

芍药苷对髓核细胞增殖的影响

王新立, 刘汝银, 王西彬, 岳宗进
(河南省中医院, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 探讨芍药苷对髓核细胞增殖的影响。**方法** 分离培养 7 周龄雄性 SD 大鼠髓核细胞加入不同浓度 (0、0.5、1、2、5、8、10、15、20、25 $\mu\text{mol/L}$) 芍药苷后, MTT、BrdU 法检测细胞活力和增殖, qRT-PCR 检测 c-fos、p27 mRNA 表达, Western blot 检测 c-fos、p27 蛋白表达。**结果** 终浓度 8~20 $\mu\text{mol/L}$ 的芍药苷显著上调细胞活力和增殖 ($P<0.05$, $P<0.01$), 呈剂量依赖性。8 $\mu\text{mol/L}$ 芍药苷显著抑制 c-fos、p27 mRNA 和蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。c-fos 过表达显著阻止芍药苷对 p27 的抑制作用和对细胞增殖的促进作用 ($P<0.01$)。8 $\mu\text{mol/L}$ 芍药苷处理 24 h 后, c-fos 过表达和 p27 敲低显著促进细胞增殖 ($P<0.01$)。**结论** 8 $\mu\text{mol/L}$ 芍药苷可通过抑制 c-fos、p27 的表达来促进髓核细胞增殖。

关键词: 芍药苷; 髓核细胞; 增殖; c-fos; p27

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)07-1527-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.07.010

Effects of paeoniflorin on nucleus pulposus cell proliferation

WANG Xin-li, LIU Ru-yin, WANG Xi-bin, YUE Zong-jin
(Henan Provincial Hospital of TCM, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of paeoniflorin on nucleus pulposus cell proliferation. **METHODS** Different concentrations (0, 0.5, 1, 2, 5, 8, 10, 15, 20, 25 mol/L) of paeoniflorin were added to the nucleus pulposus cells of 7-week male SD rats, after which the detection of cell viability and proliferation were performed by MTT and BrdU, the mRNA expressions of c-fos and p27 were detected by qRT-PCR, and the protein expressions of c-fos and p27 were detected by Western blot. **RESULTS** Paeoniflorin with final concentrations ranging from 8 to 20 $\mu\text{mol/L}$ brought forth significantly up-regulated cell viability and proliferation in a dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). 8 $\mu\text{mol/L}$ Paeoniflorin significantly decreased the mRNA and protein expressions of c-fos and p27 ($P<0.05$, $P<0.01$). c-fos Overexpression markedly suppressed paeoniflorin's inhibition on p27 and promotion on cell proliferation ($P<0.01$). Resultant c-fos overexpression and p27 knockdown from 24 h exposure to 8 $\mu\text{mol/L}$ paeoniflorin produced significant cell proliferation promotion ($P<0.01$). **CONCLUSION** 8 $\mu\text{mol/L}$ Paeoniflorin promotes nucleus pulposus cell proliferation by inhibiting c-fos and p27 expressions.

KEY WORDS: paeoniflorin; nucleus pulposus cells; proliferation; c-fos; p27

椎间盘突出以颈肩腰腿痛为主要临床症状, 其重要原因是椎间盘的退行性变化^[1], 最关键的变化是髓核细胞减少, 从而髓核基质中主要成分含量降低^[2]。因此, 促进髓核细胞生长活力和增殖能力对防治椎间盘退变具有重要意义。

芍药苷是芍药主要有效成分, 具有抗炎、调节免疫、影响细胞增殖的作用^[3-4], 可调节多种细胞

增殖, 并能抑制髓核细胞凋亡^[5], 但对其增殖作用尚不明确。文献 [6-7] 报道, 芍药苷可抑制大脑中 c-fos 表达, 并且后者具有调节成骨细胞 p27 表达的作用, p27 (p27^{kip1}) 是细胞周期素依赖性激酶抑制因子 (CDKI) 家族成员之一, 可调控细胞周期、凋亡、增殖^[8]。因此, 本实验探讨芍药苷对髓核细胞增殖的影响及相关作用机制。

