

橄榄苦苷对破骨细胞增殖影响的实验研究

高梦颖¹ 黄惠娟^{2*} 谢树红¹

1. 南京军区福州总医院, 福建 福州 350000

2. 厦门大学附属东方医院, 福建 福州 350025

中图分类号: R915 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 07-0896-04

摘要: 目的 探讨橄榄苦苷不同药物浓度及不同作用时间对破骨细胞增殖的影响。方法 破骨细胞的制备, 采用 sRANKL 与 M-CSF 诱导小鼠单核细胞 RAW264.7 细胞获得破骨细胞。设置实验组: 4 组分别加入 400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷, 另设空白对照组。运用抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒进行破骨细胞 TRAP 染色鉴定, 并采用 Cell Counting Kit 法 (CCK 法) 检测应用不同浓度橄榄苦苷及不同作用时间抑制破骨细胞增殖的情况。结果 与空白对照组比较, 400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷对破骨细胞的增殖均具有明显抑制作用。当药物作用时间为 24 h 及 72 h 时, 400 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷对破骨细胞增殖的抑制作用最强, 当药物作用时间为 48 h 时, 200 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷对破骨细胞增殖的抑制作用最强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 50 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷对破骨细胞的增殖无明显抑制作用, 差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 橄榄苦苷可能通过破坏破骨细胞细胞膜的完整性抑制破骨细胞的增殖。

关键词: 橄榄苦苷; 破骨细胞; 细胞增殖

Effect of oleuropein on the proliferation of osteoclasts

GAO Mengying¹, HUANG Huijuan^{2*}, XIE Shuhong¹

1. Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350000

2. Dongfang Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350025, China

Corresponding author: HUANG Huijuan, Email: hhj352@163.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of different solubility and different time of oleuropein on the proliferation of osteoclasts. **Methods** RAW264.7 cells were induced by sRANKL and M-CSF to osteoclasts. Oleuropein of 400, 200, 100, and 50 $\mu\text{g/mL}$ was administered to the experimental groups, respectively. A blank control group was set. Osteoclasts were identified with tartrate-resistant acid phosphate staining. The proliferation of osteoclasts inhibited by different solubility and different time of oleuropein was tested with Cell Counting Kit (CCK) method. **Results** Compared to the control group, the proliferation of osteoclasts was significantly inhibited by oleuropein at concentrations of 400, 200, and 100 $\mu\text{g/mL}$. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). At 24 h and 72 h of the treatment, the inhibiting effect of proliferation was the most obvious with 400 $\mu\text{g/mL}$ of oleuropein. At 48 h of the treatment, the inhibiting effect of proliferation was the most obvious with 200 $\mu\text{g/mL}$ of oleuropein. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The proliferation of osteoclasts was not inhibited by oleuropein at concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$. The difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Oleuropein can inhibit the proliferation of osteoclasts by destroying the integrity of cell membrane.

Key words: Oleuropein; Osteoclasts; Cell proliferation

卵巢癌是妇科三大恶性肿瘤之首, 其临床病理种类繁多, 恶性程度高, 且具有起病隐匿、癌细胞扩散快速、手术及化疗药物疗效不尽人意等特点, 严重威胁着女性健康及生存质量。据统计, 每年全球约有 20 万人患上卵巢癌, 其中 12.5 万人死于此病^[1]。

根据最新国际癌症研究中心公布的“2015 年全球癌症数据库”(GLOBOCAN 2015)^[2] 资料显示, 卵巢癌引起的死亡率占女性肿瘤的 5%, 死亡率居妇科恶性肿瘤首位。卵巢癌患者术后因体内雌激素水平急剧下降, 骨质疏松及骨折等并发症的发病率亦随之增高。骨质疏松症是以骨量降低和骨组织微结构破坏为特征, 导致骨质疏松性增加和易于骨折的一种代谢

* 通讯作者: 黄惠娟, Email: hhj352@163.com

性全身性病。立足于前期实验结果,橄榄苦苷可通过提高大鼠的骨密度来防止骨量的流失,达到延缓或防治骨质疏松的目的,此结果亦在防治绝经后妇女骨质疏松的临床研究中得到证实^[3-4]。但是橄榄苦苷是否与破骨细胞的增殖凋亡有关,目前国内尚没有相关的文献报道。本研究采用 400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$ 的橄榄苦苷作为药物刺激因子,观察不同时间及不同浓度橄榄苦苷对体外诱导的破骨细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

