

· 论 著 ·

马卡列丙中 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌对成骨细胞增殖、分化和矿化的影响^{*}

刘可心,余 迈,李莎妮,肖顺利,刘 冰[△]

(湖南医药学院药学院,湖南 怀化 418000)

[摘 要] **目的** 探究马卡列丙中蒽醌类成分 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌对成骨细胞增殖、分化和矿化的影响。**方法** 以 MC3T3-E1 成骨细胞作为对象研究,设立阴性对照组(二甲基亚砷)、阳性对照组(雌二醇)和药物组,采用四甲基偶氮唑盐比色法检测不同质量浓度 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖活性的影响,选出增殖活性最强的浓度进行后续研究,采用碱性磷酸酶染色法测定 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-羟基蒽醌对 MC3T3-E1 成骨细胞的分化程度,茜素红染色评估 1,6,8-三羟基 2,7-二甲氧基-3-羟基蒽醌对 MC3T3-E1 成骨细胞矿化能力的影响。**结果** 药物组 MC3T3-E1 成骨细胞在 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌质量浓度为 100 nmol/L 时增殖活性最高,选用质量浓度为 100 nmol/L 的 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌能促进 MC3T3-E1 成骨细胞的分化和矿化。**结论** 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌能显著促进成骨细胞增殖、分化和矿化水平,为马卡列丙的促骨折愈合作用提供了理论基础。

[关键词] 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌; 马卡列丙; 成骨细胞; 增殖; 分化; 矿化

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.07.008

中图法分类号:R966

文章编号:1009-5519(2023)07-1117-04

文献标识码:A

Effects of 1,6,8-trihydroxy-2,7-dimethoxy-3-methylanthraquinone on the proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts^{*}

LIU Kexin, YU Mai, LI Shani, XIAO Shunli, LIU Bing[△]

(College of Pharmacy, Hunan Medical College, Huaihua, Hunan 418000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of the anthraquinone components of 1,6,8-trihydroxy-2,7-dimethoxy-3-methylanthraquinone in *Duhaldea nervosa* on the proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts. **Methods** MC3T3-E1 osteoblasts were studied, and the negative control group (dimethyl sulfoxide), the positive control group (estradiol) and the drug group were established. The effects of different concentrations of 1,6,8-trihydroxy-2,7-dimethoxy-3-methylanthraquinone on the proliferation activity of MC3T3-E1 osteoblasts were detected by tetramethylazolium salt colorimetric method. The concentration with the strongest proliferation activity was selected for the follow-up study. The differentiation degree of 1,6,8-trihydroxy-2,7-dimethoxy-3-methylanthraquinone on MC3T3-E1 osteoblasts was determined by alkaline phosphatase staining. And the influence of 1,6,8-trihydroxy-2,7-dimethoxy-3-methylanthraquinone on the mineralization ability of MC3T3-E1 osteoblasts was evaluated by alizarin red staining. **Results** In the drug group, the osteoblasts of MC3T3-E1 had the highest proliferation activity when the mass concentration of 1,6,8-trihydroxy-2,7-dimethoxy-3-methylanthraquinone was 100 nmol/L, and the selection of 1,6,8-trihydroxy-2,7-dimethoxy-3-methylanthraquinone with the mass concentration of 100 nmol/L could promote the differentiation and mineralization of MC3T3-E1 osteoblasts. **Conclusion** The 1,6,8-trihydroxy-2,7-dimethoxy-3-methylanthraquinone can significantly promote the proliferation, differentiation and mineralization of osteoblast, which provides a theoretical basis for *Duhaldea nervosa* to promote fracture healing.

