

基于分子对接探究知母皂苷BⅡ对破骨细胞 分化过程中的影响

冯萌, 党院霞, 刘芬, 邢菊玲, 莫紫欣, 罗瑞娇, 周欣欣*
(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探究知母皂苷BⅡ(TBⅡ)对破骨细胞分化过程中核转录因子- κ B受体活化因子配基(RANKL), RANK, 原癌基因(C-FOS)基因表达量的影响。方法:利用分子对接软件LeDock对TBⅡ分别与RANKL, RANK和C-FOS进行分子对接打分。RAW264.7细胞给予可溶性RANKL(sRANKL)干预,设立空白组, sRANKL组(模型组), 淫羊藿苷(Ica)组, TBⅡ低剂量组($2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), TBⅡ中剂量组($4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), TBⅡ高剂量组($8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。相应试剂盒检测破骨细胞分化的标志性酶(TRAP), 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测C-FOS, 与其上游RANKL/RANK和下游活化T细胞核因子胞质1型(NFATC1)表达量, 以及骨保护素OPG的表达量。结果:分子对接打分结果分别为-11.86, -11.38, -12.34 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, TBⅡ能够与RANKL, RANK和C-FOS结合。与正常组比较, 模型组TRAP含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较, 各给药组显著降低TRAP含量($P<0.01$), 且TBⅡ呈剂量依赖性降低TRAP含量。与正常组比较, 模型组RANKL, RANK, C-FOS, NFATC1表达量显著升高($P<0.01$), OPG表达量显著降低($P<0.01$);与模型组比较, 各给药组显著降低RANKL, RANK, C-FOS, NFATC1表达量($P<0.01$), 显著升高OPG表达量($P<0.01$)。结论:TBⅡ可能通过调控RANKL/RANK/C-FOS信号通路, 抑制破骨细胞前体细胞向破骨细胞的分化, 抑制破骨细胞活性, 减少骨吸收, 改善骨质疏松。

[关键词] 知母皂苷BⅡ; 分子对接; 核转录因子- κ B受体活化因子配基(RANKL); RANK; C-FOS; RAW264.7细胞

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)19-0146-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201906

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200721.0938.002.html>

[网络出版日期] 2020-7-21 14:56

Effect of Anemarrhena Asphodeloside BⅡ on Osteoclast Differentiation Based on Molecular Docking

FENG Meng, DANG Yuan-xia, LIU Fen, XING Ju-ling, MO Zi-xin, LUO Rui-jiao, ZHOU Xin-xin*
(School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine,
Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of anemarrhena asphodeloside BⅡ (TBⅡ) on the expressions of nuclear transcription factor- κ B receptor activator factor ligand (RANKL), RANK and C-FOS genes during osteoclast differentiation. **Method:** Molecular docking software LeDock was used to score the docking of TBⅡ with RANKL, RANK and C-FOS. RAW264.7 was treated with soluble RANKL (sRANKL) and divided into control group, sRANKL group (model group), Icariin (Ica) group, low-dose TBIⅡ group ($2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), medium-dose TBⅡ group ($4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and high-dose TBⅡ group ($8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The corresponding kit was used to detect iconic enzyme (TRAP) of osteoclast differentiation. Total RNA was extracted by trizol method, Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was

[收稿日期] 20200113(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473439)

