

人参皂苷 Rh1 对 MC3T3-E1 细胞增殖和分化的促进作用及其机制

毛天娇¹, 孙 铎¹, 高 幸¹, 魏 激¹, 李熙恒¹, 姜可新¹, 姜 秋², 李 江^{1,3}

(1. 吉林大学口腔医院口腔修复科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学口腔医院儿童口腔科, 吉林 长春 130021; 3. 广州医科大学附属口腔医院口腔修复科, 广东 广州 510150)

[摘要] **目的:** 筛选靶向上调雌激素受体 β (ER β) 转录和表达的人参皂苷单体, 研究其对 MC3T3-E1 细胞增殖和分化的影响及其机制。**方法:** 采用 PGL2-ER β 和内参 Renilla 荧光素酶质粒 Prep7-Rluc 共同转染 HEK293T 细胞, 细胞分为对照组, 雌二醇组 (1×10^{-6} mmol \cdot L $^{-1}$), 人参皂苷 Rb1 组、Rb2 组、Rd 组、Rg1 组、Rg2 组和 Rh1 组 (1×10^{-5} mmol \cdot L $^{-1}$), 通过双荧光素酶报告基因实验检测各组细胞双荧光素酶活性。进一步将 MC3T3-E1 细胞分为对照组、雌二醇组和不同浓度 (1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 及 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$) 人参皂苷 Rh1 组, 采用 Western blotting 法检测各组 MC3T3-E1 细胞中 ER β 蛋白表达水平。通过 Auto Dock 分子对接实验, 模拟人参皂苷 Rh1 与 ER β 蛋白分子的结合情况。MC3T3-E1 细胞分为对照组、雌二醇组和不同浓度 (5×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 及 5×10^{-3} mmol \cdot L $^{-1}$) 人参皂苷 Rh1 组, 分别作用 24、48 和 72 h 后, 采用 CCK-8 法检测各组细胞增殖率。MC3T3-E1 细胞分为对照组、雌二醇组 (1×10^{-6} mmol \cdot L $^{-1}$) 和不同浓度 (1×10^{-5} 及 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$) 人参皂苷 Rh1 组, 配制成骨诱导液, 分别诱导 MC3T3-E1 细胞 7、14 和 21 d, 采用碱性磷酸酶 (ALP) 染色和茜素红染色检测细胞中 ALP 和钙化结节染色面积, 观察人参皂苷 Rh1 对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的影响。**结果:** 双荧光素酶报告基因实验, 各组 HEK293T 细胞中转染 ER β -PGL2 质粒后, 与对照组比较, 1×10^{-5} mmol \cdot L $^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 组细胞荧光素酶活性明显升高 ($P < 0.05$)。Western blotting 法检测, 与对照组比较, 不同浓度人参皂苷 Rh1 组细胞中 ER β 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 且 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 组细胞中 ER β 蛋白表达水平最高。Auto Dock 分析, 人参皂苷 Rh1 可以结合在 ER β 蛋白的配体结合口袋内。CCK-8 实验, 培养 24、48 和 72 h 后, 与对照组比较, 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-4} 和 1×10^{-3} mmol \cdot L $^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 组 MC3T3-E1 细胞增殖率均明显升高 ($P < 0.01$), 其中 72 h 时 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 组细胞增殖率最高。成骨诱导分化后, 与对照组比较, 不同浓度人参皂苷 Rh1 组细胞中 ALP 染色面积明显增加, 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 组细胞中 ALP 染色面积最大, 而且 14 d 时 ALP 染色面积较 7 d 时明显增加, 具有时间和浓度依赖性; 与对照组比较, 不同浓度人参皂苷 Rh1 组细胞矿化结节茜素红染色面积明显增加。**结论:** 人参皂苷 Rh1 能够明显促进成骨细胞的增殖和分化, 其机制可能与其靶向上调细胞中 ER β 的转录和表达有关。

[关键词] 人参皂苷 Rh1; 骨质疏松症; MC3T3-E1 细胞; 雌激素受体 β

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[收稿日期] 2020-12-02

[基金项目] 科技部国家重点研发计划项目 (2020YFE010636); 吉林省科技厅科研项目 (20200201025JC); 吉林省科技厅科技发展计划项目 (20190201082JC); 吉林省财政厅科研项目 (jsz2018170-3); 吉林省长春市科技局科技计划项目 (17YJ001)

[作者简介] 毛天娇 (1992—), 女, 河南省许昌市人, 住院医师, 医学硕士, 主要从事口腔修复学方面的研究。

[通信作者] 李 江, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: lijia@gzhu.edu.cn);
姜 秋, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: jiangqiu@163.com)

