年人群中最常见的临床问题之一,由于医疗资源有限和人口老龄化,我国骨质疏松疾病负担越来越重^[1]。骨质疏松症是一种以骨量减少和骨结构破坏为特征的疾病,可导致脆性骨折风险增加,老年人发生骨质疏松性骨折后通常需要住院治疗以及长期医疗护理,患者生活质量下降,出现残疾甚至死亡^[2]。成骨细胞源自骨髓腔中的间充质干细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化,成骨细胞的增殖和分化影响骨组织的生长发育和形态变化,与骨质疏松的病理过程相关^[3]。中药具有多途径、多靶点治疗等优势,目前已有多种中药被报道可通过调节成骨细胞功能延缓骨质疏松症的疾病进展^[4]。生地黄是玄参科多年生草本植物地黄的根,为“四大怀药”之一,在我国被广泛用作治疗由脑动脉粥样硬

化、衰老相关性中风和痴呆等“肾虚”引起的疾病^[5]。研究发现,地黄苷 A 具有增强体液免疫和细胞免疫的功能,但地黄苷 A 潜在的分子机制目前研究较少^[6-8]。趋化因子是一种高度保守的分泌性蛋白,作为一种免疫调节因子,其通过与相应的受体结合将白细胞迁移和募集至炎症及损伤部位^[9]。因此,地黄苷 A 的免疫调节功能很可能通过趋化因子受体相关通路实现。目前研究发现,单核细胞趋化蛋白-1/CC 类趋化因子受体-2(monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine receptor-2, MCP-1/CCR2)信号通路可能影响成骨细胞的功能,从而导致绝经后骨质疏松的发生^[10]。综合上述研究和发现,本研究通过研究地黄苷 A 对成骨细胞增殖和分化功能以及 MCP-1/CCR2 信号通路的影响,探索地黄苷 A 应用于骨质

疏松症治疗的临床潜在价值。

1 材料

1.1 细胞

MC3T3-E1 细胞由中国科学院生物化学与细胞生物研究所提供。细胞培养于 α -MEM 培养基中,培养基由 10% 胎牛血清、10 mmol/L β -甘油磷酸盐、50 μ g/mL L-抗坏血酸组成。每 3 天更换一次培养基,待细胞达到 70% 融合后,用 0.05% 胰蛋白酶处理细胞,然后重新接种以进行实验。制备低传代冻存液,实验中使用早期传代细胞(传代数少于 10 代)。

1.2 主要试剂和仪器

地黄苷 A(成都曼思特生物科技有限公司,批号: MUST-150513,分子量:52447,分子式: $C_{21}H_{32}O_{15}$, 4 $^{\circ}$ C 冷藏密封避光保存); RS504393 抑制剂(美国 Proteintech 公司,批号: CM03344); α -MEM 培养基、胎牛血清、胰酶消化液(赛默飞世尔科技有限公司,批号: 12561056、A5670701、R001100); β -甘油磷酸盐、L-抗坏血酸(美国 Sigma 公司,批号: 13408098、50817); CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号: C0038); 增殖溴脱氧尿苷(bromodeoxyuridine, BrdU)标记法载玻片细胞增殖荧光显微镜检测试剂盒(深圳子科生物科技有限公司,批号: GMS10033.3); 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号: A059-1); RNAiso Plus 试剂、PrimeScript RT 预混液(日本 TaKaRa 公司,批号: 9108、RR036B); SYBR Green PCR 预混液(美国 Applied Biosystems 公司,批号: 4309155); RIPA 缓冲液(上海碧云天生物技术公司,批号: P0013B); 骨钙素(osteocalcin, OCN)、Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)、成骨细胞特异性转录因子(osteoblast-specific transcription factor Osterix, Osx)、MCP-1、CCR2[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号: ab93876、ab192256、ab209484、ab315478、ab273050]; Immun-StarTM HRP 化学发光试剂盒(美国 Bio-Rad 公司,批号: 1705060S)。

超净工作台(苏州净化科技有限公司,型号: SW-CJ-2FD); 二氧化碳细胞培养箱(上海精其科技有限公司,型号: BPC-270); 倒置荧光显微镜(广州广卓精密仪器有限公司,型号: M30C); 细胞离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司,型号: XZ-4A); 多功能酶

