

黑骨藤抑制破骨细胞分化及骨吸收能力的活性部位研究

甄茹^{1,2}, 俸婷婷^{1,2}, 赵致^{1,3}, 陈琳^{1,2}, 赵程成^{1,2}, 周英^{1,2*}

(1. 贵州大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省中药民族药创制工程中心, 贵阳 550025;
3. 贵州省药用植物繁育与种植重点实验室, 贵阳 550025)

[摘要] **目的:**探究黑骨藤对破骨细胞分化的影响并确定其活性部位。**方法:**采用维生素 D₃(VD₃)诱导兔骨髓细胞法获得破骨细胞,以形态学观察、苏木素和伊红(HE)染色、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色鉴定破骨细胞,然后通过测定黑骨藤各极性部位低、中、高剂量组(1,10,100 mg·L⁻¹)对破骨细胞 TRAP 酶活力,TRAP⁺细胞计数及骨吸收陷窝面积的影响来确定活性部位。**结果:**黑骨藤水饱和和正丁醇层的高剂量组及乙酸乙酯层的中、高剂量组均对骨髓细胞向破骨细胞分化具有显著的抑制作用($P < 0.01$),并具有剂量依赖性。在抑制破骨细胞骨吸收能力实验中,黑骨藤乙酸乙酯层各剂量组均有显著抑制骨吸收陷窝面积的作用($P < 0.01$),而正丁醇层中、高剂量组具有显著抑制作用($P < 0.01$),均呈剂量依赖性。**结论:**黑骨藤抑制骨髓细胞向破骨细胞分化及骨吸收能力的主要活性部位是乙酸乙酯部位。

[关键词] 黑骨藤; 破骨细胞; 活性部位; 骨吸收; 乙酸乙酯层

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0112-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015010112

Research on Active Fraction of *Periploca forrestii* Inhibiting Osteoclast Differentiation and Bone Resorption Ability

ZHEN Ru^{1,2}, FENG Ting-ting^{1,2}, ZHAO Zhi^{1,3}, CHEN Lin^{1,2}, ZHAO Cheng-cheng^{1,2}, ZHOU Ying^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Engineering Center for Innovative Traditional Chinese Medicine (TCM) and Ethnic Medicine, Guiyang 550025, China; 3. Guizhou Engineering Laboratory of Propagation and Cultivation on TCM Materials, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of *Periploca forrestii* against osteoclast differentiation and determine its active fraction. **Method:** The three indicators-morphological observation, hematoxylin and eosin (HE) staining, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining were used to identify osteoclasts which was obtained by vitamin D₃ (VD₃) inducing rabbit bone marrow cells. The active fraction was determined, the inhibitory effects of each polarity of *P. forrestii* with different doses-low, medium and high dose groups (1, 10, 100 mg·L⁻¹) on the TRAP enzyme activity of osteoclasts, TRAP⁺ cells and bone resorption whirlpool area were measured. **Result:** In addition to the high-dose of water-saturated n-butanol layer, high-dose group as well as middle-dose of ethyl acetate layer also had significant inhibition on marrow cells differentiating into osteoclasts with dose-dependent manner ($P < 0.01$). The measuring result of the bone resorption ability of osteoclast, showed that ethyl acetate layer inhibited bone resorption whirlpool area dose-dependently ($P < 0.01$), while the high-dose group of n-butanol layer also had apparent effects ($P < 0.01$). **Conclusion:** Ethyl acetate fraction is the most active part of *P. forrestii* to suppress differentiation of bone marrow cells into osteoclast and bone resorption capacity.

