

淫羊藿苷对小鼠骨髓源性破骨细胞诱导生成及骨吸收功能的影响

吕明波 刘兴炎 葛宝丰 陈克明 白孟海

摘要: **目的** 探讨淫羊藿苷对破骨细胞诱导产生及骨吸收功能的影响。**方法** 用终浓度分别为 $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 M-CSF、RANKL、 $1,25(\text{OH})_2 \text{ VitD}_3$ 体外诱导培养小鼠骨髓源性破骨细胞,在此过程中加入终浓度分别为 0 、 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的淫羊藿苷。倒置相差显微镜下观察活体细胞、HE 染色、TRAP 染色及降钙素受体染色鉴定破骨细胞,计数骨片上骨吸收陷窝数及面积,玻片上 TRAP 阳性多核细胞数。**结果** 加药组随淫羊藿苷浓度的增加,骨片上形成的骨吸收陷窝数及面积,玻片上的 TRAP 阳性多核细胞数呈量的依赖性的减少,与非加药组比较, $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的淫羊藿苷组,差异有显著性 ($P < 0.05$)。**结论** 淫羊藿苷具有抑制破骨细胞诱导产生及骨吸收功能的作用,并随浓度增加抑制作用增强。

关键词: 破骨细胞; 淫羊藿苷; 骨吸收

Effects of Icaritin on inducing osteoclast formation and bone resorption in mouse bone marrow culture LV

Mingbo, LIU Xingyan, GE Baofeng, et al. Department of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Icaritin on inducing osteoclast formation and bone resorption *in vitro*. **Methods** In the process of osteoclast formation from mouse bone marrow induced by M-CSF ($25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), RANKL ($30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and $1,25(\text{OH})_2 \text{ VitD}_3$ ($10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Icaritin with different concentration ($0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was added. Osteoclasts were identified by observing live cells with inverted light microscope, HE staining, TRAP staining and CTR (calcitonin receptors) staining. The number of bone resorption pits and area on bone slices and the number of TRAP positive multinucleate cells on glass slices were counted. **Results** The addition of Icaritin ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) induced a dose-dependent decrease in the number of bone resorption pits, area and TRAP positive multinucleate cells. Compared with the control group, those groups treated by $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Icaritin were significant if $P < 0.05$. **Conclusion** Icaritin could inhibit inducing osteoclast formation and bone resorption *in vitro* in dose-dependent manner.

Key words: Osteoclast; Icaritin; Bone resorption

骨质疏松是危害中老年人健康的常见病之一,随着人口老龄化,骨质疏松的防治逐渐成为医学研究的热点。破骨细胞作为骨吸收的主要功能细胞在骨质疏松的发生与发展中起重要作用,破骨细胞的数量与功能状态直接关系到骨转换状态与骨量,因此抑制破骨细胞生成及活性是骨质疏松治疗的一个重要方面。淫羊藿是中医治疗骨质疏松的常用药物之一,淫羊藿的抗骨质疏松作用已得到公认,淫羊藿

苷是淫羊藿的主要活性成分^[1],许多研究^[2]已经证实淫羊藿苷能够促进体外培养成骨细胞的增殖与分化,但是淫羊藿苷对体外培养破骨细胞产生及骨吸收功能的影响目前尚未见报道。本实验采用体外诱导培养小鼠骨髓源性破骨细胞的方法,探讨淫羊藿苷对破骨细胞诱导产生及骨吸收功能影响,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 周龄雄性 BABL/c 小鼠,SPF 级,购自甘肃省医

作者单位: 730050 兰州,兰州军区总医院骨科

通讯作者: 陈克明, Email: Chkeming@yahoo.com.cn

学科学研究院实验动物研究中心,动物合格证号:SCXK(甘)2006-0010。

1.2 药品及试剂

α -MEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(兰州民海生物工程有限公司)。淫羊藿苷(购自中国药品生物制品检定所),17 β -雌二醇(美国 Sigma 公司)。M-CSF(美国 Sigma 公司),RANKL(美国 Alexis Biochemicals 公司),1,25(OH)₂VitD₃(美国 Sigma 公司)。抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒(美国 Sigma 公司),甲苯胺兰(美国 Sigma 公司)。降钙素受体一抗兔抗人、小鼠、大鼠多克隆一抗(英国 Abcam 公司),工作浓度 1:100, SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 主要仪器

