

# 从 ER $\alpha$ /RANK 通路探讨淫羊藿苷抑制破骨细胞分化作用

李伟娟<sup>1</sup>, 谢保平<sup>1</sup>, 石丽颖<sup>1</sup>, 李劲平<sup>1\*</sup>, 曾英<sup>2</sup>, 张杰<sup>1</sup>, 雷晓明<sup>2</sup>

(1. 中南大学药学院, 长沙 410013; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

**[摘要]** 目的:通过检测淫羊藿苷对破骨细胞诱导分化过程中雌激素受体  $\alpha$ (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ ),核转录因子- $\kappa$ B受体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B,RANK) mRNA 表达的影响,探讨淫羊藿苷抑制破骨细胞分化作用机制。方法:50  $\mu$ g $\cdot$ L<sup>-1</sup>核因子  $\kappa$ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand,RANKL)体外诱导 RAW264.7 细胞分化成破骨细胞,利用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色和骨吸收陷窝对破骨细胞进行鉴定。用不同浓度的淫羊藿苷( $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)分别处理 5 d 和 9 d 后,进行 TRAP 染色和骨吸收陷窝分析,处理 6 d 后,利用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测基质金属蛋白酶-9(MMP-9),组织蛋白酶 K(cathepsin-K,CK),TRAP,ER $\alpha$ ,RANK mRNA 表达水平,用雌激素受体阻断剂 ICI182780 阻断雌激素受体通路验证淫羊藿苷对 ER $\alpha$ /RANK 通路的调节作用。结果:与 RANKL 诱导组比较,淫羊藿苷可以显著抑制破骨细胞形成数量和骨吸收陷窝数( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),同时显著下调破骨细胞 MMP-9,CK,TRAP,RANK mRNA 表达水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),上调 ER $\alpha$  mRNA 表达水平( $P < 0.05$ )。ICI182780 可抑制淫羊藿苷上调破骨细胞的 ER $\alpha$  mRNA 表达水平和下调 RANK mRNA 表达水平的作用( $P < 0.05$ )。结论:淫羊藿苷能抑制 RANKL 诱导 RAW264.7 向破骨细胞分化和骨吸收活性,该作用可能通过上调破骨细胞的 ER $\alpha$  mRNA 表达进而下调 RANK mRNA 表达实现的。

**[关键词]** 淫羊藿苷; RAW264.7 细胞; 破骨细胞; 雌激素受体  $\alpha$ ; 核因子  $\kappa$ B 受体

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0121-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070121

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1201.034.html>

**[网络出版时间]** 2017-01-09 12:01

## Mechanism of Icaritin in Inhibiting Osteoclast Differentiation Via ER $\alpha$ /RANK Signal Pathway

LI Wei-juan<sup>1</sup>, XIE Bao-ping<sup>1</sup>, SHI Li-ying<sup>1</sup>, LI Jin-ping<sup>1\*</sup>, ZENG Ying<sup>2</sup>, ZHANG Jie<sup>1</sup>, LEI Xiao-ming<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacy Science, Central South University, Changsha 410013, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of icaritin in inhibiting the osteoclast differentiation via detecting the mRNA expression levels of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) in osteoclast induced from RAW264.7. **Method:** RAW264.7 cells were induced into osteoblasts with receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) ( $50 \mu$ g $\cdot$ L<sup>-1</sup>), and were identified by tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining and bone resorption pit formation. After RAW264.7 cells were treated with different concentrations ( $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) of icaritin for 5 days and 9 days, TRAP staining, and bone resorption pit formation analysis were conducted. After treatment for 6 days, the gene expression levels of (MMP-9), cathepsin-K (CK), TRAP, RANK and ER $\alpha$  in osteoclasts were detected by RT-PCR. ICI182780, an estrogen receptor antagonist, was used to invalidate the regulatory effect of icaritin on ER $\alpha$ /RANK pathway. **Result:** Icaritin could significantly inhibit the number of osteoclast formation and number of bone resorption pits

**[收稿日期]** 20161206(036)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81273816);中南大学研究生自主探索创新项目(2016zzts496)

**[第一作者]** 李伟娟,在读硕士,从事药理学研究,Tel:15273124061, E-mail:1083649669@qq.com

**[通讯作者]** \*李劲平,博士,副教授,硕士研究生导师,从事药理学研究,Tel:0731-82650340, E-mail:pjningli@163.com

( $P < 0.05$ ), significantly down-regulate the gene expression levels of MMP-9, CK, TRAP and RANK in the osteoclasts ( $P < 0.05$ ), and up-regulate the gene expression of ER $\alpha$ . ICI182780 could inhibit the icariin in up-regulating the gene expression level of ER $\alpha$  and down-regulating the gene expression level of RANK. **Conclusion:** Icariin could inhibit osteoclast differentiation and bone absorption function, which may be achieved via increasing ER $\alpha$  mRNA expression and decreasing RANK mRNA expression.