[第一作者] 冯萌, 在读硕士, 从事中药内分泌药理学研究, E-mail: 18855032051@163.com

[通信作者] *周欣欣, 教授, 硕士生导师, 从事中药新药研究与开发工作, E-mail: 020465@gzucm.edu.cn

used to detect the expressions of C-FOS, upstream RANKL/RANK and downstream nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATC1), and osteoprotegerin OPG. **Result:** The molecular docking score were -11.86 , -11.38 , -12.34 kcal·mol⁻¹, and there might be multiple binding sites between TBII as well as RANKL, RANK and C-FOS. Compared with the control group, the content of TRAP in model group increased significantly ($P<0.01$), and compared with model group, the content of TRAP in each administration group decreased significantly ($P<0.01$), and TB II decreased the content of TRAP in a dose-dependent manner. Compared with the control group, the expressions of RANKL, RANK, C-FOS and NFATC1 increased ($P<0.01$), whereas the expression of OPG decreased ($P<0.01$) in model group. Compared with model group, the expressions of RANKL, RANK, C-FOS and NFATC1 decreased ($P<0.01$), while the expression of OPG increased ($P<0.01$) in each administration group. **Conclusion:** TB II may inhibit the differentiation of osteoclast precursors into osteoclasts, inhibit osteoclast activity, reduce bone resorption and improve osteoporosis by regulating RANKL/RANK/C-FOS signal pathway.

[Key words] anemarrhena asphodeloside B II; molecular docking; nuclear transcription factor- κ B receptor activator factor ligand (RANKL); RANK; C-FOS; RAW264.7 cells

骨质疏松是骨科常见的一类疾病,会导致患者骨量减少,破坏骨微结构^[1],常见于老年人群中,严重影响了生活质量^[2]。破骨细胞是生物体能够介导骨吸收的细胞,若生物体内骨吸收增加异常会引发骨质疏松^[3]。RAW264.7细胞是破骨细胞前体细胞,在体外条件下,通过为您找到约20,921条相关结果可溶性核转录因子- κ B受体活化因子配基(sRANKL)因子诱导可向破骨细胞分化,是体外实验中研究破骨细胞较好的细胞模型^[4]。中药常用于抗骨质疏松的药物有淫羊藿,具有补肝肾、强筋骨、祛风湿的功效^[5-6]。淫羊藿苷是淫羊藿主要有效成分之一,研究发现淫羊藿苷阻碍破骨细胞,阻断骨吸收,抑制前体破骨细胞的增殖和分化,发挥抗骨质疏松作用^[7]。LI等^[8]采用双侧卵巢切除的小鼠建立骨质疏松模型,测定骨密度(BMD),骨矿含量(BMC),碱性磷酸酶(ALP),抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP),骨保护素(OPG)等指标,用来评价淫羊藿苷对骨质疏松小鼠的影响,结果发现淫羊藿苷在对骨质疏松小鼠不产生不良反应的前提下,提高了治疗效果。知母为百合科植物知母的根茎,是我国传统清热泻火,滋阴补肾的中药,主治温热病、高热烦渴、咳嗽气喘、骨蒸潮热、虚烦不眠等。传统中医药理论认为,知母归肾经,肾主骨,肾气足则骨髓生化有源,骨骼强健有力,肾气不足则生化无源,骨骼失养^[9]。中成药仙灵骨葆胶囊含有中药知母,安一方等^[10]研究发现其能够提高临床疗效,改善疼痛,提高骨密度。吴继云等^[11]通过大鼠行双侧卵巢切除术的建立骨质疏松模型,发现仙灵骨葆胶囊增加了骨细胞指数、破骨细胞指数、血小板衍生生长因子

和血管内皮生长因子,促进骨质疏松性骨折愈合。现代药理研究表明,知母皂苷B II能够促进骨形成,改善骨质疏松^[12]。NIAN等^[13]通过大鼠去卵巢手术建立骨质疏松模型,知母皂苷治疗12周后测定血清骨钙素浓度和血清碱性磷酸酶活性,骨密度仪测定骨密度,结果发现知母皂苷能够提高去卵巢大鼠血清碱性磷酸酶活性,降低骨钙素浓度,同时抑制骨密度下降,在不改变破骨细胞数量的情况下促进了大鼠骨形成。本课题组前期研究发现知母对高脂及糖尿病模型大鼠除了能降低血脂及血糖的含量之外,通过对大鼠的骨脆性及简单骨密度初步测定发现,知母能够增加骨密度,且不易折断。本研究基于分子对接,探究知母皂苷B II(TB II)对破骨细胞分化的影响,在细胞实验上进一步验证,为临床知母用于改善骨质疏松症状提供基础科学依据。

