

## 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖的骨保护作用与Nrf2/HO-1信号通路的相关性研究

陈婷婷<sup>1,2,3</sup>, 黄天一<sup>1,2,3</sup>, 李梦雨<sup>1,2,3</sup>, 崔杰<sup>1,2,3</sup>, 华永庆<sup>1,2,3\*</sup>, 许惠琴<sup>2,3\*</sup>

(1. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210023; 3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

**摘要:** 研究1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖(1,2,3,4,6-pentyl-*O*-galloyl-beta-*D*-glucose, PGG)骨保护作用及其抗成骨细胞凋亡相关机制。建立泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松模型, 钙黄绿素染色观察PGG对斑马鱼骨骼面积的影响。体外培养骨髓间充质干细胞, 茜素红染色观察钙化结节数目, qRT-PCR法检测成骨细胞分化相关指标Runx 2和骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)的mRNA水平; 体外培养前成骨细胞系MC3T3-E1, 过氧化氢(400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )建立氧化应激模型, 观察在该模型下PGG对成骨细胞的作用。采用MTT法检测PGG对成骨细胞活力的影响; Hoechst 33342染色观察PGG对细胞凋亡的作用; Western blot检测PGG对抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax、核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)及下游蛋白血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达; DCFH-DA荧光染色检测细胞内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; JC-1荧光染色检测线粒体膜电位水平。结果显示, 与模型组相比, PGG可以显著提高斑马鱼模型椎骨面积; 成骨细胞分化第14天时, 与空白组相比, PGG组钙化结节数目显著增多, Runx 2、OCN的mRNA水平显著提高; 此外, 在氧化应激环境下, PGG可以提高成骨细胞活力, 显著减少凋亡细胞数, 提高Bcl-2/Bax的比率; 荧光染色结果显示, PGG降低细胞内ROS荧光密度, 提高线粒体膜电位。Western blot实验数据显示, PGG可以促进核内Nrf2蛋白表达, 并增强下游蛋白HO-1的表达。综上, PGG可改善斑马鱼骨质疏松, 且该作用可能与调控Nrf2/HO-1信号通路改善线粒体功能障碍, 抗氧化应激环境下成骨细胞凋亡从而促进骨形成有关。本研究为抗骨质疏松治疗药物的发现提供新的思路与线索。

**关键词:** 骨质疏松; 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖; MC3T3-E1; 细胞凋亡; 线粒体; Nrf2/HO-1

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)05-0907-08

## Correlation between bone protection of 1,2,3,4,6-pentyl-*O*-galloyl-beta-*D*-glucose and Nrf2/HO-1 signaling pathway

CHEN Ting-ting<sup>1,2,3</sup>, HUANG Tian-yi<sup>1,2,3</sup>, LI Meng-yu<sup>1,2,3</sup>, CUI Jie<sup>1,2,3</sup>, HUA Yong-qing<sup>1,2,3\*</sup>, XU Hui-qin<sup>2,3\*</sup>

(1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210023, China;

3. School of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** To study the osteoprotective effect of 1,2,3,4,6-pentyl-*O*-galloyl-beta-*D*-glucose (PGG) its anti-osteoblast apoptosis related mechanism was investigated. A model of zebrafish osteoporosis induced by prednisone

收稿日期: 2019-09-24; 修回日期: 2019-11-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473390); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心开放课题(ZDXM-2-7); 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室资助项目(JKLPSE201818); 江苏省高校优势学科建设项目(PAPD).

\*通讯作者 Tel: 86-25-85811248, E-mail: huayongqing@126.com;

Tel: 86-25-85811933, E-mail: hqxu309@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0773

lone (Pred, 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was established *in vivo*, and calcein staining was used to detect the effect of PGG on the bone area of zebrafish. Bone marrow mesenchymal stem cells were cultured *in vitro*, and the number of calcified nodules was observed by alizarin red staining, and the relevant indexes of osteoblast differentiation runt-related transcription factor 2 (Runx 2), osteocalcin (OCN) mRNA level were detected by qRT-PCR. The osteoblast cell line MC3T3-E1 cells was cultured *in vitro*, and 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) was used to intervene the injury to detect the effect of PGG on osteoblasts under oxidative stress. The effect of PGG on osteoblast activity was detected by MTT assay. The effect of PGG on apoptosis was observed by Hoechst 33342 staining. Western blot was used to detect the expression of Bcl-2, Bax, nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1). DCFH-DA fluorescence staining for detection of reactive oxygen species (ROS) levels. JC-1 staining was used to detect mitochondrial membrane potential levels. The results showed that PGG could significantly increase the vertebral area of the zebrafish model when compared with the model group. On the 14 th day of osteoblast differentiation, the number of calcified nodules in the PGG group was significantly increased when compared with the control group and the mRNA levels of Runx 2 and OCN were also significantly increased. In addition, under oxidative stress, PGG could increase osteoblast viability, significantly reduce the number of apoptotic cells, and increase the ratio of Bcl-2/Bax. Fluorescence staining results show that PGG decreased intracellular ROS fluorescence density and increased mitochondrial membrane potential. Western blot data showed that PGG could promote the expression of Nrf2 in the nuclear and enhance the expression of downstream protein HO-1. In conclusion, PGG could improve osteoporosis in zebrafish, and this effect may be related to the regulation of Nrf2/HO-1 signaling pathway to improve mitochondrial dysfunction, anti-oxidative stress in osteoblast apoptosis and promote bone formation. This study provides new ideas and clues for the discovery of anti-osteoporosis drugs.