**[Key words]** icariin; RAW264.7; osteoclast; estrogen receptor  $\alpha$ ; receptor activator of NF- $\kappa$ B

雌激素受体(estrogen receptor, ER)是依赖配体活化转录因子的核受体家族成员之一,主要包括 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  两种形式。已有研究报道,破骨细胞(osteoclast, OC)可表达 ER,其主要形式是 ER $\alpha$ <sup>[1-2]</sup>。雌激素调节破骨细胞的分化、成熟和凋亡通过 ER 介导实现。当雌激素与 ER 结合后可调节下游靶基因的表达,进而调节靶细胞的增值和分化。核转录因子  $\kappa$ B 受体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B, RANK)在破骨细胞的分化、成熟过程中发挥必不可少的作用,CHEN 等<sup>[3]</sup>研究发现雌激素与 ER $\alpha$  结合后可上调破骨细胞中 miRNA-503 的表达,而 miRNA-503 可以直接抑制 RANK 的表达,从而抑制破骨细胞的分化和功能。由此表明雌激素可以通过 ER $\alpha$ /miRNA-503/RANK 调节途径影响破骨细胞的形成和骨吸收活性。

淫羊藿是中医临床治疗骨质疏松最常用的中药,淫羊藿苷是淫羊藿中的主要有效成分。淫羊藿苷具有类雌激素作用,很多学者已证实淫羊藿苷具有良好的抗骨质疏松作用,并可通过多途径抑制破骨细胞的形成和骨吸收活性<sup>[4-8]</sup>。淫羊藿苷能否通过调节破骨细胞中 ER $\alpha$  的表达,进而抑制 RANK 的表达来抑制破骨细胞的分化和骨吸收活性,即淫羊藿苷能否通过调节 ER $\alpha$ /RANK 通路来抑制破骨细胞的分化和骨吸收性,目前尚未见有文献报道。因此,本研究利用核转录因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)体外诱导小鼠 RAW264.7 细胞分化成破骨细胞的模型,探讨淫羊藿苷对 ER $\alpha$  和 RANK 表达的影响,从 ER $\alpha$ /RANK 通路探讨淫羊藿苷抑制破骨细胞分化和骨吸收活性的作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** RAW264.7 细胞株购自湘雅医学院细胞中心库。

**1.2 药物及试剂** 淫羊藿苷(中国科学院成都生物研究所,批号 MUST-15052801),雌激素受体阻断剂 ICI182780(美国 R&D 公司,批号 A0442A),sRANKL(美国 Peprotech 公司,批号#0715612),1%

甲苯胺蓝染色剂(美国 Solarbio 公司,批号 #G3661);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 28218),逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 00346214); $\beta$ -雌二醇、抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(美国 Sigma 公司,批号分别为 WB-0201,SLBP6455V);PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**1.3 仪器** CCL-1708-8 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(新加坡 ESCO 公司),M565 J/E/G 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司),WD-9402A 型 PCR 仪及 DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂),GPS-9160MBE 型核酸蛋白分析仪(德国 Eppendorf 公司),JY04S-3B 型凝胶成像分析系统(君意电泳有限公司),TGL-20M 型 4 度离心机(平凡仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 骨磨片制备** 用锯式切片器将新鲜牛股骨皮质部切成约 0.1 mm 厚的骨片,手工磨成 200  $\mu$ m 厚的骨片,然后修剪成 0.5 cm  $\times$  0.5 cm 大小,用双蒸水超声清洗 3 次,每次 30 min,浸泡于 75% 乙醇 4  $^{\circ}$ C 存储备用,于使用前经无菌双蒸水清洗骨片 2 次,再将骨片两面在无菌操作台上用紫外线各照射 30 min,最后用 DMEM 完全培养基浸泡骨片 3 次,每次 30 min。

