

益气温经方对 CKIP-1 介导的破骨细胞凋亡的影响

刘钟¹ 杨依然¹ 王均华¹ 张佳锋¹ 史晓林^{2△}

[摘要] 目的:观察益气温经方对酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1(Casein Kinase 2 Interaction Protein 1, CKIP-1)介导的破骨细胞凋亡程度的影响。方法:从 SD 乳鼠中分离破骨细胞体外培养,建立 CKIP-1 过表达和低表达载体,病毒包装构建稳定表达的细胞系。分为以下 5 组:破骨细胞对照组(A 组),破骨细胞+空载病毒组(B 组),破骨细胞+CKIP-1 过表达病毒组(C 组),破骨细胞+CKIP-1 过表达病毒+益气温经方处理组(D 组),破骨细胞+CKIP-1 低表达病毒组(E 组)。病毒感染 96 h 后,Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡。结果:在破骨细胞中,与 A 组相比,过表达 CKIP-1 病毒组凋亡细胞比例显著降低,差异有统计学意义($P=0.017$),而益气温经方处理后,凋亡细胞比例有升高的趋势,与 A 组相比差异无统计学意义($P=0.059$),与 C 组相比差异有统计学意义($P=0.0006$);与 A 组相比,低表达 CKIP-1 组凋亡细胞比例显著升高,差异有统计学意义($P<0.0001$)。结论:CKIP-1 具有抑制破骨细胞凋亡的功能,益气温经方可能通过逆转这种趋势,抑制骨吸收,从而起到治疗骨质疏松的作用。

[关键词] 益气温经方;CKIP-1;破骨细胞;凋亡

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)08-0014-04

Effect of Yiqiwenjing Prescription on Osteoclasts Apoptosis Mediated by CKIP-1

LIU Zhong¹ YANG Yiran¹ WANG Junhua¹ ZHANG Jiafeng¹ SHI Xiaolin^{2△}

¹ Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

² The second affiliated hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China.

Abstract Objective: To observe the effect of Yiqiwenjing prescription on osteoclasts apoptosis mediated by casein kinase 2 interaction protein 1 (CKIP-1). **Methods:** Osteoclasts were isolated from SD neonatal rats in vitro, we established CKIP-1 overexpression and low expression vector. With the method of virus packaging, stable expressed cell lines were established. Then these cell lines were divided into the following 5 groups: group A, osteoclasts control group; group B, osteoclasts & vector group; group C, osteoclasts & CKIP-1 overexpression virus group; group D, osteoclasts & CKIP-1 overexpression virus & Yiqiwenjing prescription intervened group; group E, osteoclasts & CKIP-1 low expression virus group. 96h after virus infection, Annexin V-FITC/PI was used to detect apoptosis. **Results:** Among osteoclasts, compared with the group A, the proportion of apoptotic cells in CKIP-1 overexpression virus group was significantly reduced ($P=0.017$). After intervened by Yiqiwenjing prescription, the proportion of apoptotic cells increased, and there were no significant difference compared with group A ($P=0.059$), while significant difference compared with group C ($P=0.0006$). The proportion of apoptotic cells showed significantly increased compared with group A ($P<0.0001$). **Conclusion:** CKIP-1 has the function of inhibiting the apoptosis of osteoclasts, and Yiqiwenjing prescription's effect may lie in reversing this trend, inhibiting bone absorption, and treating osteoporosis.

Keywords: Yiqiwenjing prescription; casein kinase 2 interaction protein 1; osteoclasts; apoptosis

骨质疏松属中医“骨痿”范畴,一直以来,对该病的辨证分型主要概括为:肾虚精亏、肝肾不足、后天脾胃

失调、血瘀阻滞等学说,其辨证点不同,疗效差别较大,对骨痿病机辨证的剖析仍有待深入。益气温经方是导师史晓林教授辨治骨痿的经验方,对该方治疗靶点的选择以及证据和机理的深入研究,符合现代循证医学要求。导师团队前期研究发现:1)益气温经方通过抑制破骨细胞活性,增加去势股骨骨折大鼠骨髓组织中的骨小梁数量与厚度^[1];2)质谱分析表明,特异性蛋白

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373878)

¹ 浙江中医药大学(杭州,310053)