[Key words] 1,6,8-trihydroxy-2,7-dimethoxy-3-methylanthraquinone; *Duhaldea nervosa*; Osteoblast; Proliferation; Differentiation; Mineralization

^{*} 基金项目:湖南省大学生创新创业国家级基金项目(S202012214007)。

作者简介:刘可心(2001—),本科在读,主要从事药理学研究。 [△] 通信作者, E-mail: 877936122@qq.com。

近年来,对骨质疏松的研究已成为热点。骨质疏松的主要特点是骨组织结合能力降低、骨质流失和骨含量低,主要靠破骨细胞的骨吸收和成骨细胞的骨形成才能保证人体的骨含量,因此,对骨质疏松的研究主要是通过促进成骨细胞的骨形成或抑制破骨细胞的骨吸收达到治疗骨质疏松的作用。在中国 2019 年超过 50 岁人群的骨密度流行病学调查结果显示,男、女性骨质疏松患病率分别为 6.46%、29.13%^[1]。目前,中国女性患骨质疏松患者高于男性,且随年龄增长骨质疏松患病率增加^[2]。但引起骨质疏松的原因不仅只是人口老龄化,还有众多其他因素,如家族遗传史、绝经期后妇女、缺乏锻炼,以及患有糖尿病、类风湿性关节炎、甲状腺功能亢进症等,甚至过度饮酒、体重指数过低也会诱发骨质疏松^[3]。骨质疏松引发的急、慢性疼痛,以及残疾、行动受限等极大程度地影响了人们的生活质量。

马卡列丙又称为毛秀才、小黑药,是菊科旋覆花属显脉旋覆花的全草^[4-6]。马卡列丙作为侗药的一种曾记载于《云南中草药选》《镇南本草》等书籍中,是促骨折愈合、治疗跌打损伤的佳肴。此外马卡列丙对伤风感冒、霍乱转筋、血管神经性头痛、腹痛等疗效也较好^[7-8]。目前为止,马卡列丙中已报道的成分有挥发油类、甾体、萜类、黄酮类、苯丙素类、多糖类等^[9]。在本课题组的前期研究中,分离得到一种蒽醌化合物——1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌,其与橙黄决明素为同分异构体^[10]。

蒽醌属于多环芳烃类衍生物,在各种醌类化合物中分布广泛,有人工合成者,也有天然者,不仅是廖科、百合科、茜草科、鼠李科等高等植物中的主要活性成分,也在大黄、芦荟、雷公藤等多种中药材中广泛分布^[11],在抗肿瘤、泻下、抗菌、抗氧化、利尿、止血等多方面发挥着重要的药理作用^[12]。此外也有其他蒽醌化合物在促骨折愈合方面具有影响。有研究发现,橙黄决明素具有促进成骨细胞分化的作用^[13];也有学者发现,橙黄决明素在脂多糖诱导软骨细胞的炎症模型中发挥了抗炎及保护作用^[11]。巴戟天中蒽醌类含量较多^[14]。胡英勇等^[15]发现,巴戟天提取物能防治去除卵巢的大鼠骨丢失,促进钙沉积,从而达到治疗骨质疏松症的作用。李浩亮等^[16]发现,大黄素可通过抑制微小 RNA-338-3p 表达,激活细胞外调节蛋白激酶/骨形态发生蛋白/Smad5 信号通路促进大鼠骨质疏松性骨折的愈合。PENGJAM 等^[17]发现,芦荟素可通过丝裂原活化蛋白激酶介导的 Wnt 和骨形态发生蛋白信号通路诱导成骨细胞分化。基于此,推测 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌具有与蒽醌化合物类似的药理活性。因此,本研究探讨了 1,6,8-

三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌对成骨细胞增殖、分化和矿化方面的影响,旨在为马卡列丙的进一步开发和骨质疏松的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 MC3T3-E1 成骨细胞株购自中国科学院细胞库。

1.1.2 实验试剂 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌(本院分离提取)、 α -MEM 培养基(Gibco)、胎牛血清(FBS, Gibco)、青霉素-链霉素(P/S, HyClone)、雌二醇(SIGMA)、二甲基亚砜(DMSO, SIGMA)、四甲基偶氮唑盐比色法(MTT, 碧云天)、抗坏血酸(SIGMA)、 β -甘油磷酸钠(SIGMA)、BCIP/NBT 碱性磷酸酶(AKP)显色试剂盒(碧云天)、茜素红 S(SIGMA)等。

1.2 方法

1.2.1 MC3T3-E1 成骨细胞培养 为防止 α -MEM 基础培养基受微生物污染,开封后加入 1%青霉素-链霉素,用加入 10%胎牛血清和补充剂配成的完全生长培养基培养成骨细胞,以 25 cm² 透气培养瓶为载体,将 MC3T3-E1 成骨细胞置于 37 ℃、5%二氧化碳细胞恒温培养箱中培养,待培养瓶中 MC3T3-E1 成骨细胞贴壁成梭形长满后进行传代、铺板处理。

