

# 淫羊藿苷抗骨质疏松研究进展

翟远坤 李志锋 程国政 综述 陈克明 审校

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)07-0543-04

摘要: 淫羊藿苷是中草药淫羊藿的主要有效成分之一,近年来对其在细胞水平的抗骨质疏松作用研究日益增多。笔者从骨髓间充质干细胞、成骨细胞和破骨细胞三方面入手,综述了淫羊藿苷抗骨质疏松的研究进展,并提出了今后的研究思路。

关键词: 淫羊藿苷; BMSCs; 成骨细胞; 破骨细胞

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.07.016

**Current status of the anti-osteoporosis mechanism of icariin** ZHAI Yuankun, LI Zhifeng, CHENG Guozheng, et al. College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, PLA General Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730050, China

**Abstract:** Icariin is the main component of Chinese traditional medicine-epimedium brevicornum. In recent years there have been a lot of research on the anti-osteoporosis mechanism of icariin in cell level. In this article, the current status of the anti-osteoporosis mechanism of icariin was reviewed, all these are based on three aspects, BMSCs, osteoblast and osteoclast. This article may provide a thread for our future research.

**Key words:** Icariin; BMSCs; Osteoblast; Osteoclast

淫羊藿是中医治疗骨质疏松方剂中使用频率最高的中草药之一,对其抗骨质疏松活性和有效成分的研究是近二十多年来国内骨质疏松研究领域的一个热点<sup>[1,2]</sup>。大量抗骨质疏松动物实验研究表明,淫羊藿水提液和总黄酮提取物均具有抗骨质疏松活性<sup>[3-5]</sup>,但更进一步的单体活性成分研究则尚无令人信服的结论。淫羊藿苷(Icariin, ICA)是淫羊藿中含量最为丰富的黄酮苷类化合物,可以改善心脑血管系统功能、增强机体免疫力及调节内分泌,同时还具有抗肿瘤、抗肝毒、抗缺氧/再灌注等作用<sup>[6]</sup>。我国有着丰富的中药资源,如能应用现代提取分离技术将其分离纯化,从中发现抗骨质疏松新药,对人类将是一大贡献。鲍加荣等<sup>[7]</sup>曾报道淫羊藿苷单体能增强去卵巢骨质疏松大鼠抗外力冲击的能力,可有效抑制骨量丢失,防止骨质疏松的发生。但作者再无后续报道,也无其他作者发表类似文章支持此研究结果。然而近年来不断有人报道淫羊藿苷影响骨髓

间充质干细胞、成骨细胞和破骨细胞的增殖、分化和功能等,从而提示淫羊藿苷确与淫羊藿的抗骨质疏松活性密切相关,具有开发为抗骨质疏松新药的潜力。笔者就这方面的研究进展做一综述。

## 1 淫羊藿苷对 BMSCs 成骨性分化的影响

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)在人类胚胎和新生儿期的含量极为丰富,且主要分化为成骨细胞,几乎不分化为脂肪细胞,随着年龄的增长, BMSCs 逐渐转为较多分化成脂肪细胞,而较少分化为成骨细胞,至老年时,脂肪细胞可占据髓腔容积的 90% 以上,此时骨质疏松症的发病率也达到了顶峰,由此人们认识到,骨质疏松症的发生与 BMSCs 的成骨性分化能力有密切关系<sup>[8,9]</sup>。陈克明等<sup>[10]</sup>研究了不同浓度淫羊藿苷对体外培养大鼠 BMSCs 成骨性分化的影响,发现淫羊藿苷可强烈促进 BMSCs 的成骨性分化,表现在可显著提高碱性磷酸酶的活性,促进骨钙素的表达和钙盐沉积。这种作用在淫羊藿苷浓度为 10 μmol/L 时最强,可以达到对照组的 4 倍左右。刘海江等<sup>[11]</sup>以 BMP-2 为阳性对照,研究了淫羊藿苷对犬 BMSCs 增殖分化的影响,发现淫羊藿苷可促进 BMSCs 的增殖

作者单位: 730050 兰州,兰州理工大学生命科学与工程学院  
(翟远坤、李志锋、程国政),兰州军区总医院骨科研究所(陈克明)