小鼠单核细胞 RAW264.7 细胞株由福建中医药大学基础医学细胞中心提供;小鼠重组可溶性核因子 KB 活因子受体配体 (sRANKL, Peprotech 公司)、小鼠巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF, Peprotech 公司)、橄榄苦苷 (购于 Funakoshi, Tokyo, Japan);抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒 (南京建成生物公司)、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (南京建成生物公司)、Cell Counting Kit-8 试剂盒 (GENVIEW 公司);高糖 DMEM 培养基 (HyClone 公司)、10% 胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司)、磷酸盐缓冲液 (PBS, HyClone 公司);25 cm^2 培养瓶、15 mL、50 mL 离心管 (HyClone 公司)。

1.2 方法

1.2.1 盖玻片处理:用玻璃刀把盖玻片割成 1 cm $\times$ 1 cm 大小,浓酸浸泡过夜,自来水冲洗 10 min,蒸馏水冲洗 3 min,然后浸泡于无水乙醇中 2 h 脱脂,用镊子取出在超净台中晾干,用前高压灭菌。

1.2.2 破骨细胞诱导:将装有 RAW264.7 细胞的冻存管从液氮罐中取出,迅速投入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,800 r/min 离心 5 min,弃上清,以含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基重悬后,接种到 24 孔板中的预置无菌玻片上,细胞接种密度 2×10^4 个/ cm^2 ;12 h 待细胞贴壁后,换为含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基 (含 50 ng/mL sRANKL 和 30 ng/mL M-CSF),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次。诱导 6 d 后倒置相差显微镜观察细胞的形态特征。

1.2.3 破骨细胞鉴定:抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色:避光配制 TRAP 孵育液,并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中加热 10 min。在玻片上培养 6 d 的破骨细胞经 PBS 清洗后,加固定液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中固定 25 min, PBS 冲洗 2 次,加入配制好的孵育液内,将玻片放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中避光孵育 1 h,然后用苏木素复

染 3 min, PBS 冲洗 1 次,在倒置相差显微镜下观察及拍片。

1.2.4 CCK8 法测定细胞增殖:将诱导成功的破骨细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板,用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液培养 12 h 后,第 2 天吸去培养液后,加入含有不同浓度橄榄苦苷 (400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$) 的高糖 DMEM 培养液 200 μL 继续分别培养 24 h、48 h、72 h,用 CCK8 法测定破骨细胞 OD 值。

1.2.5 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性测定:LDH 作为一种酶,参与机体能量代谢的各个环节。通过检测细胞内环境和细胞外环境中 LDH 的含量,可以评价细胞膜完整性。将诱导成功的破骨细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板,用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液培养 24 h 后,第 2 天吸去培养液后,加入含有不同浓度橄榄苦苷 (400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$) 的高糖 DMEM 培养液 200 μL 继续培养 48 h,收集细胞培养上清液,根据 LDH 检测试剂盒说明书进行 LDH 活性测定。

2 结果

2.1 破骨细胞的鉴定

经 50 ng/mL sRANKL 和 30 ng/mL M-CSF 诱导 6 d 后,RAW264.7 细胞被诱导成为圆形、椭圆形、水煎蛋型等多形态的多核细胞,倒置相差显微镜下可见细胞周围有伪足。经 TRAP 染色后,高倍镜下观察见细胞呈鲜红色样,有多个细胞核,细胞核不着色,可见核仁,胞浆内富含深红色酸性磷酸酶颗粒。见图 1。

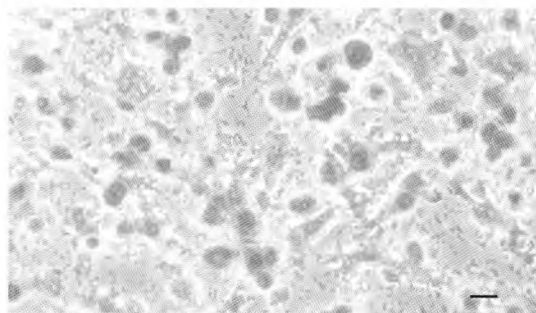


图 1 TRAP 染色结果,染色阳性且细胞核在 3 个以上者即为破骨细胞,图中线条长度为 100 μm

Fig. 1 Result of TRAP staining. Cells with positive staining and 3 or more nucleus are osteoclasts. The bar length is 100 μm

2.2 橄榄苦苷对破骨细胞增殖的影响

2.2.1 24 h 不同浓度橄榄苦苷对破骨细胞的影响:

与空白对照组 (Control, Con) 比较, 400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷对破骨细胞的增殖具有抑制作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 50 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷对破骨细胞的增殖无明显抑制作用, 差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 其中橄榄苦苷浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时对破骨细胞的增殖抑制作用最强 (具体数据及抑制趋势图见图 2)。