1 材料

胎牛血清和 DMEM/F12 购自美国 HyClone 公司；反转录试剂盒、XhoI、EcoRI、Turbofect 购自美国赛默飞世尔科技公司；BCA 试剂盒购自美国 Pierce 公司；pcDNA3.1、SYBR Green I Premix 购自大连宝生物工程有限公司；BrdU ELISA 试剂盒购自上海麦约尔公司；c-fos、p27、II 型胶原、Aggrecan、GAPDH 兔抗购自美国 CST 公司；山羊抗兔二抗购自北京博奥森生物技术有限公司；MTT 购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

2 方法

2.1 细胞分离培养 1% 戊巴比妥钠麻醉 7 周龄雄性 SD 大鼠（体质量 220~250 g），无菌条件下切除全部脊柱，收集大鼠腰椎间盘，切开外层纤维环，将胶冻状髓核完整取出，磷酸盐缓冲液冲洗 3 次，将分离组织用胶原蛋白酶处理 3 h 后，DMEM/F12（含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素、链霉素）于 37 ℃、5% CO₂ 下培养 1 周，细胞贴壁生长，倒置相差显微镜下用细胞刮刀刮除长梭形纤维细胞，待圆形或短梭形髓核细胞长成单一克隆体时，0.25% 胰酶消化且接种于新培养瓶继续培养。细胞达 90% 融合后传代，用第三代细胞进行实验。

2.2 细胞 II 型胶原、Aggrecan 免疫组织化学染色鉴定 第 3 代髓核细胞爬片，室温下多聚甲醛固定，40 min 后 0.3% TritonX-100 孵育 25 min，含 3% H₂O₂ 的甲醇室温下作用 20 min 后滴加山羊血清，室温下反应 25 min。去除血清，分别滴加 II 型胶原多抗（1：80）和 Aggrecan 单抗（1：200），湿盒 4 ℃ 下过夜，PBS 洗净滴加辣根过氧化物酶标记的二抗，室温下孵育 25 min，PBS 冲洗，DAB 显色 10 min 后用 PBS 冲洗，苏木精复染，冲洗，脱水封片。显微镜下随机检测 10 个视野（×200），每个视野检测 20 个细胞，总共 200 个，分别计数 II 型胶原和 Aggrecan 免疫组织化学染色阳性细胞数，计算该细胞百分比，即髓核细胞纯度。

2.3 细胞生长活力测定 将髓核细胞（1×10⁵/孔）接种于 96 孔板，不同浓度（0、0.5、1、2、5、8、10、15、20、25 μmol/L）芍药苷处理，于 5% CO₂，37 ℃ 下培养 24 h 后，每孔加入 20 μL MTT（5 mg/mL）培养 5 h。去掉培养基，每孔加入 150 μL 二甲基亚砷，溶解蓝紫色结晶甲瓚，酶标仪测定 490 nm 处光密度，重复 3 次，取平均值。

2.4 BrdU 检测 通过 BrdU ELISA 试剂盒检测细胞增殖情况，按照说明书进行操作，酶标仪检测

370 nm 处光密度以反映细胞增殖变化。每组 3 个复孔，重复 3 次，取平均值。

2.5 qRT-PCR 检测 Trizol 试剂裂解细胞提取总 RNA 并作为模板，反转录试剂盒合成 cDNA，进行 qRT-PCR 反应，GAPDH 为内参，反应条件为预变性 94 ℃ 5 min，94 ℃ 20 s，58 ℃（c-fos）或 60 ℃（p27）25 s，共 40 个循环，延伸 72 ℃ 10 min。反应体系 20 μL，含 10 μL SYBR Premix Ex Taq II，c-fos 正向 5'-GTGGTGAAGGCCGTATCGAGTTT-3'，反向 5'-GTGTGATGCCAGAAGCAGATCCA-3'；p27 正向 5'-ATCCGTCGGACAGCCAGAC-3'，反向 5'-CAGAACCGGCATTTGGG-3'。2^{-ΔΔCt} 法计算基因相对表达量，重复 3 次，取平均值。

2.6 Western blot 检测 裂解细胞收集总蛋白，BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。将 25 μg 蛋白加到聚丙烯酰胺凝胶电泳中进行电泳，将凝胶上蛋白通过点转移转移到硝酸纤维素膜上，5% 脱脂奶粉溶液室温封闭膜 2 h，加入 c-fos 兔单抗（1：500）、p27 兔单抗（1：500）、GAPDH 兔单抗（1：1 000），4 ℃ 下孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗（1：1 000）室温下孵育 2.5 h，洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的二抗，室温下孵育 1 h，暗室曝光观察结果。GAPDH 为内参对照蛋白，重复 3 次，取平均值。