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

和分化,在促进增殖方面的效果优于 BMP-2,在成骨性分化方面,可促进 ALP 的表达。Sheng 等<sup>[12]</sup>研究了淫羊藿苷对 BMSCs 增殖、成骨和成脂能力的影响,发现淫羊藿苷可以增强 ALP 的活性和骨钙素的表达,促进 BMSCs 向成骨细胞分化。同时淫羊藿苷降低脂蛋白脂酶以及脂肪细胞脂肪酸结合蛋白的表达量,脂滴的数目也明显减少,抑制 BMSCs 向脂肪细胞转化。

## 2 淫羊藿苷对成骨细胞(OB)的影响

殷晓雪等<sup>[13]</sup>发现,浓度为 5、10  $\mu\text{g/ml}$  的淫羊藿苷对成骨细胞的增殖没有显著影响,40  $\mu\text{g/ml}$  时对成骨细胞的增殖有一定的抑制作用,而浓度为 20  $\mu\text{g/ml}$  时能够显著促进成骨细胞的增殖和分化,使 BMP-2 mRNA 的表达量明显提高。蔡曼玲等<sup>[14]</sup>报道 0.1 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  的淫羊藿苷能够显著促进成骨细胞的增殖,并增加细胞基质钙的分泌,而浓度为 0.1 ~ 1  $\mu\text{mol/L}$  时能显著增加钙化结节的数量。雪原等<sup>[15]</sup>研究发现淫羊藿苷可刺激成骨细胞的增殖与分化,刺激成骨细胞 I 型胶原的分泌,并可提高 ALP 的活性,促进骨形成,起到健骨的作用。王俊勤等<sup>[16]</sup>发现不同浓度的淫羊藿苷对成骨细胞的生长增殖均有促进作用,但浓度为 10  $\text{ng/ml}$  时作用最为显著,同时还发现淫羊藿苷对成骨细胞的影响与药物作用时间有关,对分化早期成骨细胞的 ALP 活性具有抑制作用,对分化晚期成骨细胞的 ALP 活性却具有促进作用。但也有学者得出相反的结论。胡云峰等<sup>[17]</sup>研究了淫羊藿苷对鸡胚成骨细胞增殖和分化的影响,发现浓度为 20  $\text{ng/ml}$  的淫羊藿苷可以成骨细胞的分化,但对成骨细胞的增殖并无显著影响。王晓青等<sup>[18]</sup>报道,淫羊藿苷对新生大鼠颅骨原代细胞的增殖无促进作用,在  $10^{-8}$  ~  $10^{-6}$   $\text{mol/L}$  的浓度范围内对 ALP 的活性还有一定的抑制作用,这种抑制作用随药物作用时间的延长及浓度的提高而有所增加。陈克明等<sup>[19]</sup>报道,尽管  $10^{-5}$   $\text{mmol/L}$  的淫羊藿苷可以促进 BMSCs 的成骨性分化,但对成骨细胞的增殖分化并无明显影响。刘素彩等<sup>[20]</sup>也认为淫羊藿苷对成骨细胞的增殖并无明显作用。

## 3 淫羊藿苷对破骨细胞的影响

陈克明等<sup>[21]</sup>报道淫羊藿苷可以显著减少体外培养小鼠骨髓中由 RANKL 和 M-CSF 诱导生成的破骨细胞数量。Huang 等<sup>[22]</sup>的研究也表明,淫羊藿苷可抑制 M-CSF/RANKL 诱导的破骨细胞祖细胞分化

为破骨细胞,认为破骨细胞祖细胞可能是淫羊藿苷发挥这一作用的靶细胞。吕明波等<sup>[23]</sup>发现,淫羊藿苷可以明显降低体外培养成熟破骨细胞的骨吸收活性,表现在培养基中含有淫羊藿苷时,破骨细胞形成的骨陷窝数明显减少。张大威等<sup>[24]</sup>研究了不同浓度的淫羊藿苷对破骨细胞的影响,发现 10、50、100  $\mu\text{mol/L}$  的淫羊藿苷均可明显降低骨吸收陷窝数目和表面积,表明淫羊藿苷具有抑制破骨细胞的分化及骨吸收的作用。Xie 等<sup>[25]</sup>报道,淫羊藿苷可以促进成骨细胞 OPG 的分泌,同时抑制 RANKL 的表达,从而改变 RANKL 与 OPG 的相对比例,降低破骨细胞的活性,发挥抑制骨吸收的作用。

