

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.12.006
文章编号: 1005-8982 (2023) 12-0033-08

实验研究·论著

黄芪多糖对激素性股骨头坏死模型骨细胞凋亡和SP1/MEK/ERK轴的影响*

卢敏¹, 许晓彤¹, 申楠², 张申尧²

(1. 湖南中医药大学第一附属医院 骨伤科, 湖南 长沙 410021;
2. 湖南中医药大学第二附属医院 骨伤科, 湖南 长沙 410005)

摘要: **目的** 探究黄芪多糖对激素性股骨头坏死(SONFH)模型骨细胞凋亡和SP1/MEK/ERK轴的影响。**方法** 通过地塞米松诱导小鼠骨细胞(MLO-Y4)建立SONFH细胞模型, 加入300 μg/mL黄芪多糖处理后通过MTT和流式细胞术检测骨细胞活性和细胞凋亡。进一步在细胞中过表达或者敲降SP1, 通过Western blotting验证SP1表达对MEK/ERK通路活性的影响。**结果** SONFH模型组48 h后光密度值较对照组降低($P < 0.05$), SONFH+黄芪多糖组较SONFH+PBS组升高($P < 0.05$)。SONFH模型组细胞凋亡率较对照组高($P < 0.05$), SONFH+黄芪多糖组较SONFH模型组低($P < 0.05$), SONFH模型组Bax、Cleaved-caspase-3蛋白相对表达量较对照组高($P < 0.05$), Bcl-2蛋白相对表达量较对照组低($P < 0.05$), SONFH+黄芪多糖组Bax、Cleaved-caspase-3蛋白相对表达量较SONFH模型组低($P < 0.05$), Bcl-2蛋白相对表达量较SONFH模型组高($P < 0.05$)。SONFH模型组SP1 mRNA、蛋白相对表达量较对照组高($P < 0.05$), SONFH+黄芪多糖组较SONFH模型组低($P < 0.05$)。SONFH+黄芪多糖组SP1 mRNA相对表达量较SONFH模型组低, SONFH+黄芪多糖+OE-SP1组较SONFH+黄芪多糖+OE-NC组高。SONFH模型组细胞活性较对照组降低($P < 0.05$), SONFH+黄芪多糖组较SONFH模型组升高($P < 0.05$), SONFH+黄芪多糖组与SONFH+黄芪多糖+OE-NC组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), SONFH+黄芪多糖+OE-SP1组较SONFH+黄芪多糖组降低($P < 0.05$)。SONFH模型组细胞凋亡率和Bax、Cleaved-caspase-3蛋白相对表达量较对照组高($P < 0.05$), SONFH+黄芪多糖组较SONFH模型组低($P < 0.05$), SONFH+黄芪多糖+OE-SP1组较SONFH+黄芪多糖+OE-NC组高($P < 0.05$); SONFH模型组Bcl-2蛋白相对表达量较对照组低($P < 0.05$), SONFH+黄芪多糖组较SONFH模型组低($P < 0.05$), SONFH+黄芪多糖+OE-SP1组较SONFH+黄芪多糖+OE-NC组低($P < 0.05$)。OE-SP1组SP1 mRNA相对表达量较OE-NC组高, sh-SP1组较sh-NC组低。OE-SP1组SP1蛋白相对表达量较对照组、OE-NC组高($P < 0.05$), sh-SP1组较sh-NC组低($P < 0.05$); OE-SP1组MEK、p-ERK蛋白相对表达量较对照组、OE-NC组低($P < 0.05$), sh-SP1组较sh-NC组高($P < 0.05$)。**结论** 黄芪多糖抑制了SONFH骨细胞活性, 并促进了骨细胞凋亡, 其治疗作用可能与SP1和MEK/ERK通路相关。

关键词: 激素性股骨头坏死; 黄芪多糖; SP1; 细胞凋亡

中图分类号: R681.6

文献标识码: A

Effect of astragalus polysaccharides on osteocyte apoptosis and SP1/MEK/ERK axis in cell models of steroid-induced osteonecrosis of femoral head*

Lu Min¹, Xu Xiao-tong¹, Shen Nan², Zhang Shen-yao²

(1. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine,

收稿日期: 2022-10-11

* 基金项目: 湖南省自然科学基金(No: 2022JJ40328)

