

强骨饮对 CKIP-1 过表达成骨细胞的影响研究

杨依然¹ 刘钟¹ 王均华¹ 刘康² 史晓林^{2△}

[摘要] 目的:观察强骨饮对酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1(CKIP-1)过表达慢病毒感染的体外小鼠成骨细胞的调控情况,研究强骨饮治疗骨质疏松的分子作用机制。方法:从 2 d 龄 SD 乳大鼠分离成骨细胞,构建 CKIP-1 过表达慢病毒,将成骨细胞分成 4 组:a 组为空白成骨细胞对照组,b 组为空载慢病毒感染的成骨细胞,c 组为 CKIP-1 过表达慢病毒感染的成骨细胞,d 组为 CKIP-1 过表达慢病毒感染成骨细胞+强骨饮处理。qRT-PCR 检测成骨抑制基因 CKIP-1 和成骨相关基因 ALP 及 RUNX2 的表达,CKK-8 检测细胞相对数目,茜素红染色鉴定成骨细胞,低倍光镜下观察钙化结节计数。结果:qRT-PCR 检测:相比 a 组、b 组,c 组的 CKIP-1 有较高表达,差异有统计学意义($P<0.01$),RUNX2 和 ALPL 表达水平极低,差异有统计学意义($P<0.01$);c 组与 d 组比较,d 组的 CKIP-1 表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),RUNX2 和 ALPL 表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。CKK-8 检测:相比 a 组、b 组,c 组的细胞增殖水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);相比 c 组,d 组强骨饮处理后,细胞增殖比例有升高的趋势,且差异有统计学意义($P<0.01$)。茜素红染色:相比 a 组、b 组,c 组钙化结节明显减少;相比 c 组,d 组钙化结节显著增多。结论:CKIP-1 过表达对成骨细胞的增殖、成骨分化及矿化有明显抑制作用,强骨饮能提高 CKIP-1 过表达病理状态下成骨细胞的活性和成骨分化及矿化能力。

[关键词] 酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1;成骨细胞;过表达;细胞增殖;中药疗法

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)10-0001-05

Effect of Qianggu Yin on Rat Osteoblasts in CKIP-1 Overexpressing

YANG Yiran¹ LIU Zhong¹ WANG Junhua¹ LIU Kang² SHI Xiaolin^{2△}

¹Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;

²The Second Hospital Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310005, China.

Abstract Objective: To observe the effect of Qianggu Yin on osteoblasts of mice infected by lentivirus overexpressing casein kinase 2 interaction protein 1 (CKIP-1), and to study the molecular mechanism of Qianggu Yin for treating osteoporosis.

Methods: Osteoblasts were isolated from 2-day-old SD lactating rats to construct CKIP-1 over-expressed lentivirus. Osteoblasts were divided into 4 groups. a group, blank osteoblasts control group; b group, empty-loaded osteoblasts infected by lentivirus; c group, osteoblasts infected by lentivirus overexpression CKIP-1; d group, CKIP-1 overexpression osteoblasts infected by lentivirus combined with Qianggu Yin treatment. The expression of CKIP-1, ALP and RUNX2 were detected by qRT-PCR, the relative number of osteoblasts was detected by CKK-8, the osteoblasts were identified by alizarin red staining, and the number of calcified nodules was observed under low power microscope. **Results:** The qRT-PCR assay showed: compared with group a and group b, the expression of CKIP-1 in group c was significantly higher ($P<0.01$), the expression of RUNX2 and ALPL was extremely low ($P<0.01$); compared with group d, the expression of CKIP-1 in group c was significantly lower ($P<0.01$), and the expression of RUNX2 and ALPL was significantly higher ($P<0.01$). The CKK-8 assay showed: compared with group a and group b, the level of cell proliferation in group c was significantly decreased ($P<0.01$); compared with group c, the percentage of cell proliferation in group d after Qianggu Yin treatment

was increased, and the difference was significant ($P<0.01$). Alizarin red staining showed: compared with group a and group b, calcified nodules in group c decreased significantly; compared with group c, calcified nodules in group d increased significantly. **Conclusion:** The CKIP-1 overexpression is sig-

基金项目:国家自然科学基金项目(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

nificantly inhibited the proliferation, osteogenic differentiation and mineralization of osteoblasts. Qiangguyin can increase osteoblast activity, osteogenic differentiation and mineralization in the pathological state of CKIP-1 overexpression ability.