**Key words:** osteoporosis; 1,2,3,4,6-pentyl-*O*-galloyl-beta-*D*-glucose; MC3T3-E1; cellular apoptosis; mitochondria; Nrf2/HO-1

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种全身性骨代谢疾病, 在中国大陆慢性病中发病率高居第 3 位<sup>[1]</sup>, 其特征在于骨量和微结构的全身性损伤, 导致脆性骨折。目前研究认为衰老、雌激素水平下降等多种因素引起的氧化应激是 OP 发生的重要原因<sup>[2]</sup>。体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平过高, 可导致线粒体肿胀, 线粒体膜通透性增加, 功能降低, 从而进一步加剧 ROS 产生, 诱导细胞凋亡<sup>[3]</sup>。成骨细胞是参与骨骼形成的主要细胞, 其过度凋亡会影响骨骼修复, 导致 OP<sup>[4]</sup>。

目前, 临床用于 OP 治疗的一线药物主要是双磷酸盐类, 但长期使用会增加非典型骨折、骨坏死等不良反应风险<sup>[5]</sup>。中医药治疗 OP 具有显著的潜力和优势, 正逐渐被接受和使用。中医药治疗 OP 主要以滋补肝肾、养肾健脾和活血化痰为主。白芍具有补血、柔肝和滋阴等作用, 是组成治疗 OP 中药复方制剂的重要单味药之一, 其使用频率可达约 1/3<sup>[6]</sup>。白芍的主要化学成分是萜类和酚类化合物。已有报道<sup>[7]</sup>证实芍药苷等萜类化合物具有抗 OP 的活性。而以 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 (1,2,3,4,6-pentyl-*O*-galloyl-beta-*D*-glucose, PGG) 为代表的酚类活性成分尚未获得重视。已有研究表明, 酚类化合物可促进成骨细胞增殖、分化, 对成骨细胞具有保护作用, 并且该作用可能与抗氧化作用有关<sup>[8]</sup>。然而, PGG 对成骨细胞是否具有保护作用尚未见报道。

核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2) 是抗氧化的重要信号通路, 能调控下游多种抗氧化酶表达, 如血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)<sup>[9]</sup>。本文旨在通过斑马鱼 OP 模型观察 PGG 的骨保护作用, 并进一步探讨其在氧化应激环境下对成骨细胞的作用及其与 Nrf2/HO-1 通路的关系。

## 材料与方法

**实验动物与细胞** AB 品系受精后 1 天 (1 day post fertilization, 1 dpf) 斑马鱼, 购自江苏凯基生物科技股份有限公司。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 提取于 1~2 周龄的 SD 大鼠, 前成骨细胞系 MC3T3-E1 购自中国科学院上海细胞库。

**主要试剂** PGG (上海源叶生物有限公司, 批号: lw16041905, 纯度为 99.9%); 17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, E2, Sigma 公司); 茜素红染液 (武汉谷歌生物科技有限公司); HiScript<sup>®</sup> II Q RT SuperMix For qPCR (+ g DNA wiper) (Vazyme Biotech 公司); Bcl-2 抗体、Bax 抗体、Nrf2 抗体、 $\beta$ -tubulin 抗体 (Proteintech 公司); HO-1 抗体 (Santa Cruz biotechnology 公司); Hoechst 33342 试剂盒、活性氧检测试剂盒、JC-1 检测试剂盒、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒 (碧云天公司); 泼尼松龙 (prednisolone, Pred)、钙黄绿素 (上海源叶生物有限

公司)。

**主要仪器** 酶标仪 (Bio-Tek, 型号: SyneRgy2)、电泳仪 (型号: mini-protean powerpac basic)、数字化凝胶成像工作站 (型号: ChemiDocTMRS+) (美国 BIO-RAD 公司); 体式显微镜 (型号: stemi 2000-C); 活细胞工作站 (AXIO vert A1) (德国 ZEISS 公司)。

