

类黄酮对人体外周血破骨细胞分化 p38MAPK/c-Fos 信号通路调控的研究

王想福¹ 孙凤歧^{1*} 叶丙霖² 范有福¹ 李盛华¹ 温少瑾¹

1. 甘肃省中医院脊柱微创骨科,甘肃 兰州 730050
2. 甘肃省中医药研究院,甘肃 兰州 730050

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 11-1488-05

摘要: **目的** 探讨类黄酮调控 p38MAPK/c-Fos 信号通路对破骨细胞分化的影响。**方法** 采用人体外周血分离单个核细胞,并诱导形成破骨细胞,干预组应用类黄酮对细胞进行处理,通过细胞形态学观察并检测细胞活性,再分别采用 RT-PCR 和 Western blot 两种方法观察 p38MAPK 通路及下游转录因子 c-fos 基因和蛋白的表达水平。**结果** 对照组与干预组细胞形态学观察均可见诱导培养的破骨细胞形态明显;与对照组比较,干预组破骨细胞样细胞的形成减少,活性减弱,差异具有统计学意义($P < 0.05$);RT-PCR 结果显示,干预组 p38MAPK 通路下游转录因子 c-fos 表达水平较对照组下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$);Western blot 检测结果显示,干预组 c-fos 蛋白表达水平较对照组降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 类黄酮在体外细胞培养中可抑制破骨细胞形态,并可通过下调 p38MAPK 通路中 c-fos 基因和蛋白水平的表达,从而减弱破骨细胞的吸收功能。

关键词: 类黄酮;破骨细胞;信号通路;细胞分化

Regulation of flavonoids on p38MAPK/c-Fos signaling pathway in human peripheral blood osteoclast differentiation

WANG Xiangfu¹, SUN Fengqi^{1*}, YE Binglin², FAN Youfu¹, LI Shenghua¹, WEN Shaojin¹

1. Department of Orthopedics, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050
2. Gansu Academy of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: SUN Fengqi, Email: sunfengqi2001@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of flavonoids on p38MAPK/c-Fos signaling pathway in osteoclast differentiation. **Methods** Using human peripheral blood mononuclear cells, osteoclasts were induced. Cells in the intervention group received flavonoids treatment. Cell morphology and cell activity were detected. Expression of genes and proteins of the p38MAPK pathway and the downstream transcription factor c-fos was observed using RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** Cell morphology of osteoclast in the control group and the intervention group showed obvious osteoclast morphology after induction. Compared with the control group, osteoclast like cell formation and activity in the intervention group decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). RT-PCR result showed that the expression levels of p38MAPK downstream transcription factor c-fos was lower in the intervention group than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Western -blot assay showed that the expression level of c-fos protein in intervention group was lower than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Flavonoids inhibits osteoclast morphology in vitro and reduces the osteoclast absorption function by down regulating the expression of c-fos and protein in p38MAPK pathway.

Key words: Flavonoid; Osteoclast; Signal pathway; Cell differentiation

类黄酮是自然黄酮的类似物,在体内实验中,它

可以抑制破骨细胞引起的骨吸收。在体外实验中,它可以抑制破骨细胞的形成和骨吸收。在一些国家,类黄酮被用来治疗骨质疏松。

基金项目: 陇原青年创新人才扶持计划

骨质疏松症是一种常见的、全身性的骨代谢疾病,其特征是骨量减少、骨组织微结构退化,导致骨

* 通讯作者: 孙凤歧,Email:sunfengqi2001@163.com

脆性增加从而引起腰背疼痛、骨密度下降、骨折等常见症状,并会发生身长缩短、驼背等。骨质疏松导致代谢紊乱,从而造成血钙偏高,由此引起一系列与钙代谢紊乱相关的并发症,如高血压、冠心病、动脉硬化及脑血管疾病等^[1]。国内学者调查发现,我国 50 岁以上骨质疏松约有 6 944 万人,40 岁以上汉族人群骨质疏松患病率为 12.4%,并且女性明显多于男性^[2-3]。国外部分学者调查发现,美国每年有 2 500 万骨质疏松症患者,其中因骨质疏松导致骨折约为 150 万人,约占 6%^[1],而我国每年因骨质疏松症导致骨折的人数却高于 10%。因此,骨质疏松的治疗已成为亟待解决的社会问题。鉴于目前西药治疗的费用高、疗程长、不良反应较多等弊端,大力发展其他疗法治疗该病显得尤为重要。