² 浙江中医药大学附属第二医院

△通信作者 E-mail:xlshi-2002@163.com

的筛查对骨质疏松的早期诊疗有促进作用,其中 CKIP-1 可能是治疗骨质疏松的潜在靶点^[2]。CKIP-1 是骨形成的负调控因子,与骨代谢密切相关,还在包括癌变、凋亡在内的许多细胞行为中发挥重要的作用,是一种新型“凋亡因子”^[3]。本研究基于 CKIP-1 介导破骨细胞凋亡这一假说,旨在探讨益气温经方对骨吸收的影响作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2 d 龄 SD 乳大鼠 5 只,由湖北省实验动物研究中心提供,实验动物许可证号:SCXK(鄂)2015-0018。

1.2 实验药物及试剂

益气温经方自拟强骨饮:鹿角霜、忍冬藤、鸡血藤、秦艽、防风、川断、肉桂、川芎、黄芪、骨碎补、杜仲、露蜂房共计 12 味中药,由浙江中医药大学附属第二医院药剂科制备。

其他实验试剂:DMEM Lifetechnologies(31966);胎牛血清 Lifetechnologies(10099);Antibiotic-Antimycotic Lifetechnologies(15240-112);PBS Lifetechnologies(10010-049);Trypsin-EDTA (0.05%);Lifetechnologies(25300-054)。

1.3 实验仪器

Thermo CO₂ 培养箱(Thermo 3111);苏信超净工作台(YJ-840/YJ-1340);Eppendorff 移液器;上海贝恩生物科技有限公司台式低速离心机(TDZ4B-WS);上海沪西分析仪器厂振荡器(WH-2);吉尔森公司移液枪(P 型);流式细胞仪(FACSCalibur/Calibur)。

1.4 方法

1.4.1 CKIP-1 过表达和低表达病毒载体构建 合成 NCBI 中 CKIP-1 基因 cDNA 序列,结合酶切位点,构建至带 GFP 的过表达载体中,同时针对 CKIP-1,设计合成 1 条 siRNA 低表达载体。CKIP-1 基因参考序列(NM_016274.4)。

1.4.2 病毒包装 骨肉瘤细胞系 MG-63(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:CL-0157),待细胞密度达到 70%,Lipo-2000 转染上述载体进入细胞,使用病毒液感染 293T 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:CL-0005),筛选细胞。

1.4.3 破骨细胞分离和培养 实验动物无菌条件下取四肢长骨,放入含青、链霉素的冷 D-Hank's 平衡盐溶液中,剥离肌肉组织,软组织去除干净,洗 2~3 次,并将干骺段剪去,然后将骨置于 5 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,先横向剪成 4~5 mm 长的骨段,再纵向剪开暴露骨干内侧,用吸管反复吹打 5~10 min,使贴附在骨基质上的破骨细胞脱落下来,收集含骨髓细胞的培养液,于 35 mm 培养皿中静置 10 min,收集未贴壁的细胞悬液过 200 目细胞筛,以 1 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,所得白色沉淀

物即为破骨细胞样细胞团。用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞,吹打均匀后过 200 目细胞筛,去除杂质。将滤过后的细悬液调成 1×10^6 /mL 浓度,吹打均匀后接种到培养瓶中,置于 37 ℃,含 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内进行培养。

1.4.4 分组 A 组为破骨细胞对照组;

B 组为破骨细胞+空载病毒组;

C 组为破骨细胞+CKIP-1 过表达病毒组;

D 组为破骨细胞+CKIP-1 过表达病毒+益气温经方处理组;

E 组为破骨细胞+CKIP-1 低表达病毒组。

1.4.5 将分离培养的破骨细胞进行病毒转染,构建稳定表达细胞系 破骨细胞经原代培养后,经 PBS 缓冲液清洗 3 次后,用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化,待细胞解离后,用细胞培养基 5 mL 终止消化,吸管反复吹打,使细胞从培养皿底解离下来,然后放入 15 mL 离心管中,1 500 r/min 离心 5 min,用血球计数板计数细胞数量,然后按照 1×10^5 /孔细胞的数量,种植于 6 孔细胞培养皿中,过夜培养。次日,待细胞贴壁生长后,进行以上分组处理。病毒感染 48 h 后,加益气温经方 10 μ g/mL 处理 48 h,收样。

1.5 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡

1)细胞培养处理后,把细胞培养液吸出至一合适离心管内,PBS 洗涤贴壁细胞一次,加入适量胰酶细胞消化液消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时,吸除胰酶细胞消化液。

2)加入步骤(1)中收集的细胞培养液,稍混匀,转移到离心管内,1 000g 离心 5 min,弃上清,收集细胞,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。

3)取 5-10 万重悬的细胞,1 000g 离心 5 min,弃上清,加入 195 μ L 结合液轻轻重悬细胞。

4)加入 5 μ L Annexin V-FITC,轻轻混匀,4 ℃使用铝箔避光孵育 15 min。

5)加入 5 μ L 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,4 ℃避光孵育 5 min。同时以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。孵育过程中重悬细胞 2~3 次以改善染色效果。