2.7 重组载体构建 Trizol 法提取细胞总 RNA，将其反转录成 cDNA，以其为模板，利用 PCR 方法扩增 c-fos（GenBank accession no: XM_234422）全长且具有 Xho 和 EcoRI 酶切位点。反应条件为 94 ℃ 6 min，94 ℃ 25 s，56 ℃ 50 s，72 ℃ 1 min，共 35 个循环，72 ℃ 10 min。XhoI 和 EcoRI 双酶切 c-fos 全长 DNA 和 pcDNA. 3.1 质粒，并且将产物连接，转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中，挑选阳性克隆 37 ℃ 增殖重组质粒，提取质粒，测序，将正确的重组质粒命名为 pcDNA. 3.1-c-fos。

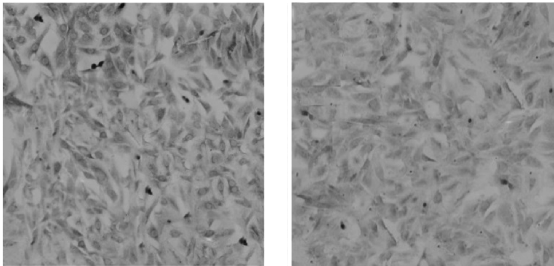
2.8 细胞转染 将髓核细胞接种于 6 孔板中，37 ℃、5% CO₂ 下培养 24 h，参照 Turbofect 操作说明进行细胞转染，将 pcDNA. 3.1-c-fos（6 μg）、pcDNA. 3.1（6 μg）、p27 siRNA（5'-GCCAGCGCAAGUGGAAUUUCGAUUU-3'，6 μg）、non-specific siRNA（6 μg）分别与 6 μL Turbofect 混合后加入各孔中，5% CO₂ 条件下转染 24 h。然后，通过 qRT-PCR、Western blot 检测转染效率。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，2 组间比较采用 *t* 检验，多

组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

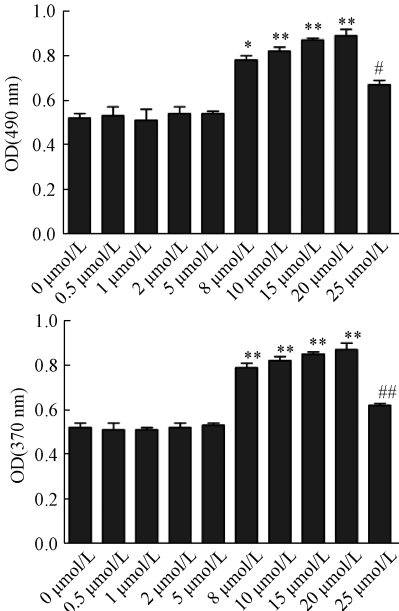
3 结果

3.1 髓核细胞鉴定 图 1 显示, 细胞中呈现大量阳性表达, 胞浆染成棕黄色, 符合髓核特征, II 型胶原、Aggrecan 的免疫组化染色阳性细胞比例分别为 97%、96%。



A. 第3代髓核细胞 II 型胶原染色 B. 第3代髓核细胞Aggrecan染色
图 1 II 型胶原和 Aggrecan 免疫组化染色 (×100)
Fig.1 Immunohistochemistry staining of type II collagen and Aggrecan (×100)

3.2 芍药苷对髓核细胞增殖的促进作用 图 2 显示, 芍药苷终浓度 8 μmol/L 时, 细胞活力和增殖显著上调 ($P<0.05$, $P<0.01$), 但在 25 μmol/L 时两者反而有所下降。

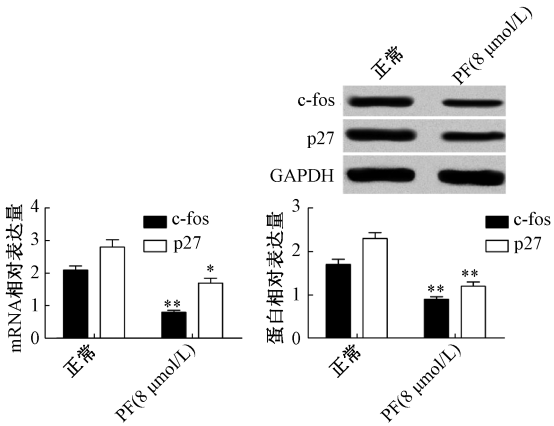


注: 与 0 μmol/L 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 20 μmol/L 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图 2 不同浓度芍药苷对细胞活力和增殖的影响
Fig.2 Effects of different concentrations of paeoniflorin on cell viability and proliferation