1 材料

1.1 单体和试剂 TB II(成都曼切斯特公司,批号 MUST-17042901);淫羊藿苷(Ica,成都曼切斯特公司,批号 MUST-17051810);胎牛血清(FBS),高糖 DMEM 培养基,0.25%胰蛋白酶,青-链霉素(美国 Gibco 公司,批号分别为 10296, 8116743, 17820, 10403);磷酸盐缓冲液(PBS,美国 HyClone 公司,批号 ABA258380);二甲基亚砜(DMSO,杭州碧云天生物技术研究所,批号 20170127);细胞增殖-毒性检测试剂盒(CCK-8,杭州碧云天生物技术研究所,批号 E1008);sRANKL(美国 Peprotech 公司,批号 1207437-1);噻唑蓝(MTT,武汉默沙克有限公司, Kt99775);RNAiso Plus 提取试剂盒,PrimeScriptTM RT reagent Kit with g DNA Eraser(日本 TaKaRa 公

司,批号分别为AKA4302,AK4701)。

1.2 细胞 小鼠破骨前体细胞RAW264.7由中山大学惠赠。细胞培养于含10% FBS和含1%青-链霉素的甲基亚砷(DMEM)培养液中,置于37℃ 5%CO₂的孵箱中。根据细胞生长的状态进行换液、传代等,取对数期生长的细胞用于实验。

1.3 仪器 BS210S型电子分析天平(北京Sartorius公司);MEGAFMGE2.0R型低温高速离心机(德国Hermle公司);HHS-21-8双列8孔电热恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);THM51119300型全波长酶标分析仪(赛默飞世尔科技公司);CFX96TM型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国伯乐公司);ECO型超净台,3111型CO₂细胞培养箱(赛默飞世尔科技公司);RE801型涡旋仪,SQ510C型高压蒸汽灭菌锅(雅马拓科技贸易有限公司)。

2 方法

2.1 分子对接 由ChemicaBook数据库中得到TB II的CAS号,在NCBI中打开CSA号,得到TB II的二维结构,转化为mol2格式^[14]。从UniProt数据库获取小鼠蛋白RANKL,RANK和C-FOS的氨基酸序列,使用Protein BLAST检索,选择同源性高且为单链蛋白结构(PDB ID分别为1PYE,5Q0J,5PAM)。将蛋白导入LeDock中LePro标签下,删除蛋白中的水分子,生成处理后蛋白。再导入TB II的mol2格式,生成对接打分结果^[15],利用Pymol观察其结合模式。

2.2 主要试剂的配置

2.2.1 sRANKL母液的配制 精密称取sRANKL 2 μg,用PBS 2 mL溶解,0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,配制为1 mg·L⁻¹的母液备用。

2.2.2 MTT母液的配制 精密称取MTT粉末50 mg,周在避光条件下,转移至超净台内,加入PBS 5 mL溶解,避光放置于4℃过夜,第2天在超净台中用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,配成10 g·L⁻¹的MTT母液,分装用锡箔纸包裹的离心管,置于-20℃保存,待用。

2.2.3 TB II母液的配制 准确称取TB II 20 mg,置于4 mL离心管内,在超净台内加入DMSO配成配成10 mmol·L⁻¹的TB II母液2.17 mL,待完全溶解,用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,分装,置于-20℃保存。

2.2.4 Ica母液的配制 准确称取Ica 20 mg,置于4 mL离心管内,在超净台内加入DMSO配成配成

12 mmol·L⁻¹的Ica母液2.463 mL,待完全溶解,用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,分装,置于-20℃保存。

2.3 实验细胞的分组与给药 根据实验设计,分组如下空白组(完全培养基),sRANKL组(不同质量浓度0,6.25,12.5,25,50,100 μg·L⁻¹的含sRANKL培养基),TB II组(sRANKL+不同浓度1,2,4,8,16 μmol·L⁻¹的TB II含药培养基),Ica组(sRANKL+不同浓度1,2,4,8,16 μmol·L⁻¹ Ica含药培养基)。根据实验后续的验证,确定最后分组的药物浓度,空白组,sRANKL组(50 μg·L⁻¹),Ica组(2 μmol·L⁻¹),TB II低剂量组(2 μmol·L⁻¹),TB II中剂量组(4 μmol·L⁻¹),TB II高剂量组(8 μmol·L⁻¹)。