**斑马鱼实验** 挑选出培养 2 天后卵健康的 3 dpf 斑马鱼随机分为 6 组: 空白组、Pred 组、阳性药 E2 组 ( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、PGG 组 ( $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )，置于 6 孔板中，每孔给予 3 mL 培养基。从 3 dpf 开始，空白组斑马鱼培养基中含 0.1% 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)，Pred 组及其他各加药组参照文献<sup>[10]</sup>方法选取含 0.1% DMSO 的 Pred ( $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。从 5 dpf 开始给药，空白组斑马鱼培养基不变，Pred 组按 Pred ( $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 给药，E2 组选取含 0.1% DMSO 对应浓度给药，PGG 组按 0.1% DMSO 对应浓度给药，每天换液，连续给药 4 天。为了检测斑马鱼幼鱼椎骨钙沉积，进行钙黄绿素染色，将 9 dpf 的斑马鱼置于二次蒸馏水中静置 1 h，除去斑马鱼体表药物，然后将斑马鱼放于暗室中，用 0.2% 钙黄绿素 (pH 7) 孵育 1 h，最后在水中漂洗 3 次，并在二次蒸馏水中再静置 1 h，除去未结合染液。置于荧光显微镜下观察拍照。

**细胞培养** MC3T3-E1 细胞及 BMSCs 均用含 10% 热灭活胎牛血清和 1% 双抗的  $\alpha$ -MEM 培养基，在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  和饱和湿度的培养箱中进行培养。隔天换液，当细胞长至 85% 左右时，用含 0.02% 乙二胺四乙酸的 0.25% 胰酶消化。

**茜素红染色检测钙化结节** BMSCs 以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔板中，分为空白组、PGG 组 ( $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。细胞贴壁 24 h 后，空白组加入成骨细胞分化液，PGG 组加入含有相应浓度药物的成骨细胞分化液，每 3 天换 1 次分化液。分化第 14 天时，每孔加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 10 min，磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 2 次，加入 500  $\mu\text{L}$  茜素红染液染色 5 min，三蒸水洗净，置于显微镜下拍照。

**RT-qPCR 检测 Runx 2、OCN mRNA 水平** 通过总 RNA 提取试剂 (Vazyme Biotech 公司) 分离和纯化总 RNA。使用 Synergy 2 多模式微孔板读数器测定 RNA 浓度。然后，使用 ABI 7500 测序检测系统 (Applied Biosystems) 和 AceQ<sup>®</sup>qPCRSYBR<sup>®</sup> 两个母体混合系统 (Vazyme Biotech, Q111-02) 进行 qRT-PCR，每组设置 3 个复孔，以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参，计算复孔的  $C_t$  平均值，按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对定量计算公式得到相对定

量结果。序列如下表 1。

**Table 1** The sequence of the marker of osteoblast. Runx 2: Runx-related transcription factor 2; OCN: Osteocalcin; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Gene	Primer sequence (5'-3')
Runx 2	Forward: -CATCCTTCCCTCCGAGACCCTAA- Reverse: -CCCAACATGGCTGCTCCCTTC-
OCN	Forward: -CTCACTCTGCTGGCCCTGAC- Reverse: -CACCTTACTGCCCTCTGCTTG-
GAPDH	Forward: -TGAACGGGAAG CTCACTGG- Reverse: -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-

**MTT 检测细胞活力** MC3T3-E1 以每孔含培养液 200  $\mu\text{L}$ ， $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔细胞培养板中。细胞分为 6 组，分别为空白组、过氧化氢组 (hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、PGG 组 ( $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )，每孔各设置 3 个复孔。细胞贴壁 24 h 后，除空白组外，进行  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤，4 h 后除去上清。空白组、 $\text{H}_2\text{O}_2$  组加入含 0.1% DMSO 的  $\alpha$ -MEM 培养液 200  $\mu\text{L}$ ，PGG 组加入含对应浓度 PGG 的培养液 200  $\mu\text{L}$ 。孵育 24 h 后弃除板中培养液，每孔加入 MTT 溶液 (5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 10  $\mu\text{L}$  和不含血清的  $\alpha$ -MEM 培养基 100  $\mu\text{L}$ ，4 h 后弃去培养上清，每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ，使用酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度 (A) 值。

**Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡** 细胞按  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔细胞培养板中，分为 4 组: 空白组、 $\text{H}_2\text{O}_2$  组、E2 组 ( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 PGG 组 ( $1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )，每组设置 3 个复孔。给药 24 h 后，PBS 洗涤 2 次，将染液用 PBS 稀释 100 倍，每孔加入 50  $\mu\text{L}$  稀释后的染液，细胞培养箱孵育 10 min。吸除含染料的培养液，PBS 洗涤 2~3 次即可在荧光显微镜下观察。

**DCFH-DA 荧光染色检测 ROS 水平** 细胞按  $3 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔细胞培养板中，分为 4 组: 空白组、 $\text{H}_2\text{O}_2$  组、E2 组 ( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 PGG 组 ( $1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )，每组设置 3 个复孔。给药 24 h 后弃去培养基，用 PBS 冲洗 2 次，加入 DCFH-DA (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )，于  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min，PBS 洗涤 2~3 次，置于荧光显微镜下观察拍照。

**JC-1 荧光染色检测线粒体膜电位** 细胞按  $3 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔细胞培养板中，分为 4 组: 空白组、 $\text{H}_2\text{O}_2$  组、E2 组 ( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 PGG 组 ( $1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )，每组设置 3 个复孔。给药 24 h 后弃去培养基，用 PBS 冲洗 2 次，加入 JC-1 染液工作液，于  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min，PBS 洗涤 2~3 次再置于荧光显微镜下观察。