Promotion effect of ginsenoside Rh1 on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells and its mechanism

MAO Tianjiao¹, SUN Duo¹, GAO Xing¹, WEI Wei¹, LI Xiheng¹, JIANG Kexin¹,

JIANG Qiu², LI Jiang^{1,3}

(1. Department of Prosthodontics, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Department of Pediatric Dentistry, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

3. Department of Prosthodontics, Affiliated Stomatology Hospital, Guangzhou Medical University,

Guangzhou 510150, China)

ABSTRACT Objective: To screen the ginsenoside monomer targetedly up-regulating the transcription and expression of estrogen receptor β (estrogen receptor β , ER β), and to explore its effect on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells and its possible mechanism. **Methods:** PGL2-ER β was co-transfected into the HEK293T cells with Renilla luciferase plasmid Prep7-Rluc, then the HEK293T cells were divided into control group, estradiol group (1×10^{-6} mmol \cdot L $^{-1}$), ginsenoside Rb1, Rb2, Rd, Rg1, Rg2 and Rh1 groups (1×10^{-5} mmol \cdot L $^{-1}$). The dual luciferase activities in various groups were detected by dual luciferase reporter gene assay. The MC3T3-E1 cells were further divided into control group, estradiol group (1×10^{-6} mmol \cdot L $^{-1}$), ginsenoside Rh1 group (1×10^{-6} mmol \cdot L $^{-1}$, 1×10^{-5} mmol \cdot L $^{-1}$ and 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$). The expression levels of ER β protein in the MC3T3-E1 cells in various groups were detected by Western blotting method. The binding of ginsenoside Rh1 to ER β protein was simulated by Auto Dock experiment. The MC3T3-E1 cells were divided into control group, estradiol group (1×10^{-6} mmol \cdot L $^{-1}$), ginsenoside Rh1 group (5×10^{-6} mmol \cdot L $^{-1}$, 1×10^{-5} mmol \cdot L $^{-1}$, 5×10^{-5} mmol \cdot L $^{-1}$, 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$, 1×10^{-3} mmol \cdot L $^{-1}$ and 5×10^{-3} mmol \cdot L $^{-1}$), after treated for 24, 48 and 72 h, the cell proliferation rates in various groups were detected by CCK-8 method. The MC3T3-E1 cells were divided into control group, estradiol group (1×10^{-6} mmol \cdot L $^{-1}$), and ginsenoside Rh1 groups (1×10^{-5} mmol \cdot L $^{-1}$ and 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$). The MC3T3-E1 cells were induced with osteogenic induction solution for 7, 14 and 21 d, respectively; alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red staining were used to detect the staining areas of ALP and calcified nodules in the MC3T3-E1 cells and observe the effect of ginsenoside Rh1 on the osteogenic differentiation of the MC3T3-E1 cells. **Results:** In double luciferase reporter gene experiment, compared with control group, the luciferase activity of cells in ginsenoside Rh1 group (1×10^{-5} mmol \cdot L $^{-1}$) was significantly increased after ER β -PGL2 plasmid was transfected into the 293T cells ($P < 0.05$). The results of Western blotting method showed that compared with blank control group, the expression levels of ER β protein in the MC3T3-E1 cells in different concentrations of ginsenoside Rh1 groups were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression level of ER β protein reached the highest at the concentration of 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$. In Auto Dock analysis, ginsenoside Rh1 could bind in the ligand binding pocket of ER β protein. In CCK-8 experiment, compared with blank control group, the proliferation activities of MC3T3-E1 cells in 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} and 1×10^{-3} mmol \cdot L $^{-1}$ ginsenoside Rh1 groups after cultured for 24, 48 and 72 h were significantly increased ($P < 0.01$), and the proliferation rate of cells in 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$ ginsenoside group reached the highest at 72 h. After osteogenic in differentiation, compared with control group, the ALP staining areas in different concentrations of ginsenoside Rh1 groups were significantly increased; when the ginsenoside concentration was 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$, the staining area of ALP was the largest, and the staining area of ALP at 14 d was significantly increased compared with that at 7 d, in a time-and concentration-dependent

manner; compared with control group, the alizarin red staining areas of mineralized nodules in different concentrations of ginsenoside Rh1 groups were significantly increased. **Conclusion:** Ginsenoside Rh1 can significantly promote the proliferation and differentiation of osteoblasts, and its mechanism may be related to the up-regulation of ER β transcription and expression.