2.4 MTT比色法检测细胞存活率 采用MTT比色法测定sRANKL及各药物单体对RAW264.7前破骨细胞增殖活性的影响。取对数生长期的细胞接种于96孔板中,分组给药后,置于37℃ 5%CO₂的培养箱中培养24,36,48 h。每孔加入MTT溶液10 μL,37℃孵育4 h,加入DMSO溶液150 μL,以波长490 nm测定吸光度A。细胞增殖率=(A_{实验组}-A_{空白组})/(A_{阳性组}-A_{空白组})×100%。

2.5 RAW264.7细胞的抗酒石酸酸性磷酸酶含量的测定 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)是破骨细胞分化的标志性酶^[16],研究发现,应用sRANKL后能成功诱导RAW264.7前破骨细胞向破骨细胞分化^[17]。取对数生长期的细胞,接种于6孔细胞培养板中,培养24 h,更换为无血清培养液,使细胞处于G₀期,同步生长12 h后,经sRANKL诱导,加入各含药培养基。弃去培养液,用预冷的PBS洗2次,加细胞裂解液裂解30 min,收集裂解液于离心管中,4℃,14 000×g离心,取上清。根据相应的试剂盒,测定TRAP和BCA含量,计算单位蛋白中TRAP的含量。

2.6 Real-time PCR检测RANKL,RANK,C-FOS,NFATC1,OPG mRNA表达 取对数生长期的RAW264.7细胞,用0.25%胰酶消化,将浓度为2×10⁵个/mL细胞接种在6孔板中,待细胞贴壁后分组给药,培养48 h,收集细胞,根据相应的试剂盒说明书,采用trizol一步法提取RNA。利用反转录仪和相应的试剂盒说明书进行反转录。根据目的需要,通过PubMed查找相关基因编码序列,委托上海生工生物工程有限公司设计合成,Real-time PCR引物序列见表1。根据相应试剂盒,利用扩增仪进行扩增反应,扩增条件为95℃ 30 s后,95℃ 5 s后再用相应退火温度30 s,95℃ 10 s,60℃ 30 s完成反应,循环40次。采用2^{-ΔΔC_t}法计算相对基因表达量。

引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
RANKL	上游 GAAAGGAGGGAGCACGA	120
	下游 GGGTTGGACACCTGAATG	
RANK	上游 TTCTCGGTGAGGTCTTGG	121
	下游 AGCTGCCTATGGGATGG	
C-FOS	上游 CAGCGAGCAACTGAGAAGA	114
	下游 AAGGGGTCCAGGGGTAG	
NFATC1	上游 CCTCAGAGAGACCTTGCC	139
	下游 CACAGGAGCTGGGGTTC	
OPG	上游 TGGCTGAGTGTCTTGGTG	101
	下游 TGGAAGGTTGCTCTTGTG	

2.7 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行统计分析,实验数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两两比较用 t 检验方法,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,使用GraphPad Prism 6.0软件制作数据结果图。

3 结果

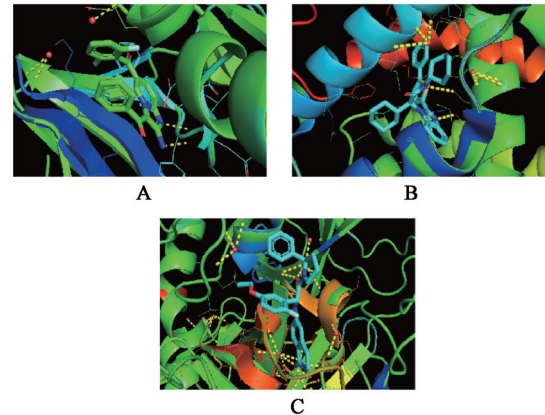
3.1 分子对接结果 根据LeDock打分结果,表示TB II能够与RANKL,RANK和C-FOS结合。打分结果见表2,结合模式见图1。