**细胞核、细胞质蛋白 Nrf2 提取** 接种  $1 \times 10^6$  个细胞于 100 mm $\times$ 60 mm 大皿中，细胞分为 6 组，分别为

空白组、 $H_2O_2$ 组、PGG组 ( $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup>)。按说明书步骤提取细胞核及胞质内蛋白。

**Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax、Nrf2、HO-1 蛋白的表达** 细胞以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔含培养液 1.5 mL。细胞分为 6 组, 分别为空白组、 $H_2O_2$ 组、PGG组 ( $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup>)。每孔各设置 3 个复孔。给药 24 h 后, 按照 BCA 试剂盒说明书对细胞中总蛋白含量进行测定, 加上样缓冲液, 100 °C 变性 10 min。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 再分别于 Bcl-2 抗体 (1:1 000) 和 Bax 抗体 (1:1 000)、HO-1 抗体 (1:1 000)、Nrf2 抗体 (1:1 000)、 $\beta$ -tubulin (1:1 000) 中过夜 (4 °C), 次日 TBST 洗膜 3 次, 包被二抗, 曝光, 以  $\beta$ -tubulin 作为内参。

**统计学分析** 实验结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 Graphpad Prism 7.0 软件中单因素方差分析方法比较各组间差异, 运用 Dunnett 检验方法进行组间比较,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 结果

### 1 PGG 改善斑马鱼骨质疏松

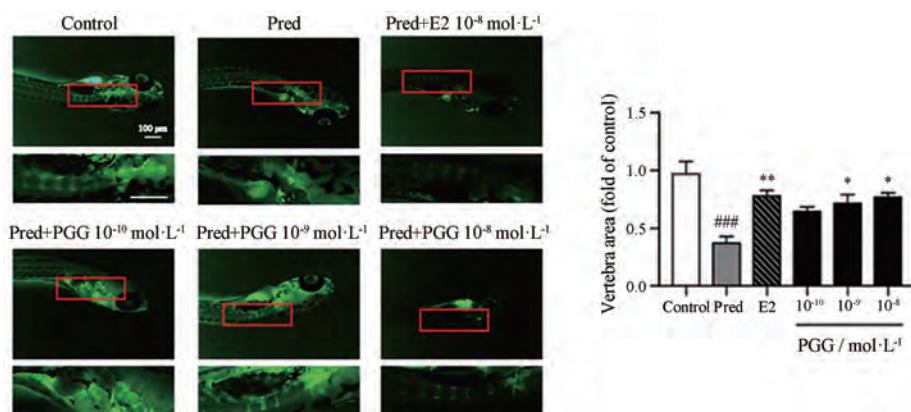
钙黄绿素染色结果所示, 与空白组相比, Pred 组斑马鱼椎骨节数减少, 椎骨面积减少; 与 Pred 组相比, E2 ( $1 \times 10^{-8}$  mol·L<sup>-1</sup>) 和 PGG ( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$  mol·L<sup>-1</sup>) 可以显著增加斑马鱼椎骨节数与面积, 促进骨形成 (图 1)。该结果显示, PGG 可以改善斑马鱼 OP 模型, 促进骨形成, 具有骨保护作用。

### 2 PGG 促成骨细胞分化

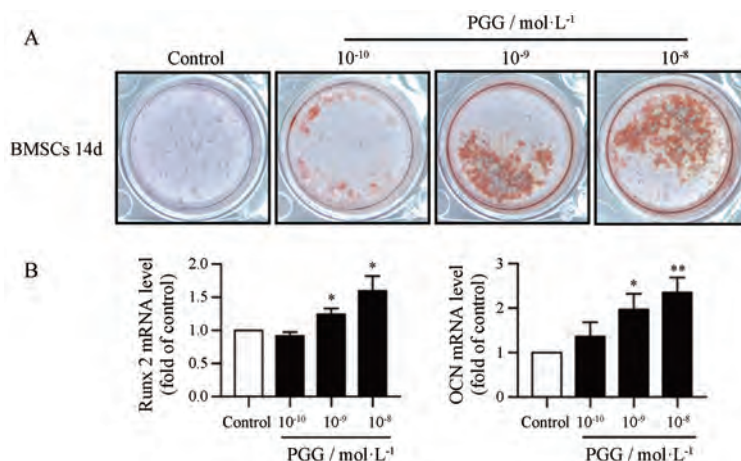
茜素红染色结果所示, 在 BMSCs 分化第 14 天时, 与空白组相比, PGG ( $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$  mol·L<sup>-1</sup>) 出现大量钙化结节, 并且可以显著提高成骨分化指标 Runx 2、OCN 的 mRNA 水平 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 2。