KEYWORDS ginsenoside Rh1; osteoporosis; MC3T3-E1 cell; estrogen receptor β

骨质疏松症是一种常见的与衰老相关的疾病,尤其高发于绝经后妇女,严重影响患者的健康和生活质量^[1],除导致股骨和髌骨等长骨的脆性骨折外,也会导致颌骨密度和牙槽骨高度降低,从而加速牙齿的脱落,并影响义齿修复、种植体植入和颌面部整形手术等口腔治疗^[2]。随着全球人口老龄化进程的加剧,骨质疏松症的发病率呈逐年升高的态势^[3],治疗骨质疏松症的高成本给社会和个人都带来了巨大的压力,是目前全球最严重的公共卫生医疗挑战^[4]。长期以来中药一直用于预防和治疗骨质疏松症,与化学合成药物比较,中药不良反应少,更适合长期使用,因此在国内外受到广泛关注和研究。人参广泛用于预防和治疗各种疾病^[5],人参皂苷是人参的主要活性成分,已有研究^[6-7]表明:人参皂苷Rb1和Rg3具有治疗骨质疏松的作用,但其作用机制尚不清楚。雌激素受体(estrogen receptor, ER)广泛存在于骨组织中,雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β)是其主要表达形式^[8]。本研究以ER β 为靶点,筛选出可以靶向上调细胞内ER β 转录和表达的人参皂苷单体,并进一步探讨其对MC3T3-E1细胞增殖和分化的影响,为人参皂苷治疗骨质疏松症提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人胚肾上皮细胞系HEK293T和小鼠前成骨细胞系MC3T3-E1购自美国组织培养库(American Tissue Culture Collection, ATCC细胞库)。PGL2-ER β 质粒由东北师范大学生命科学院实验室自制。DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶和青-链霉素等试剂(美国Gibco公司),人参皂苷单体(Rb1、Rb2、Rd、Rg1、Rg2和Rh1)和雌二醇(estradiol, E2)(宝鸡辰光科技有限公司),内参 β -actin、兔抗ER β 和HRP标记二抗(英国Abcam公司), β -甘油磷酸钠和抗坏血酸(美国Sigma公司),RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL发光试剂盒、CCK-8试剂盒、4%多聚甲醛、BCIP/NBT碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)显色试剂盒和茜素红S(上海

碧云天生物技术有限公司)。CO₂恒温细胞培养箱(日本SANYO公司),Vanox倒置显微镜(日本Olympus公司),酶标仪(美国Bio-TEK公司),电泳仪(美国赛默飞世尔公司)。

1.2 细胞培养 自液氮中取出冻存的293T细胞和MC3T3-E1细胞复苏,采用含10%胎牛血清和1%青霉素及链霉素的DMEM完全培养基,于37℃、5%CO₂培养箱中培养,每3~5 d传代1次,传3代后,待细胞活力恢复用于后续实验。

1.3 双荧光素酶报告基因实验检测 HEK293T 细胞相对荧光素酶活性 为筛选能够激活ER β 启动子的人参皂苷单体,取对数生长期的HEK293T细胞,按每孔 8×10^3 个细胞的密度接种于48孔板中,置于37℃、5%CO₂孵箱中培养,待细胞贴壁生长至80%融合后,转染PGL2-ER β 和内参Renilla荧光素酶质粒Prep7-Rluc至HEK293T细胞中。转染16 h后,细胞分为对照组、雌二醇组和人参皂苷组,分别用PBS缓冲液,雌二醇(1×10^{-6} mmol·L⁻¹)和人参皂苷Rb1、Rb2、Rd、Rg1、Rg2、Rh1(1×10^{-5} mmol·L⁻¹)分别处理细胞,每组设6个复孔,给药24 h后,检测并计算双荧光素酶报告基因活性,代表ER β 启动子转录活性。相对荧光素酶活性=萤火虫荧光强度/内参海肾荧光强度。实验重复3次。

1.4 Western blotting 法检测各组 MC3T3-E1 细胞中 ER β 蛋白表达水平 MC3T3-E1细胞分为对照组、雌二醇组和不同浓度(1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 和 1×10^{-4} mmol·L⁻¹)人参皂苷Rh1组,分别用PBS缓冲液、雌二醇(1×10^{-6} mmol·L⁻¹)和不同浓度人参皂苷Rh1处理各组细胞24 h后,收集细胞,使用预冷过的PBS缓冲液洗涤后,加入适量RIPA裂解液,置于冰上裂解30 min,4℃、12 000 r·min⁻¹离心15 min,收集上清,用BCA法检测并定量总蛋白浓度。取20 μ g各组蛋白进行上样,行SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,转膜,5%脱脂牛奶室温下封闭1 h,加入ER β 抗体(1:400)和 β -actin抗体(1:1 000),4℃条件下孵育过夜。次日,1×TBST洗涤3次,每次5 min,随后加入辣根过