6)随即进行流式细胞仪检测。

1.6 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件对所得数据进行统计处理,组间分析采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞凋亡结果

各组细胞凋亡结果见图 1。左下象限为正常细胞(Viable non-apoptotic cells),右下象限为早期凋亡细胞(Viable apoptotic cells),右上象限为晚期凋亡细胞(Non-viable apoptotic cells),左上象限为坏死细胞(Non-viable non-apoptotic cells)。

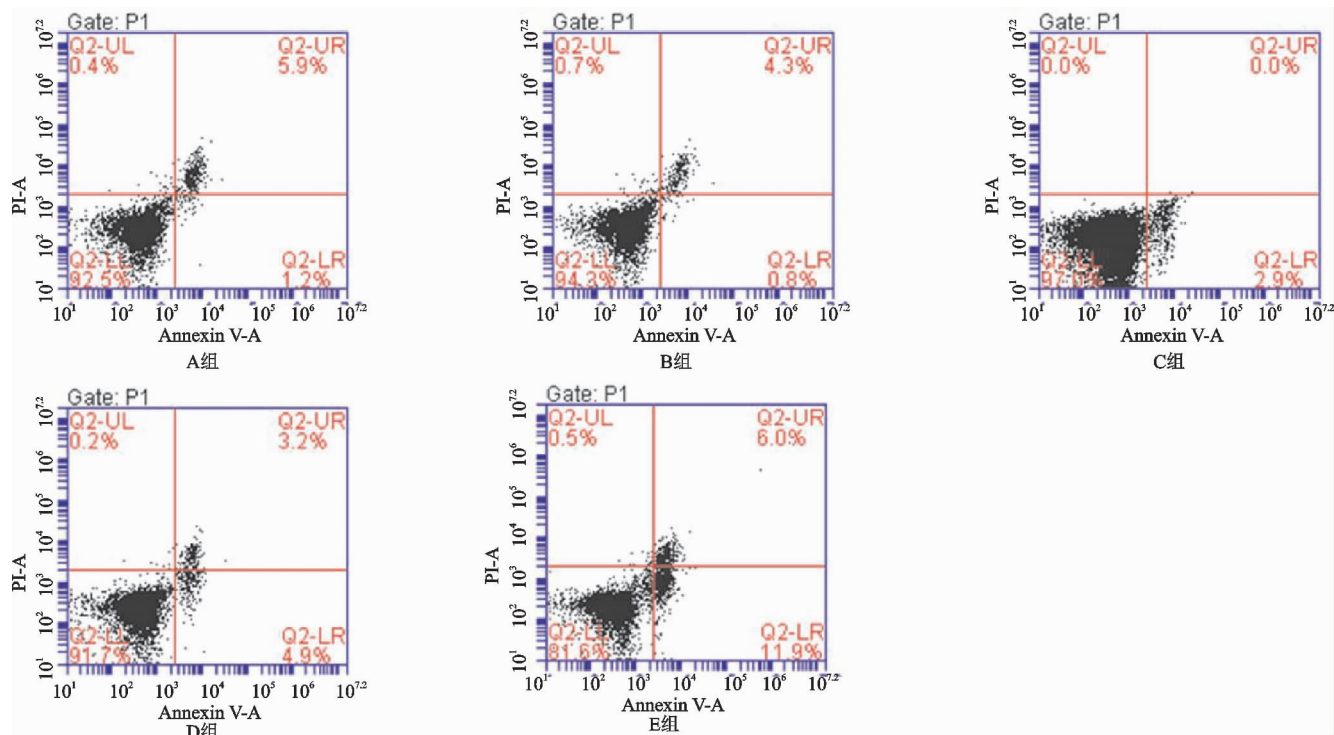


图1 破骨细胞不同处理组细胞凋亡结果

2.2 各组细胞中凋亡细胞比例

破骨细胞不同处理组凋亡细胞比例见图2。结果显示,与A组相比,B组 $P=0.374$,C组 $P=0.017$,D组 $P=0.059$,E组 $P<0.0001$;说明:1)不能认为病毒感染对破骨细胞凋亡差异无统计学意义($P>0.05$);2)CKIP-1与破骨细胞凋亡比例呈负相关($P<0.01$)。与C组相比,D组经益气温经方处理后,凋亡细胞比例升高,差异有统计学意义($P=0.0006$)。