CO₂ 培养箱(Heraeus,德国),SW-CJ-1 FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司),SP 1600 锯式切片机(LEICA,德国),倒置相差显微镜(OLYMPUS,日本),超声波清洗机(上海新芝生物技术研究),24 孔细胞培养板(Corning 公司,美国)。

1.4 玻片和骨磨片的制备与处理

将盖玻片用玻璃刀分切成 1 cm × 1 cm 大小,洗净,消毒灭菌备用。取新鲜的牛股骨,用锯式切片机将其皮质部切成 20 μ m 厚的骨片,再修剪成 0.5 cm × 0.5 cm 大小,超声波清洗后,浸泡于含青霉素 1 000 IU·mL⁻¹、链霉素 1 000 μ g·mL⁻¹ 的 PBS 缓冲液中,换液 3 次,每次 30 min,最后置 PBS 液中 4℃ 保存备用,用时浸泡于 α -MEM 培养液中,更换 3 次培养液,每次 20 min。

1.5 破骨细胞的分离与培养

拉颈处死小鼠,75% 酒精浸泡消毒 15 min,无菌条件下,分离四肢肱骨、股骨、胫骨,剪去两侧干骺端,用 α -MEM 全培养液(含 15% 胎牛血清,青霉素 100 IU·mL⁻¹,链霉素 100 mg·mL⁻¹)反复冲洗骨髓腔直至变白为止,收集细胞悬液,吸管轻轻吹打 2 min 后,150 目钢筛过滤 1 次,300 目过滤 2 次,加入 M-CSF、RANKL、1,25(OH)₂VitD₃ 使终浓度分别为 25 ng·mL⁻¹、30 ng·mL⁻¹、10⁻⁸ mol·L⁻¹,混匀后加入预置盖玻片或骨磨片的 24 孔细胞培养板中,每孔 0.5 mL,置 CO₂ 培养箱,在 5% CO₂,37℃ 条件下培养,每 2~3 天半量换液 1 次,补充等量新培养液以及等量的 M-CSF、RANKL、1,25(OH)₂VitD₃ 和淫羊藿苷或 17 β -雌二醇。

1.6 分组

1.6.1 破骨细胞诱导生成实验分组:取无菌 24 孔板 2 块,每孔加入 0.5 mL 上述细胞悬液和 1 片盖玻片,培养开始即分组加药,分为 A、B、C、D、E 5 组,每组 8 孔,A 组为空白对照组,B、C、D 为实验组加入的淫羊藿苷终浓度分别为 10⁻⁷ mol·L⁻¹、10⁻⁶ mol·L⁻¹、10⁻⁵ mol·L⁻¹,E 组作为阳性对照组,加入 17 β -雌二醇,终浓度为 10⁻⁷ mol·L⁻¹。

1.6.2 破骨细胞骨吸收功能观察实验分组:取无菌 24 孔板 2 块,每孔加入 0.5 mL 上述细胞悬液和 1 片骨磨片,培养前 8 天不加药,培养第 9 天开始分组加药,也分为 A、B、C、D、E 5 组,每组 8 孔,A 组为空白对照组不加药,B、C、D 为实验组,加入的淫羊藿苷终浓度分别为 10⁻⁷ mol·L⁻¹、10⁻⁶ mol·L⁻¹、10⁻⁵ mol·L⁻¹,E 组作为阳性对照组,加入 17 β -雌二醇,终浓度为 10⁻⁷ mol·L⁻¹。

1.7 破骨细胞的鉴定

1.7.1 活体细胞的观察:用倒置相差显微镜动态观察培养细胞的形态及生长情况。

1.7.2 HE 染色:培养第 6、9 天,取出盖玻片,10% 甲醛固定,HE 染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.7.3 TRAP 染色:培养第 6、9 天,取出盖玻片,用抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒,按说明书操作,进行 TRAP 染色。

1.7.4 降钙素受体染色:培养第 6、9 天,取出盖玻片,4% 多聚甲醛固定 15 min,根据免疫组织化学试剂盒要求染色。

1.8 破骨细胞计数

以 TRAP 染色阳性,细胞核 ≥ 3 个的细胞为破骨细胞,分别于培养第 6、9 天对整张盖玻片上的破骨细胞进行计数(100 倍光镜下),每次每组计数 3 张玻片,取均数,结果以细胞数/玻片表示。