[通信作者] 张申尧, E-mail: zhangshy0003@163.com

Changsha, Hunan 410021, China; 2. Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To explore the effect of astragalus polysaccharides on osteocyte apoptosis and SP1/MEK/ERK axis in cell models of steroid-induced osteonecrosis of femoral head (SONFH). **Methods** The cell model of SONFH was established by treating mouse osteocytes (MLO-Y4) with dexamethasone. After modeling, the SONFH cells were treated with 300 $\mu\text{g/mL}$ of astragalus polysaccharides, followed by the MTT assay and flow cytometry to detect the cell viability and apoptosis. Furthermore, SP1 was overexpressed or knocked down in SONFH cells, and the effect of SP1 expression on the activity of the MEK/ERK pathway was verified by Western blotting. **Results** The 48-hour optical density of the SONFH model group was lower than that of the control group ($P < 0.05$), while that in the SONFH + astragalus polysaccharides group was higher compared with the SONFH + PBS group ($P < 0.05$). The cell apoptosis rate in the SONFH model group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), while that in the SONFH + astragalus polysaccharides group was lower compared with the SONFH model group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the protein expressions of Bax and cleaved caspase-3 were higher, but the protein expression of Bcl-2 was lower in the SONFH model group ($P < 0.05$). Compared with the SONFH model group, the protein expressions of Bax and cleaved caspase-3 were lower, but the protein expression of Bcl-2 was higher in the SONFH + astragalus polysaccharides group ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of SP1 in the SONFH model group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), whereas those in the SONFH + astragalus polysaccharides group were lower compared with the SONFH model group ($P < 0.05$). The mRNA expression of SP1 in the SONFH + astragalus polysaccharides group was lower than that in the SONFH model group, while that in the SONFH + astragalus polysaccharides + OE-SP1 group was higher compared with the SONFH + astragalus polysaccharides + OE-NC group ($P < 0.05$). The cell viability in the SONFH model group was lower than that in the control group ($P < 0.05$), while that in the SONFH + astragalus polysaccharides group was higher compared with the SONFH model group ($P < 0.05$). There was no difference in the cell viability between the SONFH + astragalus polysaccharides group and the SONFH + astragalus polysaccharides + OE-NC group ($P > 0.05$), while the cell viability in the SONFH + astragalus polysaccharides + OE-SP1 group was lower compared with the SONFH + astragalus polysaccharides + OE-NC group ($P < 0.05$). The cell apoptosis rate and the protein expressions of Bax and cleaved caspase-3 in the SONFH group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), while they were lower in the SONFH + astragalus polysaccharides group than in the SONFH model group, and were higher in the SONFH + astragalus polysaccharides + OE-SP1 group than in the SONFH + astragalus polysaccharides + OE-NC group ($P < 0.05$). The protein expression of Bcl-2 in the SONFH model group was lower than that in the control group ($P < 0.05$), while that in the SONFH + astragalus polysaccharides group was lower than that in the SONFH model group ($P < 0.05$), and that in the SONFH + astragalus polysaccharides + OE-SP1 group was even lower than that in the SONFH + astragalus polysaccharides + OE-NC group ($P < 0.05$). The mRNA expression of SP1 in the OE-SP1 group was higher than that in the OE-NC group, while that in the sh-SP1 group was lower than that in the sh-NC group. The protein expression of SP1 in the OE-SP1 group was higher than that in the control group and the OE-NC group ($P < 0.05$), and that in the sh-SP1 group was lower than that in the sh-NC group ($P < 0.05$). The protein expressions of MEK and p-MEK in the OE-SP1 group were lower than those in the control group and the OE-NC group ($P < 0.05$), whereas those in the sh-SP1 group were higher than those in the sh-NC group ($P < 0.05$). **Conclusions** Astragalus polysaccharide inhibits the viability of osteocytes in SONFH and promotes the apoptosis of osteocytes. The therapeutic effect of astragalus polysaccharide might be related to SP1 and the MEK/ERK pathway.

Keywords: steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; astragalus polysaccharide; SP1; apoptosis

股骨头坏死 (osteonecrosis of the femoral head, ONFH) 是一种进行性髋关节退行性疾病, 近几年来在年轻人中具有高发病率、残疾率^[1]。根据流行病学研究发现, 大剂量类固醇使用是导致 ONFH 的主

要原因, 称为激素性股骨头坏死 (steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)^[2-3]。骨细胞凋亡、股骨头坏死等已被证实在 SONFH 的发病机制中起关键作用^[4-5]。研究显示, 糖皮质激素可能通过

诱导骨细胞凋亡后导致骨质疏松,引起微骨折,增加股骨头的缺血、缺氧,最终引起股骨头坏死^[6]。因此,寻找抑制骨细胞凋亡的药物试剂对预防和治疗 SONFH 具有重要意义。

黄芪多糖是从植物黄芪中分离出的具有多种生物活性成分物,包括可调节免疫、抗氧化、活血化瘀及抗肿瘤等,并能够通过调节肠道微生物群来改善骨质疏松症,且能有效缓解去卵巢大鼠氧化应激介导的骨质疏松症^[7-9]。在骨质疏松的研究中发现,转录因子家族的特异性蛋白 1 (SP1) 能够抑制成骨细胞分化和血管生成,同时促进破骨细胞形成^[10]。并且在人慢性髓原白血病细胞中,SP1 表达受黄芪多糖调控^[11]。有研究证实,MEK/ERK 通路在成骨分化和骨细胞凋亡中发挥调控作用,SP1 能够靶向激活 MEK/ERK 通路^[12]。笔者推测黄芪多糖能通过下调 SP1 激活 MEK/ERK 通路,抑制骨细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