2.2.2 48 h 不同浓度橄榄苦苷对破骨细胞的影响: 与空白对照组比较, 400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷对破骨细胞的增殖均具有抑制作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中橄榄苦苷浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时对破骨细胞的增殖抑制作用最强 (具体数据及抑制趋势图见图 2)。

2.2.3 72 h 不同浓度橄榄苦苷对破骨细胞的影响: 与空白对照组比较, 400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷对破骨细胞的增殖具有抑制作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 50 $\mu\text{g/mL}$ 的橄榄苦苷对破骨细胞的增殖无明显抑制作用, 差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 其中橄榄苦苷浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时对破骨细胞的增殖抑制作用最强 (具体数据及抑制趋势图见图 2)。

2.2.4 不同时间点及不同浓度对破骨细胞增殖情况的整体影响: 与空白对照组比较, 在不同时间点中 400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷对破骨细胞的增殖均具有抑制作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 50 $\mu\text{g/mL}$ 的橄榄苦苷只在药物作用 48 h 对破骨细胞的增殖具有抑制作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 药物作用时间为 24 h 及 72 h 时, 抑制增殖作用均不明显, 差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。当药物作用时间为 24 h 及 72 h 时, 橄榄苦苷浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时对破骨细胞的增殖抑制作用最强 ($P < 0.05$); 当药物作用时间为 48 h 时, 橄榄苦苷浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时对破骨细胞的增殖抑制作用最强 ($P < 0.05$); 同一浓度中, 随着药物作用时间的延长, 橄榄苦苷对破骨细胞增殖的抑制作用也增强 ($P < 0.05$) (具体变化趋势见图 2)。

2.3 橄榄苦苷对破骨细胞膜完整性及活性的影响

与空白对照组比较, 在加入 400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$ 橄榄苦苷作用于破骨细胞 48 h 后, 其释放到细胞外环境中的 LDH 酶活性分别为空白组 149.35%、50 $\mu\text{g/mL}$ 153.38%、100 $\mu\text{g/mL}$ 155.84%、200 $\mu\text{g/mL}$ 192.14%、400 $\mu\text{g/mL}$

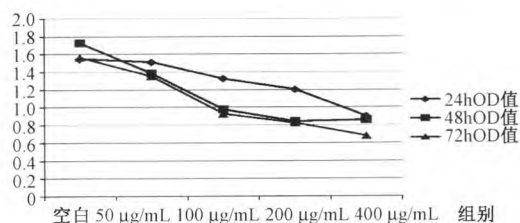


图 2 不同浓度橄榄苦苷不同时间对破骨细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of oleuropein with different solubility and different time on the proliferation of osteoclasts

254.27% ($P < 0.05$), 表明橄榄苦苷对破骨细胞的细胞膜有显著的破坏作用 (具体变化见图 3)。笔者考虑, 橄榄苦苷可能通过破坏细胞的完整性, 达到抑制破骨细胞增殖的效果, 具体机制有待进一步研究。

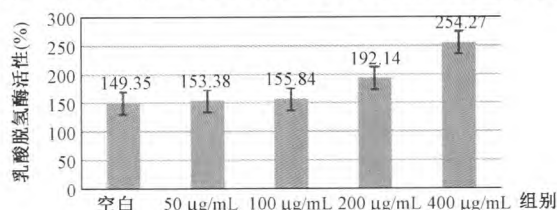


图 3 不同浓度橄榄苦苷对破骨细胞细胞膜完整性的影响 (不同浓度橄榄苦苷组与空白组比较, $P < 0.05$)

Fig. 3 Effect of oleuropein with different solubility on membrane integrity of osteoclasts (compared with the blank group, $P < 0.05$)

3 讨论

橄榄苦苷 (oleuropein) 是一种无毒的裂环烯萜苷类化合物。新研究发现, 橄榄苦苷能有效防治骨质疏松症, 是药食同源类中药橄榄油的主要提取成分之一。卵巢癌患者术后因体内雌激素水平急剧下降, 对破骨细胞的产生、分化和激活的抑制作用减弱, 导致破骨细胞大量增殖分化, 其功能的活跃及凋亡的减少, 使骨吸收速度超过骨形成速度。同时因雌激素的缺乏, 其所介导的骨保护素表达减弱, 骨量增加减少, 抑制骨吸收及骨丢失的效用减弱^[5], 造成骨质有机物和无机物成比例地减少, 使得骨质疏松及骨折等并发症的发病率显著增高。此外, 造成卵巢癌术后骨质疏松的另一重要病因是炎症因子^[6], 如 IL-1、IL-3、IL-6、IL-7、IL-11、IL-15 的作用, 同样可引起骨吸收和重建的平衡失调。因卵巢癌是一种激素依赖型肿瘤, 故术后的卵巢癌患者常规应