标分析仪(赛默飞世尔科技有限公司,型号: Multiskan FC)。

2 方法

2.1 CCK-8 检测

将 MC3T3-E1 细胞培养至 80% 融合,用含 0.25% 胰蛋白酶的胃蛋白酶溶液处理,制成细胞悬液。将细胞以 3 000 个/孔的密度接种于 96 孔板,分为 0 μ mol/L 地黄苷 A 组、1 μ mol/L 地黄苷 A 组、10 μ mol/L 地黄苷 A 组、100 μ mol/L 地黄苷 A 组,每组设置 3 个复孔,加入地黄苷 A 后分别培养 24、48、72 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液。在培养箱中培养 2 h,用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。

2.2 BrdU 检测

将 MC3T3-E1 细胞接种在细胞爬片上,给予药物,分为 0 μ mol/L 地黄苷 A 组、1 μ mol/L 地黄苷 A 组、10 μ mol/L 地黄苷 A 组、100 μ mol/L 地黄苷 A 组,每组设置 3 个复孔,加入地黄苷 A 后分别培养 24、48、72 h,向培养基中添加 10 μ mol/L BrdU,孵育 1 h。4% 多聚甲醛固定 10 min,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,用 0.1% Triton X-100 或 PBS-T(0.1% Triton X-100)透化细胞 10~15 min。用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,用 2N HCl(浓盐酸:水=1:6)在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 使核酸变性,暴露 BrdU 结合位点。用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,用 5% 血清封闭液常温下封闭 1 h,4 $^{\circ}$ C 下孵育一抗 BrdU 抗体过夜,常温下孵育荧光二抗 1~2 h。用 DAPI 工作液在常温下孵育 3~5 min,抗荧光淬灭封片剂封片。37 $^{\circ}$ C 烘箱中稍作烘干直到盖玻片不自行滑动,荧光显微镜采集图片。

2.3 ALP 活性检测

MC3T3-E1 细胞分为空白组(生理盐水)、地黄苷 A 组(10 μ mol/L)、地黄苷 A+RS504393 组(10 μ mol/L 地黄苷 A+10 μ g/mL RS504393)。将 MC3T3-E1 细胞以 1×10^5 细胞/孔的浓度接种于 24 孔培养板中,并在培养箱中培养 3、7、14 d 后,通过 ALP 活性检测分析 MC3T3-E1 细胞成骨能力。用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞后,将获得的细胞上清液以 200 $\times$ g 离心 5 min。使用 ALP 检测试剂盒在微孔板读数仪下检测 520 nm 波长下的 OD 值。

2.4 RT-qPCR 检测

MC3T3-E1 细胞分为空白组、地黄苷 A 组、地黄

昔 A+RS504393 组。将细胞以 1×10^5 细胞/孔的密度接种于 6 孔板中,培养 7 d 后,使用 RNAiso Plus 试剂按照说明提取细胞总 RNA。使用 PrimeScript RT 预混液从 RNA 样本逆转录 cDNA。以逆转录的 cDNA 为模板,使用 SYBR Green PCR 预混液进行实时 PCR 分析。10 μ L 反应体系包含 5 μ L SYBR Green 预混液、0.5 μ L 正向和反向引物、3 μ L 目标 cDNA,剩下体积用无核酸酶的水补充至 10 μ L。在 95 $^{\circ}$ C 下进行 5 min 的预变性,然后按顺序进行 40 个扩增循环,每个循环 15 s(94 $^{\circ}$ C)、15 s(60 $^{\circ}$ C)和 30 s(72 $^{\circ}$ C)。采用 Δ Ct 法计算基因表达变化倍数,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析基因相对表达倍数变化,引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列
Table 1 Gene primer sequences