3.2 sRANKL诱导RAW264.7细胞分化条件的确定 用不同质量浓度(0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sRANKL作用RAW264.7细胞24, 36,

表2 TB II与RANKL,RANK和C-FOS的对接打分

Table 2 Scoring of docking between TB II with RANKL, RANK and C-FOS

配体	受体	对接打分(kcal·mol ⁻¹)
TB II	RANKL	-11.86
TB II	RANK	-11.38
TB II	C-FOS	-12.34



A.TB II和RANKL的结合模式;B.TB II和RANK的结合模式;C.TB II和C-FOS的结合模式

图1 TB II与RANKL,RANK和C-FOS的结合模式

Fig. 1 Binding pattern of TB II with RANKL, RANK and C-FOS

48 h。利用MTT比色法检测细胞的增殖活性。与正常组比较,不同浓度sRANKL作用细胞不同时间细胞增殖率均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。最终采用50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sRANKL诱导RAW264.7细胞。见表3。

表3 不同浓度sRANKL对RAW264.7细胞24,36,48 h细胞增殖活性的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of different concentrations of sRANKL on proliferative activity of RAW264.7 cells at 24 h, 36 h and 48 h($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞增殖率/%		
		24 h	36 h	48 h
空白	-	1.019 1 \pm 0.051 0	1.000 0 \pm 0.049 0	1.000 0 \pm 0.079 3
sRANKL	6.25	1.002 7 \pm 0.046 6	0.982 7 \pm 0.034 9	0.967 7 \pm 0.081 3
	12.5	0.951 0 \pm 0.028 2 ¹⁾	0.969 8 \pm 0.057 9	0.965 4 \pm 0.040 0
	25	0.948 2 \pm 0.040 1 ²⁾	0.936 5 \pm 0.023 9 ²⁾	0.905 3 \pm 0.079 7 ²⁾
	50	0.924 3 \pm 0.049 5 ²⁾	0.874 6 \pm 0.012 5 ²⁾	0.849 2 \pm 0.072 1 ²⁾
	100	0.918 5 \pm 0.065 7 ²⁾	0.812 4 \pm 0.081 3 ²⁾	0.784 4 \pm 0.026 0 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

3.3 对RAW264.7细胞增殖活性的影响 再用不同浓度(1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的药物单体作用于RAW264.7细胞48 h,用MTT比色法检测细胞的增殖活性,确定后续实验的药物浓度。与模型组比较,各给药组干预细胞后细胞增殖率均有所下降($P<0.01$)。根据实验的结果,Ica组选择剂量

2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TB II分别选择2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表4。

3.4 对RAW264.7细胞TRAP水平的影响 与空白组比较时,sRANKL组TRAP含量显著升高($P<0.01$),结果表明sRANKL成功诱导RAW264.7细胞向破骨细胞分化。与sRANKL组比较,Ica组和

表4 TB II对RAW264.7细胞增殖活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of TB II on proliferative activity of RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞增殖率/%	
		Ica	TB II
空白	-	1.000 0 \pm 0.019 1	1.000 0 \pm 0.019 1
sRANKL	-	0.814 7 \pm 0.028 4 ²⁾	0.814 8 \pm 0.024 8 ²⁾
TB II	1	0.968 3 \pm 0.022 9 ⁴⁾	0.972 9 \pm 0.028 1 ⁴⁾
	2	0.841 8 \pm 0.010 7 ³⁾	0.916 9 \pm 0.014 2 ⁴⁾
	4	0.773 0 \pm 0.031 0 ⁴⁾	0.828 1 \pm 0.007 9
	8	0.710 0 \pm 0.005 6 ⁴⁾	0.802 1 \pm 0.012 2
	16	0.575 2 \pm 0.039 6 ⁴⁾	0.696 4 \pm 0.028 2 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与sRANKL组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表5,6同)。