MLO-Y4 (CL-0567) 和 MC3T3-E1 (CL-0710) 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,黄芪多糖(纯度 > 98%) 购自兰州沃特莱斯生物有限公司,cDNA 链合成试剂盒购自上海泽叶生物科技有限公司,AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,C16-PAF 购自美国 Med Chem Express LLC 公司,MTT Assay 试剂盒和蛋白质一抗:Bax (ab32503)、Cleaved-caspase-3 (ab32042)、Bcl-2 (ab32124)、GAPDH (ab8245)、SP1 (ab231778)、MEK (ab278716)、ERK (ab184699)、p-ERK (ab201015) 和二抗均购自英国 Abcam 公司,胎牛血清购自德国 PAN-Biotech 公司,青霉素购自美国 HyClone 公司,TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,RIPA 裂解缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司,BCA 蛋白检测试剂盒购自美国赛默飞公司,PVDF 膜美国 Bio-Rad 公司,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Biomake 公司,流式细胞分析仪购自美国 BD FACSCanto 公司,微孔板分光光度计购自美国 Perkin Elmer 公司,超微量核酸分析仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MLO-Y4 细胞在 0.15 mg/mL 大鼠

尾胶原 1 型胶原包被的培养皿中培养,同时添加含有 10% 胎牛血清和 100 u/mL 青霉素的改良 Eagle's Medium 培养基,在 37 °C、5% 二氧化碳培养箱中培养。将细胞分为对照组、SONFH 模型、SONFH + PBS 组和 SONFH + 黄芪多糖处理组。其中对照组正常培养。SONFH 模型组在培养基中添加 10 μmol/L 地塞米松诱导 48 h。SONFH + 黄芪多糖处理组是 SONFH 模型细胞培养基中加入 300 μg/mL 的黄芪多糖处理 48 h。SONFH + PBS 组在 SONFH 模型细胞培养基中加入与黄芪多糖处理同等体积的 PBS 处理 48 h。将处理后的细胞通过胰蛋白酶消化,以 8 000 r/min 离心 10 min,收集细胞液待测。

1.2.2 细胞共培养 将对照组和 SONFH 模型组的 MLO-Y4 细胞通过 Transwell 体系与 MC3T3-E1 细胞共培养,检测 MC3T3-E1 的碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性验证 SONFH 模型是否建立成功。成骨细胞的初始细胞密度为 2×10^4 个/cm。培养 3、7 d 后,离心收集成骨细胞,用 1% Triton X-100 溶液溶解。用硝基苯磷酸盐测定试剂盒检测细胞裂解液中碱性磷酸酶活性。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 SP1 mRNA 的表达 细胞经胰蛋白酶消化后,通过离心将对照组、SONFH 模型组、SONFH + PBS 组和 SONFH + 黄芪多糖组的细胞收集在离心管中待测。根据试剂盒说明书,使用 TRIzol 试剂盒从 4 组 MLO-Y4 细胞中分离得到总 RNA。通过超微量核酸分析仪检测 260 nm 处的光密度值以评估 RNA 含量,并且使用 cDNA 链合成试剂盒将 2 μg 的 RNA 逆转录成 cDNA。SP1 正向引物:5'-TGGGTACTTCAGGGATCCAG-3',反向引物 5'-TGAGGCTCTCCCTCACTGT-3',长度均 20 bp; GAPDH 正向引物:5'-AGCCCAAGATGCCCTTCAGT-3',反向引物 5'-CCGTGTTCCCTACCCCAATG-3',长度均 20 bp。在实时荧光定量 PCR 仪中使用 SYBR[®] Green Master Mix 进行 qRT-PCR,反应条件:95 °C 变性 30 s,95 °C 退火 10 s,60 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参。标准和样品 1 式 3 份。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 SP1 mRNA 相对表达量。

1.2.4 细胞转染 由上海生工生物有限公司设计合成了 SP1 过表达载体 (SP1-pcDNA3.1, OE-SP1) 和阴性对照 (pcDNA3.1, OE-NC),以及 SP1 敲降载体 (sh-SP1) 和阴性对照 (sh-NC)。将细胞分为 OE-

NC 组、OE-SP1 组、sh-NC 组和 sh-SP1 组、SONFH + 黄芪多糖 + OE-NC 组和 SONFH + 黄芪多糖 + OE-SP1 组。OE-NC 组、OE-SP1 组细胞根据说明书的步骤使用 Lipofectamine 3000 (Invitrogen) 将 OE-NC 或者 OE-SP1 载体分别转染至 MLO-Y4 细胞中。sh-NC 组和 sh-SP1 组分别将 sh-NC 和 sh-SP1 载体通过 Lipofectamine 3000 转染至 MLO-Y4 细胞中。SONFH + 黄芪多糖 + OE-NC 组和 SONFH + 黄芪多糖 + OE-SP1 组分别将 OE-NC 或者 OE-SP1 载体通过 Lipofectamine 3000 转染至 MLO-Y4 细胞中,接着对转染后的细胞进行 SONFH 模型复制和黄芪多糖处理。