1.9 骨吸收陷窝计数和面积测量

分别于培养第 11 天、14 天每组取出 3 片骨片,用 2.5% 戊二醛固定液固定 7 min,0.25 mol·L⁻¹ 氢氧化氨中超声清洗 5 min × 3 次,系列酒精脱水,自然晾干,1% 甲苯胺蓝染液室温染色 3~4 min,蒸馏水清洗后光镜下观察。光镜 100 倍下对整张骨片作陷窝计数,同时采集每张骨片的骨吸收陷窝图像,骨吸收面积用 Image Pro Plus 软件(美国 Media Cybernetics 公司)分析。以上所得数据均取均值,结果以陷窝数/骨片表示。

1.10 统计学处理

实验所得数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行处理,进行独立 t 检验和多组间单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 活体细胞的观察

细胞培养 2 天内,各组均为排列紧密均匀的小圆形细胞(图 1)。第 3 天细胞开始分化,空白对照组出现较多的大圆形单个核细胞及长梭形细胞;实验组和阳性对照组大圆形单个核细胞相对较少,体积也较空白对照组小,长梭形细胞相对较多。培养第 4、5 天空白对照组大圆形细胞数目明显增多,以两个核细胞为主,并开始出现圆形或不规则形的 3 个核及多核细胞;实验组和阳性对照组大圆形细胞虽也有增多,但两个核以上细胞较少。培养第 6、7 天,空白对照组多核细胞明显增多;实验组和阳性对照组也有多核细胞出现,但相对较少,以长梭形、多角形的骨髓基质细胞为主(图 2、3)。培养第 9 天,各组多核细胞形成达到高峰,9 天后多核细胞逐渐减少,骨髓基质细胞明显增多。

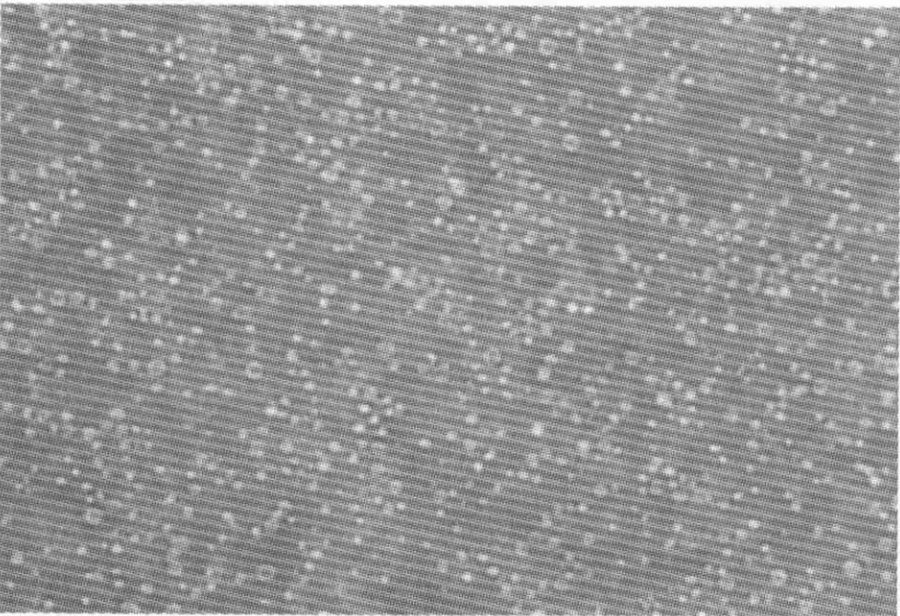


图 1 细胞培养 2 天内,各组均为排列紧密均匀的小圆形细胞(倒置相差显微镜 × 200)