氧化物酶标记的二抗,于室温下孵育 1 h, $1\times$ TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入增强型化学发光剂 ECL 进行显影。ER β 蛋白表达水平=ER β 蛋白条带灰度值/内参 β -actin 蛋白条带灰度值。实验重复 3 次。

1.5 Auto Dock 分子结构对接 准备配体文件,从美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 上下载的 Rh1 小分子配体文件进行保存,采用 SDF 格式。通过 PyMOL 3D 分子视图软件和 PMV-1.5.6 软件,对该分子进行初始化并将处理后的配体文件输出,其格式为 pdbqt。然后准备大分子受体蛋白质文件,ER β 大分子受体蛋白文件需要从蛋白质数据库中下载,保存为 pdb 格式,把大分子受体蛋白去掉 H_2O 分子并添加 H 原子,保存后将其输出至 pdbqt 格式文件。运行 Auto Grid4 和 Auto Dock4,在 PMV-1.5.6 软件中将处理后的大小分子完整放置于 Grid 格子中,设置合理的格子把 Auto Grid 参数保存成 GPF 文件。选择上述得到的小分子配体文件、大分子配体文件和 Auto Grid 参数;在 PMV-1.5.6 软件中载入之前准备好的小分子和大分子 pdbqt 文件,并进行相关文件的设置,在对接运行参数后,采用马克遗传算法运行程序并生成 dlq 格式文件。最后,在 PMV-1.5.6 软件中打开文件,日志中的对接结果分子构象为 10 个,并将相关数据显示出来,载入大分子,分析对接情况。

1.6 CCK-8 法检测 MC3T3-E1 细胞增殖率 实验分为对照组、雌二醇组 (1×10^{-6} mmol \cdot L $^{-1}$) 和不同浓度 (5×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 和 5×10^{-3} mmol \cdot L $^{-1}$) 人参皂苷 Rh1 组。取对数生长期 MC3T3-E1 细胞,按每孔 8×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 孵箱中培养,待细胞贴壁后,按照实验分组给予药物,每组设 5 个复孔,继续培养 24、48 和 72 h 后,弃培养液,每孔加入 100 μ L 不含血清的 DMEM 培养基和 10 μ L CCK-8,继续孵育 3 h,采用酶标仪测定波长 450 nm 处吸光度 (A) 值,计算细胞增殖率。细胞增殖率 = 实验组 A 值/对照组 A 值 \times 100%。实验重复 3 次。

1.7 成骨诱导实验 MC3T3-E1 细胞分为对照组、雌二醇组 (1×10^{-6} mmol \cdot L $^{-1}$) 和不同浓度 (1×10^{-5} 及 1×10^{-4} mmol \cdot L $^{-1}$) 人参皂苷 Rh1 组。将状态良好的 MC3T3-E1 细胞接种于 6 孔板,用含

10% 胎牛血清和 1% 青霉素及链霉素的 DMEM 完全培养基培养,24 h 后更换为成骨诱导培养基 (10 mmol \cdot L $^{-1}$ β -甘油磷酸钠, 50 mg \cdot L $^{-1}$ 抗坏血酸,含 10% 胎牛血清的 DMEM),每隔 1 d 更换 1 次成骨诱导培养基,根据实验需求分别诱导 7、14 和 21 d。

1.8 偶氮偶联法 ALP 染色 细胞分组同“1.7”,取对数生长期 MC3T3-E1 细胞按每孔 3×10^5 的密度接种于 6 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 孵箱中培养,待细胞贴壁后,更换为含有不同浓度药物的成骨诱导培养基,每 3 d 更换 1 次成骨诱导培养基,分别诱导 7 和 14 d。诱导完成后,使用 PBS 缓冲液清洗,4% 多聚甲醛固定后,在室温避光条件下,按照说明书的步骤,配制 BCIP/NBT 工作液进行 ALP 染色,反应中止后在显微镜下观察 ALP 染色面积,ALP 染色阳性可见细胞质呈蓝紫色,并且有蓝紫色颗粒物。

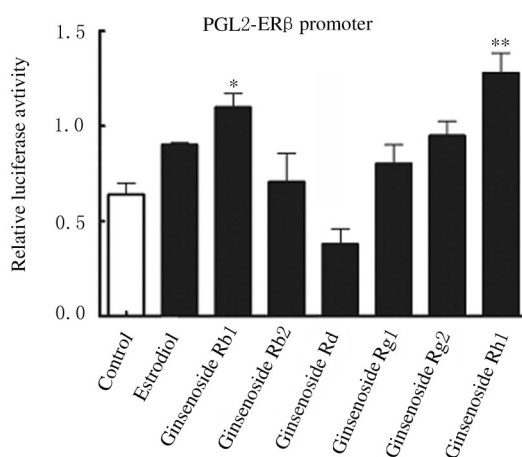
1.9 茜素红染色观察细胞中钙化结节面积 细胞分组同“1.7”,取对数生长期 MC3T3-E1 细胞按每孔 3×10^5 的密度接种于 6 孔板后置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 孵箱中培养,待细胞贴壁后,更换为含有不同浓度药物的成骨诱导培养基,每 3 d 更换 1 次成骨诱导培养基,诱导 21 d 后,使用 PBS 缓冲液清洗,4% 多聚甲醛固定后,在室温避光条件下,按照说明书的步骤,用 1% 浓度的茜素红染液进行染色,反应终止后观察钙结节染色结果及面积,矿化结节呈红色斑点状。