基因	引物(5'-3')	长度/bp
OCN	正向:CTCTGACCTCACAGATGCCAA	240
	反向:CTGGTCTGATAGCTCGTCACA	
Runx-2	正向:CCGGAATGATGAGAACTAC	202
	反向:TGTCTGTGCCTTCTTGTTTC	
OSX	正向:ATGGCGTCTCTCTGCTTG	175
	反向:AAGGTCAGCGTATGGCTTCT	
MCP-1	正向:CCCAATGAGTAGGCTGGAGA	138
	反向:TCTGGACCCATTCTTCTTG	
CCR2	正向:CCACACCTGTTTCGCTGTA	198
	反向:TGCATGGCTGCTCTAAGTG	
GAPDH	正向:TATGACTCTACCCACGGCAAGT	231
	反向:ATACTCAGCACCAGCATCACC	

2.5 Western blot 检测

MC3T3-E1 细胞分为空白组、地黄苷 A 组、地黄苷 A+RS504393 组。使用含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 缓冲液裂解细胞的总蛋白。在 4 $^{\circ}$ C 下以 14 000 r/min 离心 10 min(离心半径 20 cm)。收集可溶性蛋白质,与 5 $\times$ 样品上样缓冲液混合并煮沸 5 min。将蛋白质样品置于 SDS-PAGE 凝胶中,并在 100 V 下电泳 2 h。随后电印迹至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜,孵育一抗[OCN(1:3 000)、Runx2(1:2 000)、Osx(1:2 000)、MCP-1(1:2 000)、CCR2(1:2 000)]过夜,加入二抗 HRP(1:2 000)孵育 1 h 后,使用 Immun-StarTM HRP 化学发光试剂盒对结果进行可视化。

2.6 统计学分析

使用 SPSS 23.0 进行统计学分析,每个实验独立

重复 3 次,结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。采用单因素方差分析和 Dunnett 事后检验分析组间显著性差异,不同时间点的比较采用重复方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度地黄苷 A 对成骨细胞增殖的影响

与 0 μ mol/L 地黄苷 A 组、1 μ mol/L 地黄苷 A 组比较,10 μ mol/L 地黄苷 A 组在培养 48、72 h 的 OD 值增高($P<0.01$),100 μ mol/L 地黄苷 A 组在培养 48、72 h 的 OD 值降低($P<0.05$)。与 10 μ mol/L 地黄苷 A 组比较,100 μ mol/L 地黄苷 A 组在培养 48、72 h 的 OD 值降低($P<0.05$)。详见图 1。

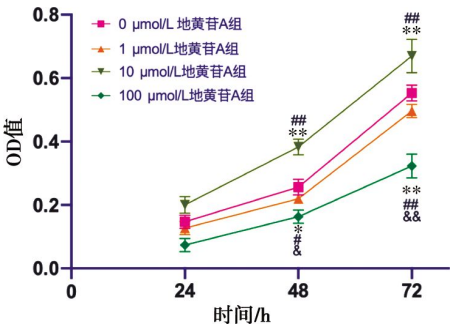


图 1 各组成骨细胞 OD 值比较

Fig.1 Comparison of osteoblast OD values among different groups

注:与 0 μ mol/L 地黄苷 A 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 1 μ mol/L 地黄苷 A 组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与 10 μ mol/L 地黄苷 A 组比较,& $P<0.05$,&& $P<0.01$ 。

与 0 μ mol/L 地黄苷 A 组、1 μ mol/L 地黄苷 A 组比较,10 μ mol/L 地黄苷 A 组 BrdU 荧光表达量在 48、72 h 增高($P<0.01$)。与 0 μ mol/L 地黄苷 A 组、10 μ mol/L 地黄苷 A 组比较,100 μ mol/L 地黄苷 A 组 BrdU 荧光表达量在 24、48、72 h 降低($P<0.01$)。与 1 μ mol/L 地黄苷 A 组比较,100 μ mol/L 地黄苷 A 组 BrdU 荧光表达量在 48、72 h 降低($P<0.01$)。详见图 2。

3.2 地黄苷 A 对成骨细胞 ALP 活性的影响

与空白组比较,地黄苷 A 组 3、7、14 d 的 ALP 活性均增高($P<0.01$);且随着成骨细胞培养时间增长,ALP 活性持续增高($P<0.01$)。与地黄苷 A 组比较,地黄苷 A+RS504393 组 3、7、14 d 的 ALP 活性均降低($P<0.01$);但随着成骨细胞培养时间增长,ALP 活性持续增高($P<0.05$)。详见图 3。