1.2.5 Western blotting 检测 SP1、MEK、ERK、p-ERK 蛋白的表达 收集待检测的对照组、SONFH 模型组、SONFH + PBS 组和 SONFH + 黄芪多糖组;对照组、SONFH 模型组、SONFH + 黄芪多糖组、SONFH + 黄芪多糖 + OE-NC 组和 SONFH + 黄芪多糖 + OE-SP1 组;以及对照组、OE-NC 组、OE-SP1 组、sh-NC 组和 sh-SP1 组的 MLO-Y4 细胞,使用含苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解缓冲液从 MLO-Y4 细胞中提取总蛋白,并使用 BCA 蛋白检测试剂盒评估蛋白浓度。在 SDS/聚丙烯酰胺凝胶上分离蛋白并转移到 PVDF 膜。随后使用 5% 的脱脂牛奶孵育膜进行非特异性封闭,将膜与一抗在 4 °C 孵育过夜。接着将膜充分洗涤并与辣根过氧化物酶缀合的二抗一起室温温育 1 h。抗原-抗体复合物通过 Bio-Rad 图像分析系统进行可视化分析。

1.2.6 MTT 检测骨细胞增殖水平 各组在 24 孔板中以 1×10^4 个/孔的细胞密度培养处理 48 h 后待检测的 MLO-Y4 细胞。24 孔板中细胞 12 h 贴壁后,将其在 37 °C 下与 0.5 mg/mL MTT 一起孵育 3 h。去除上清后,将甲臞晶体悬浮在二甲亚砜中。通过对 SONFH 细胞模型中加入 300 μ g/mL 的黄芪多糖处理,MTT 检测 48 h 后细胞 490 nm 的光密度值。

1.2.7 流式细胞分析仪检测骨细胞凋亡比例 用胰蛋白酶收集 MLO-Y4 细胞,并使用预冷 PBS 洗涤 2 次。将细胞在 500 μ L 的结合缓冲液中悬浮。根据试剂盒使用说明用 Annexin V-FITC 和 PI 标记细胞。然后将样品置于室温下的黑暗环境中 15 min。最后,用流式细胞分析仪对染色细胞进行分析,计数细胞凋亡比例(Q2+Q3)。

1.3 观察指标

①通过 MTT 检测细胞活性。验证 SONFH 细胞模型是否构建成功;②比较对照组、SONFH 模型组、SONFH + PBS 组、SONFH + 黄芪多糖组 48 h 光密度值变化;③采用流式细胞术检测对照组、SONFH 模型组、SONFH+PBS 组、SONFH+黄芪多糖组细胞凋亡率和 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量;④采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测对照组、SONFH 模型组、SONFH+PBS 组、SONFH+黄芪多糖组 SP1 mRNA、蛋白相对表达量;⑤MTT 和流式细胞术检测对照组、SONFH 模型组、SONFH+黄芪多糖组、SONFH+黄芪多糖+OE-NC 组、SONFH+黄芪多糖+OE-SP1 组中黄芪多糖处理过表达 SP1 的 SONFH 模型 SP1 mRNA 相对表达量、细胞活性、细胞凋亡率和 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量;⑥Western blotting 检测分别敲低或者过表达 SP1 后,对照组、OE-NC 组、OE-SP1 组、sh-NC 组、sh-SP1 组细胞中 SP1 mRNA 和 SP1、MEK、p-ERK 蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组比较用方差分析,两两比较用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复制 SONFH 细胞模型

对照组与 SONFH 模型组细胞活性、MC3T3-E1 细胞 ALP 含量比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),对照组较 SONFH 模型组高。提示 SONFH 细胞模型复制成功。见表 1。

表 1 对照组与 SONFH 模型组细胞活性、MC3T3-E1 细胞 ALP 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活性	MC3T3-E1 细胞 ALP 含量/(nmol/L)
对照组	1.27 \pm 0.05	4.41 \pm 0.48
SONFH 模型组	0.86 \pm 0.07	2.24 \pm 0.35
<i>F</i> 值	2.075	40.650
<i>P</i> 值	0.001	0.003

2.2 各组 48 h 后细胞 490 nm 的光密度值比较

对照组光密度值为 (1.34 ± 0.05), SONFH 模型组为 (0.86 ± 0.09), SONFH + PBS 组为 (0.83 ± 0.05), SONFH + 黄芪多糖组 (1.16 ± 0.06), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=41.760, P=0.000$)。SONFH 模型组较对照组降低 ($P<0.05$), SONFH + 黄芪多糖组较 SONFH + PBS 组升高 ($P<0.05$)。提示在 SONFH 细胞模型中, 黄芪多糖增加了骨细胞活力。

2.3 黄芪多糖抑制骨细胞凋亡

各组细胞凋亡率和 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。SONFH 模型组细胞凋亡率较对照组高 ($P<0.05$), SONFH + 黄芪多糖组较 SONFH 模型组低 ($P<0.05$), SONFH 模型组 Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量较对照组高 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白相对表达量较对照组低 ($P<0.05$), SONFH + 黄芪多糖组 Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量较 SONFH 模型组低 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白相对表达量较 SONFH 模型组高 ($P<0.05$)。提示在 SONFH 细胞模型组中, 黄芪多糖抑制了骨细胞凋亡。见表 2 和图 1、2。