1.10 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析。各组 293T 细胞相对荧光素酶活性、MC3T3-E1 细胞中 ER β 蛋白表达水平和细胞增殖率均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本平均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用 SNK- q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 HEK293T 细胞相对荧光素酶活性 双荧光素酶报告基因实验结果显示:与对照组比较,人参皂苷 Rb1 和人参皂苷 Rh1 组 HEK293T 细胞相对荧光素酶活性明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且人参皂苷 Rh1 组 HEK293T 细胞相对荧光酶活性最高,表明人参皂苷 Rh1 组 HEK293T 细胞中 ER β 启动子的转录活性明显上调。见图 1。

2.2 各组 MC3T3-E1 细胞中 ER β 蛋白表达水平 与对照组比较,人参皂苷 Rh1 组和雌二醇组



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图1 各组 HEK293T 细胞相对荧光素酶活性

Fig.1 Activities of luciferase in HEK293T cells in various groups

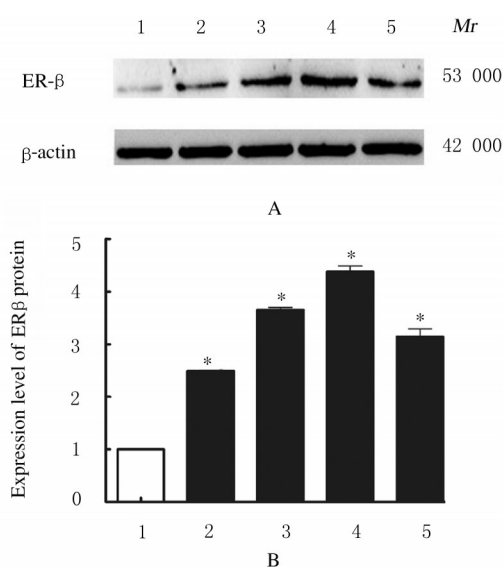
MC3T3-E1 细胞中 ER β 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 且人参皂苷 Rh1 具有浓度依赖性, 浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞中 ER β 蛋白表达水平最高。见图 2。

2.3 人参皂苷 Rh1 与 ER β 分子对接实验 通过 Auto Dock 计算模拟人参皂苷 Rh1 与 ER β 的分子对接, 结果显示: 人参皂苷 Rh1 可结合在 ER β 的配体结合口袋内。有 7 个氨基酸对接位点: GLU-291、GLY-367、LYS-368、VAL-370、GLU-371、GLY-372 和 LEU-374。见图 3。

2.4 各组 MC3T3-E1 细胞增殖率 不同浓度人参皂苷 Rh1 和雌二醇与 MC3T3-E1 细胞共培养 24、48 和 72 h 后, 与对照组比较, 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-4} 和 $1 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 组及雌二醇组 MC3T3-E1 细胞增殖率明显升高 ($P < 0.01$), 且随着时间延长, 细胞增殖率明显升高, 72 h 时 $1 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 组细胞增殖率最高。见表 1。

2.5 各组 MC3T3-E1 细胞 ALP 染色结果 MC3T3-E1 细胞成骨诱导分化 7 和 14 d 后, 与对照组比较, 不同浓度人参皂苷 Rh1 组 MC3T3-E1 细胞中可见大量散在胞质内的蓝紫色颗粒, 细胞 ALP 染色呈阳性, $1 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 组细胞 ALP 染色面积最大, 且 14 d 时 ALP 染色面积较 7 d 时明显增加。见图 4。

2.6 各组 MC3T3-E1 细胞钙化结节茜素红染色结果 成骨诱导分化 21 d 后, 各组 MC3T3-E1 细胞中均有红染钙化结节, 与对照组比较, 不同浓度人



Lane 1: Control group; Lane 2: $1 \times 10^{-6} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ginsenoside Rh1 group; Lane 3: $1 \times 10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ginsenoside Rh1 group; Lane 4: $1 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ginsenoside Rh1 group; Lane 5: Estradiol group. * $P < 0.01$ compared with control group.