TB II各剂量组TRAP的含量均显著降低($P<0.01$)。见表5。

3.5 对RAW264.7细胞RANKL, RANK, C-FOS, NFATC1, OPG mRNA表达的影响 与空白组比较, sRANKL组中RANKL, RANK, C-FOS, NFATC1

表5 TB II对RAW264.7细胞TRAP水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of TB II on level of TRAP of RAW264.7 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TRAP/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	17.39 \pm 1.13
sRANKL	-	39.05 \pm 0.59 ²⁾
Ica	2	23.73 \pm 0.56 ⁴⁾
	4	19.08 \pm 0.55 ⁴⁾
	8	18.77 \pm 0.16 ⁴⁾

mRNA的表达量显著升高,OPG mRNA的表达量显著降低($P<0.01$)。与sRANKL组比较,TB II各剂量组有不同程度的显著降低RANKL,RANK,C-FOS,NFATC1 mRNA的表达量,显著升高OPG的表达量($P<0.01$),且TB II高剂量效果最好,成剂量依赖性。说明在破骨细胞分化的阶段,RANKL,RANK,C-FOS,NFATC1 mRNA的表达量升高,OPG mRNA表达量减少,而TB II能够抑制破骨细胞分化。见表6。

表6 TB II对RAW264.7细胞RANKL, RANK, C-FOS, NFATC1, OPG mRNA的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of TB II on RANKL, RANK, C-FOS, NFATC1, OPG mRNA in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	RANKL	RANK	C-FOS	NFATC1	OPG
空白	-	0.33 \pm 0.22	0.28 \pm 0.11	0.28 \pm 0.11	0.29 \pm 0.16	1.46 \pm 0.05
sRANKL	-	1.01 \pm 0.16 ²⁾	1.01 \pm 0.14 ²⁾	1.02 \pm 0.23 ²⁾	1.03 \pm 0.24 ²⁾	1.00 \pm 0.02 ²⁾
Ica	2	0.60 \pm 0.24 ⁴⁾	0.54 \pm 0.20 ⁴⁾	0.78 \pm 0.12 ⁴⁾	0.68 \pm 0.14 ⁴⁾	1.16 \pm 0.07 ⁴⁾
TB II	2	0.51 \pm 0.15 ⁴⁾	0.44 \pm 0.17 ⁴⁾	0.69 \pm 0.25 ⁴⁾	0.67 \pm 0.17 ⁴⁾	1.20 \pm 0.04 ⁴⁾
	4	0.43 \pm 0.10 ⁴⁾	0.36 \pm 0.12 ⁴⁾	0.65 \pm 0.17 ⁴⁾	0.66 \pm 0.13 ⁴⁾	1.27 \pm 0.18 ⁴⁾
	8	0.35 \pm 0.20 ⁴⁾	0.30 \pm 0.13 ⁴⁾	0.59 \pm 0.23 ⁴⁾	0.64 \pm 0.22 ⁴⁾	1.34 \pm 0.06 ⁴⁾

4 讨论

骨质疏松是近年来发病率较高的一种疾病,易导致骨脆性增加,使骨组织微结构发生改变,其发病率与致残率高,严重影响了患者的生活质量^[18-19]。破骨细胞的异常能够引起骨质疏松的发生^[20-21]。破骨细胞是生物体内唯一能够介导骨吸收的细胞,具有特殊的骨吸收功能,主要影响矿化的生理和病理退化^[22]。分子对接是通过小分子配体与受体大分子相互作用,预测相互结合的能力,本研究基于TB II与RANKL,RANK,C-FOS分子对接结果,作为参考药效,通过细胞实验进一步验证。

TRAP是破骨细胞分化成熟的标志,研究表明,TRAP含量升高时,骨吸收增强。当患有骨质疏松时,TRAP含量异常升高^[23]。本研究通过测定TRAP含量,发现TB II呈剂量依赖性降低TRAP含量,抑