Keywords: casein kinase 2 interaction protein 1; osteoblast; overexpression; cell proliferation; Chinese herbal medicine

骨质疏松症是绝经后女性及老年人的常见病^[1]。随着年龄的增长,破骨细胞活性增加,成骨细胞逐渐丧失成骨功能,导致骨形成的总体减少^[2],这种骨吸收大于骨形成的动态过程是由骨质疏松症发展的细胞水平原因决定的^[3]。Lu等^[4]的研究表明:敲除酪蛋白激酶2相互作用蛋白1(Casein Kinase 2 Interaction Protein 1, CKIP-1)基因后,小鼠的骨密度和骨量随着年龄增加而增加,并且这些小鼠的成骨细胞的活性显著高于野生型小鼠。Zhou等^[5]的研究表明:在大鼠下颌骨牵张成骨模型中,CKIP-1低表达可以促进体内和体外的骨形成。此外多个研究^[6-9]也支持这一观点:CKIP-1抑制成骨,CKIP-1过表达可以导致骨质疏松。强骨饮是史晓林教授在“因虚致淤”理论^[10]的基础上,经过多年的临床实践研创的经验方,经过多年的临床应用,强骨饮对绝经后骨质疏松症的临床效果确切^[11-13]。本研究通过观察强骨饮对CKIP-1过表达慢病毒感染的体外大鼠成骨细胞的调控作用,以探讨强骨饮治疗骨质疏松的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 成骨细胞分离、培养

取2 d龄SD乳大鼠[湖北省实验动物研究中心,实验动物许可证号SCXK(鄂)2015-0018],在无菌条件下,分离颅顶盖骨,剔除骨膜及其他组织,用D-Hank's液冲洗3次,用眼科剪将骨片剪成1 mm×1 mm的碎块,加入0.25%的胰蛋白酶,于37℃消化30 min,弃上清液,用D-Hank's液冲洗3次,加入含0.05%胰蛋白酶及2 mL的I型胶原酶的消化液。37℃消化2 h,吸取消化液,经140目尼龙网过滤。再用DMEM培养液冲洗消化的骨残集,收集冲洗液,过滤后与消化液混合,以1 500 r/min离心15 min,收集细胞,即为新鲜的成骨细胞,加入含10%小牛血清的DMEM培养基,调整密度为 1×10^5 细胞/mL,接种于100 mL的培养皿中,置37℃,5% CO₂的孵箱中培养。24 h后换液,以后视细胞生长情况2~3 d换液1次。

1.2 实验试剂

DMEM培养基、胎牛血清、PBS(pH 7.4), Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent, Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Life-technologies), PureLink RNA Mini Kit (Ambion),

SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMixd for qRT-PCR, SYBR Greener™ qPCR SuperMix Universal (Invitrogen), 碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究所), CCK8 试剂盒(碧云天), CKIP-1 抗体(Omnimabs), Real-time PCR 试剂盒(全式金)。

1.3 实验仪器

CO₂ 培养箱(Thermo), 超净工作台(苏信), MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (ABI), 分光光度计(Beckman), 显微镜(奥林巴斯), 移液器(Eppendorf), 生物倒置显微镜(OLYMPUS), 离心机(Eppendorf centrifuge), PCR 仪(Eppendorf), 荧光定量PCR仪(Agilent), 酶标仪(芬兰雷勃酶标仪)。

1.4 强骨饮自拟方院内制剂

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,共十二味(来源:浙江中医药大学附属第二医院药房)。

1.5 CKIP-1 过表达慢病毒的构建

根据美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中CKIP-1基因合成cDNA序列,结合酶切位点,构建至带GFP的过表达载体中,合成两端带有BamH I和Xho I酶切位点的上述序列,连接至pReceiver-Lv201载体,构建CKIP-1过表达载体pReceiver-Lv201-CKIP-1。将CKIP-1过表达载体及空载载体进行病毒包装及浓缩,分装后保存在病毒管中,-80℃保存备用。