## 4 淫羊藿苷的作用机理

### 4.1 淫羊藿苷的雌激素样作用

许多作者认为淫羊藿苷及其体内代谢物是以雌激素样作用发挥抗骨质疏松作用。邱峰等<sup>[26]</sup>报道,淫羊藿苷经口服后产生的主要代谢物为淫羊藿素和淫羊藿次苷 II,这与 Xu 等<sup>[27]</sup>的研究结果相似。淫羊藿素和淫羊藿次苷 II 均可提高 ALP 的活性、促进 OC、I 型胶原的分泌并增加 OPG 的 mRNA 表达量,而且淫羊藿素在增强 ALP 活性和促进 OC 表达方面甚至要优于金雀异黄素,这些促进作用均可被雌激素受体阻断剂 ICI 182,780 所抑制<sup>[22]</sup>。叶海涌等<sup>[28,29]</sup>发现淫羊藿素和淫羊藿苷的另一代谢物—去甲基淫羊藿素均可促进雌激素受体的表达,而淫羊藿苷没有这种效果,在体外培养的 MCF-7 细胞系中淫羊藿苷也不显示雌激素样作用。Wang 等<sup>[30]</sup>研究报道,淫羊藿素和去甲基淫羊藿素可以强烈的刺激 MCF-7/BUS 细胞的增殖。它们对细胞周期的影响与雌激素相似。用淫羊藿素和去甲基淫羊藿素对细胞进行干预 24h 后,发现雌激素受体调节剂-孕激素受体和早老素 X(PS2) mRNA 水平升高,这些影响都可以被 ICI 182,780 所抑制。可见,淫羊藿素和去甲基淫羊藿素应是通过雌激素样作用发挥其功能的。

### 4.2 淫羊藿苷对 BMP-2 的影响

BMP-2 在体内能诱导骨形成,对人骨髓间充质干细胞有强烈的骨诱导活性,而且能促进成骨细胞的成熟<sup>[31]</sup>。BMP-2 在促进 hBMSCs 成骨性分化的同时,还可抑制其向其他细胞(如脂肪细胞和肌肉细胞)转化,淫羊藿苷也具有这种效果,可抑制 MSCs 向脂肪细胞转化<sup>[32]</sup>。柯勇等<sup>[33]</sup>使用 10、20、40  $\text{ng/ml}$  等不同浓度的淫羊藿苷作用于成骨细胞,Western Blotting 法检测 BMP-2 的含量,发现淫羊藿苷可以明

显促进 BMP-2 的表达,以 20 ng/ml 时的效果最为显著。克明等<sup>[34]</sup>研究发现,淫羊藿苷可以强烈促进原代培养 rBMSCs 的成骨性分化,实时荧光定量 PCR 分析各种标志蛋白和细胞因子的基因表达水平,发现 BMP-2 的表达水平有极显著提高。Zhao 等<sup>[35]</sup>也报道,淫羊藿苷在促进成骨细胞的增殖的同时刺激骨形态发生蛋白(BMP-2、BMP-4)的表达。

## 5 小结

综上所述,淫羊藿苷不仅可以促进骨形成,而且可以抑制骨吸收,从而以双重活性发挥抗骨质疏松作用。虽然关于淫羊藿苷抗骨质疏松的细胞实验已有较多报道,但相关药理活性的动物实验仅有鲍加荣一篇文献,此后再无类似报道,淫羊藿苷是否就是淫羊藿中抗骨质疏松的单体有效成分,在动物实验方面还缺乏令人信服的证据。

目前淫羊藿苷作用于细胞的确切机理尚不清楚,未来的研究可以采用动物实验与细胞及分子水平研究相结合的思路。我国有着丰富的中药资源,其中不乏强筋健骨类的中草药,这些中草药中含有大量促进骨形成或抑制骨吸收的有效成分,应用现代提取分离技术将其分离纯化,然后进行细胞水平的筛选,并通过分子生物学分析,得到先导化合物,此应是开发抗骨质疏松新药的有效途径之一。相信在不久的将来,源于传统中药的抗骨质疏松活性成分将会不断涌现,简单有效并且廉价的新型药物也会备受患者欢迎。