类黄酮是一种广泛存在于自然界中的酚类物质,作为一种植物次生代谢产物,广泛存在于多种植物中^[4]。大量动物实验证实类黄酮可以抑制骨细胞的吸收,促进骨生成^[5]。因而增加对类黄酮的认识可对骨质疏松的治疗起到重要作用。本研究观察了类黄酮对体外培养破骨细胞的影响,从而更加了解类黄酮对骨质疏松治疗的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

培养基 MEM,临用时加 10% 小牛血清(NBS, Gibco BR);消化酶(0.25% 胰蛋白酶,0.1% II 型胶原酶, Sigma 公司);类黄酮(上海迪奥生物科技有限公司);D-Hanks 液(美国 Hyclone 公司);人重组 RANKL 蛋白和 M-CSF 蛋白;2.5% 戊二醛固定液;青链霉素双抗、淋巴细胞分离液等。

1.2 主要仪器及器械

二氧化碳培养箱,德国;纯水系统,美国;电子天平,上海;超洁净工作台,苏州;倒置相差显微镜 Olympus EX70,日本;光学显微摄影系统 Nikon E600 型,日本;磁力搅拌器,上海;微量移液器,上海;RT-PCR 仪:LineGene 9600,杭州;低温台式高速离心机,上海;引物合成,上海生工。

1.3 试验对象

健康志愿者外周血,所有志愿者均签署伦理知情同意书。

1.4 细胞的培养

1.4.1 体外破骨细胞诱导模型的复制:抽取健康志愿者外周血液共计 13 mL,其中 3 mL 用于血常规检查,将另外 10 mL 外周血加入 50 mL 离心管,并加入

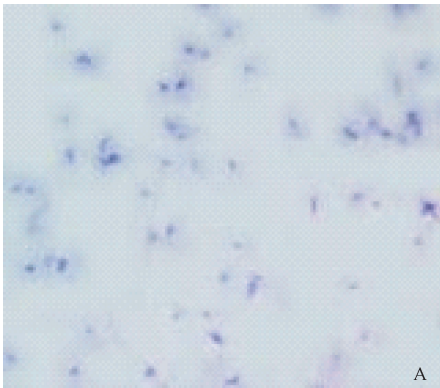
等体积的 D-hanks 液,混合均匀。取 4 mL 淋巴细胞分离液(室温)加入 15 mL 无菌离心管,加入上述混合均匀的血液 8 mL 置于淋巴细胞分离页面上,离心并吸取含有单个核细胞的白膜层,再加入 5 倍体积 D-hanks 液,洗涤并充分离心,细胞沉淀中加入 1 mL 含 10% FBS 的培养基,吹打均匀并计数细胞,预留活细胞率 > 95%,细胞数 > 10^7 个的细胞悬浮液进入下一步纯化。利用 RANKL、M-CSF 诱导单个核细胞向破骨细胞分化。接种单个核细胞并置于 5% 二氧化碳培养箱培养 48 h。将冲洗并收集的离心并用 MEM 洗涤 2 次,并将细胞沉淀中加入 1 mL 含 10% FBS 及 100 U/mL 青霉素 + 100 μ g/mL 链霉素的培养基,吹打并计数,预留活细胞率 > 95%,细胞数 > 10^7 个的细胞悬浮液进入下一步培养。将上述细胞调整为 10^7 个/mL 细胞悬液,分别加入 RANKL 和 M-CSF 的两个体系,及时换液,铺有细胞的骨片转移至新孔培养,进行 TRAP 染色。双蒸水轻柔漂洗 2 次,加入 100 μ L 苏木素复染 2 min,再次用双蒸水冲洗细胞核为蓝色,干燥后采用荧光倒置显微镜观察,摄像。取出骨片 PBS 冲洗,2.5% 戊二醛固定 10 min,再次 PBS 冲洗,去离子水超声冲洗 3 min $\times$ 3 次,酒精脱干并甲苯胺蓝染色 20 s, PBS 冲洗,干燥再进行骨吸收陷窝染色观察。

