

• 实验研究 •

人参皂甙 Rg1 对钛颗粒共培养成骨细胞整合素表达水平及信号转导通路的调控作用

林焱斌^{1△} 林煜¹ 余光书¹ 周家烽² 黄奕祺²

[摘要] 目的:通过研究人参皂甙 Rg1 对体外钛微粒诱导的成骨细胞整合素通路相关因子的影响,以期为临床运用人参皂甙 Rg1 防治人工关节无菌性松动提供实验依据。方法:用人参皂甙 Rg1 与钛微粒共培养成骨细胞,通过 ELISA 法检测细胞液中的 FN,Col-I 及 VN 含量,Western Blot 检测 MG-63 细胞 FAK 和 FAK(pTyr397)蛋白的含量,qPCR 法检测 MG-63 细胞内 FAK,Integrin α v 及 Integrin β 1 mRNA 的表达。结果:正常组细胞较大,视野内细胞数最多,实验组细胞数量次之,对照组最少且形态较小,钛微粒周围无细胞生长,并可见凋亡细胞。实验组细胞液中 FN,Col-I 及 VN 的表达较对照组有明显增高,细胞 mRNA 与蛋白中 FAK,FAK(pTyr397),Integrin α v 及 Integrin β 明显高于对照组。结论:人参皂甙 Rg1 可能通过直接或间接作用于 MG-63 Integrin 及其相关信号因子,使与钛微粒共培养的 MG-63 细胞被抑制的 FAK 磷酸化再次增强,从而 VN 和 FN 功能增强,加速细胞的分裂增殖。

[关键词] 人参皂甙 Rg1;成骨细胞;信号转导通路

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)05-0005-04

Effect of Ginsenoside Rg1 on Expression of Integrin and Regulation of Signal Transduction Pathway in Osteoblasts Co-cultured with Ti Particles

LIN Yanbin^{1△} LIN Yu¹ YU Guangshu¹ ZHUO Jiafeng² HUANG Yiqi²

¹ Department of Orthopedics and Traumatology, Fuzhou Second Hospital, Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, China;

² Graduate School, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China.

Abstract Objective: To study the effect of Ginsenoside Rg1 on integrin pathway-related factors of osteoblasts induced by titanium particles in vitro, so as to provide experimental basis for the clinical application of Ginsenoside Rg1 in the prevention and treatment of aseptic loosening of artificial joints. **Methods:** The osteoblasts were co-cultured with Ginsenoside Rg1 and Ti particles. The content of FN, Col-I and VN in cytoplasm was detected by ELISA method, the content of FAK and FAK(pTyr397) protein in MG-63 cells was detected by western blot, the expression of FAK, integrin α v and integrin β 1 mRNA in MG-63 cells was detected by qPCR method. **Results:** The cells in the normal group were larger, and the number of the cells within the view was the highest. The number of cells in the experimental group was the second, while the control group was the smallest and the morphology was smaller. There was no cell growth around Ti particles, and apoptotic cells were found near the Ti particles. The expression of FN, Col-I and VN in the cytoplasm in the experimental group was increased significantly than that in the control group. The expression of mRNA, FAK, FAK(pTyr397), Integrin α v and Integrin β protein was significantly higher when compared with the control groups. **Conclusion:** Ginsenoside Rg1 may enhance the phosphorylation of FAK again, which is inhibited by MG-63 cells co-cultured with Ti particles, by direct or indirect acting on MG-63 Integrin and its related signaling factors, so that the function of VN and FN is enhanced to accelerate cell division and proliferation.

Keywords: Ginsenoside Rg1; osteoblasts; signal transduction pathway

基金项目:国家自然科学基金(81302986)

福建省卫生厅中医课题(wzgs201308)

¹ 厦门大学附属福州第二医院创伤骨科(福州, 350007)

² 福建中医药大学研究生院

[△]通信作者 E-mail: 18065142418@163.com

人工关节置换术后假体松动问题严重,表现为假体周围骨溶解。关节置换后假体周围随着运动产生的磨损颗粒同时通过抑制成骨细胞的增殖与促进破骨细胞

骨吸收能力,打破假体周围骨的生成和吸收的平衡,最终导致假体周围的骨溶解^[1-3]。整合素(Integrin)信号传导通路是影响成骨细胞分化、成熟的重要通路,对其在假体松动过程中的变化进行研究,可以获取成骨细胞整合素信号调控的重要信息。采用人参皂甙 Rg1 对体外与钛微粒共培养后发现,人参皂甙 Rg1 能降低钛微粒诱导的成骨细胞炎性细胞因子含量^[4]。本实验通过研究人参皂甙 Rg1 对体外钛微粒诱导的成骨细胞整合素通路相关因子的影响,以期临床运用人参皂甙 Rg1 防治人工关节无菌性松动提供实验依据,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