制破骨细胞分化,减少骨吸收。现代研究表明,C-FOS的持久表达可以促进破骨细胞分化^[24-25]。C-FOS的上游基因为RANKL,RANKL在破骨细胞的形成中起着重要的作用,而RANK是目前已知的RANKL的唯一受体,当RANKL和RANK特异性结合时,能够刺激核内C-FOS的表达增加,同时C-FOS能进一步启动破骨细胞生成基因NFATC1的转录,整个过程能够刺激前破骨细胞的成熟、分化为破骨细胞,影响骨吸收的异常,表现出骨质疏松^[26]。OPG是骨保护素,也是RANKL的假性受体,OPG能够与RANKL结合,竞争性抑制RANKL与RANK结合,也能够与RANKL,RANK形成三聚体,影响下游关键转录因子C-FOS,进一步抑制NFATC1的转录^[27-28]。本研究通过Real-time PCR检测,在RAW264.7细胞向破骨细胞分化的阶段,测定

RANKL, RANK, C-FOS的基因表达量,结果显示3种基因的表达量逐渐增加,在破骨细胞的分化过程中起正向调节作用^[29-30],同时测定了NFATC1 mRNA的表达量,以及RANKL的假性受体OPG的表达量,结果显示NFATC1的表达量增加,OPG的表达量降低。Real-time PCR结果显示TB II呈剂量依赖性降低RANKL, RANK, C-FOS, NFATC1的表达量,增加OPG的表达量。说明在破骨细胞的分化过程中, TB II可能通过增加OPG的表达,竞争性抑制RANKL和RANK的结合,或者降低RANKL/RANK的表达来减弱C-FOS的表达,进而抑制转录因子NFATC1的表达,影响破骨细胞的分化。因此TB II可能通过下调RANKL/RANK/C-FOS信号通路发挥抑制破骨细胞分化的作用减少骨吸收,为评估知母对骨质疏松的改善作用提供了基础依据。未来将通过动物实验进一步考察知母在改善骨质疏松症方面的研究。

[参考文献]

[1] HOU T, ZHANG L, YANG X. Ferulic acid, a natural polyphenol, protects against osteoporosis by activating SIRT1 and NF-kappaB in neonatal rats with glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109205.

[2] HA J, KIM S A, LIM K, et al. The association of potassium intake with bone mineral density and the prevalence of osteoporosis among older Korean adults [J]. *Nutr Res Pract*, 2020, 14(1): 55.

[3] 江灿. 骨质疏松患者骨吸收与骨形成指标表达情况研究[J]. *临床合理用药杂志*, 2019, 12(15): 21-22, 25.

[4] NAGAOKA M, MAEDA T, MORIWAKI S, et al. OPetunidin, a B-ring 5'-methylated derivative of delphinidin, stimulates osteoblastogenesis and reduces sRANKL-induced bone loss[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2759.

[5] 柯志鹏, 张新庄, 曹泽彧, 等. 基于网络药理学研究淫羊藿治疗骨质疏松症的分子作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(18): 4048-4052.

[6] 徐忠坤, 殷洪梅, 李芳, 等. 淫羊藿总黄酮胶囊中黄酮类成分含量测定及抗骨质疏松活性研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(15): 3140-3144.

[7] 沈焱, 祝峥, 张奇, 等. 淫羊藿苷对UMR-106成骨细胞和RAW264.7细胞诱导的破骨细胞蛋白质组学的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2019, 54(4): 268.

[8] LI M, ZHANG N D, WANG Y, et al. Coordinate

regulatory osteogenesis effects of icariin, timosaponin B II and ferulic acid from traditional Chinese medicine formulas on UMR-106 osteoblastic cells and osteoblasts in neonatal rat calvaria cultures [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 7(5): 185.

[9] 王明明, 蔡圣朝. 肾藏精主骨生髓的病因病机探析[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2017, 15(16): 65-66.