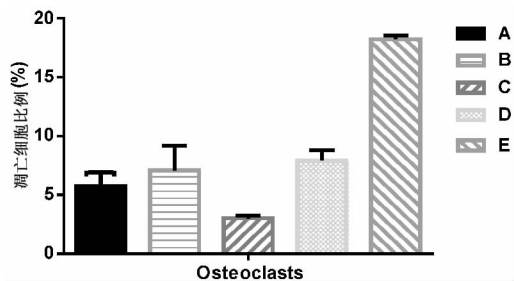


图2 破骨细胞不同处理组凋亡细胞比例

3 讨论

细胞凋亡是细胞自主有序死亡的过程,骨系细胞凋亡与骨质疏松密切相关。有研究发现骨桥蛋白通过抑制细胞凋亡,在辅助性T细胞1的免疫应答和存活中发挥重要作用^[4]。Ye等^[5]认为:骨细胞凋亡是雌激素耗竭的第一反应,从而刺激破骨细胞骨吸收,引起骨丢失。抗凋亡策略与骨质疏松治疗药物的选择十分重要^[6]。与西药相比,中医能够发挥辨证论治多样化的专长,部分中药具有双向调节的作用,目前已有中药提取物调控骨系细胞凋亡治疗骨质疏松的研究,它们集中于骨形成与骨吸收领域。Wang等^[7]认为:过量的糖皮质激素诱导骨髓间充质干细胞的凋亡,吡喃型异

黄酮通过抑制成骨细胞凋亡,拮抗糖皮质激素诱导的骨质疏松^[8]。王秉义等^[9]对丹参素的研究也支持上述结果,并发现丹参素是通过活化PI3k/Akt通路进而减少成骨细胞的凋亡。王晓晖等^[10]体外分离培养成骨细胞,发现高糖组早期凋亡率升高,葛根素能明显抑制凋亡率,以 10^{-8} mol/L浓度效果最为显著。明磊国等^[11]研究表明,蛇床子素能提高破骨细胞凋亡率,抑制RANKL,TRAP基因表达及JNK1/2磷酸化水平,达到抑制骨丢失的作用。邱慈鑫^[12]以复方温阳补肾方对体外培养破骨细胞的研究表明,该方能降低破骨细胞RANK蛋白表达,促进破骨细胞凋亡。

CKIP-1介导破骨细胞凋亡是本研究的一个切入点。值得注意的是,细胞凋亡受靶向因子和目的基因激活、表达、调控。Chen等^[13]发现CKIP-1和肿瘤细胞凋亡的关系,指出CKIP-1高表达与肺癌的发生发展有关,敲除该基因可能通过促进人肺癌细胞株H1299凋亡而阻断肿瘤细胞的生长。CKIP-1有其独特的生理功能,并参与骨组织发育、骨重建、骨修复^[14],与骨质量负相关。本研究提出益气温经方对CKIP-1介导的破骨细胞凋亡产生影响,这一主体思路和实验设计有一定的依据,丰富了益气温经方抗骨吸收治疗靶点的选择。

本研究初探益气温经方对CKIP-1介导的破骨细胞凋亡影响,研究结果发现CKIP-1负调控破骨细胞凋亡和益气温经方有逆转上述作用的趋势。本研究的不足之处在于未对引起凋亡的机制和相应代谢通路展开深入研究,例如前文提到PI3k/Akt,与其下游通路-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian Target of Rapamycin, mTOR)组成了PI3k/Akt/mTOR通路,参