[Key words] *Periploca forrestii*; osteoclasts; active fraction; bone resorption; ethyl acetate layer

[收稿日期] 20140610(016)

[基金项目] 贵州省高校工程技术研究中心建设项目“贵州省中药民族药创制工程中心”(黔教合 KY 字[2012]018 号);贵阳市科技计划(筑科合社字[2012]2049 号);贵州大学研究生创新基金(研农 2013024);贵州省国际科技合作计划项目(黔科合外 G 字[2013]7009 号);贵州大学引进人才科研项目(贵大人基合字(2012)010 号);贵州省药用植物繁育与种植人才基地(黔人颁发[2013]15 号)

[第一作者] 甄茹, 硕士在读, 从事天然产物药理活性研究, Tel:18286116940, E-mail: zhenru10086@126.com

[通讯作者] *周英, 博士后, 教授, 从事天然药物的活性研究, E-mail: yingzhou71@126.com

骨质疏松(osteoporosis, OP)是骨代谢过程中骨吸收和骨形成的偶联出现失衡,使骨密度逐渐减少而引起的临床症状。破骨细胞在骨吸收过程中起着主要的作用,旧骨被吸收的进展速度和持续时间取决于破骨细胞的骨吸收活性和破骨细胞数量的多少。激素替代疗法(HTR)是治疗和预防绝经后骨质疏松的主要方法,但近期研究表明,HTR和女性患子宫内膜癌和卵巢癌风险增加有关,而传统民族药的运用相比更具安全性和实用性^[1]。

黑骨藤是贵州常用苗药,为萝藦科杠柳属植物黑龙骨的根或全株,主治风湿麻木疼痛、跌打损伤、月经不调、骨折、骨痛、各种神经性疼痛等,化学成分主要有强心苷类、三萜类、黄酮类、苯丙素类等^[2]。而同样主治骨折、跌打损伤,风湿性关节炎的接骨木已被研究证明具有治疗骨质疏松的作用,并且是通过抑制破骨细胞的数量及骨吸收功能来发挥作用^[3]。提示黑骨藤可能也具有相应的活性,并且笔者尚未发现关于黑骨藤是否对破骨细胞活性有作用的研究,因此本研究采用一系列指标检测黑骨藤各极性部位对破骨细胞活性的作用,并确定其活性部位,以期为民族药材治疗骨质疏松的后续开发提供理论依据。

1 材料

1.1 药物 黑骨藤 *Periploca forrestii*,购自贵阳济仁堂药店,由贵州大学熊源新教授鉴定为萝藦科杠柳属植物黑龙骨的茎。

1.2 动物 出生48 h内的乳兔购自贵州省畜牧研究所实验基地,清洁级,合格证号 SCXK(黔)2012-001。

1.3 试剂 无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇(批号20111127,天津富宇试剂厂), α -MEM培养基(批号1148795, Gibco公司),胎牛血清(批号131124,杭州天杭生物科技有限公司),DMSO(批号M4300), $1\alpha, 25-(OH)_2 VitD_3$ (批号083M4033V), Triton X-100(批号M2528)、甲苯胺蓝(批号BCBG4799V)及抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(批号SLBB7138),均购自美国Sigma公司;StrACP抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒(批号20130630,南京建成生物工程研究所);骨切片(兰州军区兰州总医院骨科研究所)。

1.4 仪器 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器),冷冻干燥机(北京松源华兴科技),CO₂培养箱(Thermo,美国),正置研究型荧光显微镜(Olympus,日本),倒置荧光相差显微镜(舜宇),酶标仪(Thermo,美国)。

2 方法

2.1 样品的制备 取黑骨藤药材200 g,用70%乙醇回流提取3次,每次3 h,合并提取液,减压浓缩至适量,将浓缩提取液依次用石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取,分别获得石油醚层、乙酸乙酯层、水饱和正丁醇层、水层4部分,经减压浓缩、冷冻干燥后,得到干燥样品,依次记为I, II, III, IV, 备用。

2.2 玻片和骨切片的预处理 将1.0 cm × 1.0 cm盖玻片经洗洁精浸泡过夜后,清水冲洗干净,然后浸泡铬酸洗液过夜,双蒸水冲洗干净后,用纱布擦干净,高压灭菌备用。将购得的骨切片修剪成0.5 cm × 0.5 cm大小,经PBS超声波清洗、75%乙醇浸泡、紫外灯照射处理后备用,实验前无菌操作将骨切片放入24孔培养板,加入少量 α -MEM培养基,置CO₂培养箱2 h以上,弃去旧液,接种细胞。