3.3 芍药苷对 c-fos 和 p27 表达的抑制作用 图 3 显示, 8 μmol/L 芍药苷作用于细胞 24 h 后, c-fos、

p27 mRNA、蛋白表达显著下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。



注: PF 为芍药苷。与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$
图 3 芍药苷对 c-fos、p27 表达的影响
Fig.3 Effects of paeoniflorin on c-fos and p27 expressions

3.4 芍药苷对 p27 表达的调节作用 图 4 显示, 与 pcDNA. 3.1 组比较, pcDNA. 3.1-c-fos 组 c-fos mRNA、蛋白表达显著上调 ($P<0.01$), 表明 c-fos 过表达成功, 同时 p27 mRNA、蛋白表达也显著上调 ($P<0.01$)。另外, 8 μmol/L 芍药苷处理 c-fos 过表达细胞 24 h 后, 可显著抑制芍药苷对细胞增殖的促进作用。

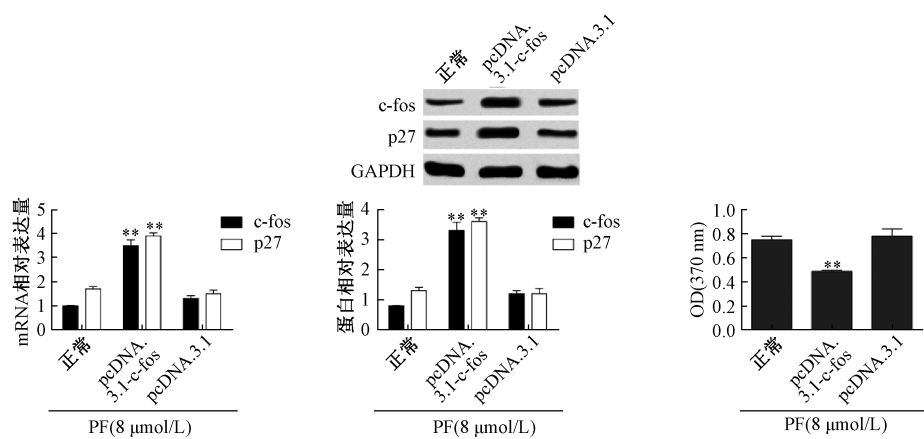
3.5 芍药苷对细胞增殖的促进作用 图 5 显示, 与 c-fos-non spe 组比较, p27 mRNA、蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。同时, 8 μmol/L 芍药苷孵育 c-fos 过表达和抑制 p27 的髓核细胞 24 h 后, 细胞增殖显著高于 c-fos-non spe 组 ($P<0.01$)。

4 讨论

椎间盘突出发生率呈上升趋势, 退变后椎间盘髓核细胞数量减少, 其分泌的 Aggrecan 和 II 型胶原也随之降低, 导致椎间盘功能减弱, 从而发生形态学变化, 引发腰腿痛。临床上手术治疗只能缓解病痛, 无法从根本上根治椎间盘退变^[9-10]。

芍药苷是从芍药干燥根中提取出的有效成分, 具有抗肿瘤、保护神经细胞等作用^[11-16], 也可促进椎间盘纤维环细胞增殖^[17], 促进骨髓间充质干细胞由 G0/G1 期进入 S 期来促进其增殖^[18], 但目前还没有关于其对髓核细胞增殖影响的研究。本实验分离培养大鼠腰椎间盘髓核细胞, 以不同浓度芍药苷处理 24 h, 发现该成分终浓度在 8~20 μmol/L 时, 细胞活力和增殖均显著上调, 呈现剂量依赖性, 但在 25 μmol/L 时反而有所下降, 故以 8 μmol/L 芍药苷处理 24 h 的髓核细胞为模型进行后续研究。