### 3 PGG 提高氧化应激环境下 MC3T3-E1 细胞活力

MC3T3-E1 在  $H_2O_2$  的干预下, 细胞活力明显降低 ( $P < 0.01$ ), 当加入  $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup> PGG 时, 可明显升高 MC3T3-E1 的细胞活力 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。见图 3。该结果显示, PGG 可提高氧化应激环

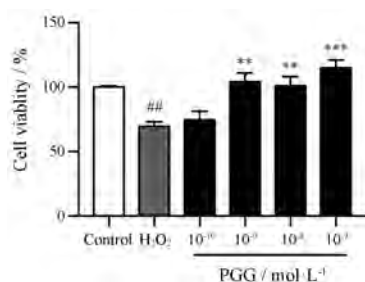


**Figure 1** The effects of 1,2,3,4,6-pentyl-*O*-galloyl-beta-*D*-glucose (PGG) on zebrafish osteoporosis model (calcein staining  $\times 80$ ). Pred: Prednisolone; E2: 17 $\beta$ -estradiol.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Pred group



**Figure 2** The effects of PGG on osteoblast differentiation in bone mesenchymal stem cells. A: Alizarin red staining detected the number of calcified nodules; B: RT-qPCR detected the mRNA level of osteoblast marker Runx 2 and OCN.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group

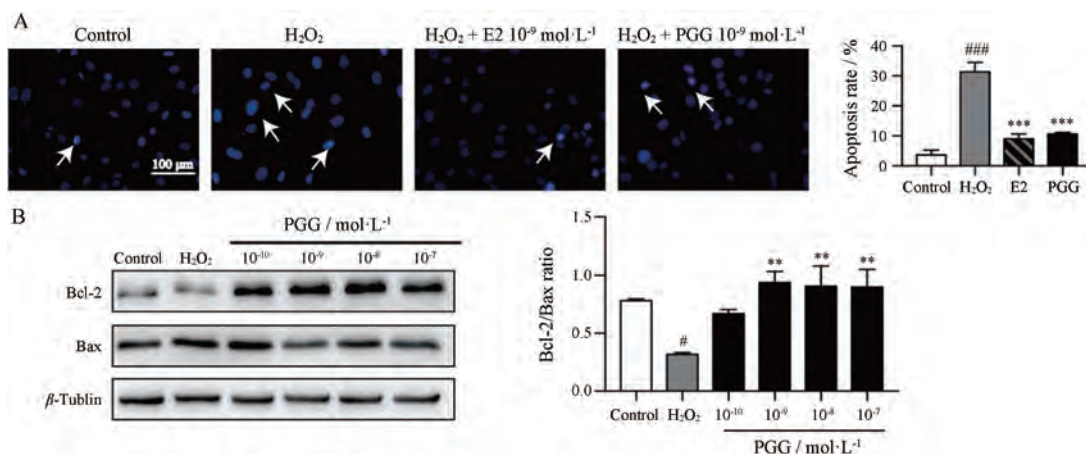
境下 MC3T3-E1 的细胞活力, 在  $1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度下已有显著作用。因此, 本研究选择该浓度进行后续实验。



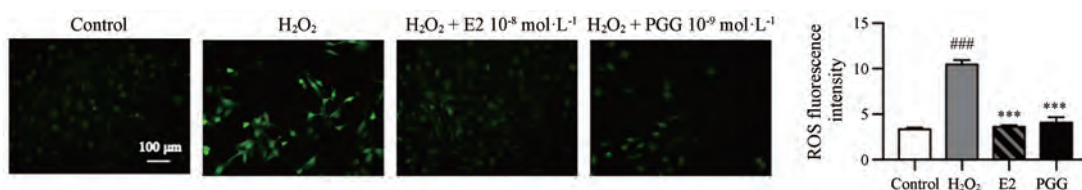
**Figure 3** The effects of PGG on osteoblast viability in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced MC3T3-E1 cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . ## $P < 0.01$  vs control group; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  group

#### 4 PGG 抑制氧化应激环境下 MC3T3-E1 细胞凋亡

Hoechst 33342 染色结果显示, 与空白组相比,  $\text{H}_2\text{O}_2$  组细胞核发生形态皱缩, 出现明亮、致密浓染的凋亡细胞; 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组相比, E2、PGG 组具有凋亡特征的细胞核数目明显减少。并且, 与空白组相比,  $\text{H}_2\text{O}_2$  组可促使抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达降低, 促凋亡蛋白 Bax 表达升高, Bcl-2/Bax 比率显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组相比, PGG 促进 Bcl-2 蛋白的表达, 降低 Bax 蛋白的表达, 显著提高了 Bcl-2/Bax 的比率 ( $P < 0.01$ )。



**Figure 4** The effects of PGG on osteoblast apoptosis in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced MC3T3-E1 cells. A: Representative pictures of Hoechst staining, the white arrow indicated apoptotic cells (Hoechst staining  $\times 400$ ); B: Western blot detected the expression of Bcl-2 and Bax.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  group



