

淫羊藿苷抑制体外培养的大鼠股骨组织骨吸收活性

周建, 陈克明*, 葛宝丰, 马小妮, 王嘉琪, 郭晓宇, 成魁, 高玉海, 闫丽娟, 石文贵
(兰州军区兰州总医院骨科研究所, 兰州 730030)

[摘要] **目的:**研究淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织(骨干和骨骺端)吸收活性的影响。**方法:**体外分离培养大鼠股骨组织的骨干和骨骺端,48 h后采用终浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的淫羊藿苷对体外培养骨干和骨骺端进行处理。测定抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, StrACP)活性;测定培养基中葡萄糖(glucose, Glu)和乳酸(lactic acid, Lac);Real-Time RT-PCR检测抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, StrACP)、集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, MCSF)、组织激酶K(cathepsin K, CTSK)mRNA表达水平。**结果:** $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 淫羊藿苷可抑制StrACP活性,增加培养基中乳酸含量和减少培养基中葡萄糖含量,抑制StrACP, MCSF, CTSK mRNA的表达水平。**结论:**淫羊藿苷抑制体外培养大鼠股骨组织的骨骺端和骨干吸收活性。

[关键词] 淫羊藿苷; 股骨组织; 抗酒石酸酸性磷酸酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0201-05

[doi] 10.11653/syjf2013240201

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131012.0917.002.html>

[网络出版时间] 2013-10-12 9:17

Icariin Promotes Metabolism and Inhibites Resorption of Rats Femur Tissue *in vitro*

ZHOU Jian, CHEN Ke-ming*, GE Bao-feng, MA Xiao-ni, WANG Jia-qi, GUO Xiao-yu,
CHENG Kui, GAO Yu-hai, YAN Li-juan, SHI Wen-gui
(Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of icariin on femoral tissue (diaphyses and metaphysis) resorption and metabolic activity of rats *in vitro*. **Method:** The femoral tissue (diaphyses and metaphysis) was isolated which was treated with final concentration of $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ icariin in culture medium *in vitro*. The tartrate-resistant acid phosphatase (StrACP) activity, glucose and lactic acid content in culture medium were determined, StrACP, MCSF, CTSK mRNA expression was detected by Real-Time RT-PCR. **Result:** $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ icariin inhibited the activity of StrACP, increased the content of lactic acid and decreased glucose content, and improved StrACP, MCSF, CTSK mRNA expression level. **Conclusion:** Icariin are adjust femurs tissue metabolic activity and inhibited resorption.

[Key words] icariin; femur tissue; StrACP

骨质疏松是一种全身性系统性的骨骼疾病,研究表明是因为骨代谢失去了平衡所导致一种疾病,

正常骨代谢中,破骨细胞(osteoclast, OC)的骨吸收与成骨细(osteoblast, OB)的骨形成相互偶联,维持

[收稿日期] 20130304(018)

[基金项目] 甘肃省科技重大专项项目(09ZKNKA025);国家自然科学基金项目(81270963)

[第一作者] 周建, 博士生, 从事骨质疏松防治相关研究, Tel: 13919413656, E-mail: zhoujian715412@126.com

[通讯作者] * 陈克明, 博士, 研究员, 从事骨质疏松的治疗研究, Tel: 0931-8994327, E-mail: chkeming@yahoo.com.cn

一种动态平衡^[1],当 OC 的骨吸收相对增强或 OB 的骨形成相对减弱,骨吸收大于骨形成导致骨量丢失时将导致骨质疏松^[2]。有效的抑制骨吸收的药物研究已经成为研究的一个热点,有实验报道淫羊藿苷能促进体外培养骨髓间充质细胞成骨分化和成骨细胞成熟钙化^[3-4],因此本实验应用了体外股骨组织培养模型^[5],体外培养股骨组织培养模型是一种具有成骨细胞、破骨细胞、骨细胞和骨髓间充质细胞的多细胞复合体,此模型应用药物研究更接近体内药物代谢的过程,因此本实验研究了淫羊藿苷对体外培养的大鼠股骨组织吸收活性的影响,有望为淫羊藿苷治疗骨质疏松提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠,甘肃省中医学院动物实验中心,合格证号 SCXK(甘)2004-0006-152。