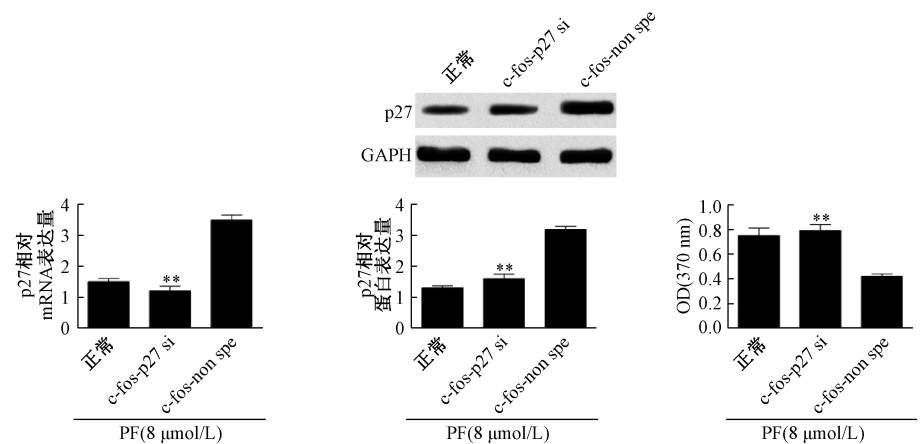
文献 [6] 报道, 芍药苷可抑制大脑中 c-fos



注：PF 为芍药苷。与 pcDNA. 3.1 组比较，** $P<0.01$

图 4 c-fos 过表达 对 p27 表达、细胞增殖的影响

Fig. 4 Effects of c-fos overexpression on p27 expression and cell proliferation



注：PF 为芍药苷。与 c-fos-non spe 组比较，** $P<0.01$

图 5 c-fos 过表达和 p27 敲低对细胞增殖的影响

Fig. 5 Effects of c-fos overexpression and p27 knockdown on cell proliferation

表达，该基因是即刻早期基因，调控多种细胞增殖能力，Long 等^[19]发现 MicroRNA-101 通过抑制 c-fos 来抑制膀胱癌细胞和骨肉瘤的增殖和侵袭；该基因表达量下调可抑制血管平滑肌细胞的增殖^[20]；然而 Mikula 等^[21]研究表明其过表达可抑制肝癌细胞增殖能力，可见它对不同细胞增殖能力的调控作用有所差异；本实验发现，8 μmol/L 芍药苷处理 24 h 后髓核细胞 c-fos 表达明显降低，而且 c-fos 过表达可明显抑制髓核细胞增殖能力。研究表明，c-fos 具有调节成骨细胞 p27 表达的作用^[7]，它通过多种方式参与细胞周期调控，抑制细胞分裂和增殖，如乳腺癌细胞、Neuro-2a 细胞、胃癌细胞等^[22-23]，Qiu 等^[24]发现其表达降低可有效促进肺腺癌细胞增殖；本实验发现，8 μmol/L 芍药苷处理髓核细胞 24 h 后，p27 表达显著降低，而且 c-fos 过表达可有效抑制芍药苷对其表达的下调作用。另外，在

c-fos 过表达和芍药苷处理的髓核细胞中减弱 p27 表达时，可显著促进髓核细胞增殖，表明芍药苷通过调节 c-fos 表达量来调控 p27 表达，进而调控髓核细胞的增殖能力。

综上所述，芍药苷可促进髓核细胞增殖，呈现剂量依赖性，而且能抑制 c-fos、p27 表达，并通过 c-fos 调控 p27，进而促进髓核细胞增殖。

参考文献：

[1] Tschugg A, Diepers M, Simone S, *et al.* A prospective randomized multicenter phase I/II clinical trial to evaluate safety and efficacy of NOVOCART disk plus autologous disk chondrocyte transplantation in the treatment of nucleotomized and degenerative lumbar disks to avoid secondary disease: safety results of Phase I-a short report[J]. *Neurosurg Rev*, 2017, 40 (1): 155-162.