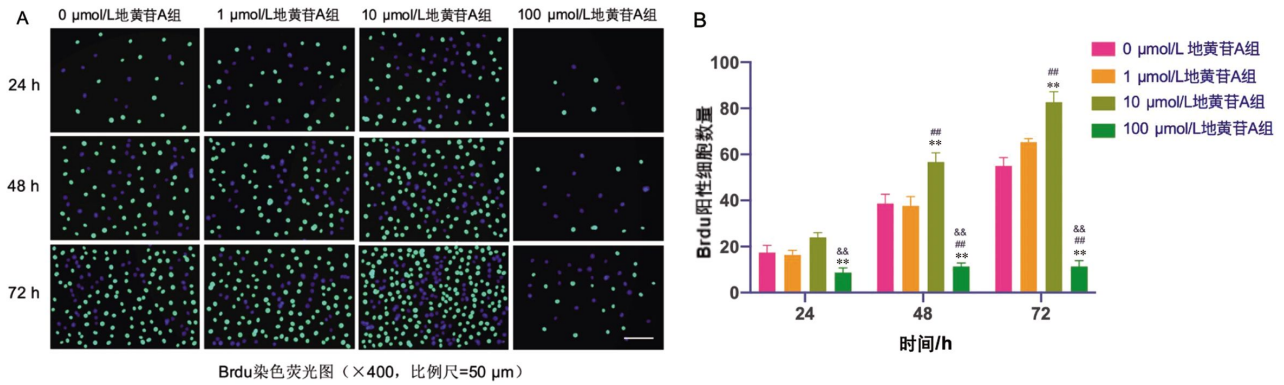


图2 各组成骨细胞增殖能力比较

Fig.2 Comparison of osteoblast proliferation capacity among different groups

注:A.BrdU 染色荧光图;B.BrdU 阳性细胞数量比较。与 0 μmol/L 地黄苷 A 组比较,** $P<0.01$;与 1 μmol/L 地黄苷 A 组比较,** $P<0.01$;与 10 μmol/L 地黄苷 A 组比较,** $P<0.01$ 。

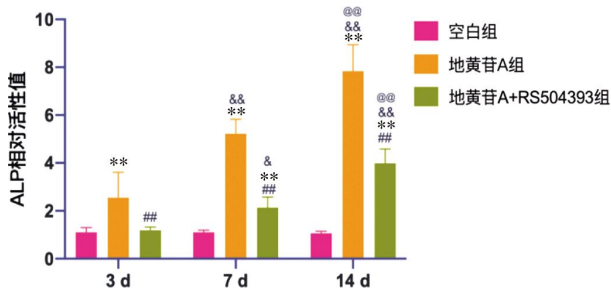


图3 各组成骨细胞 ALP 活性比较

Fig.3 Comparison of ALP activity in osteoblasts among different groups

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与地黄苷 A 组比较,** $P<0.01$ 。与 3 d 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 7 d 比较,** $P<0.01$ 。

3.3 地黄苷 A 对成骨细胞分化标志物表达的影响

与空白组比较,地黄苷 A 组 OCN、Runx2、Osx mRNA 和蛋白表达量均升高($P<0.01$)。与地黄苷 A 组比较,地黄苷 A+RS504393 组 OCN、Runx2、Osx mRNA 和蛋白表达量均降低($P<0.01$)。详见图 4—5。

3.4 地黄苷 A 对成骨细胞 MCP-1/CCR2 信号通路的影响

与空白组比较,地黄苷 A 组 MCP-1、CCR2 的 mRNA 和蛋白表达量均升高($P<0.01$)。与地黄苷 A 组比较,地黄苷 A+RS504393 组 MCP-1、CCR2 的 mRNA 和蛋白表达量均降低($P<0.01$)。详见图 6—7。

4 讨论

地黄为玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根,始载于《神农本草经·干地黄篇》,被列为上品。地黄含有多糖苷类成分,其中以环烯醚萜苷类为主,如梓