1.2 试剂 胎牛血清(兰州民海生物公司);DMEM 培养基、II 型胶原酶(Gibco 公司,美国);RNAiso Reagent kit、Prime Script™ SYBR® Premix Ex Taq™ II PCR 扩增试剂盒(大连宝生物公司);青霉素、链霉素、胰蛋白酶(Sigma 公司,美国);BCA 蛋白定量试剂盒(武汉博士德);抗酒石酸酸性磷酸酶(南京建成);葡萄糖测定试剂盒(南京建成);淫羊藿苷(icariin, ICA,中国药品生物制品检定所提供的对照品,纯度 >99%);其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),紫外分光光度计、台式高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司),7300 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 大鼠股骨组织的培养 选取 80 g 左右 SD 雄性大鼠 6 只 40 日龄,脱臼处死后放入 75% 乙醇浸泡 10 min,取股骨,去除肌肉、血管及结缔组织,用无菌 PBS 冲洗骨髓腔后,将骨骺端和骨干分开培养。将骨骺端和骨干剪成约 1 mm³ 大小的骨片,PBS 反复冲洗骨片,PBS 漂洗后,用含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM(含 4.5 g·L⁻¹ Glucose)培养液 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 d 换液 1 次^[5]。

2.2 分组处理 骨组织培养 48 h 后,随机分为 2 组,分别为含终浓度为 1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 淫羊藿苷组和对照组(C)。

2.3 StrACP 活性测定 药物处理培养后的第 3,6,9,12 天 PBS 漂洗骨片,匀浆器匀浆骨片后,在匀浆液中加入 1 mL 组织裂解液,裂解后 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 弃掉沉淀,Bradford 测定蛋白浓度,操作按

照说明书进行,制作标准曲线,计算样品中蛋白浓度,然后分别测定各组 StrACP 活性,StrACP 活性测定按试剂盒说明书操作,测定 490 nm 处吸光度(A),经过计算换算 StrACP 活性(U·g⁻¹)^[6]。

2.4 葡萄糖含量测定 药物处理培养后的第 3,6,9,12 天换培养液时收集培养测定培养中葡萄糖的含量,505 nm 测定 A 值。制作标准曲线,依据标准曲线计算样本中葡萄糖含量^[7]。

2.5 乳酸含量测定 药物处理培养后的 3,6,9,12 d 换培养液时收集培养液测定培养液中乳酸的含量,530 nm 测定 A 值。制作标准曲线,依据标准曲线计算样本中乳酸含量^[7]。

2.6 基因表达水平分析 Total RNA 提取:骨组织在淫羊藿苷培养处理培养后的第 3,6,9 d 和 12 d 后弃培养液,无酶 PBS 漂洗 2 次,加入 1 mL RNAiso Reagent Kit 裂解液匀浆骨组织,收集匀浆液,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液加入 200 μL 氯仿 4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液加入等体积的异丙醇静置 15 min,4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 弃上清液,75% 乙醇重悬浮沉淀 4℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清后 -70℃ 保存,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,在 230,260,280,320 nm 测定 A 值,调整 Total RNA 的浓度。

逆转录:使用 Prime Script™ reagent Kit(TakaRa Code:DRR037A)反转录试剂盒反转录出第一条 cDNA 链。反应体系:5 × Prime Script™ Buffer 4 μL, Prime Script™ RT Enzyme Mix I 1.0 μL, Oligo dT Primer(50 μmol·L⁻¹) 1.0 μL, Random 6 Primer(100 μmol·L⁻¹) 1.0 μL, Total RNA 10 μL(1 000 ng) 补 RNase Free 水至 20 μL。37℃ 反应 15 min,85℃ 5 s, -20℃ 保存。