1.4.2 类黄酮调控:根据上述方法获得破骨细胞,并分为对照组(10% FBS + MEM + 100 U 青霉素 + 100 μ g/mL 链霉素 + 30 ng/mL RANKL、25 ng/mL M-CSF)和干预组(10% FBS + MEM + 100 U 青霉素 + 100 μ g/mL 链霉素 + 30 ng/mL RANKL、25 ng/mL M-CSF + 0.5 μ g/mL 类黄酮),将最终培养得到的细胞进行镜下观察破骨细胞活性。提取 RNA(均为冰上操作),分别进行匀浆、分相、沉淀、清洗、溶解、RNA 定量及纯度检测、逆转录。PCR 所需引物均由上海生工合成,以人 β -actin 作为内参对照,进行凝胶电泳检测模板,进行 RT-PCR,每个反应孔 15 μ L 体系,每个基因 3 个复孔,每组均设阴性对照。并进行 Western blot 检测,具体步骤如下:收集 DATS 处理后的 OCs 细胞,冷 PBS 洗 2 次后,加入适量的细胞裂解缓冲液,于 4 $^{\circ}$ C 裂解 1 h, 10000 rpm $\times$ 10 min,吸取上清液,即为细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。调节每份样品浓度,以等量的蛋白量加样,样品加入 1:4 的 5 $\times$ SDS 加样缓冲液,沸水煮沸 5 min,经 10% SDS-PAGE 胶电泳分离,然后转至 PVDF 膜上,膜用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入一抗(封闭液 1:200 ~ 1:1000 稀释),室温孵育 2 h;TBST 洗 3

次,每次 10 min;加相应的辣根过氧化物酶连接的抗兔的二抗(封闭液 1:2000 稀释),室温孵育 1 h;TBST 洗 3 次,每次 15 min;用 ECL 发光法检测不同蛋白表达状况;薄层扫描仪测定印迹区带的光密度值。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件对各组样本均数行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。



2 结果

2.1 类黄酮对干预组和对照组破骨细胞的活性影响

细胞形态学观察可见诱导培养的破骨细胞形态明显,干预组破骨细胞样细胞的形成减少,活性减弱,两组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

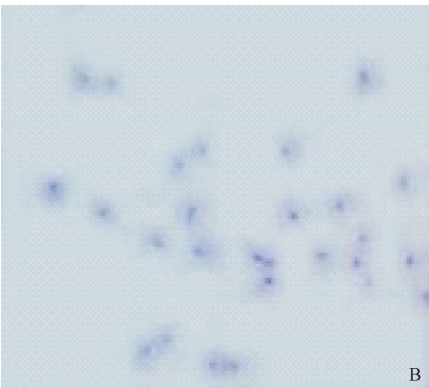


图 1 类黄酮对体外培养的破骨细胞活性影响。A:对照组($\times 10$);B:干预组($\times 10$)

Fig.1 Effect of flavonoids on osteoclast activity in vitro. A: Control group ($\times 10$); B: Intervention group ($\times 10$)

2.2 RT-PCR 检测 c-fos 基因表达量结果

采用 RT-PCR 技术,对干预组破骨细胞中 c-fos mRNA 水平进行了检测,见图 2。由图 2 可见,检测物质的溶解曲线较好,无非特异性杂带。与对照组比较,类黄酮作用的干预组 c-fos 的 mRNA 表达水平较对照组降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

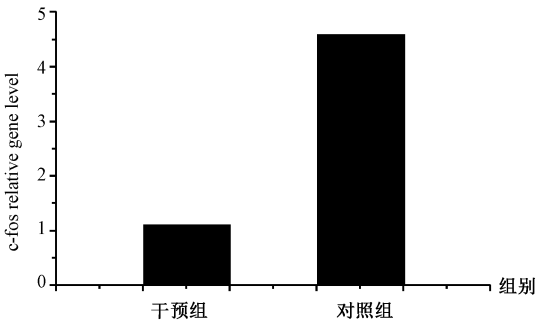


图 2 c-fos mRNA 量化结果

注:与干预组比较,** $P < 0.01$

Fig.2 Results of c-fos mRNA quantization.