**2.2 破骨细胞诱导和鉴定**<sup>[3]</sup> RAW264.7 细胞复苏,传代 2~3 次后,取生长状态良好的细胞接种于含有玻片或骨片的 12 孔细胞培养板中,每孔细胞密度为  $4 \times 10^4$  个/mL。待细胞贴壁 12 h 后,换成 DMEM 完全培养基(含有 50  $\mu$ g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 RANKL),在 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养,诱导第 3,5 天于倒置显微镜下观察细胞形态,诱导第 5 天,取出玻片进行 TRAP 染色,诱导第 9 天,取出骨片进行甲苯胺蓝染色。

**2.3 破骨细胞生成数目及骨吸收活性的测定** 实验分组为 RANKL 诱导组,雌激素组( $1 \times 10^{-6}$  mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),淫羊藿苷高、中、低剂量组( $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),每组设 5 个复孔。按上述破骨细胞诱导方法诱导 5 d 后,取出玻片,对玻片

进行 TRAP 染色,倒置显微镜下进行 TRAP 阳性多核 (TRAP<sup>+</sup>) 细胞计数。计数标准:在 100 倍倒置显微镜随机选取 5 个视野,胞浆呈紫红色且细胞核数目  $\geq 3$  的细胞计为 TRAP<sup>+</sup> 细胞,即破骨细胞。骨片分组培养方法同上,在培养第 9 天后,取出骨片,进行甲苯胺蓝染色,在 100 倍的光学显微镜下进行骨吸收陷窝计数。

**2.4 相关基因表达检测** 实验分组为 RANKL 诱导组,雌激素组 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),淫羊藿苷高、中、低剂量组 ( $1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ );为了验证淫羊藿苷对破骨细胞形成过程中 ER $\alpha$ /RANK 通路的调节作用,同时设立雌激素受体阻断剂 ICI182780 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + 雌激素组 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),雌激素受体阻断剂 ICI182780 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + 淫羊藿苷高剂量组 ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),每组设 5 个复孔。按上述破骨细胞诱导方法诱导 6 d 后,每孔用 Trizol 1 mL 抽提细胞总 RNA,利用核酸蛋白仪测定总 RNA 浓度及纯度,采用逆转录反应体系 20  $\mu\text{L}$ ,取总 RAN 2  $\mu\text{g}$  进行逆转录,逆转录后的 cDNA 放于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

各目的基因和内参  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 基因引物序列见表 1,PCR 程序参数如下,95  $^\circ\text{C}$  3 min,95  $^\circ\text{C}$  30 s,72  $^\circ\text{C}$  30 s,扩增 35 个循环,末次循环 72  $^\circ\text{C}$  5 min,4  $^\circ\text{C}$  终止。各基因的 PCR 退火温度见表 1。取等量 PCR 产物进行电泳,经凝胶成像系统进行拍照,用 Image Lab 5.0 软件进行定量分析。分别计算目的基因的 PCR 产物电泳条带灰度与  $\beta$ -actin 的 PCR 产物电泳条带灰度比值。

表 1 RT-PCR 所需要的引物序列和退火温度

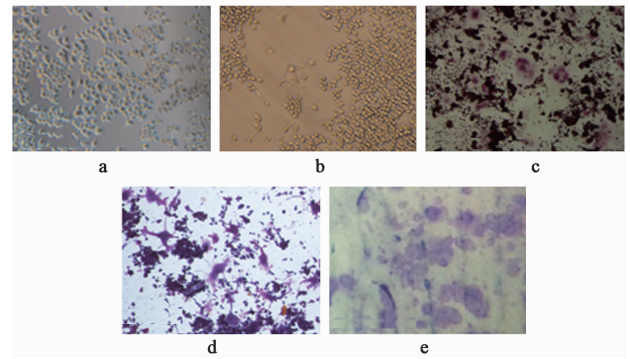
Table 1 Primer sequences of RT-PCR and annealing temperature

基因	序列 (5'-3')	产物长度/bp	退火温度/ $^\circ\text{C}$
MMP-9	上游 TGCCGTCTTATCGTAGTCAG	302	57
	下游 TGTCATCCAGTTGGTGTCC		
CK	上游 CATAGCCCACCACCAACT	305	57
	下游 GACCACTGCCTTCCAATACC		
TRAP	上游 GACCACCTTGGAATGTCTCTG	262	57
	下游 GGCTGAGGAAGTCTCTGAGTTG		
ER $\alpha$	上游 TGCCCCACTTCGTAACACTTG	311	55
	下游 TCCCGCCTTCTACAGGTCTA		
RANK	上游 GGCTGACATACACCACGATG	305	55
	下游 CTACACAGGCAGTGGAACA		
$\beta$ -actin	上游 GTCCCTCACCTCCAAAAG	298	55
	下游 GCTGCCTCAACACCTCAACCC		