1.6 实验分组

将大鼠成骨细胞随机分为4组:a组为不作特别处理的成骨细胞;b组为空载慢病毒感染的成骨细胞;c组为CKIP-1过表达慢病毒感染的成骨细胞;d组为CKIP-1过表达慢病毒感染的成骨细胞,病毒感染48 h后按比例加入强骨饮(10 μg/mL)处理。

1.7 qRT-PCR检测

感染96 h后,分别收集各组细胞,用实时荧光定量核酸扩增检测系统(qRT-PCR)检测成骨抑制基因CKIP-1和成骨相关基因ALP和RUNX2的表达。

1.7.1 样本处理 取以上处理后的细胞于无RNA酶的EP管中,加裂解液进行裂解;加入1 mL的Trizol,移入无RNA酶的EP管中,剧烈震荡5 min;加入氯仿(200 μL),盖紧离心管盖,用力震荡,直至乳化,溶

液呈乳白色状后,再室温静置 5 min, 12 000g 4 ℃ 离心 15 min, 从离心机中取出离心管, 此时裂解液分为 3 层: 无色的上清液, 中间白色蛋白层及带有颜色的下层有机相。吸取无色上清液转移至另一新的 1.5 mL 离心管中, 经过异丙醇沉淀, 乙醇清洗, 沉淀溶解完成样本处理。

1.7.2 总 RNA 反转录 将 RNA 在 65 ℃ 条件下水浴 5 min 后, 立即置于冰上冷却。逆转录反应条件: 37 ℃, 60 min; 85 ℃, 5 min; 4 ℃, 5 min; -20 ℃ 保存。反应体系 (25 μ L): RNA-Primer Mix 12 μ L, 5 \times RT Reaction Buffer 5 μ L, 25 mmol/L dNTPs 1 μ L, 25 U/ μ L RNase Inhibitor 1 μ L, 200 U/ μ L M-MLV Rtae 1 μ L, Oligo(dT)18 1 μ L, ddH₂O (DNase-free) 4 μ L。

1.7.3 Real-time PCR 采用两步法。体系: Primer P1 0.4 μ L, Primer P2 0.4 μ L, 2 \times supermix 10 μ L, PASSIVE DYE 0.4 μ L, Template 2 μ L, ddH₂O 6.8 μ L, 共 20 μ L。反应条件: 95 ℃ 3 min, 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 20 s, 72 ℃ 20 s, 40 个循环。溶解曲线: 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 15 s, 20 min 升温, 95 ℃ 15 s。使用的引物序列: CKIP-F CGATCCCGCCATGAAGAAGA, CKIP-R TCAGCACCACATAGCGGTTT, RUNX2-F ACTATGCGGTCAAACAGCCT, RUNX2-RTACAACCTTGAAGGCCACGG, ALPL-F TGCAGGATCGGAACGTCAAT, ALPL-RGAGTTGGTAAGGCAGGGTCC。

1.7.4 CKK-8 检测 感染 96 h 后, CKK-8 检测各组细胞的相对数目。成骨细胞分离鉴定和 CKIP-1 过表达慢病毒载体的构建及检测参考前期研究。在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ L/孔), 将培养板放在培养箱中预培养一段时间, 培养条件: 37 ℃, 5% CO₂。待细胞完全贴壁后进行对应的分组处理。向每孔加入 10 μ L CCK-8 反应液, 将培养板在培养箱内孵育 2 h, 用酶标仪测定波长在 450 nm 处的吸光度。

1.7.5 茜素红染色 细胞经分组对应处理 96 h 后, 换含 10% 血清的 DMEM (50 μ g/mL 维生素 C 和 10 mmol/L β -甘油磷酸钠), 每 3 d 换一次液, 15 d 后弃去培养皿内的培养液, PBS 洗涤 3 次; 用 95% 乙醇固定 15 min, PBS 洗涤 3 次; 固定后的细胞用 2% 茜素红染液释液室温孵育 1 h, 蒸馏水漂洗细胞 3 次; 倒置显微镜下观察拍照。