**Figure 5** The effects of PGG on ROS levels in  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced MC3T3-E1 cells (DCFH-DA staining  $\times 200$ ).  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.001$  vs control group; \*\*\* $P < 0.001$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  group

见图4。

#### 5 PGG 降低氧化应激环境下 MC3T3-E1 细胞 ROS 水平

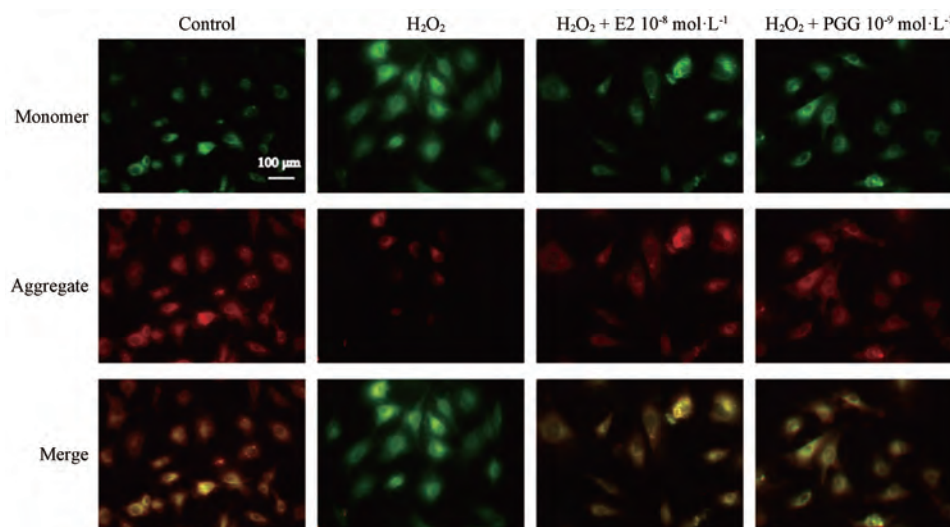
DCFH-DA 荧光染色结果显示,  $\text{H}_2\text{O}_2$  组细胞内 ROS 荧光密度值显著高于空白组 ( $P < 0.001$ ); 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组相比, E2、PGG 组细胞内的 ROS 荧光密度值显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图5。结果表明, PGG 可清除氧化应激环境下 MC3T3-E1 细胞内的 ROS。

#### 6 PGG 提高氧化应激环境下 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位

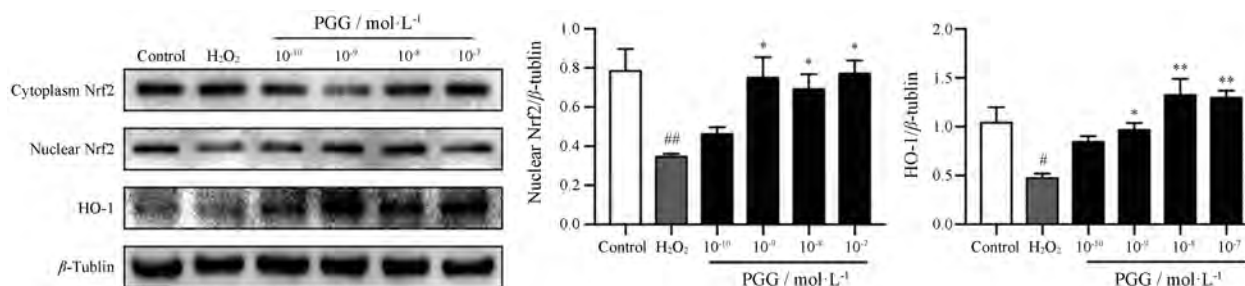
JC-1 荧光染色结果显示, 与空白组相比,  $\text{H}_2\text{O}_2$  组绿色荧光增强, 红色荧光减弱, 合并图偏绿代表线粒体膜电位下降; 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组相比, E2、PGG 组绿色荧光减弱, 红色荧光增强, 合并图偏黄代表线粒体膜电位提高。见图6。结果表明, PGG 可改善氧化应激环境下 MC3T3-E1 细胞的线粒体功能障碍。

#### 7 PGG 上调 Nrf2/HO-1 蛋白的表达

与空白组相比,  $\text{H}_2\text{O}_2$  组核内 Nrf2 表达降低, 胞质内 Nrf2 表达升高; 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组相比, PGG 可促进核内 Nrf2 表达, 降低胞质内 Nrf2 表达。同时,  $\text{H}_2\text{O}_2$  可降低 Nrf2 下游蛋白 HO-1 表达, PGG 可升高 HO-1 表达。见图7。结果表明, PGG 可能通过 Nrf2/HO-1 通路发挥对氧化应激环境下 MC3T3-E1 的保护作用。



**Figure 6** The effects of PGG JC-1 staining of PGG on mitochondrial membrane potential in  $H_2O_2$ -induced MC3T3-E1 cells (JC-1 staining  $\times 200$ )



**Figure 7** Effects of PGG on the expression of Nrf2 and HO-1.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs  $H_2O_2$  group