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计软件对所有数据进行正态性检验和方差分析,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,方差齐用  $Q$  检验分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 破骨细胞鉴定** 未经诱导的 RAW264.7 细胞其形态在显微镜下观察多为圆形、椭圆形,有少数细胞呈现长梭形,一般有 1 或 2 个细胞核。RAW264.7 细胞经 RANKL 诱导 3 d 后,有少量细胞融合,胞内细胞核数目  $\geq 3$ 。诱导 5 d 后,细胞融合数目增多,经 TRAP 染色后,细胞胞浆呈紫红色,细胞核数目  $\geq 3$ ,细胞边缘不规则有伪足,细胞体积大,苏木素复染后,胞浆成紫红色,细胞核被染色蓝色;诱导 9 d 后,骨片采用甲苯胺蓝染色法,在光学显微镜下可以观察到骨吸收陷窝为紫色,形状为圆形、椭圆形或者腊肠形。见图 1。



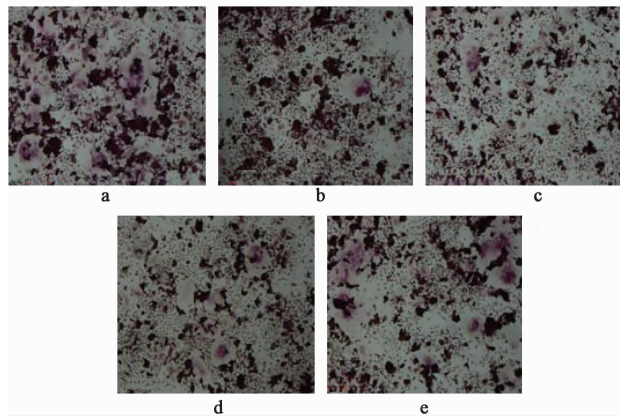
a. 未经诱导的 RAW264.7 细胞;b. RAW264.7 经 RANKL 诱导 3 d 后,出现少量细胞融合;c. RAW264.7 经 RANKL 诱导 5 d 后 TRAP 染色,TRAP<sup>+</sup> 细胞,即破骨细胞,其形态为细胞大,细胞边缘不规则,胞浆被染成紫红色,细胞核  $\geq 3$ ;d. TRAP 染色后经苏木素复染,破骨细胞的核染成蓝色,胞浆为紫红色;e. RAW264.7 经 RANKL 诱导 5 d 后,骨片甲苯胺蓝染色,骨吸收陷窝为紫色,形状为圆形、椭圆形或者腊肠形

图 1 RANKL 诱导 RAW264.7 TRAP 染色及细胞形态学观察 ( $\times 100$ )

Fig. 1 RANKL induced RAW264.7 cell with TRAP staining and morphological observation ( $\times 100$ )

**3.2 对破骨细胞的生成和骨吸收活性的影响** RAW264.7 细胞经 RANKL 诱导 5 d,TRAP 染色后,RANKL 诱导组和各用药物组均可出现边缘不规则,细胞体积大,胞浆呈紫红色,细胞核数目  $\geq 3$  的 TRAP<sup>+</sup> 细胞。与 RANKL 诱导组比较,雌激素组和不同浓度的淫羊藿苷组 TRAP<sup>+</sup> 细胞数目明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 2,表 2。诱导 9 d,骨片经甲苯胺蓝染色后,每组均可见形状不规则、被染成紫色的骨吸收陷窝,与 RANKL 诱导组比较,雌激素

组和不同浓度淫羊藿苷组的骨吸收陷窝形成数明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 3, 图 3。在  $1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度, 淫羊藿苷抑制破骨细胞的分化和骨吸收活性有剂量依赖性, 即淫羊藿苷浓度越大, 其抑制破骨细胞分化和骨吸收活性的作用越明显。



a. RANKL 诱导组; b. 雌激素组; c. 淫羊藿苷  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组; d. 淫羊藿苷  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组; e. 淫羊藿苷  $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组(图 3~5 同)。