引物设计:根据实验要求,在 genbank 查询所需要基因的序列 mRNA 序列,引物均由宝生物(大连)公司根据序列设计并合成。StrACP: NM_019144.1, Forward 5'-GTGCATGACGCCAATGACCAAG-3', Reverse 5'-TTTCCAGCCAGCAGGTACCA-3', 产物长度 98 bp; MCSF: AF514357.1, Forward 5'-GCTGACTTGGCTTGGGATG-3', Reverse 5'-CGT-GATTTGGTTGCTCTGTTG-3', 产物长度 154 bp; CTSK: NM_031560.2, Forward 5'-CGGCTATATGACCACTGCC TTC-3', Reverse 5'-TTTGCCGT GCGTTATAC ATACA-3', 产物长度 114 bp; Gapdh: NM_017008.3, Forward 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3', Reverse 5'-ATGTTGTTGAAGACGC-

CAGTA-3',产物长度 143 bp。

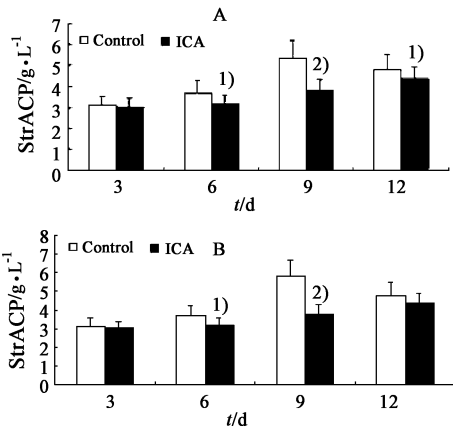
PCR 反应体系为 20 μL ,包括:SYBR Premix Ex Taq TMII(2 \times)10 μL ;forward primer (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.8 μL ;Reverse primer (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.8 μL ;ROX reference dye (50 \times) 0.4 μL ;cDNA Template 2 μL ;dH₂O 6 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 31 s,进行 40 个循环,每个循环收集荧光信号。随后缓慢升温,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,温度变化速度为 0.1 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$,绘制 PCR 产物的溶解曲线,了解扩增的特异性。

Real-Time RT-PCR 数据分析处理采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 处理数据,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示数据的结果^[8]。

2.7 统计学处理 所有统计分析均采用 SPSS 13.0 统计软件完成,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。首先用方差分析检验各组间是否有显著性差异,当存在显著性差异时,再用多参数 t -检验,验证各均数间是否有显著性差异。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 StrACP 活性分析 图 1 为淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织 StrACP 活性,图 1A 和 1B 分别为:骨骺端和骨干 StrACP 活性。在第 3 天时对照组和淫羊藿苷处理组 StrACP 活性无差异;淫羊藿苷处理组在第 6,9,12 天时抑制骨后端的 StrACP 的活性 ($P < 0.01, P < 0.05$);在药物处理后的第 6 天和 9 天淫羊藿苷显著抑制骨干的 StrACP 的活性 ($P < 0.01, P < 0.05$),表明淫羊藿苷抑制体外培养大鼠股骨组织的 StrACP 活性。



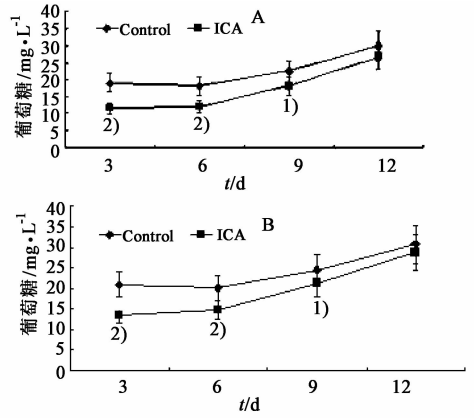
与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 2 ~ 6 同)

图 1 淫羊藿苷处理第 3,6,9,12 天股骨组织

抗酒石酸性磷酸酶活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 葡萄糖含量分析 图 2 为淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织的培养液中葡萄糖的影响,药物处