### 讨论

机体步入衰老期后, 体内氧化应激水平升高, 骨吸收速率超过骨形成速率, 骨重建失衡形成OP<sup>[11]</sup>。目前, 抑制破骨细胞介导的过度骨吸收是治疗OP的主要策略, 而对成骨细胞介导骨形成的干预研究相对较少, 促进骨形成治疗OP的策略已经成为一个新热点。白芍在治疗OP方剂中常被重用, 用量约10~15 g。作为白芍的主要活性成分, 芍药苷被发现可通过调节NF- $\kappa$ B信号通路抑制骨吸收, 并可抑制成骨细胞凋亡、促进骨形成从而改善OP<sup>[12,13]</sup>。PGG在白芍中是仅次于芍药苷的标志性成分, 含量高达约20 mg·g<sup>-1</sup><sup>[14]</sup>。然而PGG对OP的干预效应尚未见报道。研究发现多酚类化合物可促成骨细胞矿化从而促进骨形成, 同时也具有抗成骨细胞凋亡和抑制骨吸收的作用, 该作用可能与其抗氧化能力有关<sup>[15]</sup>。PGG是一种典型的多酚化合物, 其抗氧化能力也早已被证实。Ahn等<sup>[16]</sup>发现PGG可增强超氧化物歧化酶的活性, 清除细胞内ROS水平, 可延长秀丽隐杆线虫的寿命。Choi等<sup>[17]</sup>发现PGG在神经2A细胞中可增强HO-1的表达, 对保护神经细胞有

很大的潜力。本研究证实了作为白芍代表性活性成分PGG具有显著的骨保护作用。

成骨细胞起源于骨髓基质的间质细胞, 在骨形成过程中经历增殖、分化、基质矿化及凋亡等过程。本研究采用泼尼松龙诱导的斑马鱼OP模型在整体上观察了PGG对OP的作用。斑马鱼与人类基因高度同源, 具有体积小、产卵量多、发育迅速、胚胎透明, 可直接在体观察骨骼发育等特点, 是研究OP的理想模式生物<sup>[18]</sup>。泼尼松龙作为糖皮质激素类药物, 过量使用会导致体内氧化应激水平升高, 骨吸收增强, 骨形成抑制, 使骨量降低最终导致OP<sup>[19]</sup>。泼尼松龙诱导的OP模型已获得广泛应用。Zhao等<sup>[20]</sup>运用25  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> Pred成功建立了斑马鱼OP模型, 并验证了淫羊藿低糖苷组分有良好的抗斑马鱼OP作用。本课题组也运用该模型, 用钙黄绿素染色观察斑马鱼脊椎骨荧光强度, 证明了藜本内酯及芍药苷对斑马鱼OP模型有明显改善作用<sup>[10,13]</sup>。本研究结果表明PGG可显著增加斑马鱼椎骨节数, 增加斑马鱼骨量, 促进骨形成, 对斑马鱼OP模型有明显改善作用。在成骨分化过程中, Runx 2主

要调节骨基质蛋白的表达,是分化早期的标志物,OCN是中晚期成骨细胞形成的标志物,其可通过与钙及羟基磷灰石结合促进骨形成。本研究体外进行了BMSCs分化实验,进一步验证PGG促进骨形成的作用。结果显示,PGG可促进BMSCs产生大量钙化结节,并可提高Runx 2、OCN mRNA水平,促进骨形成。

在骨形成过程中,成骨细胞凋亡引起成骨减少,抑制其凋亡对促进骨形成至关重要。研究表明,氧化应激水平升高是导致成骨细胞凋亡的重要因素<sup>[21]</sup>。体内过高的ROS水平会引发线粒体膜电位降低,ATP产生减少,导致线粒体结构和功能受损,加速细胞凋亡。Bcl-2家族的促凋亡蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-2之间的平衡控制细胞线粒体凋亡途径<sup>[22]</sup>。ROS水平过高时,Bax促进线粒体通透性转换孔(PTP)开放,导致线粒体结构和功能的紊乱,线粒体的内、外膜依次裂解,释放出细胞色素C,诱导细胞凋亡,Bcl-2作用与之相反<sup>[23]</sup>。本研究发现,氧化应激环境下PGG可上调Bcl-2蛋白的表达,降低Bax蛋白的表达,清除细胞内的ROS,恢复线粒体膜电位,具有抗成骨细胞凋亡的作用。Nrf2是细胞氧化还原稳态的主要调节因子。在生理条件下,Nrf2分布于细胞质内,ROS水平过高时,Nrf2易位至细胞核,激活下游抗氧化基因HO-1的表达。HO-1可催化血红素分解释放胆绿素,然后进一步降解为抗氧化活性更强的胆红素<sup>[24]</sup>,清除细胞内的ROS。本研究进一步发现,PGG在氧化应激环境下对成骨细胞的保护作用可能与促进Nrf2入核、增强HO-1表达有关。