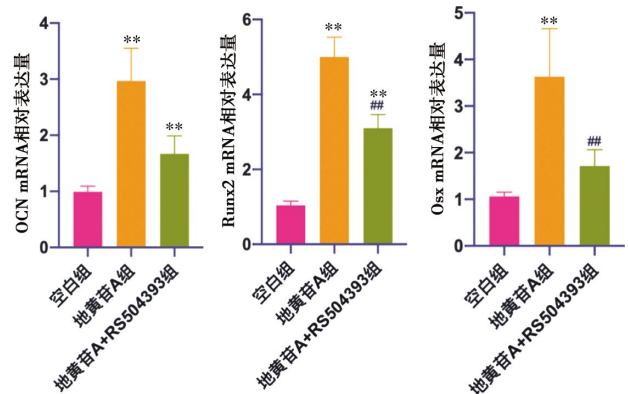


图4 各组成骨细胞分化标志物 mRNA 表达量比较

Fig.4 Comparison of mRNA expression levels of osteogenic differentiation markers among different groups

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与地黄苷 A 组比较,** $P<0.01$ 。

醇、二氢梓醇、乙酰梓醇、桃叶珊瑚苷、单密力特苷及地黄苷 A、B、C、D 等,地黄苷 A 有降血糖、免疫调节等作用^[11]。本研究探讨地黄苷 A 对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的作用机制,结果发现地黄苷 A 通过 MCP-1/CCR2 信号通路显著促进 MC3T3-E1 细胞成骨增殖和分化。

本研究结果显示,100 μmol/L 地黄苷 A 组对 MC3T3-E1 细胞增殖能力表现出抑制作用,10 μmol/L 为促进成骨细胞增殖及分化的最佳浓度。尽管目前尚无研究报道地黄苷 A 对成骨细胞的影响,但是已有研究报道地黄苷 A 可调节炎症因子的水平,如地黄苷 A 可减轻脓毒症大鼠的炎症因子,降低大鼠脑组织白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子-α 水平^[12]。而成骨细胞增殖和分化与炎症调节过程密切相关,长时间炎症刺激下,其增殖和分化功能受到抑制^[13]。以上

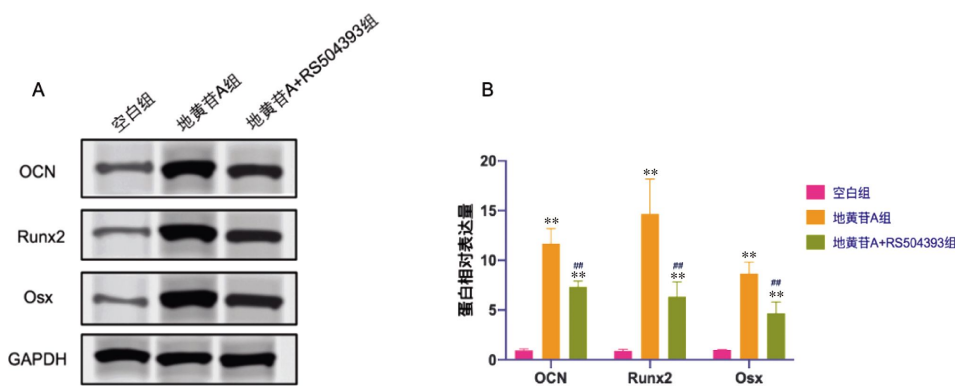


图 5 各组成骨细胞分化标志物蛋白表达水平比较

Fig.5 Comparison of protein expression levels of osteogenic differentiation markers among different groups

注:A.蛋白表达条带图;B.蛋白相对表达量。与空白组比较,** $P < 0.01$;与地黄苷 A 组比较,## $P < 0.01$ 。

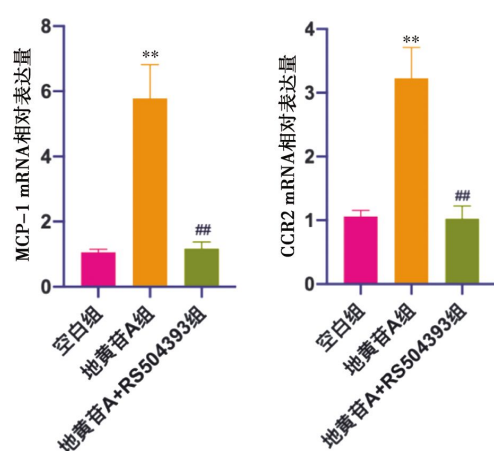


图 6 各组成骨细胞 MCP-1/CCR2 信号通路 mRNA 表达量比较

Fig.6 Comparison of mRNA expression levels of MCP-1/CCR2 signaling pathway in osteoblasts among different groups