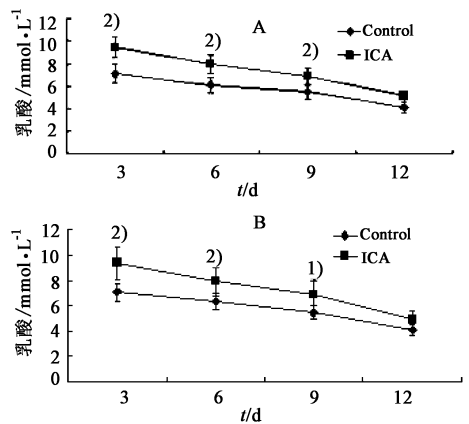
理组从第 3 ~ 12 天培养基中葡萄糖的代谢呈现减缓的局势,骨骺端在药物处理后,3,6 d 葡萄糖含量显著低于对照组 ($P < 0.01$),9 d 低于对照 ($P < 0.05$);骨干在药物处理后 3,6 d 葡萄糖含量显著低于对照组 ($P < 0.01$),9 d 低于对照 ($P < 0.05$);结果表明淫羊藿苷能提高体外培养股骨组织代谢水平。



A. 骨骺端;B. 骨干

图 2 淫羊藿苷处理股骨组织后 3,6,9,12 d 后股骨组织培养液中葡萄糖含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 乳酸含量分析 图 3 为淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织的培养液中乳酸的影响,药物处理组从第 3,12 天培养基中乳酸的含量呈现减少的局势,骨骺端在药物处理后,3,6,9 d 乳酸含量显著高于对照组 ($P < 0.01$),9 d 高于对照 ($P < 0.05$);骨干在药物处理后 3,6 d 乳酸含量显著低于对照组 ($P < 0.01$),9 d 高于对照 ($P < 0.05$)。



A. 骨骺端;B. 骨干

图 3 淫羊藿苷处理股骨组织 3,6,9,12 d 后股骨组织培养液中乳酸含量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 基因表达分析 图 4 为淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织 StrACP mRNA 表达量的影响,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法处理数据。淫羊藿苷抑制 StrACP mRNA 表

达,骨骺端在药物处理后,9 d StrACP mRNA 表达水平显著低于对照组 ($P < 0.01$),6,12 d StrACP mRNA 表达水平低于对照 ($P < 0.05$);骨干在药物处理后 9 d StrACP mRNA 表达水平显著低于对照组 ($P < 0.01$),12 d 低于对照 ($P < 0.05$)。

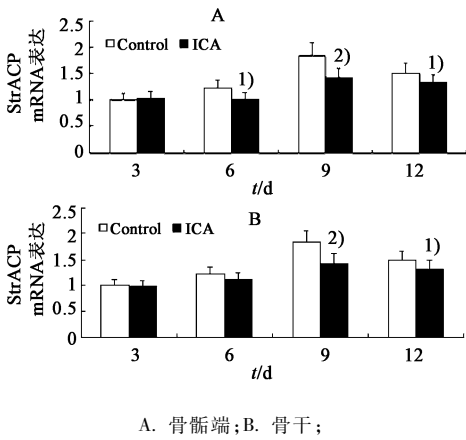


图 4 淫羊藿苷处理股骨组织 3,6,9,12 d 后股骨组织抗酒石酸酸性磷酸酶 mRNA 表达分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 5 为淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织 MCSF mRNA 表达量的影响,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理数据。淫羊藿苷抑制 MCSF mRNA 表达,骨骺端在药物处理后,9 d MCSF mRNA 表达水平显著低于对照组 ($P < 0.01$),6 d MCSF mRNA 表达水平低于对照 ($P < 0.05$);骨干在药物处理后 6 d 和 9 d MCSF mRNA 表达水平显著低于对照组 ($P < 0.01$),12 d 低于对照 ($P < 0.05$)。