## 【参 考 文 献】

- [1] Wu MS, Li E, Zhao SZ, et al. Meridian tropism of prescription for tonifying kidney and the expression of signal transduction protein Smad 4 in target organs following experimental osteoporosis. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2007, 11 (45): 9095-9099 (in Chinese).
- [2] Xu Bilian, Wu Tie, Cui L, et al. The effects of epimedium pubescens flavonoids combined with diethylstilbestrol on ovariectomy induced osteopenia in rats. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2004, 20(2): 218-219 (in Chinese).
- [3] Ye Chun, Su Jin, Wang F, et al. Preventive effect of Epimedium on osteoporosis of ovariectomized rats. *Chinese Journal of Clinical Anatomy*, 2008, 26(1): 87-90 (in Chinese).
- [4] Chen Keming, Ge Baofeng, Ma MP, et al. Inhibitory effect of total flavonoid extract of Epimedium sagittatum on rat osteoporosis induced by ovariectomy. *Chinese Journal of clinical Rehabilitation*, 2004, 8 (26): 5681-5683 (in Chinese).
- [5] Ma HP, Jia ZP, Ge X, et al. Studies on the therapeutic effect on total flavonoids of Herba Epimedii on experimental osteoporosis in

rats. *West China Journal of Pharmacy*, 2002, 17(3): 163-167 (in Chinese).

- [6] Di Kaijun, Zhang Jingbo. An Outline of Icarin Pharmacological Study. *Ziran Zazhi*, 2003, 25(4): 19 (in Chinese).
- [7] BAO Jiarong, YANG Jiwen, Li SF, et al. Effects of Icarin on ovariectomized osteoporotic Rats. *Journal of Hygiene research*, 2005, 34(2): 191-193 (in Chinese).
- [8] Song Chunli, Dang Gengding. Adipocyte in marrow cavity and osteoporosis. *Chinese Journal of osteoporosis*, 2002, 8(3): 266-269 (in Chinese).
- [9] Justesen J, Stenderup K. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int*, 2002, 71(1): 36-44.
- [10] Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. Icarin, a flavonoid from the herb Epimedium enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells. *Pharmazie*, 2005, 60(12): 939-941.
- [11] Liu Haijiang, Wang Xiaoping, Lin J, et al. The Effect of Icarin and Astragaloside I on the Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. *Zhong Yao Cai*, 2006, 29(10): 1062-1065 (in Chinese).
- [12] Sheng Hui, Zhang Ge, Qin L, et al. Phytochemical molecule icaritin stimulates osteogenic but inhibits adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Bone*, 2008, 43: S42-S43.
- [13] Yin Xiaoxue, Chen Zhongqiang, Dang GT, et al. Effects of epimedium pubescens icaritin on proliferation and differentiation of human osteoblasts. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, 30 (4): 289-291 (in Chinese).
- [14] Cai Manling, Ji Hui, Li P, et al. Effects of five flavonoids isolated from Epimedium pubescens on osteoblasts *in vitro*. *Chin J Nat Med*, 2004, 10(4): 235-237 (in Chinese).
- [15] Xue Yuan, Wang Pei, Qi QH, et al. The experiment study of the effects of icaritin on increasing Smad 4 mRNA level in MC3T3-E1 cell *in vitro*. *Chin J Orthop*, 2005, 25(2): 119-121 (in Chinese).
- [16] Wang Junqin, Hu Yougu, Zheng HJ, et al. The effect of icaritin on proliferation and differentiation of osteoblasts *in vitro*. *Chinese Journal of clinical Rehabilitation*, 2002, 6(9): 1307-1308 (in Chinese).
- [17] Hu Yunfeng, Hou Jiafa, Deng YF, et al. Effects of icaritin on Proliferation and Differentiation of Osteoblasts from Chicken Embryo. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(3): 43-46 (in Chinese).
- [18] Wang Xiaoqing, Wen Fen, Hu LR, et al. Effect of icaritin, diosgenin and genistein on proliferation and differentiation of newborn rat skull cells *in vitro*. *China Journal of Modern Medicine*, 2005, 15(21): 3242-3243 (in Chinese).
- [19] Chen KM, Ma HP, Ge BF, et al. Icarin enhances the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells but has no effects on the differentiation of newborn calvarial osteoblasts of rats. *Pharmazie*, 2007, 62(10): 785-788.
- [20] Liu Sucai, Kong Dejuan, Zhao JS, et al. Effects of Icarin on the Proliferation and Differentiation of Osteoblasts. *Chinese J Basic Med TCM*, 2001, 17(8): 28-30 (in Chinese).