图 2 淫羊藿苷对 RANKL 诱导的 RAW264.7 分化为破骨细胞的影响 (TRAP,  $\times 100$ )

Fig. 2 Effect of icariin on osteoclast differentiation induced by RANKL from RAW264.7 (TRAP,  $\times 100$ )

表 2 淫羊藿苷对 RANKL 诱导的 RAW264.7 分化为破骨细胞计数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of icariin on osteoclast count differentiation induced by RANKL from RAW264.7 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	破骨细胞计数/个
RANKL 诱导	-	105.20 $\pm$ 7.08
雌激素	$1 \times 10^{-6}$	54.46 $\pm$ 9.48 <sup>2)</sup>
淫羊藿苷	$1 \times 10^{-5}$	60.83 $\pm$ 6.80 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-6}$	68.80 $\pm$ 6.87 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-7}$	86.40 $\pm$ 11.26 <sup>1)</sup>

注:与 RANKL 诱导组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05, ^{2)}$  $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

表 3 淫羊藿苷对 RANKL 诱导的 RAW264.7 分化为破骨细胞的骨吸收陷窝形成数影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of icariin on bone resorption of osteoclast induced by RANKL from RAW264.7 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	骨吸收陷窝计数/个
RANKL 诱导	-	91.43 $\pm$ 6.95
雌激素	$1 \times 10^{-6}$	41.88 $\pm$ 6.46 <sup>2)</sup>
淫羊藿苷	$1 \times 10^{-5}$	53.41 $\pm$ 6.02 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-6}$	64.62 $\pm$ 6.62 <sup>2)</sup>
	$1 \times 10^{-7}$	70.22 $\pm$ 6.24 <sup>2)</sup>

3.3 对破骨细胞相关基因表达的影响 诱导 6 d 后, 与 RANKL 诱导组比较, 雌激素和不同浓度的淫

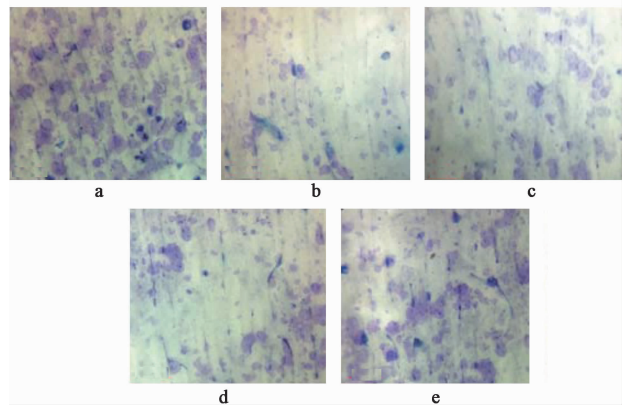


图 3 淫羊藿苷对 RANKL 诱导的 RAW264.7 分化为破骨细胞的骨吸收陷窝形成数影响 (甲苯胺蓝,  $\times 100$ )

Fig. 3 Effect of icariin on bone resorption of osteoclast induced by RANKL from RAW264.7 (toluidine blue,  $\times 100$ )

羊藿苷均可显著抑制破骨细胞中 MMP-9, CK, TRAP, RANK 的基因表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 同时显著上调 ER $\alpha$  基因表达 ( $P < 0.05$ )。见图 4, 表 4。加入雌激素受体阻断剂 ICI182780 后, 雌激素受体阻断剂 ICI182780 不仅显著抑制雌激素对 ER $\alpha$  基因表达上调 ( $P < 0.05$ ) 和雌激素对 RANK 基因表达下调的作用 ( $P < 0.05$ ), 而且显著抑制淫羊藿苷对 ER $\alpha$  基因表达上调的作用 ( $P < 0.05$ ) 和淫羊藿苷下调 RANK 基因表达作用 ( $P < 0.05$ )。见图 5, 表 5。