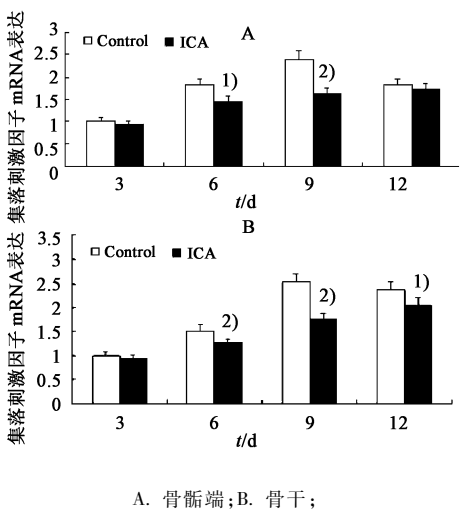


图 5 淫羊藿苷处理股骨组织 3,6,9,12 d 后集落刺激因子 mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 6 为淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织 CTSK mRNA 表达量的影响,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理数据。淫羊藿苷抑制 CTSK mRNA 表达,骨骺端在药

物处理后,9 d CTSK mRNA 表达水平显著低于对照组 ($P < 0.01$),6 d 和 12 d CTSK mRNA 表达水平低于对照 ($P < 0.05$);骨干在药物处理后 9 d CTSK mRNA 表达水平显著低于对照组 ($P < 0.01$),6 d 低于对照 ($P < 0.05$)。

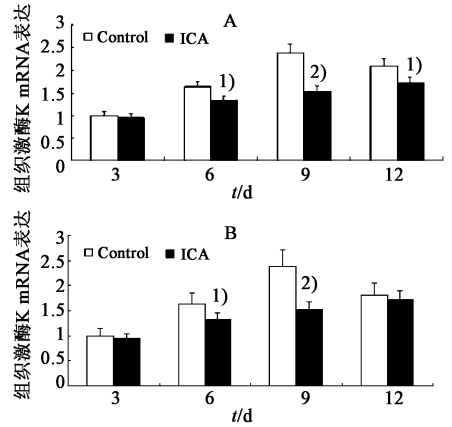


图 6 淫羊藿苷处理股骨组织 3,6,9,12 d 后组织激酶 K mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

淫羊藿苷 (icariin, ICA) 是传统中药淫羊藿的有效药理成分,研究表明淫羊藿苷具有较强的植物雌激素样活性^[9-12],近年来研究报道植物雌激素广泛用于抗骨质疏松活性药物的研究,骨质疏松的发病机制骨吸收大于骨形成,和骨骼代谢速度减慢一种系统性骨骼疾病,但是其部分作用机制还不是很清楚。因此本实验在应用体外培养股骨组织模型研究淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织吸收活性的影响,此模型,是一种含有破骨细胞,成骨细胞和骨细胞的多细胞的复合体,因此应用此模型研究药物代谢活性的结果更接近体内的药物代谢过程,因此本实验从骨吸收和营养代谢两方面在体外培养股骨组织水平研究了淫羊藿苷对骨吸收活性和营养代谢的影响。本实验应用已报道的淫羊藿苷浓度^[3]处理体外培养股骨组织,检测 StrACP 活性、培养液中葡萄糖和乳酸含量,以及骨吸收相关基因的表达情况。

抗酒石酸酸性磷酸酶 (StrACP),被认为是破骨细胞的标志酶,其活性与破骨细胞功能密切相关^[12],因此实验观察了淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织中 StrACP 活性的影响,结果表明淫羊藿苷抑制 StrACP 活性,因此推测淫羊藿苷是通过抑制破骨细胞吸收调节骨骼代谢活性。葡萄糖作为细胞或者组织代谢利用主要的能源物质和乳酸作为主要代谢产物,因此实验检测了体外培养股骨组织培养液中葡萄糖和乳酸

的含量,实验结果表明淫羊藿苷能提高体外培养股骨组织的培养液中乳酸含量,减少葡萄糖含量,因此实验推测淫羊藿苷能提高体外培养股骨组织营养代谢速度,提高骨骼的营养代谢水平保护骨骼健康。