1.8 统计学方法

应用 SPSS19.0 进行数据分析, 组间分析采用 Student's *t* 检验 (两组) 或单因素方差分析 (One-Way ANOVA, 两组以上) 方法进行分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.01$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 强骨饮对成骨抑制基因 CKIP-1 的 mRNA 表达水平的影响

qRT-PCR 检测各组的成骨抑制基因 CKIP-1 的 mRNA 表达水平结果见图 1: a 组和 b 组的差异无统计学意义; 相比 a 组和 b 组, c 组的 CKIP-1 有较高表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 这表明 CKIP-1 过表达慢病毒构建成功; 与 c 组相比, 经强骨饮处理的 d 组 CKIP-1 表达水平显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 这表明强骨饮可以有效抑制 CKIP-1 在体外大鼠成骨细胞中的表达水平。

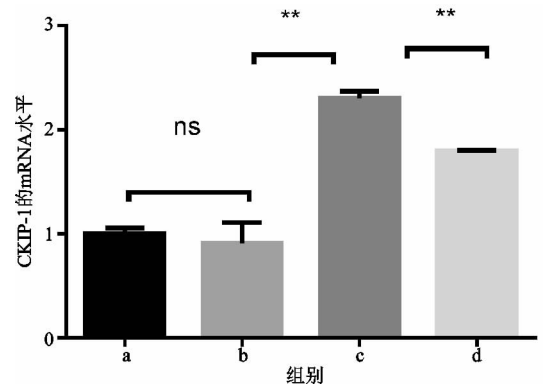


图 1 qRT-PCR 检测成骨细胞中 CKIP-1 的 mRNA 水平 (* * 表示 $P < 0.01$)

2.2 强骨饮对 CKIP-1 过表达的成骨细胞的成骨相关基因 RUNX2 ALPL mRNA 表达水平的影响

qRT-PCR 检测各组的成骨分化相关基因 RUNX2 和 ALPL 的 mRNA 表达水平, 结果见图 2 和图 3: a 组和 b 组的差异无统计学意义; 相比 a 组和 b 组, c 组的 RUNX2 和 ALPL 的表达水平极低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 这表明 CKIP-1 的过表达可以抑制体外大鼠成骨细胞中成骨相关基因 RUNX2 和 ALPL 的表达; c 组与 d 组比较, 经强骨饮处理的 d 组 RUNX2 和 ALPL 表达显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 这表明强骨饮可以有效抑制 CKIP-1 过表达对体外大鼠成骨细胞造成的成骨抑制作用。

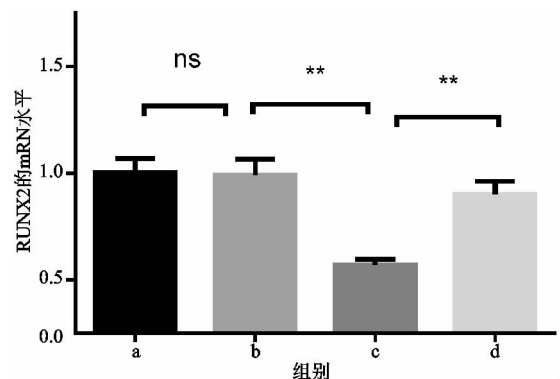


图 2 qRT-PCR 检测成骨细胞中 RUNX2 的 mRNA 水平 (* * 表示 $P < 0.01$)

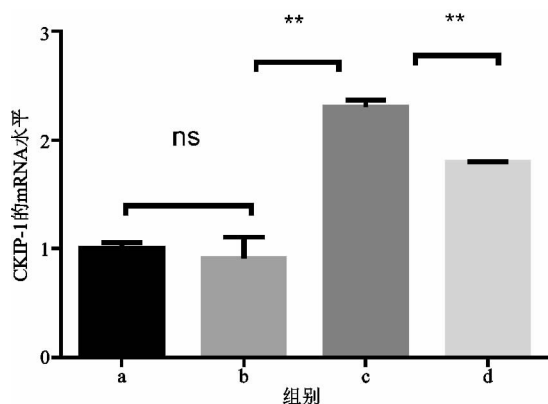


图3 qRT-PCR检测成骨细胞中ALPL的mRNA水平

(* * 表示 $P < 0.01$)