2.3 骨髓细胞的获得与诱导培养^[4-5] 将出生48 h以内的乳兔断颈处死,75%乙醇浸泡消毒,在无菌操作台中剥离后肢股骨和胫骨,剔出部分软组织,置于冷的PBS缓冲液中洗净。然后进一步去除软组织,将干净的骨干置于 α -MEM全培养基(含10%胎牛血清,青霉素 $1 \times 10^6 U \cdot L^{-1}$,链霉素 $1 \times 10^6 U \cdot L^{-1}$)内,将骨干纵向剖开,轻刮骨的内表面至颜色变白,然后将骨渣及培养基移入具塞玻璃试管中进行漩涡震荡,过筛(200目)后配成所需细胞悬液,按照密度 1.8×10^6 个/孔接种于24孔培养板上(根据实验需要可预先放置骨切片或盖玻片)。置于5% CO₂, 37 °C,饱和湿度条件下培养,24 h左右冲洗掉未贴壁细胞,加入含 $10^{-8} mol \cdot L^{-1}$ 的 $1\alpha, 25-(OH)_2 VitD_3$ 的新培养基进行诱导,计为Day 1,每3天更换1次培养基。

2.4 破骨细胞的鉴定 形态学观察:在培养过程中于倒置显微镜下观察细胞生长状态。HE染色:于第7天取出盖玻片,经10%甲醛固定、苏木素染色、1% HCl分化, Li₂CO₃返蓝、伊红染色、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片等过程,置于倒置显微镜下观察。TRAP染色:于第7天弃培养液, PBS轻洗玻片后用固定剂(枸橼酸+丙酮+37%甲醛)固定1 min,蒸馏水冲洗。按抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒说明书进行TRAP染色,二甲苯透明,中性树胶封片,正置显微镜下观察。

2.5 实验分组 将培养细胞分为13组,第1组为空白组(control),只加药物溶剂DMSO,体积分数为 $1 mL \cdot L^{-1}$;第2~13组分别加入1, 10, 100 mg·L⁻¹的I, II, III, IV样品。每组平行做3孔,均采用24

孔培养板。

2.6 对骨髓细胞向破骨细胞分化的影响 于第7天进行 TRAP 酶活力测定,先用 0.2% TritonX-100 裂解,取细胞裂解液 20 μL 于 TRAP 酶活力测定:酶标条中,按照抗酒石酸酸性磷酸酶 (StrACP) 测试盒说明书进行,于酶标仪上检测 530 nm 处吸光度 (A),记录数据,根据说明书上的计算公式换算成金氏单位 ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)。

TRAP 染色:同 2.4 项下步骤,然后统计整张玻片上的阳性细胞数。

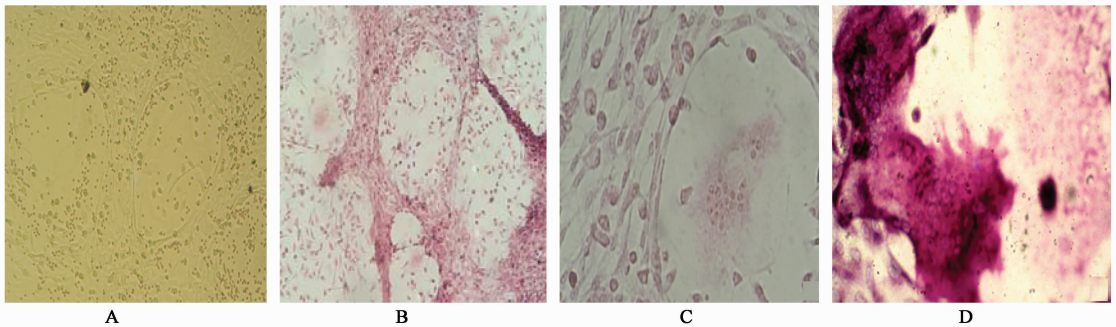
2.7 对破骨细胞骨吸收功能的影响 于第10天吸弃培养基, PBS 冲洗, 10% 甲醛固定骨切片 10 min, 然后用 0.25 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨水超声清洗 3 次, 每次 5 min, 再用不同梯度的乙醇脱水, 然后用 1% 甲苯胺蓝染色, 蒸馏水清洗, 自然晾干后正置显微镜观察,