本实验进一步从基因水平研究了淫羊藿苷对 StrACP, MCSF 和 CTSK mRNA 表达水平影响。抗酒石酸酸性磷酸酶表达高低与破骨细胞的活性密切相关^[13];组织蛋白酶 K 使胶原降解、变性导致骨骼结构发生变化^[14];MCSF 是细胞分泌的一种可溶性因子,可溶的性细胞因子通过细胞与细胞的接触反应将信号传递至原始的破骨细胞,促进其成熟分化^[2] MCSF 增多促进破骨细胞分化成熟增加骨吸收。实验研究发现淫羊藿苷能抑制体外培养股骨组织中 StrACP、MCSF 和 CTSK mRNA 表达水平,因此淫羊藿苷通过抑制 StrACP mRNA 表达水平抑制破骨细胞的活性,通过抑制 MCSF 的表达,抑制了原破骨细胞成熟,以及抑制 CTSK 表达水平 mRNA,因此实验结果表明淫羊藿苷通过抑制原破骨细胞的成熟和破骨细胞的活性来调节体外培养股骨组织的吸收活性,这可能是淫羊藿苷治疗骨质疏松症的机制之一。

实验应用体外培养股骨组织模型,此模型是一个更接近体内药物代谢过程的体外药物研究模型,通过此模型研究发现淫羊藿苷在组织水平抑制骨吸收活性,及提高营养代谢活性水平调节骨骼的代谢,因此实验结果有望在进一步从已经观察到的结果进一步研究其机制。此实验结果为淫羊藿苷治疗骨质疏松症的机制研究和临床应用提供一定的药理学基础。

[参考文献]

[1] Rodan G A, Martin T J. Therapeutic approaches to bone diseases [J]. Science, 2000, 289: 1508.

[2] Teitelbaum S L. Bone resorption by osteoclasts [J]. Science, 2000, 289: 1504.

[3] 陈克明,葛宝丰,马慧萍,等. 淫羊藿苷对体外培养骨髓基质干细胞成骨性分化的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(9): 642.

[4] 翟远坤,李志忠,陈克明,等. 淫羊藿苷对体外培养大鼠颅骨成骨细胞增殖、分化及成熟的影响 [J]. 中

材, 2011, 34(6): 917.

- [5] Masayoshi Y, Reiko H, Satoshi U, et al. Effects of flavonoid on calcium content in femoral tissue culture and parathyroid hormone-stimulated osteoclastogenesis in bone marrow culture *in vitro* [J]. Mol Cell Biochem, 2007, 303: 83.
- [6] Ying L L, Masayoshi Y. Phytochemical p-hydroxycinnamic acid stimulates bone formation and inhibits bone resorption in rat femoral tissues *in vitro* [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 292: 45.
- [7] Yamaguchi M, Oishi H, Suketa Y. Stimulatory effect of zinc bone formation in tissue culture [J]. Biochem Pharmacol, 1987, 36: 4007.
- [8] Kenneth J, Livak, Thomas D, Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 2001, 25, 402.
- [9] Qin L, Han T, Zhang Q, et al. Antiosteoporotic chemical constituents from Er-Xian decoction, a traditional chinese herbal formula [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 118(2): 271.
- [10] Zhang G, Qin L, Sheng H, et al. Epimedium-derived phytoestrogen exert beneficial effect on preventing steroid-associated osteonecrosis in rabbits with inhibition of both thrombosis and lipid-deposition [J]. Bone, 2007, 40(3): 685.
- [11] Ye H Y, Lou Y J. Estrogenic effects of two derivatives of Icarin on human breast cancer MCF-7 cells [J]. Phytomedicine, 2005, 12(10): 735.
- [12] 武密山,赵素芝,任立中,等. 淫羊藿苷元磷脂复合物防治去卵巢骨质疏松大鼠骨丢失和提高骨质量的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(13): 163.
- [13] 张兵兵,潘君,邓小燕,等. 破骨细胞骨吸收的分子机制 [J]. 生物医学工程学杂志, 2005, 22(6): 1283.
- [14] Delaisse J M, Andersen T L, Engsig M T, et al. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities [J]. Microsc Res Tech, 2003, 61(6): 504.

[责任编辑 聂淑琴]