1.2.2 MC3T3-E1 成骨细胞增殖活性检测 将 MC3T3-E1 成骨细胞培养至对数生长期用胰酶消化后按 0.5×10^4 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中,十字摇匀后将 96 孔板放回培养箱中,培养 24 h 后分为阴性对照组(DMSO)、阳性对照组(雌二醇)和药物组(分别为 0.01、0.10、1.00、10.00、100.00 nmol/L 不同质量浓度的 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌,每个质量浓度 4 个复孔)。培养 24 h 后每孔加入 10 μ L MTT 溶液,在细胞恒温培养箱中孵育 4 h,避光操作,弃废液,每孔加入 100 μ L DMSO,使形成的蓝紫色甲臞结晶溶解,待结晶完全溶解后放入酶标仪中,用 490 nm 处波长检测各孔吸光值。

1.2.3 MC3T3-E1 成骨细胞分化活性检测 将 MC3T3-E1 成骨细胞培养至对数生长期用胰酶消化后按 10×10^4 个/孔的细胞密度接种于 24 孔板中,十字摇匀后将 24 孔板放入培养箱中培养 24 h 后取出 24 孔板,分为阴性对照组、阳性对照组和药物组,选择 MTT 细胞活力实验中最佳药物质量浓度为给药组(100 nmol/L),每个质量浓度 2 个复孔。培养至第 6 天进行 AKP 染色,第 3 天换药。弃废液,每孔用 400 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,用 400 μ L 95%乙醇固定 30 min,弃废液,再次用 400 μ L PBS 洗涤 2 次,最后 1 次吸干 PBS,按说明书配置 AKP 试

剂,每孔加入 300 μ L 避光染色 24 h,在低倍镜下观察拍照。

1.2.4 MC3T3-E1 成骨细胞矿化活性检测 细胞培养方法、加药和质量浓度与 1.2.3 项相同,待培养 27 d 后弃废液,每孔用 400 μ L PBS 洗涤 2 次,用 400 μ L 95%乙醇固定 30 min,弃废液,再次用 400 μ L PBS 洗 2 次,最后 1 次吸干 PBS,每孔加入 100 μ L 0.2%茜素红 S 染色,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中染色一段时间,在高倍镜下观察并拍照。

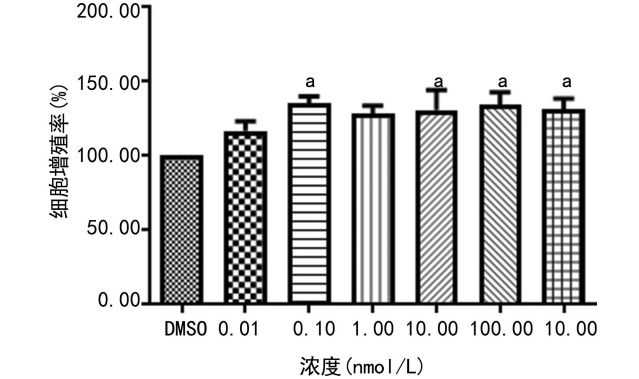
1.3 统计学处理 采用 Graphpad prism5 中的单向方差(anova)进行数据分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 MC3T3-E1 成骨细胞增殖活性比较 不同质量浓度 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-羟基蒽醌均能不同程度地促进成骨细胞增殖。100.00、10.00、0.10 nmol/L 药物组 MC3T3-E1 成骨细胞增殖活性与阴性对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

2.2 各组 MC3T3-E1 成骨细胞分化活性比较 各组

MC3T3-E1 成骨细胞质中均有被染成蓝紫色的结节,提示各组 MC3T3-E1 成骨细胞均发生了成骨分化,而药物组 MC3T3-E1 成骨细胞分化更明显。见图 2。



注:与阴性对照组比较,^a $P<0.05$ 。
图 1 各组 MC3T3-E1 成骨细胞增殖活性比较

2.3 各组 MC3T3-E1 成骨细胞矿化活性比较 各组 MC3T3-E1 成骨细胞均有不同程度矿化结节。与阴性对照组比较,药物组 MC3T3-E1 成骨细胞矿化结节数目更多,面积更大;而药物组 MC3T3-E1 成骨细胞与阳性对照组差异不明显。见图 3。