2.4 黄芪多糖下调 SONFH 模型细胞中 SP1 表达

各组 SP1 mRNA、蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。SONFH 模型组较对照组高 ($P<0.05$), SONFH + 黄芪多糖组较 SONFH 模型组低 ($P<0.05$)。提示黄芪多糖下调 SONFH 模型细胞中 SP1 表达。见表 3 和图 3。

2.5 黄芪多糖通过下调 SP1 促进 SONFH 模型组的骨细胞活性、抑制细胞凋亡

对照组细胞的 SP1 mRNA 相对表达量为 (1.10 ± 0.08)、SONFH 模型组为 (2.11 ± 0.22)、SONFH+ 黄芪

表 2 各组细胞凋亡率和 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率/ %	Bcl-2	Bax	Cleaved- caspase-3
对照组	7.40 ± 1.89	0.58 ± 0.06	0.07 ± 0.05	0.08 ± 0.06
SONFH 模型组	25.26 ± 1.92	0.17 ± 0.05	0.72 ± 0.07	0.75 ± 0.04
SONFH+PBS 组	26.63 ± 2.19	0.18 ± 0.06	0.71 ± 0.08	0.70 ± 0.09
SONFH+黄芪多糖组	15.03 ± 2.03	0.36 ± 0.06	0.22 ± 0.11	0.37 ± 0.09
F 值	60.750	69.960	55.820	56.090
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

多糖组为 (1.27 ± 0.14)、SONFH + 黄芪多糖 + OE-NC 组为 (1.26 ± 0.17)、SONFH + 黄芪多糖 + OE-SP1 组为 (2.26 ± 0.25), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=26.860, P=0.000$)。SONFH + 黄芪多糖组较 SONFH 模型组低, SONFH + 黄芪多糖 + OE-SP1 组较 SONFH+黄芪多糖+OE-NC 组高 ($P<0.05$)。

通过 MTT 检测细胞活性, 对照组细胞活性为 (1.48 ± 0.04), SONFH 模型组为 (0.84 ± 0.04), SONFH+黄芪多糖组为 (1.24 ± 0.03), SONFH + 黄芪多糖 + OE-NC 组为 (1.30 ± 0.04), SONFH + 黄芪多糖 + OE-SP1 组为 (0.92 ± 0.07), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=92.470, P=0.000$)。SONFH 模型组较对照组降低 ($P<0.05$), SONFH+黄芪多糖组较 SONFH 模型组升高 ($P<0.05$), SONFH+黄芪多糖组与 SONFH + 黄芪多糖 + OE-NC 组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), SONFH + 黄芪多糖 + OE-SP1 组较 SONFH+黄芪多糖组降低 ($P<0.05$)。

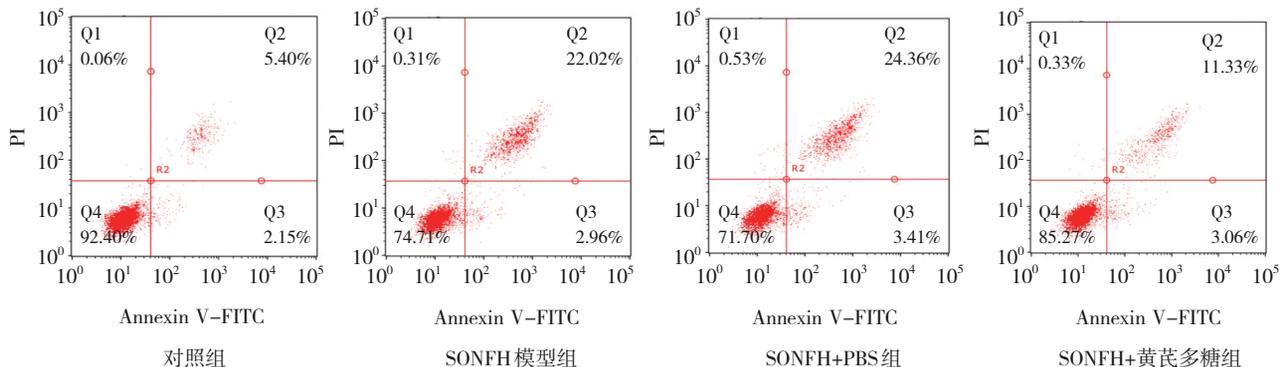
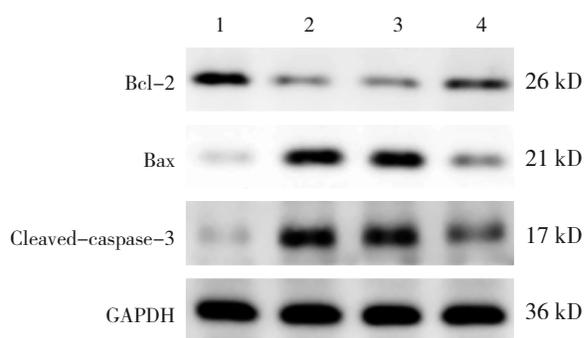