2.2 HE 染色

可见形态不规则的巨大细胞,胞核呈深蓝色,多核,呈圆形、椭圆形,胞浆呈粉红色(图 4)。

2.3 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棕红色沉淀,胞核染色呈阴性,多核(图 5)。

2.4 降钙素受体染色

可见破骨细胞和破骨细胞前体细胞胞体呈棕黄色,核复染为淡蓝色(图 6)。

2.5 骨片甲苯胺蓝染色

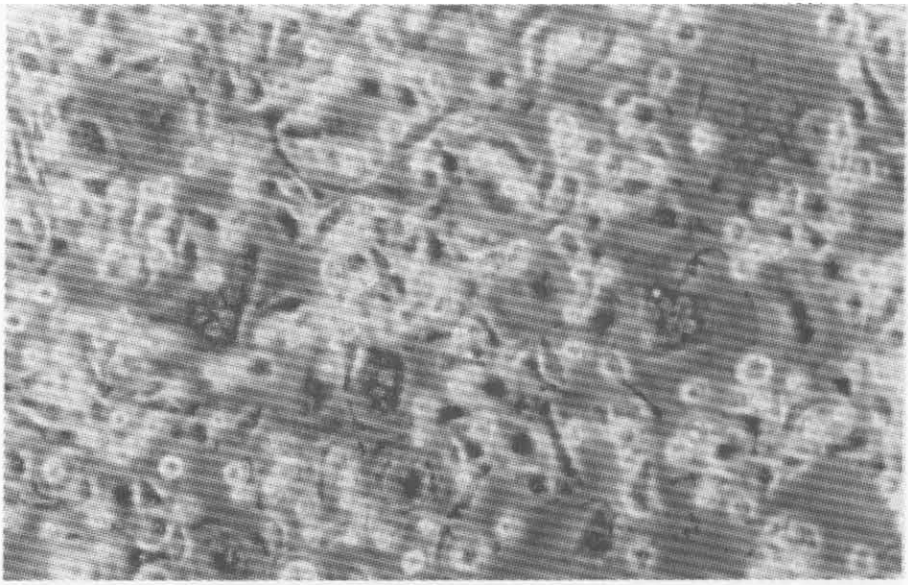


图 2 培养第 6 天空白对照组出现较多多核细胞(倒置相差显微镜 × 200)

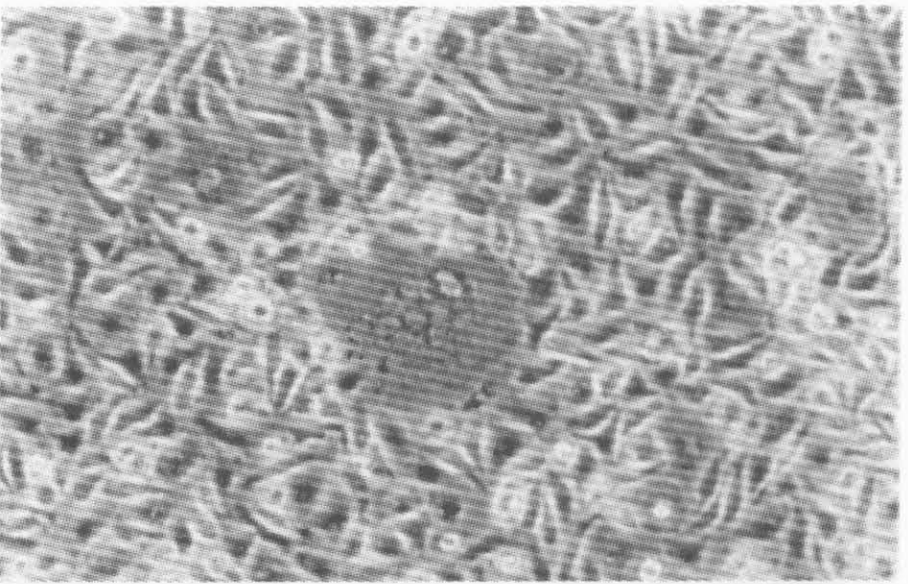


图 3 培养第 6 天 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的淫羊藿苷组与空白对照组比较多核细胞较少,以长梭形、多角形的骨髓基质细胞为主(倒置相差显微镜 × 200)