图2 各组 MC3T3-E1 细胞中 ER β 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 2 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of ER β protein in MC3T3-E1 cells in various groups

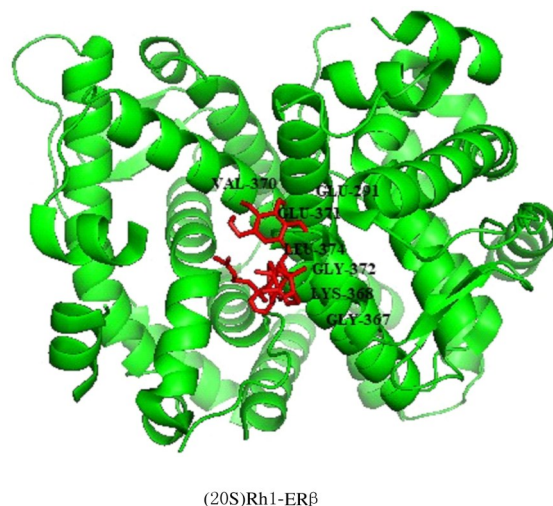


图3 人参皂苷 Rh1 与 ER β 对接位点

Fig. 3 Docking sites of ginsenoside Rh1 and ER β

参皂苷 Rh1 组 MC3T3-E1 细胞中红色钙化结节面积明显增加, $1 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 组钙化结节面积最大, 与雌二醇组接近。见图 5。

表1 各组 MC3T3-E1 细胞增殖率

Tab. 1 Proliferation rates of MC3T3-E1 cells in various groups
($n=5, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Proliferation rate		
	(t/h) 24	48	72
Control	100.000 \pm 0.116	100.000 \pm 0.011	100.000 \pm 0.013
Ginsenoside Rh1(mmol·L ⁻¹)			
5 \times 10 ⁻⁶	103.579 \pm 0.072	103.954 \pm 0.013	104.952 \pm 0.021
1 \times 10 ⁻⁵	108.301 \pm 0.071*	108.302 \pm 0.012*	109.731 \pm 0.023*
5 \times 10 ⁻⁵	110.159 \pm 0.078*	112.582 \pm 0.009*	113.025 \pm 0.023*
1 \times 10 ⁻⁴	117.323 \pm 0.067*	120.016 \pm 0.011*	122.282 \pm 0.021*
1 \times 10 ⁻³	107.158 \pm 0.068*	109.711 \pm 0.013*	107.632 \pm 0.019*
5 \times 10 ⁻³	103.107 \pm 0.103	103.292 \pm 0.015	102.107 \pm 0.014
Estrodiol	109.663 \pm 0.071*	110.770 \pm 0.009*	111.819 \pm 0.009*

* $P<0.01$ compared with control group.