用 Image Pro Plus 6.0 软件统计整张骨切片的骨吸收陷窝面积。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较选用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 破骨细胞的鉴定 倒置相差显微镜下观察可见破骨细胞贴壁生长, 形态不规则, 有圆形、油煎蛋形、长靴形、蝴蝶形等, 部分细胞可见有伪足, 细胞内可见多个细胞核, 胞浆内有时见大小不等的空泡。 HE 染色可见形态不规则的巨大细胞, 胞核呈浅蓝色, 多核, 呈椭圆形、油煎蛋形、狭长形等形状, 胞浆呈粉红色。 TRAP 染色可见破骨细胞胞浆内抗酒石酸酸性磷酸酶活性部位形成紫红色沉淀, 胞核染色呈阴性, 多核, 部分胞浆可见大小不一的空泡, 见图 1。



A. 活体状态观察 (100 \times); B. HE 染色 (100 \times); C. HE 染色 (400 \times); D. TRAP 染色 (400 \times)

图 1 破骨细胞的鉴定

Fig.1 Identification of osteoclast

3.2 黑骨藤各极性部位对骨髓细胞向破骨细胞分化的影响

3.2.1 各极性部位对 TRAP 酶活力的影响 黑骨藤乙酸乙酯层样品中、高剂量组对破骨细胞 TRAP 酶活力均具有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 并呈剂量依赖。此外, 水饱和正丁醇层样品的中、高剂量组对 TRAP 酶活力也有一定的抑制作用, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。其他极性部位对 TRAP 酶活力的抑制作用不明显, 因此, 黑骨藤乙酸乙酯层对破骨细胞 TRAP 酶活力的抑制作用最强。见表 1。

3.2.2 各极性部位对 TRAP 染色阳性细胞计数的影响 黑骨藤乙酸乙酯部位中、高剂量组可显著抑制 TRAP 染色呈阳性的破骨细胞数目 ($P < 0.01$), 并且在显微镜下观察可看出细胞体积较小, 细胞核数目较少, 一般 3 ~ 10 个核。水饱和正丁醇高剂量组的破骨细胞体积相比其他组也较小, 细胞数目抑制也很明显 ($P < 0.01$)。水层样品各剂量组破骨细

表 1 黑骨藤各极性部位对破骨细胞 TRAP 酶活力及 TRAP 染色阳性细胞计数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of each polar fraction on osteoclast TRAP enzyme activity and number of TARAP⁺ cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

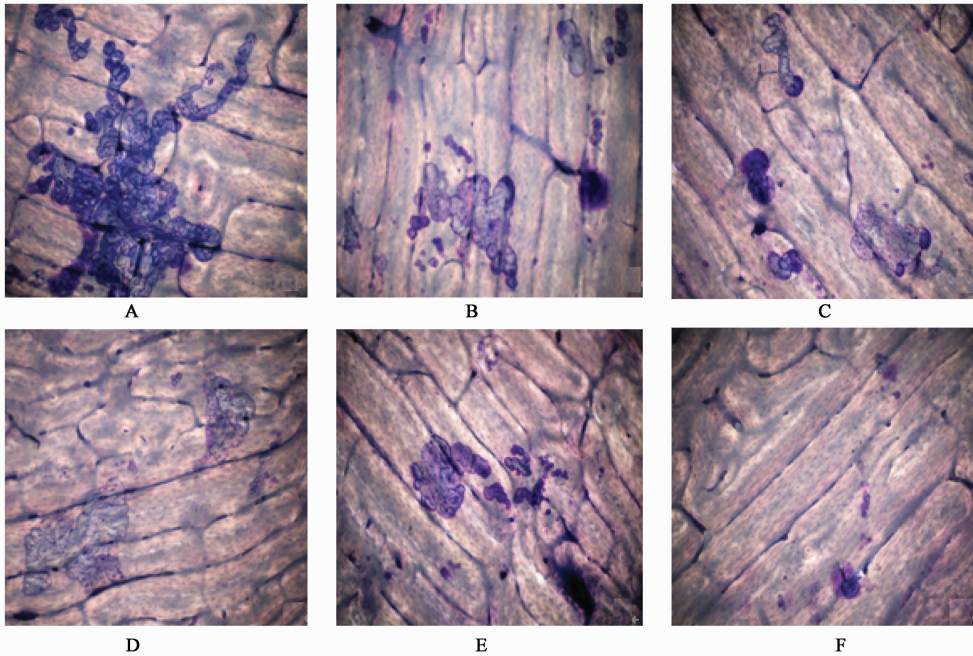
组别	剂量	TRAP 酶活力	TRAP ⁺ 细胞
	/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	
空白	-	9.53 \pm 1.2	463 \pm 24
石油醚层	1	9.64 \pm 1.50	469 \pm 19
	10	8.58 \pm 1.74	470 \pm 16
	100	4.65 \pm 0.63 ²⁾	184 \pm 27 ²⁾
乙酸乙酯层	1	8.17 \pm 0.69	456 \pm 35
	10	4.54 \pm 0.76 ²⁾	213 \pm 23 ²⁾
	100	1.71 \pm 0.13 ²⁾	18 \pm 6 ²⁾
正丁醇层	1	9.24 \pm 0.34	440 \pm 14
	10	7.90 \pm 0.57 ¹⁾	443 \pm 39
	100	2.82 \pm 0.37 ²⁾	114 \pm 27 ²⁾
水层	1	9.02 \pm 1.13	415 \pm 33 ¹⁾
	10	9.24 \pm 0.45	421 \pm 33
	100	9.80 \pm 0.62	470 \pm 11