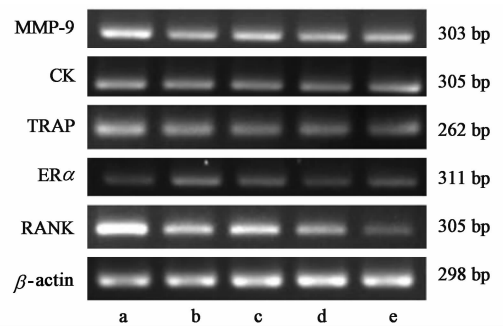


图 4 破骨细胞 MMP-9, CK, TRAP, ER $\alpha$ , RANK mRNA 表达的影响

Fig. 4 mRNA expression of MMP-9, CK, TRAP, ER $\alpha$ , RANK in osteoclasts

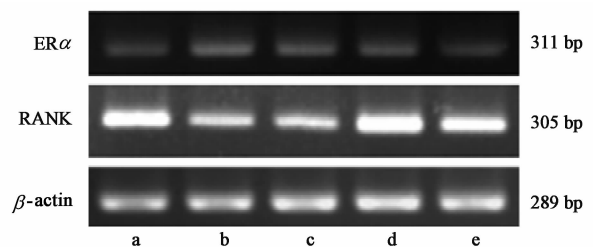


图 5 淫羊藿苷调节破骨细胞中 ER $\alpha$  和 RANK mRNA 表达的影响  
Fig. 5 ICI182780 on icariin to regulate ER $\alpha$  mRNA and RANK mRNA expression in osteoclast

表 4 淫羊藿苷对破骨细胞 MMP-9, CK, TRAP, ER $\alpha$ , RANK mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Effect of icariin on mRNA expression of MMP-9, CK, TRAP, ER $\alpha$  RANK in osteoclasts ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/mol·L <sup>-1</sup>	MMP-9/ $\beta$ -actin	CK/ $\beta$ -actin	TRAP/ $\beta$ -actin	ER $\alpha$ / $\beta$ -actin	RANK/ $\beta$ -actin
RANKL 诱导	-	2.189 1 $\pm$ 0.146 1	1.531 6 $\pm$ 0.220 6	0.980 9 $\pm$ 0.028 7	0.914 2 $\pm$ 0.088 8	2.642 7 $\pm$ 0.077 6
雌激素	1 $\times$ 10 <sup>-6</sup>	0.616 0 $\pm$ 0.078 2 <sup>2)</sup>	0.876 4 $\pm$ 0.094 8 <sup>1)</sup>	0.791 4 $\pm$ 0.045 7 <sup>2)</sup>	1.072 7 $\pm$ 0.102 5 <sup>1)</sup>	1.632 6 $\pm$ 0.037 8 <sup>1)</sup>
淫羊藿苷	1 $\times$ 10 <sup>-5</sup>	0.703 5 $\pm$ 0.043 9 <sup>2)</sup>	1.041 0 $\pm$ 0.154 8 <sup>1)</sup>	0.572 6 $\pm$ 0.019 7 <sup>1)</sup>	1.122 0 $\pm$ 0.183 9 <sup>1)</sup>	1.084 7 $\pm$ 0.108 5 <sup>2)</sup>
	1 $\times$ 10 <sup>-6</sup>	0.838 6 $\pm$ 0.132 0 <sup>2)</sup>	1.068 1 $\pm$ 0.131 7 <sup>1)</sup>	0.746 3 $\pm$ 0.049 6 <sup>1)</sup>	0.913 3 $\pm$ 0.099 6	1.831 1 $\pm$ 0.110 1 <sup>1)</sup>
	1 $\times$ 10 <sup>-7</sup>	1.033 7 $\pm$ 0.163 3 <sup>2)</sup>	1.097 4 $\pm$ 0.160 3 <sup>1)</sup>	0.759 6 $\pm$ 0.056 4 <sup>1)</sup>	1.029 2 $\pm$ 0.055 5 <sup>1)</sup>	1.918 2 $\pm$ 0.132 0 <sup>1)</sup>