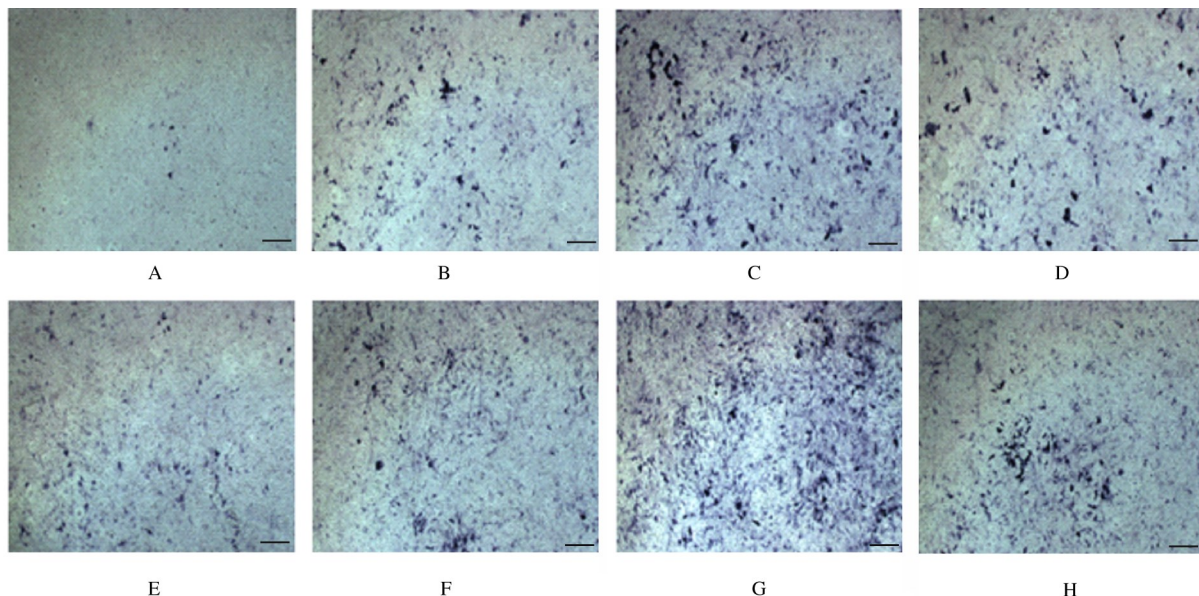
3 讨 论

随着年龄的增长,骨量的减少和成骨能力的降低会影响颌面外科手术和种植牙的效果^[9]。有研究^[10]表明:治疗骨质疏松症的药物可以有效改善牙槽骨的丢失,并促进种植体周围的骨整合。目前,临床上常用的双膦酸盐、雌激素替代疗法和选择性雌激素受体调节剂等虽然可以在一定程度上改善骨质疏松症,但长期使用都会产生不良反应^[11-12]。如何阻止骨质疏松症的发生发展一直是研

究的热点。

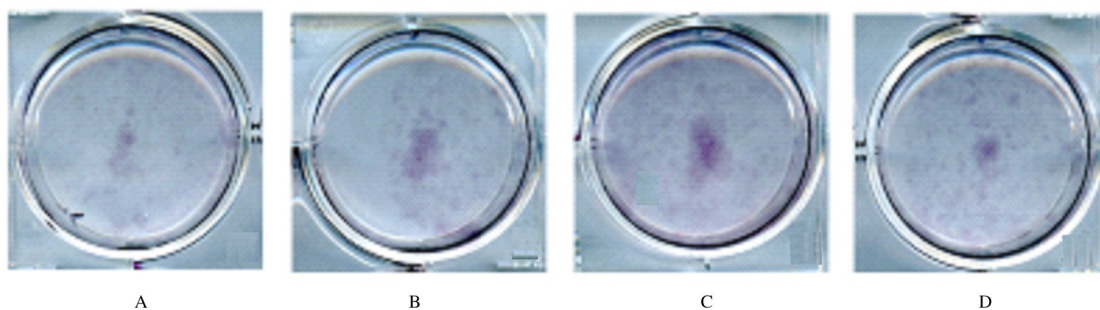
来自中药的天然产物是开发新药的优秀且可靠的来源。人参皂苷是人参、西洋参和三七中的主要有效成分,可溶于无水乙醇和DMSO,不溶于水,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节和抗骨质疏松等多种药理活性^[13-14];人参皂苷与内源性雌激素结构相似,可以作为ER的选择性配体^[14]。ER在协调成骨细胞和破骨细胞在骨稳态中的活性以及预防绝经后骨质流失中起重要作用。是潜在的治疗骨质疏松的靶标^[15]。研究^[16-17]显示:ER β 参与了骨代谢,在成骨细胞分化过程中处于高表达水平。因此本研究以ER β 作为靶点,筛选出可以靶向上调ER β 转录和表达的人参皂苷 Rh1,并利用 Auto Dock 分子作用力分析软件 3D 模拟人参皂苷 Rh1 与 ER β 的结合,进一步证实了人参皂苷 Rh1 可以与 ER β 蛋白发生分子结构对接,表明人参皂苷 Rh1 可以与成骨细胞内的 ER β 基因序列启动子上的结合位点相结合,从而上调其转录和表达,起到了与内源性雌激素类似的作用。

本研究进一步探讨人参皂苷 Rh1 对 MC3T3-E1 细胞增殖和分化的作用,结果表明:在一定浓度范围内,人参皂苷 Rh1 可以呈浓度依赖性促进 MC3T3-E1 细胞增殖。成骨细胞的分化和基质钙化是骨形成的基础,ALP 是骨形成时期活跃分泌的蛋白,可以启动成骨细胞的钙化,是常用的评估成



A—D: 7 d, E—H: 14 d; A, E: Control group; B, F: 1 \times 10⁻⁵ mmol·L⁻¹ ginsenoside Rh1 group; C, G: 1 \times 10⁻⁴ mmol·L⁻¹ Rh1 group; D, H: Estrodiol group.

图4 各组 MC3T3-E1 细胞成骨分化过程中 ALP 染色(Bar=500 μ m)Fig. 4 Results of ALP staining of MC3T3-E1 cells during osteogenic differentiation in various groups (Bar=500 μ m)



A: Control group; B: 1×10^{-5} mmol·L⁻¹ ginsenoside Rh1 group; C: 1×10^{-4} mmol·L⁻¹ ginsenoside Rh1 group; D: Estrodiol group.