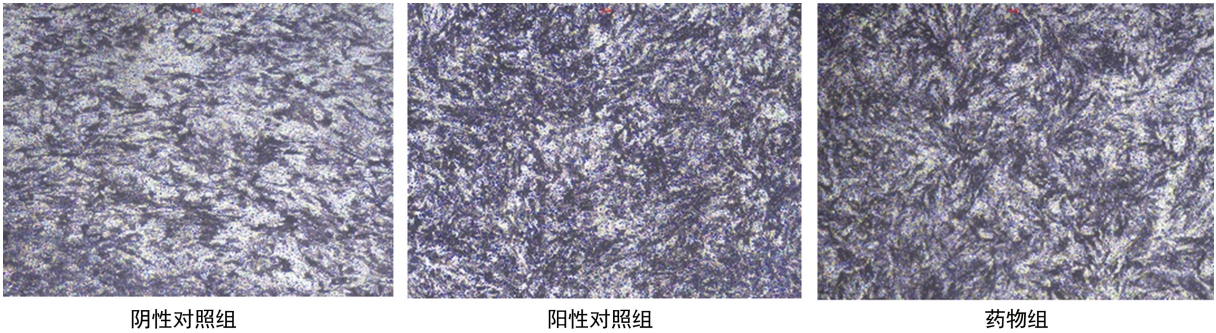


图 2 各组 MC3T3-E1 成骨细胞分化活性比较 (AKP 染色,4 $\times$)

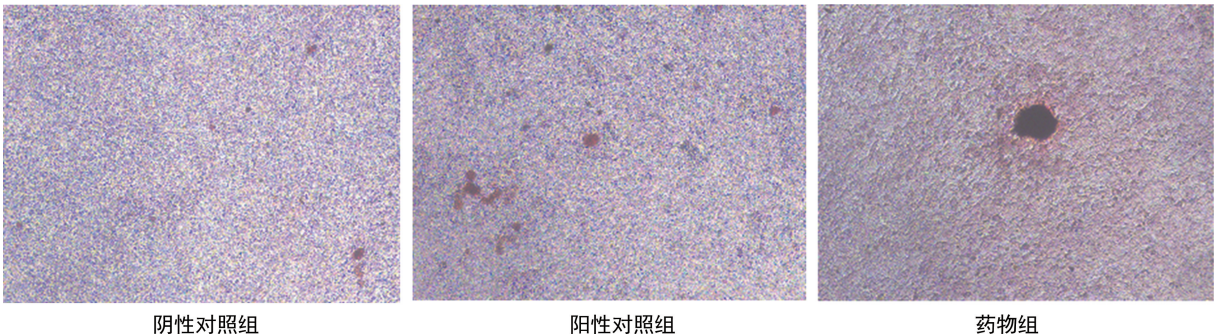


图 3 各组 MC3T3-E1 成骨细胞矿化活性比较 (茜素红 S 染色,10 $\times$)

3 讨 论

如今随着老龄化越来越严重,骨质疏松症带来的不便已严重影响了人们的生活质量。骨质疏松大多是由于骨密度降低、骨脆性增高而导致的代谢性疾病。骨间充质干细胞是非造血多能干细胞成员,成骨

细胞主要是由骨间充质干细胞分化而来,参与了骨基质的合成、分泌和矿化过程;通过单核巨噬细胞分化的破骨细胞,主要在骨骼的发育、生长、修复和重建中发挥着显著作用。本研究利用前成骨细胞——MC3T3-E1 成骨细胞株探讨了不同质量浓度 1,6,8-

三羟基-2,7-二甲氧基-3-羟基蒽醌对促进骨形成的影响。

马卡列丙的主要成分有萜类、黄酮类、糖类等。有学者已对马卡列丙化学成分进行了提取分离,从中分离得到一些蒽醌类化合物单体^[18]。有学者研究了蒽醌类化合物对成骨细胞的影响^[19-20],但尚鲜见新分离得到的 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-甲基蒽醌对成骨细胞影响的相关文献报道。