MG-63 成骨样细胞系(中科院上海细胞库);人参皂甙 Rg1 单体(大连生生绿谷生物工程有限公司);钛微粒(北京有色金属公司);细胞内毒素检测试剂盒(厦门鲎试剂有限公司);酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 ADL 有限公司);TRIzol[®] 试剂、WesternBreeze 免疫检测试剂盒(美国 Invitrogen 公司);SYBRaPremix qPCR (TAKARA 公司);FAK 和 FAK(pTyr397)抗体(Calbiochem 公司); β -actin 抗体(Cell Signaling 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 正常组,10%胎牛血清+DMEM 常规培养基;对照组,10%胎牛血清+DMEM 常规培养基+钛微粒;实验组,10%胎牛血清+DMEM 常规培养基+钛微粒+终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rg1^[4]。

1.2.2 钛微粒混悬液制备及内毒素检测 将筛选出的直径大约 1 μm 的钛微粒(梯度离心法)用无水乙醇浸泡 24 h,0.25%硝酸溶液 70 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 3 h,放入 300 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烤干,紫外线消毒 24 h 后,取部分样品根据内毒素检测试剂盒检测,结果为检测的钛微粒内毒素小于 0.25 EU/mL。用 PBS,10%胎牛血清及 DMEM 常规培养基配制成分比为 0.1%的钛混悬液(约 5×10^7 个/mL),4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.3 成骨细胞的培养及干预 将 MG-63 细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中常规培养,每 48 h 换液 1 次。空白组常规培养基培养,对照组将配制的钛微粒悬液加入与细胞共同培养,实验组将配制的钛微粒悬液与终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rg1 加入,与细胞共同培养,连续培养 48 h。

1.2.4 观察指标检测

1.2.4.1 ELISA 法检测细胞液中的 FN,Col-I 及 VN 含量 取各组血清,按要求分别加入样品、稀释液,标准品各 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。再加入酶标偶合液洗板,加入底物反应 15 min 后加入终止液,酶标仪 450 nm 读取 OD 值。

1.2.4.2 Western Blot 检测 MG-63 细胞 FAK,FAK(pTyr397)蛋白的含量 各组脑组织低温充分匀浆后,用 Bradford 法进行蛋白定量。取 20 μg 蛋白样品,10% SDS-PAGE 电泳,100 V 转移 1 h 至硝酸纤维素薄膜,放入封闭液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;一抗(TGF- β 1, Smad2, Smad3, TF)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。同时,另 1 张用不含抗体 TBS-T 液孵育,作为阴性对照。反复洗膜后,将膜与碱性磷酸酶(AP)标记的抗 IgG 抗体孵育,室温轻摇 1 h,洗膜后,用 Western blotting 印迹观察,用图像分析测定各带吸光度值(A)作定量分析。

1.2.4.3 qPCR 法检测 MG-63 细胞内 FAK,Integrin α v 及 Integrin β 1 mRNA 的表达 收集连续培养 3 d 细胞,采用实时荧光相对定量 SYBR GREEN 法检测。FAK 引物:上游 F 为 5'-AAGGAGCACCCATCTAACC -3',下游 R 为 5'-AAATGGACTGCCACAGCTT -3',产物长度 176 bp。整合素 α v 引物序列:上游引物 F 为 5'-CCCAGCGAGTAAGTGTATTT -3',下游引物 R 为 5'-AAGGTGGATAGAGACGCAC -3',产物长度 207 bp。整合素 β 1 的引物序列:上游引物 F 为 5'-GATTGGCTGAATGAGGGTAA -3' 下游引物 R 为 5'-GGCTTCTTCAGGAACGTGAC -3',产物长度 186 bp。内参 β -actin 引物:上游 5'AGGCTGTCCCGTGTTTGTA3',下游 5'ATGTCCGATTACGCATCC 3',产物长度 178 bp。采用 Trizol 法提取总 RNA,抽提后的 RNA 加入溴酚蓝进行琼脂糖凝胶电泳,电泳结果通过凝胶图像分析系统对条带进行分析;检验 RNA 无降解,测定 RNA 的吸光度值,计算出 RNA 的浓度,再根据浓度计算出体积后取 RNA 500 ng 按试剂盒步骤进行反转录。反转录后在 ABI 7 500 上按照试剂说明进行 mRNA 扩增,得到扩增曲线与 CT 值。将得到的各组目的基因及 β -actin 基因的值分别代入各自的标准曲线,换算出各自的起始模板量。以 β -actin 作为参比基因对所有样品进行 RNA 校正,用待测基因的定量结果除以 β -actin 定量结果即可得到校正值。以阴性对照组 mRNA 的表达量作为“1”,再根据校正值计算出其他各组的相对量,进行组间相对量的比较。