图5 各组MC3T3-E1细胞成骨分化过程中骨基质的钙化(茜素红)

Fig. 5 Calcification of bone matrix during osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells in various groups (Alizarin red)

骨细胞早期分化的指标^[18-20]。本研究结果显示:人参皂苷Rh1可以明显增强MC3T3-E1细胞中ALP活性,促进成骨细胞的早期分化。茜素红染色是测定成骨细胞基质钙化的特异性指标,本研究结果表明:人参皂苷Rh1可以明显促进MC3T3-E1细胞基质中钙化结节的形成。

综上所述,人参皂苷Rh1可以与MC3T3-E1细胞中的ER β 靶向结合,从而上调细胞中ER β 的转录和表达水平,促进成骨细胞的增殖和分化。本研究结果为人参皂苷Rh1用于骨质疏松症的防治提供了依据。

[参考文献]

- [1] YANG D, LIU T, JIANG G, et al. Senkyunolide H attenuates osteoclastogenesis and postmenopausal osteoporosis by regulating the NF- κ B, JNK and ERK signaling pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 533(3): 510-518.
- [2] CHEN C H, WANG L, SERDAR TULU U, et al. An osteopenic/osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair[J]. Bone, 2018, 112: 212-219.
- [3] IGUACEL I, MIGUEL-BERGES M L, GÓMEZ-BRUTON A, et al. Veganism, vegetarianism, bone mineral density, and fracture risk: a systematic review and meta-analysis[J]. Nutr Rev, 2019, 77(1): 1-18.
- [4] KANIS J A, COOPER C, RIZZOLI R, et al. Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis (ESCEO) and the Committees of Scientific Advisors and National Societies of the International Osteoporosis Foundation (IOF). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women[J]. Osteoporos Int, 2019, 30(1): 3-44.
- [5] ZHU H, HE Y S, MA J, et al. The dual roles of ginsenosides in improving the anti-tumor efficiency of cyclophosphamide in mammary carcinoma mice [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 265: 113271.
- [6] ZHANG X N, HUANG F L, CHEN X Y, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates ovariectomy-induced osteoporosis via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. Drug Dev Res, 2020, 81(7): 875-884.
- [7] YANG B, ZHAO S C, YAN L. The role of ginsenoside Rb1 in bone homeostasis[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2020. DOI: 10.2174/1574888x15666200628141743.
- [8] LIU Y, XU Z J, WANG Q Q, et al. Selective regulation of RANKL/RANK/OPG pathway by heparan sulfate through the binding with estrogen receptor β in MC3T3-E1 cells[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 161: 1526-1534.
- [9] JIANG L T, ZHANG W J, WEI L, et al. Early effects of parathyroid hormone on vascularized bone regeneration and implant osseointegration in aged rats [J]. Biomaterials, 2018, 179: 15-28.
- [10] KHAJURIA D K, PATIL O N, KARASIK D, et al. Development and evaluation of novel biodegradable chitosan based metformin intrapocket dental film for the management of periodontitis and alveolar bone loss in a rat model[J]. Arch Oral Biol, 2018, 85: 120-129.
- [11] PATERNI I, GRANCHI C, KATZENELLENBOGEN J A, et al. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential[J]. Steroids, 2014, 90: 13-29.
- [12] COMPSTON J E, MCCLUNG M R, LESLIE W D. Osteoporosis[J]. Lancet, 2019, 393(10169): 364-376.
- [13] KIM J H, YI Y S, KIM M Y, et al. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases [J]. J Ginseng Res, 2017, 41(4): 435-443.
- [14] ZHANG T, ZHONG S, LI T, et al. Saponins as

- modulators of nuclear receptors [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020,60(1):94-107.
- [15] THOMAS T, MARTIN A. Formation osseuse, facteurs de régulation [J]. J Soc Biol, 2008, 202(4): 257-264.
- [16] SCHMOLDT A, BENTHE H F, HABERLAND G. Digitoxin metabolism by rat liver microsomes [J]. Biochem Pharmacol, 1975,24(17):1639-1641.
- [17] WIREN K M, CHAPMAN EVANS A, ZHANG X W. Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and-beta expression [J]. J Endocrinol, 2002,175(3):683-694.
- [18] LIN Y T, PENG S W, IMTIYAZ Z, et al. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the osteogenic potential of *Davallia mariesii* T. Moore ex Baker [J]. J Ethnopharmacol, 2021,264:113126.
- [19] 顾艺婧,傅稼耀,武文婧,等.抗骨相关细胞衰老作用治疗雌激素缺乏骨质疏松症的初步研究[J].同济大学学报(医学版),2019,40(3):274-280.
- [20] KUO T R, CHEN C H. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives[J]. Biomark Res, 2017, 5: 18.