本研究结果显示,从马卡列丙中提取得到的 1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-羟基蒽醌与橙黄决明素具有类似的药理活性。与阴性对照组比较,1,6,8-三羟基-2,7-二甲氧基-3-羟基蒽醌明显促进了 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖、分化和矿化,但与阳性对照组差异不大,为骨质疏松的研究提供了更好的理论基础。在后续的进一步研究中可进行深入的机制和通路研究,阐明其促进成骨细胞增殖、分化和矿化的具体机制,但在本研究前期的预实验中发现,该蒽醌化合物在高浓度时会抑制成骨细胞生长,因此,要控制好药物浓度。本研究为骨质疏松治疗提供了研究基础和新方向。

参考文献

[1] 程晓光,董剩勇,王亮,等.应用双能 X 线骨密度仪调查中国人群骨密度水平和骨质疏松症患病率;多中心大样本体检人群调查[J].中华健康管理学杂志,2019,13(1):51-58.

[2] 杨弦弦,丁贤彬,唐文革,等.重庆市监测人群骨质疏松症患病率及其影响因素分析[J].公共卫生与预防医学,2022,33(1):90-94.

[3] CHAI H,GE J,LI L,et al. Hypertension is associated with osteoporosis:A case-control study in Chinese postmenopausal women [J]. BMC Musculoskelet Disord,2021,22(1):253-256.

[4] 萧成纹.侗族医药探秘[M].长沙:岳麓书社,2004:212-216.

[5] 汪治,邱世平,梅树模,等.毛秀才的生药学研究[J].时珍国医国药,2008,19(5):1212-1213.

[6] 湘泉.接骨茶治跌打损伤[J].湖南中医杂志,1989,6(5):4-6.

[7] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志第七十五卷[M].北京:科学出版社,1979:267-269.

[8] 赵丽,辛克勤,李永秋.显脉旋覆花[J].食品与药品,2007,9(5):53-54.

[9] 严岚,金慧子,聂利月,等.显脉旋覆花化学成分的研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(2):258-261.

[10] XIAO S L,GUAN L J,JIANG R F,et al. The metabolism and pharmacokinetics of rhein and aurantio-obtusin[J]. Curr Drug Metab,2020,21(12):960-968.

[11] 瞿晶菁,宋雁.蒽醌毒理学研究进展[J].卫生研究,2021,50(5):868-872.

[12] 赵盼盼,佟继铭,田沂凡,等.蒽醌类化合物药理作用研究进展[J].承德医学院学报,2016,33(2):152-155.

[13] VISHNUPRASAD C N,TSUCHIYA T,KANE-GASAKI S, et al. Aurantio-obtusin stimulates chemotactic migration and differentiation of MC3T3-E1 osteoblast cells [J]. Planta Medica, 2014,80(7):544-549.

[14] 黄清霞,覃川娴,何泽源,等.巴戟天化学成分、药理作用及质量标志物预测分析[J].中华中医药学刊,2022,40(7):251-258.

[15] 胡英勇,尹耀庭,刘月平.巴戟天提取物对去卵巢大鼠骨质疏松症的防治作用[J].湖南中医杂志,2019,35(11):139-141.

[16] 李浩亮,李东方.大黄素抑制 miR-338-3p 表达促进骨质疏松性骨折大鼠的愈合[J].中国组织工程研究,2022,26(32):5155-5161.

[17] PENGJAM Y,MADHYASTHA H,MADHYASTHA R, et al. Anthraquinone glycoside aloin induces osteogenic initiation of MC3T3-E1 cells;Involvement of MAPK mediated wnt and bmp signaling[J]. Biomol Ther,2016,24(2):123-131.

[18] 谭紫玲,王李婷,智馨君,等.侗药马卡列丙化学成分预试验及总多糖含量测定[J].中国药业,2020,29(9):96-99.

[19] 王洪英,毛敏,齐小雪,等.巴戟天总蒽醌对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(2):29-30.

[20] 曾荣.芦荟大黄素对破骨细胞增殖分化和骨质疏松模型小鼠骨量的影响[D].南宁:广西医科大学,2016.

(收稿日期:2022-05-28 修回日期:2022-11-17)