1.3 统计学方法

运用 SPSS 19.0 软件包进行数据分析,参数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用多组间单因素方差分析方法(F 检验)。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

在显微镜下观察显示:贴壁的 MG-63 细胞呈三角形、梭形或不规则形,正常组细胞较大,视野内细胞数最多,实验组细胞数量次之,对照组最少且形态较小,钛微粒周围无细胞生长,并可见凋亡细胞(图 1~3)。

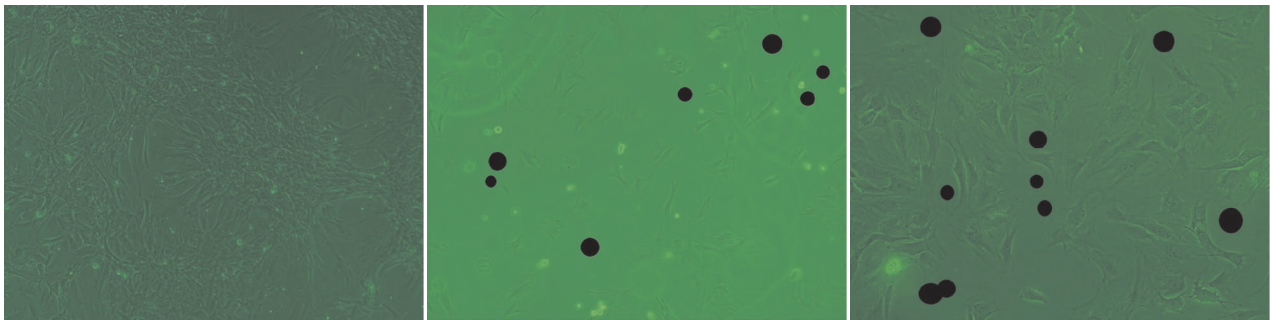


图 1 正常组细胞形态(40×)

图 2 对照组细胞形态(40×)

图 3 实验组细胞形态(40×)

2.2 细胞液中 FN,Col-I 及 VN 含量的表达结果

干预 MG-63 细胞后,采用 ELISA 法分析细胞液中的 FN,Col-I 及 VN 结果显示:对照组及实验组的 FN,Col-I 及 VN 的表达均低于不含钛颗粒的正常组,且实验组的 FN,Col-I 及 VN 表达高于对照组,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1. FN 含量的差异有统计学意义($F=74.235,P<0.001$),对照组及实验组的 FN 的表达均低于不含钛颗粒的正常组($P<0.001,P<$

0.001),实验组的 FN 表达高于对照组($P<0.001$);Col-I 含量的差异有统计学意义($F=56.325,P<0.001$),对照组及实验组的 Col-I 的表达均低于不含钛颗粒的正常组($P<0.001,P=0.031$),实验组的 Col-I 表达高于对照组($P=0.023$);VN 含量的差异有统计学意义($F=38.432,P<0.001$),对照组及实验组的 VN 的表达均低于不含钛颗粒的正常组($P<0.001,P<0.001$),实验组的 VN 表达高于对照组($P=0.017$).

表 1 不同组别细胞培养液中 FN,Col-I 及 VN 的含量($\bar{x}\pm s$)($\mu\text{g/mL}$)

组别	FN	Col-I	VN
正常组	22.324±0.258	15.954±0.215	25.234±0.332
对照组	16.619±0.536	7.634±0.164	17.257±0.351
实验组	18.355±0.234	8.859±0.252	20.871±0.223

2.3 细胞中 FAK 和 FAK(pTyr397)蛋白含量的表达结果

干预 MG-63 细胞后,采用 Western Blot 法检测细胞中的 FAK,FAK(pTyr397)蛋白结果显示:正常组的 FAK 和 FAK(pTyr397)的表达最高,实验组次之,对照组最低,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4).