[2] Torkki M, Majuri M L, Wolff H, *et al.* Osteoclast activators are

- elevated in intervertebral disks with Modic changes among patients operated for herniated nucleus pulposus[J]. *Eur Spine J*, 2016, 25(1): 207-216.
- [3] Tao Y E, Wen Z, Song Y, *et al.* Paeoniflorin attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic pathways[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(1): 263-268.
- [4] Zheng Y B, Xiao G C, Tong S L, *et al.* Paeoniflorin inhibits human gastric carcinoma cell proliferation through up-regulation of microRNA-124 and suppression of PI3K/Akt and STAT3 signaling[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(23): 7197-7207.
- [5] Shi L, Teng H, Zhu M, *et al.* Paeoniflorin inhibits nucleus pulposus cell apoptosis by regulating the expression of Bcl-2 family proteins and caspase-9 in a rabbit model of intervertebral disc degeneration[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(1): 257-262.
- [6] Yin D, Liu Y Y, Wang T X, *et al.* Paeoniflorin exerts analgesic and hypnotic effects via adenosine A1 receptors in a mouse neuropathic pain model[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2016, 233(2): 281-293.
- [7] Sunter A, Thomas D P, Yeudall W A, *et al.* Accelerated cell cycle progression in osteoblasts overexpressing the c-fos proto-oncogene; induction of cyclin A and enhanced CDK2 activity [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(11): 9882-9891.
- [8] Fernandez S, Risolino M, Mandia N, *et al.* miR-340 inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis by targeting multiple negative regulators of p27 in non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2015, 34(25): 3240-3250.
- [9] Zhu Y, Liu J T, Yang L Y, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase inhibition modulates nucleus pulposus cell apoptosis in spontaneous resorption of herniated intervertebral discs; An experimental study in rats[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(5): 4001-4006.
- [10] Deng Y, Tan X T, Wu Q, *et al.* Correlations between COL2A and aggrecan genetic polymorphisms and the risk and clinicopathological features of intervertebral disc degeneration in a Chinese Han population; a case-control study[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2017, 21(2): 108-115.
- [11] 蔡江晖, 饶梦琳, 唐 蜜, 等. 芍药苷激活 2 型大麻素受体保护脑缺血再灌注大鼠海马神经元[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(4): 443-447.
- [12] Wang Z, Yu G, Liu Z, *et al.* Paeoniflorin inhibits glioblastoma growth *in vivo* and *in vitro*; a role for the Triad3A-dependent ubiquitin proteasome pathway in TLR4 degradation[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 887-897.
- [13] Wei Y, Zhou X, Ren L, *et al.* The prolactin-release inhibitor paeoniflorin suppresses proliferation and induces apoptosis in prolactinoma cells via the mitochondria-dependent pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 5704-5714.
- [14] Zhang J, Wang F, Wang H, *et al.* Paeoniflorin inhibits proliferation of endometrial cancer cells via activating MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 5445-5451.
- [15] Li W, Zhi W, Liu F, *et al.* Paeoniflorin inhibits VSMCs proliferation and migration by arresting cell cycle and activating HO-1 through MAPKs and NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 103-111.
- [16] Li Y, Gong L, Qi R, *et al.* Paeoniflorin suppresses pancreatic cancer cell growth by upregulating HTRA3 expression[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 2481-2491.
- [17] 陈少清, 林建平, 王诗忠, 等. 芍药苷促椎间盘纤维环细胞增殖的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 254-258.
- [18] 晁二涛, 白 海, 王存邦, 等. 芍药苷对骨髓间充质干细胞增殖的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(1): 101-107.
- [19] Long Y, Wu Z, Yang X, *et al.* MicroRNA-101 inhibits the proliferation and invasion of bladder cancer cells via targeting c-FOS[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2651-2656.
- [20] Zhang Y H, Fang L H, Ku B S. Fangchinoline inhibits rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation and cell cycle progression through inhibition of ERK1/2 activation and c-fos expression[J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(9): 1853-1860.
- [21] Mikula M, Gotzmann J, Fischer A N, *et al.* The proto-oncoprotein c-Fos negatively regulates hepatocellular tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2003, 22(43): 6725-6738.
- [22] Li Y, Huang J, Zeng B, *et al.* PSMD2 regulates breast cancer cell proliferation and cell cycle progression by modulating p21 and p27 proteasomal degradation[J]. *Cancer Lett*, 2018, 430: 109-122.
- [23] Wesley U V, Hatcher J F, Dempsey R J. Sphingomyelin synthase 1 regulates Neuro-2a cell proliferation and cell cycle progression through modulation of p27 expression and Akt signaling[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(3): 1530-1541.
- [24] Qiu M, Xu Y, Wang J, *et al.* A novel lncRNA, LUADT1, promotes lung adenocarcinoma proliferation via the epigenetic suppression of p27[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1858.