综上所述,体内外实验证明,PGG可促进骨形成,具有骨保护作用,该作用可能与激活Nrf2/HO-1通路,改善线粒体功能从而抗成骨细胞凋亡有关。本研究为临床应用PGG治疗OP提供了依据,为OP治疗药物发现提供了新思路。

## References

- [1] Bai BH, Xie XW, Li DP, et al. Epidemiological studies on osteoporosis in the past five years in China [J]. Chin J Osteoporosis (中国骨质疏松杂志), 2018, 24: 253-258.
- [2] Sun ZS, Gen YQ, Zhang LJ, et al. Research progress on the pathogenesis of oxidative stress mediated osteoporosis [J]. Chin J Osteoporosis (中国骨质疏松杂志), 2016, 22: 1063-1067.
- [3] Akkaya M, Traba J, Roesler AS, et al. Second signals rescue B cells from activation-induced mitochondrial dysfunction and death [J]. Nat Immunol, 2018, 8: 871-884.
- [4] Chen X, Wang Z, Duan N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions [J]. Connect Tissue Res, 2017, 2: 99-107.
- [5] Abbasi J. Amid osteoporosis treatment crisis, experts suggest addressing patients' bisphosphonate concerns [J]. J Am Med Assoc, 2018, 319: 2464-2466.
- [6] Guo Y, Ma Y. Analysis of common prescriptions for treatment of osteoporosis with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul (中国实验方剂学杂志), 2010, 7: 188-191.
- [7] Wang YM, Zhu Y, Lu SD, et al. Beneficial effects of paeoniflorin on osteoporosis induced by high-carbohydrate, high-fat diet-associated hyperlipidemia *in vivo* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498: 981-987.
- [8] Shavandi A, Bekhit AEA, Saeedi P, et al. Polyphenol uses in biomaterials engineering [J]. Biomaterials, 2018, 167: 91-106.
- [9] Ma XR, Wang YL, Zou DX, et al. The effects of Huangqin Tang on oxidative stress and ulcerative colitis in rats through Nrf2 signal pathway [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 653-659.
- [10] Yang F, Lin ZW, Huang TY, et al. Ligustilide, a major bioactive component of *Angelica sinensis*, promotes bone formation via the GPR30/EGFR pathway [J]. Sci Rep, 2019, 9: 6991.
- [11] Weitzmann MN, Oforokun I. Physiological and pathophysiological bone turnover - role of the immune system [J]. Nat Rev Endocrinol, 2016, 9: 518-532.
- [12] Wang YM, Dai JZ, Zhu Y, et al. Paeoniflorin regulates osteoclastogenesis and osteoblastogenesis via manipulating NF- $\kappa$ B signaling pathway both *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncotarget, 2018, 9: 7372-7388.
- [13] Lin ZW, Yang F, Huang TY, et al. Study on the anti-osteoporosis effect of paeoniflorin on osteoblast apoptosis and zebrafish osteoporosis model [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2019, 35: 426-431.
- [14] Yu JJ, Wu JX, Liang YF et al. Simultaneous quantitative determination of six active compounds from *Paeoniae Rubra Radix* and *Paeoniae Alba Radix* by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 1673-1677.
- [15] Alldritt I, Agut BW, M Sipin et al. Metabolomics reveals diet-derived plant polyphenols accumulate in physiological bone [J]. Sci Rep, 2019, 9: 8047.
- [16] Ahn D, Cha DS, Lee EB, et al. The longevity properties of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-beta-*D*-glucose from *Curcuma longa* in *Caenorhabditis elegans* [J]. Biomol Ther (Seoul), 2013, 21: 442-446.
- [17] Choi BM, Kim HJ, Oh GS, et al. 1,2,3,4,6-Penta-*O*-galloyl-beta-*D*-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide-mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1 [J]. Neurosci Lett, 2002, 328: 185-189.
- [18] Almeida M, Han L, Ambrogini E, et al. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts [J]. J Biol Chem, 2011, 286: 44326-44335.
- [19] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 7446: 498-503.

- [20] Zhao BJ, Zhang L, Yuan JR, et al. Beneficial effects of low glycosides fraction from Epimedii Herba on UMR-106 cells and zebrafish with osteoporosis [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 19: 3441-3446.
- [21] Sato AY, Tu X, McAndrews KA, et al. Prevention of glucocorticoid induced-apoptosis of osteoblasts and osteocytes by protecting against endoplasmic reticulum (ER) stress *in vitro* and *in vivo* in female mice [J]. Bone, 2015, 73: 60-68.
- [22] Li J, Li H, Li Q, et al. Repaglinide inhibits cyclosporine A-induced renal tubular toxicity by affecting apoptosis and Bax and Bcl-2 expression [J]. Turk J Med Sci, 2018, 48: 880-885.
- [23] Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, et al. Bcl-xL retrotranslocates bax from the mitochondria into the cytosol [J]. Cell, 2011, 145: 104-116.
- [24] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 17: 3221-3247.