[10] 安一方, 章铁立, 谢雁鸣, 等. 仙灵骨葆胶囊治疗原发性骨质疏松症随机对照试验的系统评价及Meta分析[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(15): 2829-2844.

[11] 吴继云, 陈伟南, 蒋春华. 仙灵骨葆胶囊对大鼠骨质疏松性骨折愈合过程PDGF、TGF- β 和VEGF表达的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2019, 44(5): 541-546.

[12] LI M, ZHANG N D, WANG Y, et al. Coordinate regulatory osteogenesis effects of icariin, timosaponin B II and ferulic acid from traditional Chinese medicine formulas on UMR-106 osteoblastic cells and osteoblasts in neonatal rat calvaria cultures [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 7(5): 185.

[13] NIAN H, QIN L P, CHEN W S, et al. Protective effect of steroidal saponins from rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* on ovariectomy-induced bone loss in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(6): 728-734.

[14] 李好好, 吴俊勇, 叶艳, 等. 合欢皮小分子化合物对单胺氧化酶A抑制作用的分子对接研究[J]. *当代化工*, 2020, 49(1): 6-11.

[15] VILAR S, COZZA G, MORO S. Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE): application of QSAR and molecular docking to drug discovery[J]. *Curr Top Med Chem*, 2008, 8(18): 1555-1572.

[16] 郑嘉铭, 贺双江, 赵鸿雁, 等. RhoU基因沉默对破骨细胞分化的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(9): 1904-1911.

[17] 王云龙, 巩栋. 杨梅苷抑制RANKL诱导的RAW264.7细胞分化为破骨细胞的研究[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(66): 14-17.

[18] LI Y Y, CUI Y, WANG H L, et al. Effect of total flavonoids of *Herba Taxilli* on osteoporotic rats induced by retinoic acid[J]. *World J Tradit Chin Med*, 2019, 5(4): 243-249.

[19] HAN X, ZHOU J, PENG W. Orexins facilitates osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells [J]. *Iubmb Life*, 2018, 70(7): 633-641.

[20] 张健豪. 靶向调控破骨细胞活性治疗骨质疏松的研究进展[J]. *医学理论与实践*, 2019, 32(11): 1653-1655.

[21] 高云兵. BX-912对破骨细胞相关的骨质疏松症的影响

- 响研究[D]. 南宁:广西医科大学,2019.
- [22] 韩大庆,张其清. 破骨细胞完善类骨组织体外重建的研究[J]. 生物医学工程与临床,2006,S1:20.
- [23] 韦玮,李剑,黄林海,等. 血清镁浓度与绝经后骨质疏松症患者骨转换指标和骨密度的相关性研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2019,doi:11.3701.R.20190816.1049.002.
- [24] 刘梦楠. CaMK II δ 过表达对破骨细胞分化中 c-fos、c-jun 基因表达的影响[D]. 唐山:华北理工大学,2019.
- [25] HAN S Y, KIM Y K. Berberine suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation by inhibiting c-Fos and NFATc1 expression[J]. Am J Chin Med, 2019, 47(2):439-455.
- [26] TAKAYANAGI H, KIM S, MATSUO K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta [J]. Nature, 2002, 416(6882):744-749.
- [27] TEODORESCU A C, MARTU I, TESLARU S, et al. Assessment of salivary levels of RANKL and OPG in aggressive versus chronic periodontitis [J]. J Immunol Res, 2019, doi:10.1155/2019/6195258.
- [28] 向益,郑烽,王显. 基于 OPG/RANKL/RANK 通路探讨单味中药治疗骨质疏松的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2019,27(2):86-88.
- [29] 丁士育,戚孟春. RANKL-RANK 及胞内信号通路对破骨细胞生成的调节机制[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2012,15(1):148-150.
- [30] CHEN B, DU Z, DONG X, et al. Association of variant interactions in RANK, RANKL, OPG, TRAF6, and NFATC1 genes with the development of osteonecrosis of the femoral head [J]. Dna Cell Biol, 2019, 38(7):734-746.

[责任编辑 周冰冰]