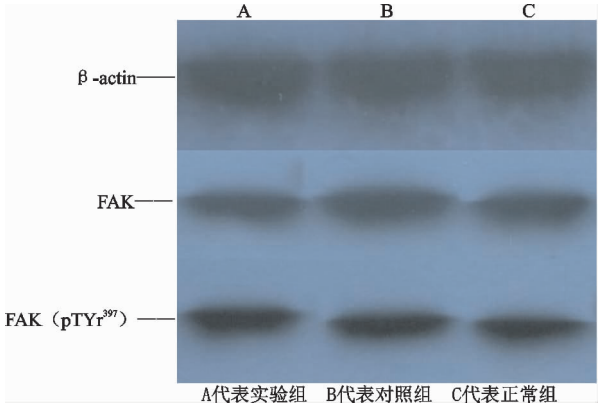


图 4 各组总蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳结果

2.4 细胞中 FAK,Integrin α v 及 Integrin β 1 mRNA 的表达结果

干预 MG-63 细胞后,采用 qPCR 法分析细胞中的 FAK,Integrin α v 及 Integrin β 1 mRNA 结果显示:正常组的 FAK,Integrin α v 及 Integrin β 1 的表达最高,实验组次之,对照组最低,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2.

FAK mRNA 的差异有统计学意义($F=524.255,P<0.001$),对照组及实验组的 FAK 的表达均低于不含钛颗粒的正常组($P<0.001,P<0.001$),实验组的 FAK 表达高于对照组($P<0.001$),对照组的 FAK 低于其他两组($P<0.001$);Integrin α v mRNA 的差异有统计学意义($F=864.284,P<0.001$),对照组及实验组的 Integrin α v 的表达均低于不含钛颗粒的正常组($P<0.001,P<0.001$),实验组的 Integrin α v 表达高于对照组($P<0.001$),对照组的 Integrin α v 低于其他两组($P<0.001$);Integrin β 1 mRNA 的差异有统计学意义($F=795.147,P<0.001$),对照组及实验组的 Integrin β 1 的表达均低于不含钛颗粒的正常组($P<0.001,P<0.001$),实验组的 Integrin β 1 表达高于对照组($P<0.001$),对照组的 Integrin β 1 低于其他两组($P<0.001$).

表 2 不同组别细胞中 FAK,Integrin α v 及 Integrin β 1 mRNA 的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	FAK	Integrin α v	Integrin β 1
正常组	1	1	1
对照组	0.634±0.016	0.539±0.016	0.453±0.021
实验组	0.859±0.021	0.752±0.025	0.773±0.023

3 讨论

人工关节置换术后假体产生磨损微粒会诱导宿主反应,细小的假体磨损微粒刺激假体周围的各种细胞表达促炎性/促破骨性细胞因子来增加破骨细胞的活性,并抑制成骨细胞的活性,导致假体周围的骨的动态平衡被打破,骨吸收超过骨形成,最终导致假体周围骨溶解的发生进而引起假体的松动^[5]。

成骨细胞大量表达 Integrin,而 Integrin 及下游因子 Col-I, FN, VN 及 FAK 磷酸化的表达水平在某种程度上能反映成骨细胞增殖能力、成骨能力以及与细胞外基质结合能力^[6]。磨损微粒影响成骨细胞增殖、分化、成熟,最终导致假体松动的过程中均可能有成骨细胞 Integrin 信号调控机制参与其中^[7]。Integrin 是一种细胞表面跨膜蛋白,是由 α 和 β 亚基非共价结合的杂化二聚体,介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间粘附作用,成骨细胞在整合素的介导粘附作用下,与多种骨基质蛋白结合,并激活细胞内 FAK 活性,导致细胞形态改变、细胞骨架重建,引起细胞有丝分裂活性提高,从而促进成骨细胞分化、成熟^[8]。细胞外基质—Integrin—FAK—细胞骨架,构成了 Integrin 信号转导通路,将细胞外信息传递到细胞内,调控基因表达,恢复功能^[9-11]。FAK 依赖 Integrin 的信号转导通路的基础性信号传递分子,调节成骨细胞的增殖、粘附、迁移和分化,Tyr397 是 FAK 的主要磷酸化位点,在 Integrin 与配体结合后,引起 FAK 构象的改变,使 Tyr397 结构域处于活化状态,促进成骨细胞与细胞外基质的结合,最终促进成骨细胞增殖、分化^[12]。本实验中在与钛微粒共培养后成骨细胞中 mRNA 以及蛋白的 Integrin α v, Integrin β 1 以及 Col-I, FN, VN, FAK 磷酸化的表达水平与正常组比较,出现明显降低,表明磨损颗粒抑制了成骨细胞中 Integrin 的表达,使细胞液中 Integrin 配体减少,引起整合素下游磷酸化的 FAK 表达的减少, VN, FN 含量减少,从而导致成骨细胞有丝分裂活性降低,减缓成骨细胞分化、成熟,即 Col-I 的表达下降,并降低成骨细胞的粘附功能。