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与地黄苷 A 组比较,## $P < 0.01$ 。

研究均部分解释了地黄苷 A 促进成骨细胞增殖的潜在效应。

为探索地黄苷 A 促进 MC3T3-E1 细胞成骨分化的机制,本研究进一步检测 MCP-1/CCR2 信号通路相关分子的表达量。与空白组比较,地黄苷 A 组的 MC3T3-E1 细胞中成骨细胞 ALP 活性增强,成骨分化标志物 OCN、Runx2、Osx 和信号通路分子 MCP-1、CCR2 的 mRNA 和蛋白表达均升高。MCP-1 又称为趋化因子 2 (chemokine C-C motif ligand 2, CCL2), 主要由单核/巨噬细胞分泌,CCR2 是 CCL2 的受体^[14], CCL2 对单核细胞和嗜碱性粒细胞具有趋化活性,是调节单核细胞/巨噬细胞迁移和浸润的关键趋化因子之一^[15]。CCL2/CCR2 在调节生理性骨重建,以响应激素和骨的机械刺激方面有重要作用^[16]。研究表明,CCL2 和 CCR2 基因变异是骨质疏松症的危险因素,CCL2 在骨质疏松性骨中广泛表达^[17]。成骨细胞 CCL2 的时空表达与炎症过程中单核细胞的募集和骨重建的调控有关^[18]。外源性 CCL2 可增强炎症骨中单核细胞的募集,进一步增加 CCR2 基因缺失小鼠的骨量,降低破骨细胞的数量、大小和活性^[19-20]。为进一步确

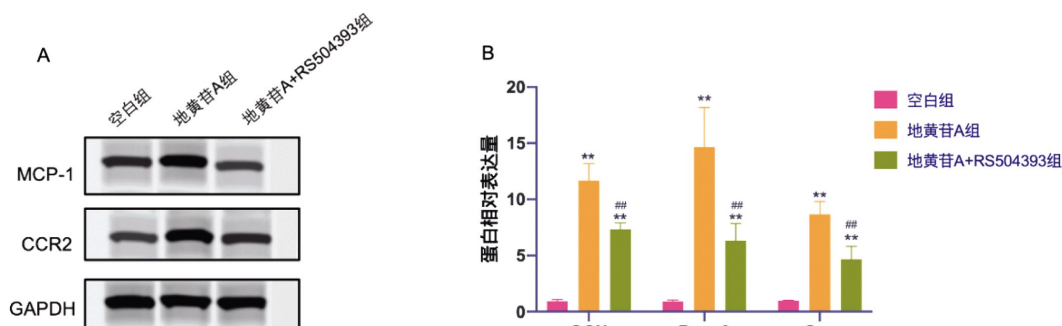


图 7 各组成骨细胞 MCP-1/CCR2 信号通路蛋白表达水平比较

Fig.7 Comparison of protein expression levels of MCP-1/CCR2 signaling pathway in osteoblasts among different groups

注:A.蛋白表达条带图;B.蛋白相对表达量。与空白组比较,** $P < 0.01$;与地黄苷 A 组比较,## $P < 0.01$ 。

定 MCP-1/CCR2 信号通路是否参与 MC3T3-E1 细胞的成骨分化,本研究采用 MCP-1/CCR2 信号通路抑制剂 RS504393 阻断该通路,ALP 检测结果发现,RS504393 部分逆转了地黄苷 A 介导的促进 MC3T3-E1 细胞成骨分化的作用,RT-qPCR 和 Western blot 分析进一步验证 ALP 检测的结果,表明地黄苷 A 可能通过 MCP-1/CCR2 信号通路影响成骨细胞分化。