图 1 各组细胞凋亡流式散点图



1:对照组; 2:SONFH模型组; 3:SONFH+PBS组; 4:SONFH+黄芪多糖组。

图2 各组细胞凋亡相关蛋白的表达

表3 各组SP1 mRNA、蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SP1 mRNA	SP1 蛋白
对照组	1.03 ± 0.13	0.29 ± 0.16
SONFH模型组	2.30 ± 0.17	0.96 ± 0.06
SONFH + PBS组	2.19 ± 0.24	0.99 ± 0.13
SONFH + 黄芪多糖组	1.22 ± 0.23	0.39 ± 0.11
F值	33.780	27.470
P值	0.000	0.000

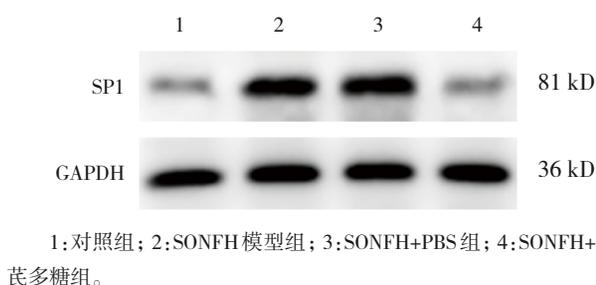


图3 各组SP1蛋白质的表达

各组细胞凋亡率和 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SONFH 模型组细胞凋亡率和 Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量较对照组高 ($P < 0.05$), SONFH + 黄芪多糖组较 SONFH 模型组低 ($P < 0.05$), SONFH + 黄芪多糖 + OE-SP1 组较 SONFH + 黄芪多糖 + OE-NC 组高 ($P < 0.05$); SONFH 模型组 Bcl-2 蛋白相对表达量较对照组低 ($P < 0.05$), SONFH + 黄芪多糖组较 SONFH 模型组低 ($P < 0.05$), SONFH + 黄芪多糖 + OE-SP1 组较 SONFH + 黄芪多糖 + OE-NC 组低 ($P < 0.05$)。见图 4、5 和表 4。

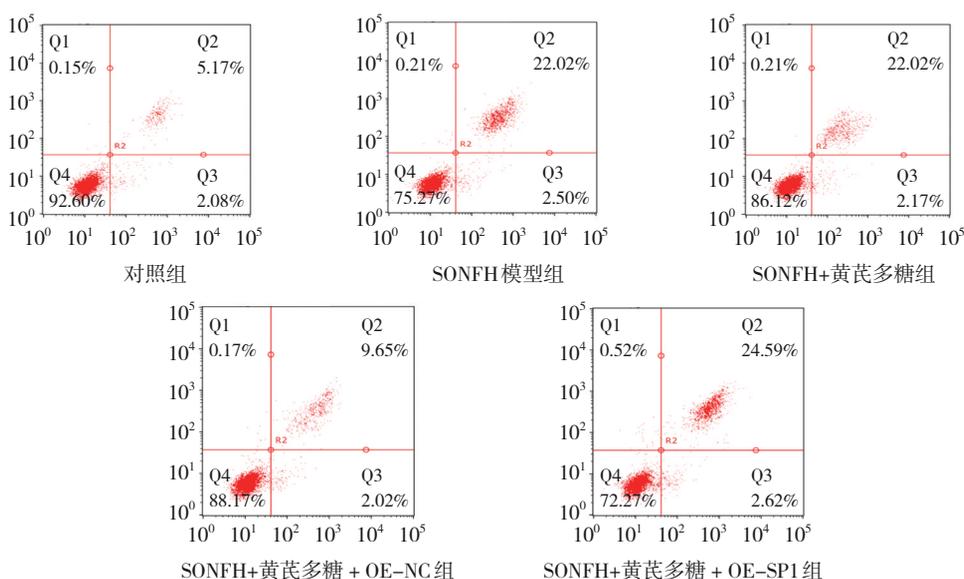


图4 各组细胞凋亡的流式散点图

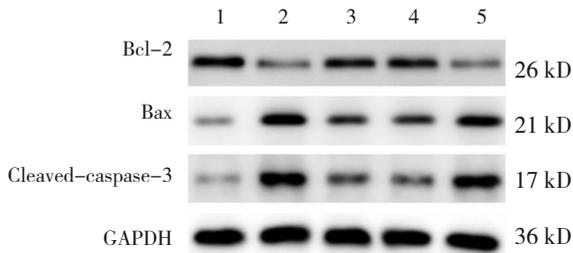
2.6 SP1 调控 MLO-Y4 骨细胞 MEK/ERK 通路

笔者对 SP1 可能调控的下游通路进行验证。对照组 SP1 mRNA 相对表达量为 (0.96 ± 0.10)、OE-NC 组为 (1.01 ± 0.22)、OE-SP1 组为 (2.51 ± 0.19)、sh-NC 组为 (1.08 ± 0.12)、sh-SP1 组为 (0.46 ± 0.15), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 96.990, P = 0.000$)。OE-SP1 组较 OE-NC 组高, sh-SP1 组较 sh-NC 组低。