Note: Compared with the intervention group, ** $P < 0.01$.

2.3 采用 Western blot 检测 p38 蛋白表达水平

Western blot 检测结果显示干预组 p-p38 蛋白表达水平较对照组降低,差异具有统计学意义

($P < 0.05$),见图 3、4。

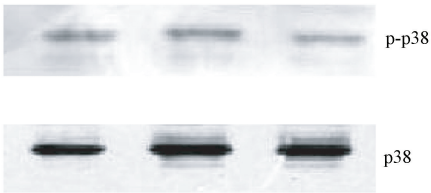


图 3 p-p38/p38 检测结果对比

注:以 p38 为内参,干预组 p-p38 表达降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)

Fig.3 Comparison of p-p38/p38 test results.

Note: Using p38 as internal control, p-p38 expression in the intervention group decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

3 讨论

类黄酮因其色泽多呈黄色而被冠以此名,它是一大类常见的多酚化合物,目前已发现的天然类黄酮有 4000 多种,类黄酮是一类具有广泛生物活性的植物次生代谢物,其在人体内作用机制比较复杂,类黄酮多存在于淫羊藿、花、茶叶、豆类、蔬菜、水果等多种食源性植物中。近年来不断深入的研究发现,

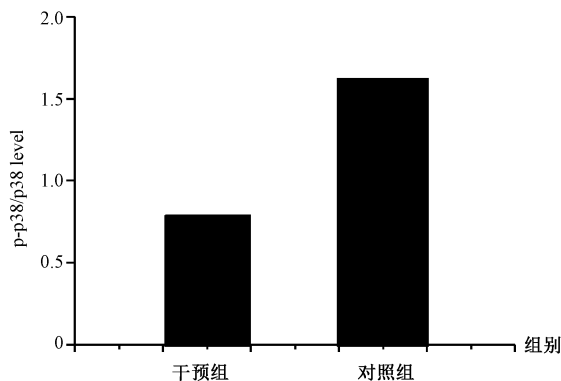


图 4 p-p38/p38 量化结果

注:与干预组比较, ** $P < 0.05$

Fig. 4 Results of p-p38/p38 quantization

Note: Compared with the intervention group, ** $P < 0.05$.

类黄酮具有减弱破骨细胞活性、促进成骨细胞增殖、分化、矿化促进骨形成,并且具有良好的抗氧化、抑制脂质过氧化反应、预防心血管疾病、抗癌等生物活性^[6-9]。

骨质疏松引起的各种疾病严重影响中老年人尤其是绝经后妇女的生活质量,加上医疗费用支出的增多、寿命的缩短等不仅对患者的身心健康造成危害,也增加了家庭和社会的经济负担,已被公认为仅次于心血管疾病的第 2 大健康杀手,成为极为严重的公共健康问题。因此,骨质疏松作为一种常见的代谢性骨骼疾病,常见的疾病好发因素包括老化、炎症性肠病、甲亢以及药物引起等。根据 2014 年我国骨质疏松诊断标准专家共识,目前国内骨质疏松患者人数仍有逐年增多趋势,严重威胁着人类的健康。

类黄酮的作用主要包括防治骨质疏松、抑制血小板聚集、止血与镇痛、抑菌、抗炎、抗风湿、保肝、抗氧化及抗癌作用,类黄酮通过对人体外周血 p38MAPK/c-fos 信号通路的调控来抑制破骨细胞分化。其中 p38MAPK 通路主要参与破骨细胞的生成和凋亡,但是还缺少有关作用机制的研究,更缺少随机对照的大样本临床研究^[10-11]。近年关于类黄酮治疗骨质疏松的研究层出不穷,越来越多的证据表明类黄酮对于骨质疏松的治疗具有确切的疗效。部分学者在细胞和动物实验中发现类黄酮能够通过多种途径促进成骨细胞生成,抑制破骨细胞分化,进而能够在机体雌激素缺乏时尽量减少骨质的丢失,以至提高骨密度和骨矿含量,但是具体作用机制尚不完全清楚。Ailsa 等^[12]研究认为,类黄酮可能是通过减少氧化应激或慢性低度炎症信号通路的影响,从而达到防止骨质流失的作用。部分学者赞同上述