人参皂甙具有抗炎、抗氧化、促分化等作用^[13],成骨细胞与钛微粒共培养后,钛微粒能促进成骨细胞分泌 COX-2, PGE-2 及 TNF- α 等炎症因子,间接导致成骨细胞凋亡,而人参皂甙 Rg1 可通过减少成骨细胞分泌炎症因子,从而提高成骨细胞的活性、抑制骨的吸收^[14,15]。本研究应用人参皂甙 Rg1 干预与钛共培养的 MG-63 细胞,结果显示:实验组中细胞液中 FN, Col-I 及 VN 的表达较对照组有明显增高,细胞 mRNA 与蛋白中 FAK, FAK(pTyr397), Integrin α v 及 Integrin β 明显高于对照组 ($P < 0.05$),表明 MG-63 细胞在 Rg1 的干预下,分泌细胞外基质成分的能力有所增强、分泌量上升,人参皂甙 Rg1 可能通过以上机制直接或间接作用于 MG-63 Integrin 及其相关信号因子,使与钛微粒共培养的 MG-63 细胞被抑制的 FAK 磷酸化再次增强,从而 VN 和 FN

功能增强,加速细胞的分裂增殖。因此,有效调控成骨细胞整合素及其相关信号因子可能是人参皂甙 Rg1 防治假体松动作用机制的环节之一。

参考文献

- [1] Man Z, Sha D, Sun S, et al. In Vitro bioactivity study of RGD-coated titanium alloy prosthesis for revision total hip arthroplasty[J]. Biomed Res Int, 2016; 8627978.
- [2] Marsland D, Mears SC. A review of periprosthetic femoral fractures associated with total hip arthroplasty[J]. Geriatr Orthop Surg Rehabil, 2012, 3(3): 107-120.
- [3] Deirmengian GK, Zmistowski B, O'Neil JT, et al. Management of acetabular bone loss in revision total hip arthroplasty[J]. J Bone Joint Surg Am, 2011, 93(19): 1842-1852.
- [4] Lin Y, Wu Y, He J. Effects of ginsenosides Rg1 on osteoblasts cultured with Ti particles[J]. Biomol Ther, 2012, 20(1): 75-80.
- [5] Harris WH. Conquest of a worldwide human disease: particle-induced periprosthetic osteolysis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, 429: 39-42.
- [6] Zhang K, Ding W, Sun W, et al. Beta1 integrin inhibits apoptosis induced by cyclic stretch in annulus fibrosus cells via ERK1/2 MAPK pathway[J]. Apoptosis, 2016, 21(1): 13-24.
- [7] Shen Z, Crotti TN, McHugh KP, et al. The role played by cell-substrate interactions in the pathogenesis of osteoclast-mediated peri-implant osteolysis[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(3): R70.
- [8] Zhou S, Zu Y, Zhuang F, et al. Hypergravity-induced enrichment of β 1 integrin on the cell membranes of osteoblast-like cells via caveolae-dependent endocytosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 463(4): 928-933.
- [9] Nakayamada S, Okada Y, Saito K, et al. Beta1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on osteoblasts and osteoclast maturation[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 45368-45374.
- [10] Haugh MG, Vaughan TJ, McNamara LM. The role of integrin α (V) β (3) in osteocyte mechanotransduction[J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2015, 42: 67-75.
- [11] 张天智, 王玥, 邓力, 等. 运动负荷对大鼠后肢骨成骨细胞整合素表达和血清骨钙素水平的影响[J]. 华西药志, 2006, 21(3): 237-240.
- [12] Moussa FM, Hisijara IA, Sondag GR, et al. Osteoactivin promotes osteoblast adhesion through HSPG and α v β 1 integrin[J]. J Cell Biochem, 2014, 115(7): 1243-1253.
- [13] Yin LH, Cheng WX, Qin ZS, et al. Effects of ginsenoside Rg-1 on the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(9): 676-681.
- [14] 赵玮, 余占海, 李秀兰, 等. 人参皂甙 Rg-1 对牙周炎大鼠牙周组织中 TNF- α 、IL-1 β 表达的影响[J]. 口腔医学研究, 2009, 25(5): 548-550.
- [15] Sun HQ, Zhou ZY. Effect of ginsenoside-Rg3 on the expression of VEGF and TNF- α in retina with diabetic rats[J]. Int J Ophthalmol, 2010, 3(3): 220-223.

(收稿日期: 2016-12-06)