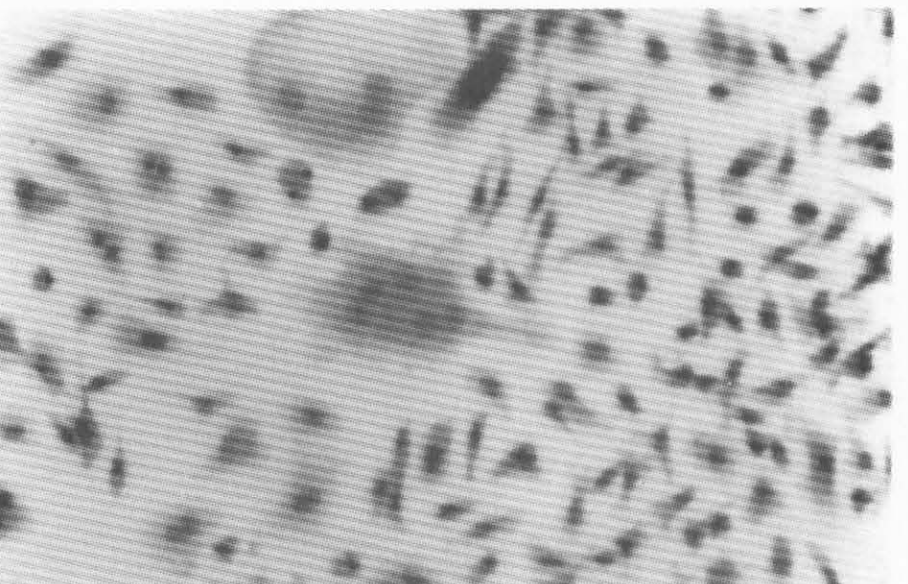


图 4 HE 染色可见形态不规则的巨大细胞,胞核呈深蓝色,多核,胞浆呈粉红色(× 200)

可见骨吸收陷窝呈紫蓝色圆形、椭圆形、腊肠型等多种形态部分连接呈串珠样(图 7、8)。

2.6 破骨细胞计数

各组破骨细胞计数结果见表 1。与 A 组相比,B、C、D 3 组培养第 6 天和 9 天的破骨细胞数目均有减

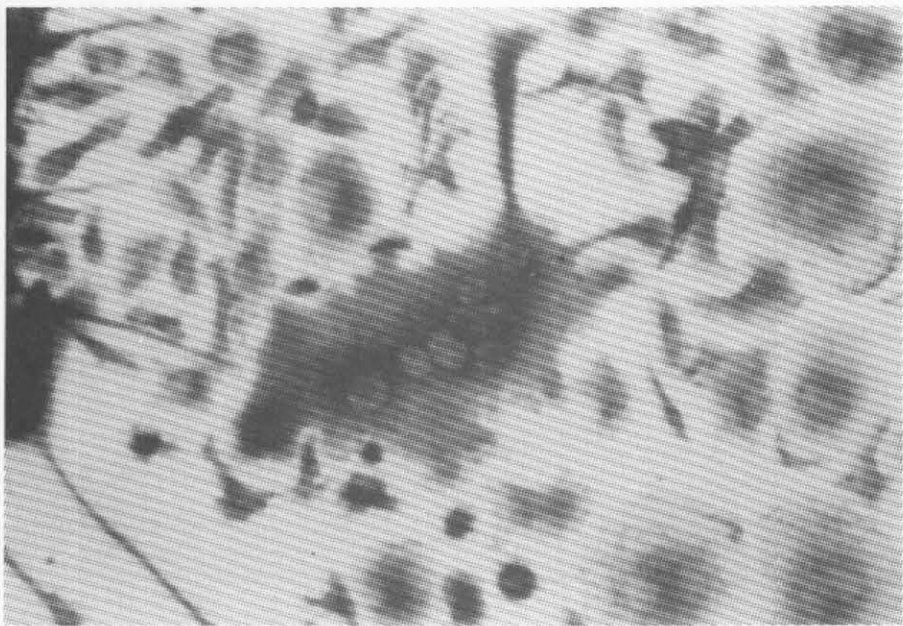


图 5 TRAP 染色可见破骨细胞胞浆内抗酒石酸酸性磷酸酶活性部位形成棕红色沉淀,胞核染色呈阴性,多核(×200)