2.3 强骨饮对CKIP-1过表达的成骨细胞增殖的影响

CCK-8检测结果各组细胞增殖情况,结果见图4:

a组和b组差异无统计学意义;相比a组和b组,c组的细胞增殖水平显著降低($P < 0.01$),这表明,CKIP-1过表达明显抑制成骨细胞增殖;相比c组,d组的细胞增殖比例有升高的趋势,且差异显著($P < 0.01$),这表明强骨饮可以有效改善CKIP-1过表达对体外大鼠成

骨细胞增殖所造成的抑制。

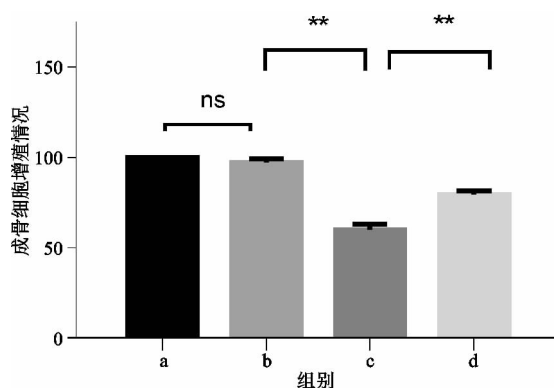


图4 CCK-8检测成骨细胞增殖情况(* * 表示 $P < 0.01$)

2.4 强骨饮对CKIP-1过表达的成骨细胞矿化功能的影响

结果见图5:a组和b组的钙化结节无明显差异;相比a组和b组,c组钙化结节明显减少,这表明CKIP-1过表达抑制成骨细胞钙化结节形成;相比c组,d组钙化结节显著增多,这表明强骨饮可以有效缓解CKIP-1过表达对体外大鼠成骨细胞矿化的抑制。

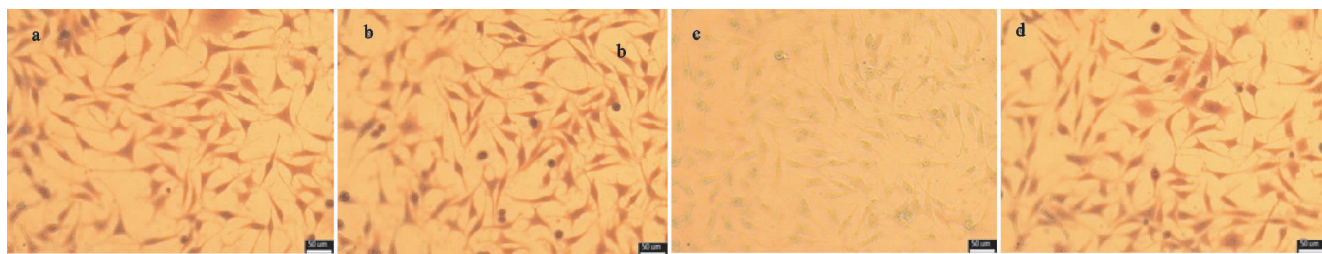


图5 低倍镜下茜素红染色鉴定结果(图中线条长度为50 μm)

3 讨论

CKIP-1作为支架蛋白介导多种信号传导和细胞蛋白质的相互作用^[14],因此CKIP-1可以介导细胞的生长、分化、细胞凋亡、细胞骨架的形成^[15,16],是一种在骨形成中起重要作用的蛋白质。尹秀山等^[17]的研究表明:CKIP-1对体外成骨细胞的细胞增殖、成骨分化及矿化形成有明显抑制作用。CKIP-1是通过激活泛素连接酶1(Smad Ubiquitin Regulatory Factor 1, SMURF-1)的活性对成骨细胞负调节^[18]。在李春雯等^[19]的动物研究中已经证明强骨饮有很强的促进成骨作用,但是其分子机制尚不明确。