综上所述,本研究首次证明地黄苷 A 通过直接上调 MCP-1/CCR2 信号通路增强了 MC3T3-E1 细胞的成骨分化潜能。地黄苷 A 有可能成为未来干预骨质疏松症的潜在治疗靶点,对预防和治疗骨代谢疾病具有重要意义。

参考文献

- [1] WANG J, SHU B, TANG D Z, et al. The prevalence of osteoporosis in China, a community based cohort study of osteoporosis[J]. *Frontiers in Public Health*, 2023, 11: 1084005.
- [2] FOESSL I, DIMAI H P, OBERMAYER-PIETSCH B. Long-term and sequential treatment for osteoporosis[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2023, 19(9): 520-533.
- [3] 范钦臣, 何大伟, 李 翀. 外源性硫化氢通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进衰老 BMSCs 的成骨分化[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2024, 34(3): 234-241.
- [4] 宋世雷, 陈跃平. 骨质疏松症铜死亡基因的免疫浸润分析及潜在中药预测[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(6): 1100-1109.
- [5] 陈金鹏, 张克霞, 刘 毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1772-1784.
- [6] 王 军, 于 震, 李更生, 等. 地黄苷 A 对“阴虚”及免疫功能低下小鼠的药理作用[J]. *中国药理学杂志*, 2002, 37(1): 20-22.
- [7] 刘 盼, 王晓英, 韩 丹. 地黄苷 A 通过调节 AKT/Nrf2/GPX4 信号通路介导的铁死亡改善大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(22): 4112-4119.
- [8] 许 静, 霍 康, 郭秦乐, 等. 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍和 Nrf2/GPX4 介导的铁死亡通路的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2024, 24(14): 2619-2625.
- [9] 谢 芳, 李树冬, 戴斌玉, 等. 趋化因子在骨性关节炎中的作用机制研究进展[J]. *医学综述*, 2023, 29(19): 3759-3764.
- [10] ZHU S P, LIU M, BENNETT S, et al. The molecular structure and role of CCL2 (MCP-1) and C-C chemokine receptor CCR2 in skeletal biology and diseases[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(10): 7211-7222.
- [11] 卢兴美, 钟凌云, 王 硕, 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 分析不同炮制工艺对地黄化学成分的影响[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(2): 399-414.
- [12] 许 静, 霍 康, 郭秦乐, 等. 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍和 Nrf2/GPX4 介导的铁死亡通路的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2024, 24(14): 2619-2625.
- [13] KONG Y P, ZHANG Y W, CAI Y J, et al. METTL3 mediates osteoblast apoptosis by regulating endoplasmic reticulum stress during LPS-induced inflammation[J]. *Cellular Signalling*, 2022, 95: 110335.
- [14] 崔珍珍, 赵一凡, 孙 玉, 等. 基于 CCL2/CCR2 信号轴的肿瘤免疫治疗药物的研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2024, 55(1): 36-44.
- [15] HU Y Q, WANG L, ZHAO Z J, et al. Cytokines CCL2 and CXCL1 may be potential novel predictors of early bone loss[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 22(6): 4716-4724.
- [16] YUAN S G, HU H L, WANG X J, et al. Bindarit reduces bone loss in ovariectomized mice by inhibiting CCL2 and CCL7 expression via the NF- κ B signaling pathway[J]. *Orthopaedic Surgery*, 2022, 14(6): 1203-1216.
- [17] 樊增荣, 蒋 勇, 刘德洪. 毛兰素调节 CCL2-CCR2 轴对关节软骨细胞炎症损伤的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2024, 30 (3): 335-340, 354.
- [18] TOYA M, ZHANG N, TSUBOSAKA M, et al. CCL2 promotes osteogenesis by facilitating macrophage migration during acute inflammation[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2023, 11: 1213641.
- [19] SHINOHARA I, TSUBOSAKA M, TOYA M, et al. C-C motif chemokine ligand 2 enhances macrophage chemotaxis, osteogenesis, and angiogenesis during the inflammatory phase of bone regeneration[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(11): 1665.
- [20] ZIAASTANI Z, KALANTARI-KHANDANI B, NIAZI M J, et al. Identification of critical genes and metabolic pathways in rheumatoid arthritis and osteoporosis toward drug repurposing[J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2024, 180: 108912.

(本文编辑 周 旦)