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$ 。

胞数量较多,并且体积较大,胞核数目较多,绝大部分 20 个核以上,有些组别甚至多于空白组。黑骨藤各极性部位对 TRAP 染色阳性细胞计数影响的结果与对 TRAP 酶活力的影响结果基本一致,因此,黑骨藤抑制兔骨髓细胞向破骨细胞分化的活性部位主要是在乙酸乙酯层。见表 1。

3.3 黑骨藤活性部位对破骨细胞骨吸收功能的影响

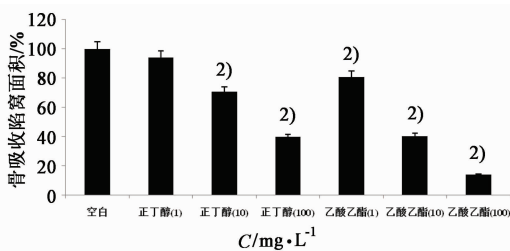
各给药组的骨吸收陷窝数量明显少于空白组,乙酸乙酯部位各剂量组对破骨细胞骨吸收陷窝数量的影响尤为显著。各给药组的骨吸收陷窝面积与空白组相比所占的百分比,结果表明黑骨藤乙酸乙酯部位各剂量组均显著抑制破骨细胞的骨吸收能力 ($P < 0.01$),正丁醇部位的中、高剂量组对破骨细胞的骨吸收能力也具有明显的抑制作用 ($P < 0.01$)。见图 2~3。



A. 空白组;B~C. 黑骨藤正丁醇部位 10,100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;D~F. 黑骨藤乙酸乙酯部位 1,10,100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 2 黑骨藤活性部位对骨吸收陷窝的影响

Fig. 2 Effects of active fraction of *Periploca forrestii* on bone resorption pits



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 3 黑骨藤的活性部位对破骨细胞骨吸收陷窝面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of active fraction of *Periploca forrestii* area of bone resorption pits ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

关于从中草药中分离具有抑制破骨细胞活性的天然成分的研究越来越受到关注,并且一些化合物的分子机制也得到了一定程度的阐释,例如丹参酮 IIA 通过下调 c-Fos 和 NFATc1 基因来抑制破骨细胞分化^[6],此外,姜黄素^[7]、黄连碱^[8]等也具有破骨

细胞形成的活性。

黑骨藤是贵州传统民族用药,具有良好的抗类风湿关节炎作用,是市售药黑骨藤追风活络胶囊的主要成分之一,有文献表明^[9],其作用机制可能与调节免疫器官功能及促炎细胞因子 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的含量水平有关。但总体关于黑骨藤药理作用及机制的研究较少,本文研究了黑骨藤各极性部位抑制破骨细胞分化及骨吸收能力的活性,结果表明,黑骨藤乙酸乙酯部位能够显著抑制破骨细胞的数目和 TRAP 酶活力,以及骨吸收能力。破骨细胞是从单核巨噬细胞分化而来,骨吸收功能是由破骨细胞数量及单个细胞降解骨基质的能力所决定的^[10]。已有学者已经从黑骨藤中分离得到黄酮类化合物山奈素、槲皮素等,苯丙素类化合物反式对羟基肉桂酸、咖啡酸等^[11],有文献表明槲皮素可抑制破骨细胞分化,在破骨细胞前体细胞中负调控 NF- κ B 和 AP-1 的转录活性^[12],咖啡酸不仅可抑制破骨