本研究观察强骨饮对CKIP-1过表达的大鼠体外成骨细胞的细胞增殖和成骨分化情况的影响,发现强骨饮能明显提高CKIP-1过表达的体外大鼠成骨细胞的细胞增殖能力和成骨分化能力,这说明强骨饮可能是通过调控CKIP-1起到促进成骨的作用。强骨饮治疗骨质疏松症的分子机制仍需要更多的细胞生物学研究来明确。

参考文献

[1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏

松症诊疗指南(2017)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 20(5): 413-443.

- [2] Pacifici R. Bone remodeling and the microbiome[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017.
- [3] Peng S, Cao L, He S, et al. An Overview of long noncoding RNAs involved in bone regeneration from mesenchymal stem Cells[J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 8273648.
- [4] Lu K, Yin X, Weng T, et al. Targeting WW domains linker of HECT-type ubiquitin ligase Smurf1 for activation by CKIP-1[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(8): 994-1002.
- [5] Zhou ZC, Che L, Kong L, et al. CKIP-1 silencing promotes new bone formation in rat mandibular distraction osteogenesis[J]. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology, 2017, 123(1): 1-9.
- [6] Litchfield DW. CKIP-1. Encyclopedia of signaling molecules[M]. Berlin: Springer International Publishing, 2018: 1125-1129.
- [7] Liu J, Lu C, Wu X, et al. Targeting osteoblastic casein kinase-2 interacting protein-1 to enhance smad-dependent BMP signaling and reverse bone formation reduction in glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Sci Rep, 2017, 7: 41295.

[8]

Kawata T,Tada K,Kobayashi M,et al. Dual inhibition of the mTORC1 and mTORC2 signaling pathways is a promising therapeutic target for adult T-cell leukemia[J]. Cancer Sci,2018,109(1):103-111.

[9]

Zhang G,Guo B,Wu H,et al. A delivery system targeting bone formation surfaces to facilitate RNAi-based anabolic therapy[J]. Nature Medicine,2012,18(2):307-314.

[10]

史晓林,王健,王博,等. 虚瘀兼顾——治疗原发性骨质疏松症的基本原则[J]. 中医正骨,2017,29(3):14-16.

[11]

史晓林,朱彦昭,宁玉梅,等. 强骨饮对骨质疏松患者抗酒石酸酸性磷酸酶-5b 影响的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2008,16(1):25-27.

[12]

吴连国,刘康,王定,等. 强骨饮治疗骨关节炎合并骨质疏松患者的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2011,19(12):10-13.

[13]

史晓林,刘康,李胜利. 自拟强骨饮治疗骨质疏松性骨痛的 44 例临床报告[J]. 中国中医骨伤科杂志,2007,15(2):9-10.

[14]

Nie J,Liu L,He F,et al. CKIP-1: a scaffold protein and potential therapeutic target integrating multiple signaling pathways and physiological functions [J]. Ageing Res Rev,2013,12(1):276-281.

[15]

Ozdamar B,Bose R,Barrios-Rodiles M,et al. Regulation of the polarity protein par6 by TGFβ receptors controls epithelial cell Plasticity [J]. Science, 2005, 307 (5715): 1603-1609.

[16]

Zhang GM. Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation[J]. Cell,2005,121(1):101-113.

[17]

尹秀山. CKIP-1 基因的敲除小鼠模型建立及其在骨骼、免疫系统中的生理功能研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院,2009.

[18]

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.

[19]

李春雯,史晓林,刘康,等. 强骨饮与福善美对去势大鼠腰椎骨形态计量学的对比实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2007,15(9):41-43.

(收稿日期:2018-04-13)

广告目次

1. 国药集团精方(安徽)药业股份有限公司			
颈舒颗粒	封二		
2. 广东省医药进出口公司珠海公司			
同息通	彩插一		
3. 陕西盘龙药业集团股份有限公司			
盘龙七片	封三		
4. 贵州益佰制药股份有限公司			
金骨莲胶囊	封四		