与许多主要的细胞过程^[15],这将是后续研究拟解决的关键问题。

参考文献

- [1] 姚建亮,王博,吴鹏,等.强骨饮对去卵巢大鼠骨折愈合骨小梁 Micro-CT 改变研究[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(11):1395-1398.
 - [2] 张志强,李春雯,潘定权,等.蛋白组学在骨质疏松中的应用[J].中华中医药学刊,2014,32(6):1316-1319.
 - [3] 胡炯,王博,吴鹏,等.CKIP-1 与骨质疏松的最新研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(8):1053-1057.
 - [4] Iida T, Wagatsuma K, Hirayama D, et al. Is osteopontin a friend or foe of cell apoptosis in inflammatory gastrointestinal and liver diseases? [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(1).
 - [5] Ye T, Cao P, Qi J, et al. Protective effect of low-dose risedronate against osteocyte apoptosis and bone loss in ovariectomized rats [J]. Plos One, 2017, 12 (10): e0186012.
 - [6] Chen SY, Shiau AL, Wu CL, et al. P53-derived hybrid peptides induce apoptosis of synovial fibroblasts in the rheumatoid joint[J]. Oncotarget, 2017, 8(70):115413-115419.
 - [7] Wang L, Zhang HY, Gao B, et al. Tetramethylpyrazine protects against glucocorticoid-induced apoptosis by promoting autophagy in mesenchymal stem cells and improves bone mass in glucocorticoid-induced osteoporosis rats[J]. Stem Cells & Development, 2017, 26(6):419-430.
 - [8] Chen GM, Ding RF, Tan YD, et al. Role of the CKIP1 gene in proliferation and apoptosis of the human lung cancer cell line H1299 [J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2015, 14(2):4005-4014.
 - [9] 王秉义,潘剑.丹参素拮抗氧化应激所致骨质疏松并通过 PI3k/Akt 通路减少成骨细胞的凋亡[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(1):1-5.
 - [10] 王晓晖,罗向霞,史晓伟,等.葛根素对高糖培养成骨细胞增殖、矿化及凋亡的影响[J].中国中医药科技,2017,24(6):733-735.
 - [11] 明磊国,王鸣刚,陈克明,等.蛇床子素对体外培养破骨细胞骨吸收及细胞凋亡的影响[J].药学学报,2012,47(2):174-179.
 - [12] 邱慈鑫.温阳补肾方对体外培养破骨细胞活性与凋亡影响的实验研究[D].福州:福建中医药大学,2015.
 - [13] Chen GM, Ding RF, Tan YD, et al. Role of the CKIP1 gene in proliferation and apoptosis of the human lung cancer cell line H1299 [J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2015, 14(2):4005-4014.
 - [14] Peng X, Wu X, Zhang J, et al. The role of CKIP-1 in osteoporosis development and treatment[J]. Bone & Joint Research, 2018, 7(2):173-178.
 - [15] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease[J]. Cell, 2012, 149(2):274-293.
(收稿日期:2018-03-11)
-
- (上接第 13 页)
- [6] Zuk P. Adipose-derived stem cells in tissue regeneration: a review[J]. ISRN Stem Cell, 2013(5).
 - [7] 赵明臻,刘畅.脂肪干细胞在软骨组织工程中的研究进展[J].中国生物医学工程学报,2014,33(4):475-481.
 - [8] Fan J, Park H, Tan S, et al. Enhanced osteogenesis of adipose derived stem cells with noggin suppression and delivery of BMP-2[J]. PLOS One, 2013, 8(8):e72474.
 - [9] Bigot N, Mouche A, Preti M, et al. Hypoxia differentially modulates the genomic stability of clinical-grade ADSCs and BM-MSCs in long-term culture[J]. Stem Cells, 2015, 33(12):3608-3620.
 - [10] Daans M, Luyten FP, Lories RJ. GDF-5 deficiency in mice is associate with instability-driven joint damage, gait and subchondral bone changes[J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(1):208-213.
 - [11] Chhabra A, Zijerdi D, Zhang J, et al. BMP-14 deficiency inhibits long bone fracture healing: a biochemical, histologic, and radiographic assessment[J]. J Orthop Trauma, 2005, 19(9):629-634.
 - [12] Toulouse A, Collins GC, Sullivan AM. Neurotrophic effects of growth/differentiation factor 5 in a neuronal cell line[J]. Neurotox Res, 2012, 21(3):256-265.
 - [13] Zaidi SH, Huang Q, Momen A, et al. Growth differentiation factor 5 regulates cardiac repair after myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(2):135-143.
 - [14] Gao S, Zheng Y, Cai Q, et al. Different methods for inducing adipose-derived stem cells to differentiate into Schwann-like cells[J]. Arch Med Sci, 2015, 11(4):886-892.
 - [15] Zhu P, Liu J, Shi J, et al. Melatonin protects ADSCs from ROS and enhances their therapeutic potency in a rat model of myocardial infarction[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(9):2232-2243.
 - [16] Alexander TH, Sage AB, Chen AC, et al. Insulin-like growth factor I and growth differentiation factor-5 promote the formation of tissue-engineered human nasal septal cartilage[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16(5):1213-1221.
 - [17] 李明辉,刘洋,孙凯,等.生长分化因子 5 诱导脂肪干细胞向软骨细胞的转化[J].中组织工程研究,2016,20(51):7628-7633.
 - [18] Holmes T, De Lacalle S, Su X, et al. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(12):6728-6733.
 - [19] Daniunaite K, Serenaitė I, Misgirdaitė R, et al. Epigenetic regulation of human adipose-derived stem cells differentiation[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 410(1-2):111-120.
(收稿日期:2017-12-11)