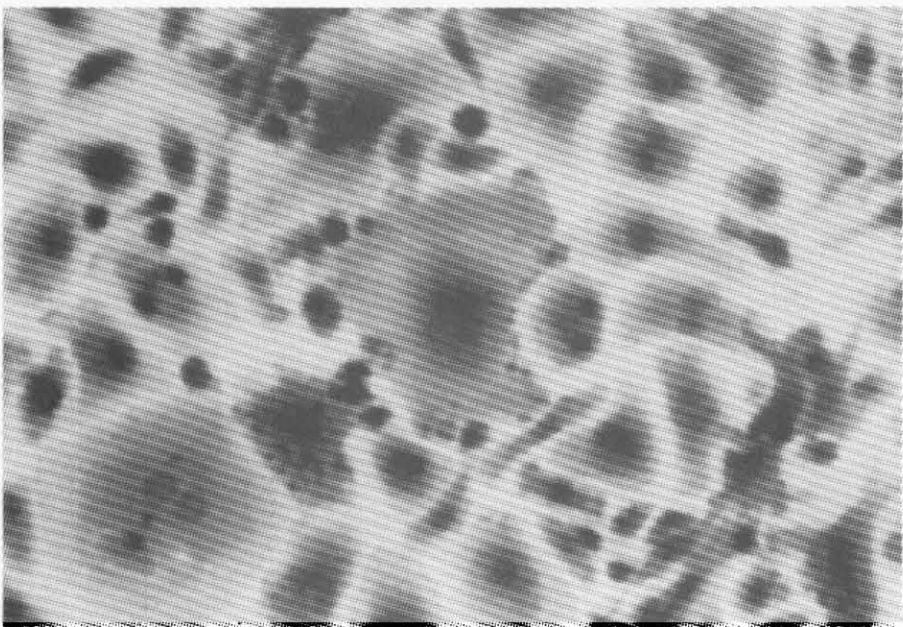


图 6 降钙素受体染色可见破骨细胞和破骨细胞前体细胞胞体呈棕黄色,核复染为淡蓝色(×200)

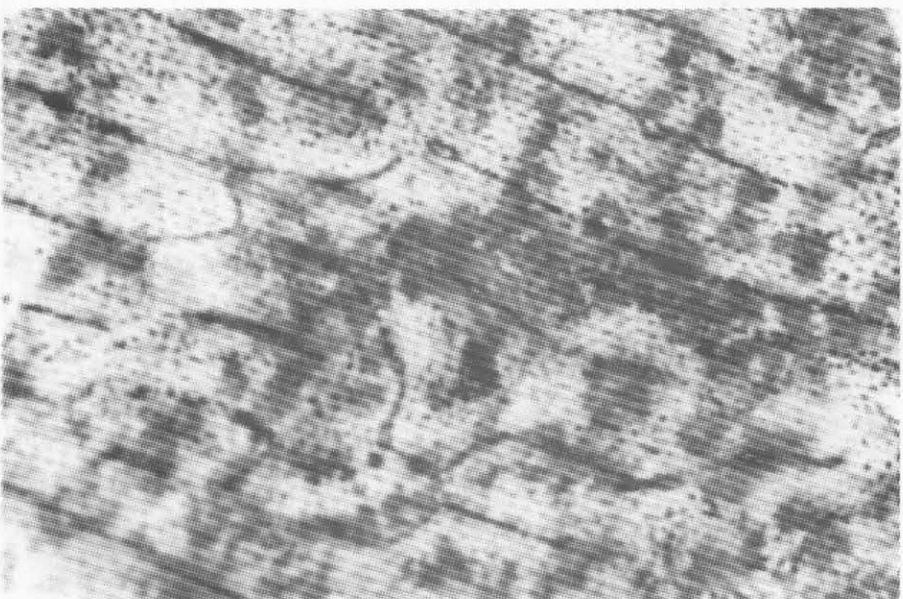


图 7 空白对照组在培养第 14 天形成的骨吸收陷窝(×40)

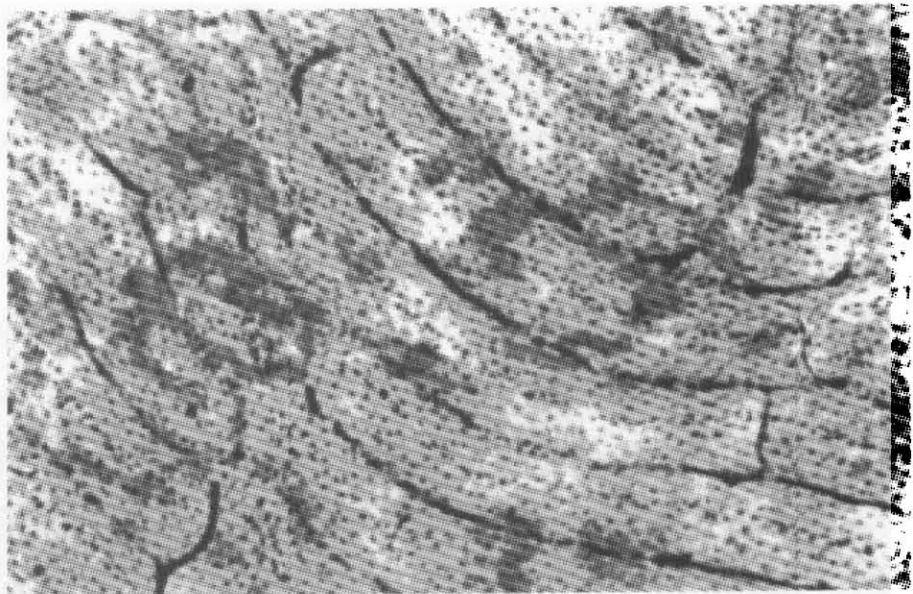


图 8 淫羊藿苷在浓度为 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时培养第 14 天形成的骨吸收陷窝(×40)