细胞的形成还可显著抑制 CTSK 基因的表达^[13],而上述活性成分可能就是使得黑骨藤乙酸乙酯部位具有较强的抑制破骨细胞形成及骨吸收能力的活性的原因,而由于乙酸乙酯和正丁醇极性相近,所含成分可能有所重合,因此正丁醇层样品也具有一定的抑制活性。但黑骨藤所含化学成分多样,具体发挥作用的成分及作用机制还有待研究。本研究确定了其活性部位,为进一步的以活性为指导而分离得到一系列化合物提供了基础,也说明黑骨藤具有研究开发应用的潜力。

破骨细胞的分化或功能的改变所导致的骨改建失衡是骨质疏松的重要病理基础,而其骨吸收功能活跃是骨质疏松发生的病理生理之一,对破骨细胞骨吸收功能的抑制是防治骨质疏松症的主要药理基础^[14]。但由于体外试验的结果与体内实际作用可能存在较大的差异,因此对于黑骨藤临床应用于骨质疏松的治疗的具体依据仍需要采用动物骨质疏松模型来进行进一步的评价。

[参考文献]

[1] Zhang Y, Li Q, Wan H Y. Study of the mechanisms by which *Sambucus williamsii* HANCE extract exert protective effects against ovariectomy-induced osteoporosis *in vivo* [J]. *Osteoporos Int*, 2011 (22): 703-709.

[2] 甘秀海,周欣,赵超,等. 黑骨藤化学成分及药理作用研究进展[J]. *广东化工*, 2012, 39(9):20-21.

[3] Xie F, Wu C F, Zhang Y, et al. Increase in bone mass and bone strength by *Sambucus williamsii* HANCE in ovariectomized rats [J]. *Biolog Pharmaceut Bull*, 2005, 28 (10):1879-1885.

[4] Wattel A, Kamel S, Mentaverri R, et al. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol *in vitro* osteoclastic bone

resorption [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65 (1):35-42.

[5] 吕享,周英,陈克明,等. 8-异戊烯基柑橘素抑制骨髓细胞向破骨细胞分化及骨吸收活性[J]. *药学报*, 2013, 48(3):347-351.

[6] Kwak H B, Yang D, Ha H, et al. Tanshinone II_A inhibits osteoclast differentiation through down-regulation of c-Fos and NFATc1 [J]. *Exp Mol Med*, 2006, 38: 256-264.

[7] Bharti A C, Takada Y, Aggarwal B B. Curcumin (Diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF- κ B ligand-induced NF- κ B activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis [J]. *J Immunol*, 2004, 172:5940-5947.

[8] Hu J P, Nishishita K, Sakai E, et al. Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppressing the NF- κ B and Akt pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 580:70-79.

[9] 黄明进,罗春丽,郭刚,等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(12):174-177.

[10] Xu Feng, Steven L Teitelbaum. Osteoclasts: New insight [J]. *Bone Res*, 2013(1):11-26.

[11] 甘秀海,周欣,陈华国,等. 黑骨藤中性部位化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34 (24): 3225-3228.

[12] Wattel A, Kamel S, Prouillet C, et al. Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via a mechanism involving NF kappa B and AP-1 [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 92(2):285-295.

[13] 唐全勇,贾志宇,赵云转,等. 咖啡酸对破骨细胞形成及组织蛋白酶 K 基因表达的抑制 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 46(16):8561-8565.

[14] 代晓霞,熊咏民,王治伦. 骨质疏松症与破骨细胞性骨吸收 [J]. *中国地方病学杂志*, 2002, 21 (1): 71-73.

[责任编辑 聂淑琴]