表 5 ICI182780 对淫羊藿苷调节破骨细胞中 ER $\alpha$  和 RANK mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 5 Effect of ICI182780 on icariin on regulate ER $\alpha$  and RANK mRNA expression in osteoclast ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/mol·L <sup>-1</sup>		基因表达	
	药物	ICI182780	ER $\alpha$ / $\beta$ -actin	RANK/ $\beta$ -actin
RANKL 诱导	-	-	1.137 2 $\pm$ 0.200 5	1.345 6 $\pm$ 0.153 3
雌激素	1 $\times$ 10 <sup>-6</sup>	-	1.498 0 $\pm$ 0.218 7 <sup>1)</sup>	1.026 5 $\pm$ 0.172 7 <sup>1)</sup>
雌激素 + ICI182780	1 $\times$ 10 <sup>-5</sup>	1 $\times$ 10 <sup>-6</sup>	1.447 0 $\pm$ 0.212 6 <sup>2)</sup>	0.927 5 $\pm$ 0.155 5 <sup>2)</sup>
淫羊藿苷	1 $\times$ 10 <sup>-6</sup>	-	1.197 4 $\pm$ 0.181 2 <sup>1)</sup>	1.196 9 $\pm$ 0.106 4 <sup>1)</sup>
淫羊藿苷 + ICI182780	1 $\times$ 10 <sup>-6</sup>	1 $\times$ 10 <sup>-6</sup>	1.073 4 $\pm$ 0.228 8 <sup>2)</sup>	1.493 5 $\pm$ 0.249 9 <sup>2)</sup>

注:与 RANKL 诱导组比较<sup>1)</sup>P < 0.05;与相应药物组比较<sup>2)</sup>P < 0.05。

#### 4 讨论

OC 是骨组织中唯一的骨吸收细胞<sup>[9]</sup>,在骨代谢平衡中发挥很重要的作用,其溶骨活性相对增强,会导致骨吸收大于骨形成最终导致骨质疏松的发生。减少 OC 的生成和降低 OC 的溶骨活性是治疗骨质疏松症的重要策略。

OC 的分化及其活性受骨微环境中多种激素和细胞因子的调节。RANK/RANKL 系统是 OC 生成必不可少的信号传导通路<sup>[10]</sup>,成为治疗绝经后骨质疏松症的关键靶点。RANK 是一种表达在 OC 前体细胞及 OC 表面上的 I 型跨膜受体蛋白,是目前 RANKL 的唯一已知受体。当 RANKL 与 RANK 结合后,可以激活下游多条信号通路(如 NF- $\kappa$ B, MAPK 和磷脂酰肌醇等信号通路),进而促进 OC 的分化、成熟、活化和阻止 OC 凋亡<sup>[11-12]</sup>。

ER 是目前治疗绝经后骨质疏松疾病关键靶点之一<sup>[13]</sup>。目前发现 ER 主要有 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  2 种亚型,其中 ER $\alpha$  在抗骨质疏松疾病中研究比较多。雌激素和拟雌激素药物可直接通过 ER $\alpha$  的介导,调控下游多种信号分子的表达进而调节 OC 的分化和骨吸收活性<sup>[14]</sup>。本实验室研究发现去卵巢骨质疏松大鼠雌激素水平和 ER mRNA 表达会显著下降<sup>[15-16]</sup>,与绝经后骨质疏松妇女其体内雌激素水平和 ER 表达显著下降现象一致<sup>[17]</sup>,雌激素治疗和拟

雌激素药物治疗可以逆转这一变化。护骨素(osteoprotegerin, OPG)/RANKL/RANK 系统是 E<sub>2</sub>/ER 通路的下游信号转导通路之一,雌激素可通过 ER $\alpha$  上调 OPG 表达,从而调节 OPG/RANKL/RANK 系统来抑制破骨细胞的生成和骨吸收活性<sup>[18]</sup>,而雌激素替代治疗同样降低去卵巢大鼠的 RANK 表达,发挥抗骨质疏松作用。那么雌激素与雌激素受体结合后是怎样调控 RANK 表达的呢? CHEN 等<sup>[3]</sup>人研究发现雌激素与雌激素受体结合后可通过上调破骨细胞细胞中 miRNA-503 的表达,miRNA-503 可直接抑制 RANK 的表达,从而抑制 OC 的分化和骨吸收活性。

本实验利用 RANKL 体外诱导小鼠 RAW264.7 细胞向 OC 分化的模型,初步探讨淫羊藿苷是否通过调节 ER $\alpha$ /RANK 通路来抑制 OC 的分化及其骨吸收活性。结果表明不同浓度的淫羊藿苷可以显著抑制破骨细胞的形成数和骨吸收陷窝数,并抑制 OC 的 MMP-9,CK 等基因表达,与其他研究者的结果一致<sup>[7]</sup>。同时,本研究结果表明淫羊藿苷可促进 OC 的 ER $\alpha$  mRNA 表达,降低 OC 的 RANK mRNA 表达。ER $\alpha$  作为核转录因子,可以调节包括 RANK 在内的许多信号分子的表达,那么,淫羊藿苷调节 RANK 的基因表达是否通过 ER $\alpha$  途径呢? 本研究应用雌激素受体阻断剂 ICI182780 阻断 ER $\alpha$  信号通路,