用植物雌激素或激素替代疗法来防治骨质疏松症的安全性具有很大的争议。研究表明,橄榄苦苷可以通过调节 OPG/RANKL/RANK 信号通路^[7-9]、降低肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 IL-6 的分泌^[3,10]、调控 MAPK38-COX-2 信号通路^[11-13] 3 种途径来防治妇科恶性肿瘤术后骨质疏松。

本研究观察发现,浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的橄榄苦苷在破骨细胞增殖过程中无明显抑制作用,而浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 的橄榄苦苷对破骨细胞的增殖均具有明显抑制效果,且抑制效果与橄榄苦苷的浓度呈剂量依赖性,说明橄榄苦苷要在一定浓度下才能发挥抑制破骨细胞增殖的效用,具体起始浓度、是否存在最大浓度,还有待进一步探究。在橄榄苦苷保持同一浓度的前提下,抑制增殖的效用与作用时间呈正相关,说明用药时间越长,防治骨质疏松的效果越好,为临床卵巢癌患者术后延缓骨质疏松用药时间提供一定依据。

LDH 是一种存在于细胞内的酶。橄榄苦苷作用于破骨细胞 48 h 后,细胞膜的损伤导致细胞自身打开了缺口,储存于细胞内的 LDH 外流,使得细胞外的 LDH 活性显著增强。因细胞膜完整性遭到破坏,使破骨细胞启动细胞凋亡机制。根据研究结果,细胞外 LDH 活性的增强与作用于破骨细胞的橄榄苦苷浓度呈剂量依赖性,说明细胞外 LDH 活性的增强和细胞凋亡率是由于橄榄苦苷对破骨细胞细胞膜的毒性作用,具体机制还有待进一步研究。

综上所述,橄榄苦苷能够抑制破骨细胞增殖,从而降低破骨细胞的骨吸收活性,起到延缓或防治骨质疏松的效果。

【参 考 文 献】

- [1] Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006, 20(2): 207-225.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29.
- [3] 黄惠娟,郑小花,李宝恒. 橄榄油对大鼠去势后骨代谢指标及骨密度的影响. *中国妇幼保健*, 2013, 20(2): 3333-3336.
- Huang HJ, Zheng XH, Li BH. Effect of olive oil on bone metabolism and bone mineral density of ovariectomized rats. *Maternal and Child Health Care of China*, 2013, 20(2): 3333-3336. (in Chinese)
- [4] Filip R, Possemiers S, Heyerick A, et al. Twelve-month consumption of a polyphenol extract from olive (*Olea europaea*) in a double blind, randomized trial increases serum total osteocalcin levels and improves serum lipid profiles in postmenopausal women with osteopenia. *J Nutr Health Aging*, 2015, 19(1): 77-86.
- [5] Horst-Sikorska, Wawrzyniak A. The role of hormonal therapy in osteoporosis. *Endokrynol Pol*, 2011, 62(2): 19-22.
- [6] Al-Daghri NM, Aziz I, Yakout S, et al. Inflammation as a contributing factor among postmenopausal Saudi women with osteoporosis. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(4): e5780.
- [7] Omiya T, Tanaka S. Anti-RANKL antibody. *Nihon Rinsho*, 2015, 73(10): 1690-1695.
- [8] Warren JT, Zou W, Decker CE, et al. Correlating RANK ligand / RANK binding kinetics with osteoclast formation and function. *J Cell Biochem*, 2015, 116(11): 2476-2483.
- [9] 刘慧兰,黄惠娟,李宝恒,等. 橄榄苦苷对成骨细胞 OPG/RANKL mRNA 的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(6): 649-652.
- Liu HL, Huang HJ, Li BH, et al. Effects of oleuropein on OPG/RANKL mRNA expression in osteoblasts. *Chin J Osteopor*, 2015, 21(6): 649-652. (in Chinese)
- [10] Kyriazis ID, Koutsoni OS, Aligiannis N, et al. The leishmanicidal activity of oleuropein is selectively regulated through inflammation and oxidative stress-related genes. *Parasit Vectors*, 2016, 9(1): 441.
- [11] Carrera González MP, Ramírez Expósito MJ, Mayas MD, et al. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer/Trends in Food. *Science & Technology*, 2013, 31(2): 92-99.
- [12] Sirianni R, Chimento A, De Luca A, et al. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(6): 833-840.
- [13] Lamy S, Ben Saad A, Zgheib A, et al. Olive oil compounds inhibit the paracrine regulation of TNF- α -induced endothelial cell migration through reduced glioblastoma cell cyclooxygenase-2 expression. *J Nutr Biochem*, 2016, 27: 136-145.

(收稿日期: 2016-12-16; 修回日期: 2017-02-05)