天和 14 天的骨吸收陷窝数目、面积均有减少, C、D 2 组与 A 组相比差异有显著性 ($P < 0.05$), B 组骨吸收陷窝数目、面积虽略有减少,但与 A 组相比差异无显著性, B、C、D 3 组之间差异也有统计学意义 ($P < 0.05$), E 组与 A 组相比也有统计学差异 ($P < 0.05$)。

表 1 各组破骨细胞计数结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	第 6 天	第 9 天
A	141.33 ± 23.00	215.67 ± 23.01
B	131.67 ± 15.82	190.33 ± 14.29
C	91.67 ± 10.97	122.00 ± 14.80
D	51.33 ± 11.68	74.67 ± 9.07
E	67.67 ± 8.51	88.33 ± 10.02

注:与 A 组比较,除 B 组外, $P < 0.05$; B、C、D 组间比较 $P < 0.05$

表 2 各组骨磨片上的骨吸收陷窝数及面积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	骨吸收陷窝数		骨吸收陷窝面积(μm^2)	
	11 天	14 天	11 天	14 天
A	94.33 ± 8.02	216.00 ± 19.08	1533.29 ± 291.28	3072.54 ± 647.35
B	83.67 ± 5.51	180.00 ± 22.34	1326.81 ± 212.16	2890.36 ± 1028.47
C	38.00 ± 4.00	75.33 ± 8.32	587.98 ± 186.76	1174.72 ± 482.63
D	21.67 ± 3.51	44.00 ± 8.00	339.52 ± 136.89	592.64 ± 245.12
E	28.67 ± 5.03	64.33 ± 7.51	462.76 ± 171.32	915.08 ± 223.74

注:与 A 组比较,除 B 组外, $P < 0.05$; B、C、D 组间比较 $P < 0.05$

3 讨论

骨髓源性细胞诱导分化破骨细胞的方法由 Burger 等^[3]于 1982 年首次报道,同其他培养方法相比该方法最大特点就是培养环境比较接近体内破骨细胞分化产生的微环境,因此比较适合进行破骨细胞产生过程的药物干预、调控等方面的研究。本实验采用 M-CSF、RANKL 和 $1,25(\text{OH})_2 \text{VitD}_3$ 作为诱导因子,三者都是目前体外诱导培养破骨细胞最常用的诱导因子,许多研究^[4,5]已证实 M-CSF 和 RANKL 是生理情况下破骨细胞产生、分化过程中必需的、真

少,除 B 组外 C、D 2 组与 A 组相比差异均有显著性 ($P < 0.05$), B、C、D 3 组之间差别也有统计学意义 ($P < 0.05$), E 组与 A 组相比也有统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.7 骨吸收陷窝计数和面积测量

如表 2 所示,与 A 组相比, B、C、D 3 组培养第 11

正起作用的因子, RANKL 与 M-CSF 一起可以直接调控破骨细胞的形成和分化, 而不需其他因子参与, $1, 25(\text{OH})_2 \text{VitD}_3$ 也是体内破骨细胞分化成熟的主要激活因子, 研究^[6]显示 $1, 25(\text{OH})_2 \text{VitD}_3$ 可诱导破骨细胞前体细胞分化为成熟的破骨细胞, 其机制可能主要是通过作用于成骨细胞/基质细胞间接诱导破骨细胞的产生。

本实验由小鼠的骨髓细胞诱导产生破骨细胞, 经活体观察和 HE 染色呈典型的破骨细胞形态特征, TRAP 染色和降钙素受体染色呈阳性反应, 能在骨片上形成骨吸收陷窝, 符合公认的破骨细胞鉴定标准^[7]。