检测淫羊藿苷对 RANK 基因表达的影响。结果表明 ER $\alpha$  被 ICI182780 阻断后, RANK 的表达显著升高, ICI182780 阻断 ER $\alpha$  后既显著抑制雌激素降低 RANK 基因表达作用, 也显著抑制淫羊藿苷降低 RANK 基因表达作用。

从上述结果分析可知, 淫羊藿苷能显著抑制 RANKL 诱导 RAW264.7 分化成 OC, 这种抑制作用可通过升高 ER $\alpha$  表达而直接或间接降低 RAW264.7 和 OC 细胞的 RANK 表达, 进而降低 RANKL/RANK 信号水平, 最终降低 OC 形成数量和 OC 骨吸收活性。因此本实验从基因水平上阐明通过提高破骨细胞 ER $\alpha$  的表达, 降低 RANK 表达的作用是淫羊藿苷抑制破骨细胞分化和骨吸收功能的机制之一。但对于淫羊藿苷对 ER $\alpha$ /RANK 通路的作用细节, 以及淫羊藿苷是否通过其他信号通路影响 RANK 表达, 有待进一步研究。

[参考文献]

[1] GUO Z, Krucken J, Benten W P, et al. Estradiol-induced no genomic calcium signaling regulates geotropic signaling in macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2002, 227(9): 7044-7050.

[2] Garcia P V, Robinson L J, Borysenko C W, et al. Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 cells by estrogen and phytoestrogens [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(14): 13720-13727.

[3] CHEN C, CHENG P, XIE H, et al. MiR-503 Regulates osteoclastogenesis via targeting RANK [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(2): 338-347.

[4] 刘玉萍, 丁学芳, 黄萌萌, 等. 淫羊藿苷在不同骨质疏松大鼠模型中肠道吸收代谢研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(13): 2532-2537.

[5] CHEN K M, GE B F, LIU X Y, et al. Icarin inhibits the osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor in mouse bone marrow culture [J]. *Pharmazie*, 2007, 62(5): 388-391.

[6] Tsai P H, Shioh Y S, Jui S S. et al. Icarin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF- $\kappa$ B regulated HIF-1 and PGE2 synthesis [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(2/3): 176-185.

[7] 吕明波, 陈克明, 葛宝丰. 淫羊藿苷对小鼠破骨细胞

MMP-9, CK mRNA 表达的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(8): 896-899.

[8] WEI Z S, WANG M X, HONG M F, et al. Icarin exerts estrogen-like activity in ameliorating EAE via mediating estrogen receptor  $\beta$ , modulating HPA function and glucocorticoid receptor expression [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(4): 1910-1918.

[9] Steven L. Bone resorption by osteoclasts [J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1504-1507.

[10] Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. Osteoclast differentiation and activation [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 337-342.

[11] CHEN X W, LIU W T, WANG Y X, et al. Cyclopropanyldehydrocostunolide LJ attenuates high glucose-induced podocyte injury by suppressing RANKL/RANK-mediated NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways [J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(5): 760-769.

[12] Duran A, Serrano M, Leitges M, et al. The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(2): 303-309.

[13] Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts [J]. *Cell*, 2007, 130(5): 811-823.

[14] Lanyon L, Armstrong V, Ong D, et al. Is estrogen receptor alpha key to controlling bones' resistance to fracture? [J]. *J Endocrinol*, 2004, 182(2): 183-191.

[15] 杨琳, 曾英, 李劲平, 等. 补骨脂素对去势雌鼠 E $_2$ 、ER $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17 的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(4): 387-392.

[16] 刘珊, 李劲平, 杨琳, 等. 淫羊藿苷对去势大鼠 ER $\beta$  基因表达及血清 E $_2$  水平的影响 [J]. *湖南中医杂志*, 2016, 32(1): 150-152.

[17] 唐宏宇, 董路珏, 霍少川, 等. 组蛋白去甲基化酶 JMJD2 和雌激素受体相关受体  $\alpha$  在绝经后骨质疏松症的表达 [J]. *中国工程组织研究*, 2016, 20(2): 167-172.

[18] Saika M, Inoue D, Kido S, et al. 17 Beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(6): 2205-2212.

[责任编辑 周冰冰]