各组 SP1、MEK、p-ERK 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。OE-SP1 组 SP1 蛋白相对表达量较对照组、OE-NC 组高 ($P < 0.05$), sh-SP1 组较 sh-NC 低 ($P < 0.05$); OE-SP1 组 MEK、p-ERK 蛋白相对表达量较对照组、OE-NC 组低 ($P < 0.05$), sh-SP1 组较 sh-NC 高 ($P < 0.05$)。提示 SP1 调控 MEK/ERK 通路。见表 5 和图 6。

表 4 各组细胞凋亡率和 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率/%	Bcl-2	Bax	Cleaved-caspase-3
对照组	6.91 ± 2.41	0.63 ± 0.06	0.17 ± 0.07	0.14 ± 0.06
SONFH 模型组	27.17 ± 2.90	0.23 ± 0.06	0.66 ± 0.11	0.74 ± 0.06
SONFH+黄芪多糖组	13.86 ± 2.57	0.55 ± 0.07	0.35 ± 0.05	0.33 ± 0.07
SONFH+黄芪多糖 + OE-NC 组	13.08 ± 3.76	0.51 ± 0.09	0.31 ± 0.09	0.30 ± 0.07
SONFH+黄芪多糖 + OE-SP1 组	26.62 ± 2.06	0.20 ± 0.08	0.54 ± 0.07	0.69 ± 0.09
F 值	30.810	22.230	18.230	46.040
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

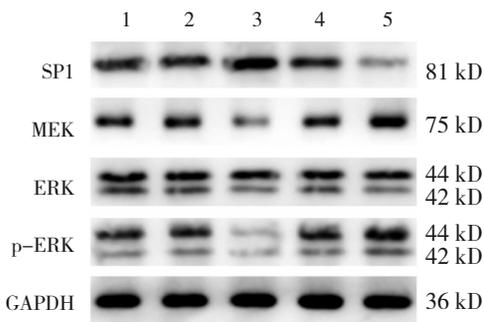


1: 对照组; 2: SONFH 模型组; 3: SONFH+黄芪多糖组; 4: SONFH+黄芪多糖 + OE-NC 组; 5: SONFH+黄芪多糖 + OE-SP1 组。

图 5 各组细胞凋亡相关蛋白条带图

表 5 各组 SP1、MEK、p-ERK 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SP1 蛋白	MEK 蛋白	p-ERK 蛋白
对照组	0.67 ± 0.07	0.52 ± 0.08	1.05 ± 0.13
OE-NC 组	0.66 ± 0.07	0.54 ± 0.08	0.98 ± 0.11
OE-SP1 组	0.90 ± 0.04	0.25 ± 0.08	0.39 ± 0.15
sh-NC 组	0.64 ± 0.11	0.56 ± 0.05	0.94 ± 0.07
sh-SP1 组	0.24 ± 0.13	0.76 ± 0.09	1.26 ± 0.06
F 值	21.070	17.830	26.360
P 值	0.000	0.000	0.000



1: 对照组; 2: OE-NC 组; 3: OE-SP1 组; 4: sh-NC 组; 5: sh-SP1 组。

图 6 各组细胞 SP1、MEK、ERK、p-ERK 蛋白条带图

3 讨论

SONFH 是慢性糖皮质激素导致的骨细胞死亡,

最常见于股骨头,但膝关节周围、腕关节和踝关节等骨骼也会受到影响^[13]。有研究显示,在糖皮质激素相关的骨坏死和骨质疏松症中,糖皮质激素能够促进骨细胞凋亡和坏死^[14]。为探究 SONFH 的具体分子机制,本研究通过在体外培养小鼠骨细胞 MLO-Y4 并且使用地塞米松进行诱导,构建 SONFH 细胞模型。

传统中药在中国、日本等亚洲国家中作为替代或补充药物被广泛用于各种疾病^[15]。黄芪多糖是从黄芪中提取的单体,也是黄芪中的活性成分之一,近年来被证明可用于治疗不同的疾病,包括骨质疏松^[16]。有研究发现黄芪多糖能够上调 TLR4/MyD88 的表达,并抑制原代人成骨细胞的凋亡^[17]。

SP1 是最早发现的与特定 DNA 序列结合的转录因子之一,在哺乳动物细胞中 SP1 能够影响多种代谢通路和参与疾病调控^[18]。有研究显示,SP1 调节的 miR-545-3p 通过靶向 LRP5 使 Wnt/ β -catenin 信号失活而发挥成骨抑制的作用^[19]。同样地,SP1 能够上调炎症反应和细胞衰老,并导致成骨细胞谱系的过早状态延迟和血管平滑肌细胞谱系的成骨转变从而导致骨质疏松^[20]。本研究结果显示,在 SONFH 中 SP1 表达升高,黄芪多糖治疗后 SP1 表达降低。进一步深入探究发现,过表达 SP1 能够逆转黄芪多糖对 SONFH 模型细胞的治疗作用,在 MLO-Y4 细胞中 SP1 能够调控 MEK/ERK 通路的磷酸化水平。