本实验结果显示 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的淫羊藿苷组破骨细胞生成数量均明显减少, 与空白对照组相比差异有显著性, 并且具有剂量依赖性, $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的淫羊藿苷组破骨细胞生成数量虽略有减少, 但与非加药组比较差异无显著性, 说明中、高浓度的淫羊藿苷能有效抑制破骨细胞诱导生成, 而低浓度的淫羊藿苷对破骨细胞生成没有明显影响。对于淫羊藿苷抑制破骨细胞诱导生成的作用机制目前还不清楚, 有研究^[8]显示, 淫羊藿苷可下调成骨细胞中 RANKL mRNA 的表达, 而 RANKL 是调节破骨细胞分化、形成的关键因子, 本实验中混有一些成骨细胞和骨髓基质细胞, 因此本研究不能排除淫羊藿苷通过成骨细胞/基质细胞间接抑制破骨细胞诱导生成的可能性, 具体机制还有待于进一步研究。

骨吸收是破骨细胞的主要功能, 体外培养破骨细胞骨吸收功能有多种检测方法, 主要包括: 酶组织化学法、同位素示踪法和骨片上吸收陷窝形态分析法, 酶组织化学法主要是通过测定培养液中抗酒石酸酸性磷酸酶的浓度来间接反映破骨细胞骨吸收功能, 该方法虽操作简单、灵敏度高, 但缺乏直接性、特异性较差; 同位素示踪法要求破骨细胞数量大, 而且具有放射性, 目前已很少应用; 骨片上吸收陷窝形态分析法通过骨吸收陷窝形态观察、计数和面积测量可直接反映破骨细胞的骨吸收能力, 是目前判断体外培养破骨细胞骨吸收功能的主要检测方法^[9]。本实验通过观察不同剂量淫羊藿苷组骨磨片上的骨吸收陷窝数目和面积, 结果 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的淫羊藿苷均能明显抑制破骨细胞骨吸收功能, 并且具有剂量依赖性。 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的淫羊

藿苷对破骨细胞骨吸收功能虽略有抑制作用, 但与空白对照组比较差异无显著性。另外本实验在培养第 9 天破骨细胞诱导产生达到高峰时开始加药, 这样可使各组破骨细胞数量基本一致, 避免早期加药导致各组破骨细胞产生数目不同对骨吸收陷窝数目和面积测定结果的干扰, 使实验结果更具有可比性。关于淫羊藿苷抑制破骨细胞骨吸收功能的作用机制目前还不清楚, 但本研究另有实验显示, 淫羊藿苷可下调体外培养破骨细胞基质金属蛋白酶 MMP-9 mRNA 的表达, 而 MMP-9 是参与破骨细胞骨吸收的重要蛋白酶^[10]。

本研究采用体外诱导培养破骨细胞的方法, 观察到淫羊藿苷具有抑制破骨细胞诱导产生及骨吸收功能的作用, 这将为淫羊藿苷治疗骨质疏松提供新的理论依据。

【参 考 文 献】

- [1] 叶丽卡, 李国秀, 陈妍妍, 等. HPLC 法测定生物样品中淫羊藿苷的浓度. 药物分析杂志, 1998, 18(1): 15.
- [2] 殷晓雪, 陈仲强, 党耕町, 等. 淫羊藿苷对人成骨细胞增殖与分化的影响. 中国中药杂志, 2005, 30(4): 289-291.
- [3] Burger EH, Vander Meer JWM, Vande Gevel JS. *In vitro* formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. J Exp Med, 1982, 156: 1604-1614.
- [4] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature, 1999, 397 (28): 315-323.
- [5] Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, et al. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. J Exp Med, 1993, 178: 1733-1744.
- [6] Qi DY, Perkins SL, Russell RG. Divergent regulation of $1, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 on human bone marrow osteoclastogenesis and myelopoiesis. J Cell Biochem, 1999, 72(3): 387-395.
- [7] Kukita T, McManus LM, Miller M, et al. Osteoclast-like cells formed in long-term human bone marrow cultures express a similar surface phenotype as authentic osteoclast. Lab Invest, 1989, 60: 532.
- [8] 张秀珍, 杨黎娟. 淫羊藿苷对大鼠成骨细胞护骨素、RANKL 表达的影响. 中华内分泌与代谢杂志, 2006, 22(3): 222-225.
- [9] Kanchisa J, Heersche JNM. Osteoclastic bone resorption: *in vitro* analysis of the rate of resorption and migration of individual osteoclasts. Bone, 1988, 9: 73.
- [10] Sakiyama H, Masuda R, Inoue N. Establishment and characterization of macrophage-like cell lines expressing osteoclast-specific markers. J Bone Miner Metab, 2001, 19: 220-227.

(收稿日期: 2006-09-26)