- [ 21 ] Chen KM , Ge BF , Liu XY . Icarin inhibits the osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor in mouse bone marrow culture . *Pharmazie* , 2006 , 61 ( 5 ) : 388-391 .
- [ 22 ] Huang Jian , Yuan Lan , Wang X , et al . Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic , but suppress osteoclastic , differentiation and activity *in vitro* . *Life Sciences* 2007 , 81 : 832-840 .
- [ 23 ] Lv Mingbo , Liu Xingyan , Ge BF , et al . Effects of Icarin on inducing osteoclast formation and bone resorption in mouse bone marrow culture . *Chin J Osteoporos* , 2007 , 13 ( 15 ) : 315-319 ( in Chinese ) .
- [ 24 ] Zhang Dawei , Cheng Yan , Zhang JC , et al . Effects of icaritin on the differentiation and Bone-resorption function of osteoclasts . *Chinese Pharmacological Bulletin* 2007 , 28 ( 4 ) : 463-467 ( in Chinese ) .
- [ 25 ] Xie F , Wu CF , Lai WP , et al . The osteoprotective effect of *Herba epimedii* extract *in vivo* and *in vitro* . *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2005 , 2 : 353-361 .
- [ 26 ] Qiu F , Chen YJ , Kano YH , et al . Metabolism of Orally Administered Icarin in Rats . *Acta Pharmaceutica Sinica* , 1999 , 20 ( 3 ) : 222-226 ( in Chinese ) .
- [ 27 ] Xu Wen , Zhang Yaping , Yang M , et al . LC-MS/MS method for the simultaneous determination of icaritin and its major metabolites in rat plasma . *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007 , 45 : 667-672 .
- [ 28 ] Ye HY , Lou YJ . Estrogenic effects of two derivatives of icaritin on human breast cancer MCF-7 cells . *Phytomedicine* , 2005 , 12 : 735-741 .
- [ 29 ] YE Haiyong , LIU Jian , Lou YJ , et al . Preparation of two derivatives from icaritin and investigation of their estrogen-like effects . *Journal of Zhejiang University ( Medical Sciences )* , 2005 , 34 ( 2 ) : 131-135 ( in Chinese ) .
- [ 30 ] Wang Zhiqiang , Lou YJ . Proliferation-stimulating effects of icaritin and desmethylicaritin in MCF-7 cells . *European Journal of Pharmacology* 2004 , 504 : 147-153 .
- [ 31 ] Troen BR . Molecular mechanisms underlying osteoblast formation and activation . *Exp Gerontol* 2003 , 38 ( 6 ) : 605-614 .
- [ 32 ] Dang Z , Lowik CW . The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis . *Bone Miner Research* 2004 , 19 ( 5 ) : 853-861 .
- [ 33 ] KE Yong , ZHANG Gongli , Yu ZH , et al . Effects of Icarin on the Expression of Bone Morphogenetic Protein-2 in Osteoblasts . *Journal of Yunnan Medical College* 2008 , 27 ( 3 ) : 202-208 ( in Chinese ) .
- [ 34 ] Chen Keming , Ge Baofeng , Ma HP , et al . Effects of icaritin on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* . *Chin J Osteoporos* 2008 , 14 ( 9 ) : 642-645 ( in Chinese ) .
- [ 35 ] Zhao Jiyan , Shinsuke Ohba , Masashige Shinkai , et al . Icarin induces osteogenic differentiation *in vitro* in a BMP- and Runx2-dependent manner , *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008 , 369 : 444-448 .