本研究在体外构建 SONFH 细胞模型,并对黄芪多糖调控骨细胞凋亡的机制进行深入研究。通过地塞米松处理 MLO-Y4 骨细胞同时联合黄芪多糖,通过相关分子生物学实验检测黄芪多糖对模型细胞活性和凋亡的影响,并且证实了黄芪多糖能够调控 SP1/MEK/ERK 轴的激活。

综上所述,黄芪多糖通过下调 SP1 激活 MEK/

ERK 通路, 促进细胞活性, 并抑制骨细胞凋亡。

参 考 文 献 :

- [1] CHEN K, LIU Y H, HE J B, et al. Steroid-induced osteonecrosis of the femoral head reveals enhanced reactive oxygen species and hyperactive osteoclasts[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(11): 1888-1900.
- [2] XU H X, WANG C Q, LIU C, et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells for treating steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10(5): 781-796.
- [3] 葛彦志, 黄培洁, 瞿杭波, 等. 基于生物信息学分析鉴定激素性股骨头坏死的关键生物标志物及相关免疫细胞浸润[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2022, 15(6): 467-474.
- [4] WANG B, GONG S, SHAO W K, et al. Comprehensive analysis of pivotal biomarkers, immune cell infiltration and therapeutic drugs for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 5971-5984.
- [5] 王子虎, 许巍, 肖楠, 等. 骨质疏松候选基因研究进展[J]. *人民军医*, 2020, 63(8): 803-806.
- [6] XU K, LU C, REN X Y, et al. Overexpression of HIF-1 α enhances the protective effect of mitophagy on steroid-induced osteocytes apoptosis[J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(11): 2123-2137.
- [7] ZHANG R, XU L M, AN X X, et al. *Astragalus polysaccharides* attenuate pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition and NF- κ B pathway activation[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(1): 331-339.
- [8] LIU J S, LIU J, LIU L, et al. The gut microbiota alteration and the key bacteria in *Astragalus polysaccharides* (APS) -improved osteoporosis[J]. *Food Res Int*, 2020, 138(Pt B): 109811.
- [9] OU L, WEI P F, LI M, et al. Inhibitory effect of *Astragalus polysaccharide* on osteoporosis in ovariectomized rats by regulating FoxO3a/Wnt signaling pathway[J]. *Acta Cir Bras*, 2019, 34(5): e201900502.
- [10] YU X, RONG P Z, SONG M S, et al. lncRNA SNHG1 induced by SP1 regulates bone remodeling and angiogenesis via sponging miR-181c-5p and modulating SFRP1/Wnt signaling pathway[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 141.
- [11] YANG M, QIAN X H, ZHAO D H, et al. Effects of *Astragalus polysaccharide* on the erythroid lineage and microarray analysis in K562 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(2): 242-250.
- [12] TAKENO A, KANAZAWA I, NOTSU M, et al. Glucose uptake inhibition decreases expressions of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteocalcin in osteocytic MLO-Y4-A2 cells[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018, 314(2): E115-E123.
- [13] CHANG C, GREENSPAN A, GERSHWIN M E. The pathogenesis, diagnosis and clinical manifestations of steroid-induced osteonecrosis[J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102460.
- [14] YAMAMOTO H, SAITO M, GOTO T, et al. Heme oxygenase-1 prevents glucocorticoid and hypoxia-induced apoptosis and necrosis of osteocyte-like cells[J]. *Med Mol Morphol*, 2019, 52(3): 173-180.
- [15] YANG L, PENG W B, ADAMS J, et al. Treating people with arthritis with traditional Chinese medicine (TCM): an examination of the perception of TCM practitioners[J]. *Acupunct Med*, 2018, 36(4): 228-239.
- [16] ZHOU Y M, ZONG Y H, LIU Z H, et al. Astragalus polysaccharides enhance the immune response to OVA antigen in BALB/c mice[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 9976079.
- [17] QIU H Q, ZHANG L Y, HE X Q, et al. Promotion of angiogenesis *in vitro* by *Astragalus polysaccharide* via activation of TLR4 signaling pathway[J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(10): e14329.
- [18] HASEGAWA Y, STRUHL K. Different SP1 binding dynamics at individual genomic loci in human cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(46): e2113579118.
- [19] LI L S, QIU X M, SUN Y, et al. SP1-stimulated miR-545-3p inhibits osteogenesis via targeting LRP5-activated Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 517(1): 103-110.
- [20] ZENG Z L, GUO R, WANG Z Y, et al. Circulating monocytes act as a common trigger for the calcification paradox of osteoporosis and carotid atherosclerosis via TGFBI-SP1 and TNFSF10-NFKB1 axis[J]. *Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 944751.

(李科 编辑)

本文引用格式: 卢敏, 许晓彤, 申楠, 等. 黄芪多糖对激素性股骨头坏死模型骨细胞凋亡和SP1/MEK/ERK轴的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(12): 33-40.

Cite this article as: LU M, XU X T, SHEN N, et al. Effect of astragalus polysaccharides on osteocyte apoptosis and SP1/MEK/ERK axis in cell models of steroid-induced osteonecrosis of femoral head[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(12): 33-40.