观点,并且通过实验研究初步证实类黄酮可以减少维生素 A 的应激氧化,并且能够阻滞维甲酸和磷的含量以防骨质的流失^[13]。

类黄酮在人体内作用机制比较复杂^[14],本研究虽然发现类黄酮在人体外周血破骨细胞分化 p38MAPK/c-fos 信号通路调控中起作用,但是目前实验过程由于不可控因素较多,尚缺乏有效证据表明类黄酮对于人体骨质疏松的治疗效果。因此,类黄酮发挥治疗骨质疏松的具体机制尚未完全阐明,进一步的研究将有助于认识该药物的治疗作用机制,从而为类黄酮大量的投入应用于临床奠定一定的理论基础^[15-16]。类黄酮对人体外周血破骨细胞分化机制还不是十分清楚,还有待大规模、多中心随机对照实验研究。

【 参 考 文 献 】

- [1] Becker S, Ogon UDM. Epidemiology of osteoporosis. Springer Vienna, 2008, 64 (3): 9-13.
- [2] 中国健康促进基金会骨质疏松防治中国白皮书编委会. 骨质疏松症中国白皮书. 中华健康管理学杂志, 2009, 3(3): 148-154.
China Health Promotion Foundation Osteoporosis Prevention and Control Chinese White Paper Editorial Board. Osteoporosis Chinese white paper. Chin J Health Manage, 2009, 3(3): 148-154. (in Chinese)
- [3] 夏维波. 中国骨质疏松的流行病学研究//中华医学会, 中华医学会内分泌学分会. 中华医学会第十二次全国内分泌学术会议论文汇编, 西安, 2013.
Xia WB. Epidemiological study of osteoporosis in China// Chinese Medical Association, Endocrinology division of Chinese Medical Association Compilation of the twelfth National conference on endocrinology of Chinese Medical Association, Xi'an, 2013. (in Chinese)
- [4] 陈磊. 类黄酮和 α -淀粉酶相互作用特性及机理的研究. 广州: 华南理工大学, 2014.
Chen L. Studies on the interaction between flavonoids and α -amylase and its mechanism. Guangzhou: South China University of Technology, 2014. (in Chinese)
- [5] Zhang G, Qin L, Hung WY, et al. Flavonoids derived from herbal epimedium brevicornum maxim prevent OVX-induced osteoporosis in rats independent of its enhancement in intestinal calcium absorption. Bone, 2006, 38(6): 818-825.
- [6] Wong JY, Matanjun P, Ooi YBH, et al. Evaluation of antioxidant activities in relation to total phenolics and flavonoids content of selected malaysian wild edible plants by multivariate analysis. International Journal of Food Properties, 2014, 17 (8): 1763-1778.

(下转第 1529 页)

- antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*, 2005, 280 (20):19883-19887.
- [22] Jinhu X, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res*, 2012, 27 (3): 499-505.
- [23] Costa AG, Cremers S, Dworakowski E, et al. Comparison of two commercially available ELISAs for circulating sclerostin. *Osteoporos Int*, 2014, 25(5):1547-1554.
- [24] Kirmani S, Amin S, McCready LK, et al. Sclerostin levels during growth in children. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 23 (3):1123-1130.
- [25] Hackl M, Heilmeier U, Weilner S, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases: complex signatures for multifactorial diseases?. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 432(5):83-95.
- [26] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (12):5003-5008.
- [27] Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*, 2008, 3(9):e3148.
- [28] Gennari, Bianciardi S, Merlotti D. MicroRNAs in bone diseases. *Osteoporosis Int*, 2017, 28(4):1191-1213.
- [29] 张艳玲. 骨代谢指标在特发性身材矮小儿童骨生长发育评价体系中的应用价值. *临床荟萃*, 2007, 22(19):1378-1381.
- Zhang YL. Value of bone metabolization indexes in evaluating system of bone growth in idiopathic short stature children. *Clinical Focus*, 2007, 22(19):1378-1381. (in Chinese)
- [30] 李筠, 陈黎勤, 梁黎. 重组人生长激素对生长激素缺乏症儿童骨代谢的影响. *浙江大学学报*, 2005, 34(4):312-315.
- Li Y, Chen LQ, Liang L. Effects of recombinant human growth hormone (GH) replacement therapy on bone metabolism in children with GH deficiency. *J Zhejiang Univ*, 2005, 34(4):312-315. (in Chinese)
- [31] 赵丽娜, 刘桂玲, 褚丽敏, 等. 常用抗癫痫药物对癫痫患儿骨代谢的影响. *实用儿科临床杂志*, 2010, 18(4):1416-1418.
- Zhao LN, Liu GL, Chu LM, et al. Effect of antiepileptic drugs on bone metabolism in children with epilepsy. *Clin Pediatr*, 2010, 18 (4):1416-1418. (in Chinese)
- [32] 林岚, 张春玲. 佝偻病患者骨代谢生化标志物的检测. *广东医学*, 2006, 27(10):1525-1527.
- Lin L, Zhang CL. The detection of rickets in children with bone metabolic biochemical markers. *Guangdong Medical Journal*, 2006, 27(10):1525-1527. (in Chinese)
- [33] 覃佳强, 徐培菊, 张德文, 等. 维生素 K 防治儿童肾病综合征继发性骨质疏松作用的研究. *第三军医大学学报*, 2006, 28 (18):1891-1893.
- Qin JQ, Xu PJ, Zhang DW, et al. Vitamin K in treating secondary osteoporosis to nephrotic syndrome in children. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2006, 28 (18):1891-1893. (in Chinese)
- [34] Doyon A, Fischer DC, Bayazit AK, et al. Markers of bone metabolism are therapy in children with chronic kidney disease. *PLOS One*, 2015, 10(2):e0113482.
- [35] 刘海波, 孟宪梅, 党西强. 儿童糖皮质激素性骨质疏松的发病机制及诊治. *国际儿科学杂志*, 2016, 43(5):364-368.
- Liu HB, Meng XM, Dang XQ. Pathogenesis and treatment progress of glucocorticoid induced osteoporosis in children. *Int J Pediatric*, 2016, 43(5):364-368. (in Chinese)

(收稿日期:2017-04-21;修回日期:2017-07-10)

(上接第 1491 页)

- [7] Tourtoglou C, Nenadis N, Paraskevopoulou A. Phenolic composition and radical scavenging activity of commercial Greek white wines from vitis vinifera cv, Malagousia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2014, 33(2):166-174.
- [8] 张秀珍, 韩峻峰, 杨黎娟, 等. 淫羊藿总黄酮对体外培养骨细胞功能的影响. *中国新药与临床杂志*, 2004, 23(9):602-606.
- Zhang XZ, Han JF, Yang LJ, et al. Effect of total flavonoids of herba epimedii on bone cell function in vitro. *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Medicine*, 2004, 23(9):602-606. (in Chinese)
- [9] Chen Z, Zheng S, Li L, et al. Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review. *Current drug metabolism*, 2014, 15(1):48-61.
- [10] 黄少慧, 张娟, 李娟, 等. 骨灵片通过 p38 MAPK 信号通路影响成骨细胞功能的机制. *南方医科大学学报*, 2008, 28(7):1148-1153.
- Huang SH, Zhang J, Li J, et al. Effects of p38 MAPK signaling pathway on the function of osteoblast cells. *Journal of Southern Medical University*, 2008, 28(7):1148-1153. (in Chinese)
- [11] 时圣明, 袁永兵, 兰新新, 等. 狗脊的化学成分及药理作用研究进展. *药物评价研究*, 2016, 39(3):489-492.
- Shi ZM, Yuan YB, Lan XX, et al. Progress in the chemical composition and pharmacological effects of the ridge of the dog. *Drug Evaluation Research*, 2016, 39(3):489-492. (in Chinese)
- [12] Welch AA, Hardcastle AC. The effects of flavonoids on bone. *Current osteoporosis reports*, 2014, 12(2):205-210.
- [13] Oršolić N, Goluža E, Dikić D, et al. Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat. *European Journal of Nutrition*, 2014, 53 (5):1217-1227.
- [14] Xu H, Su ZR, Huang W, et al. Er Zhi wan, an ancient herbal decoction for woman syndrome, activates the estrogenic response in cultured MCF-7 cells; an evaluation of compatibility in defining the optimized preparation method. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 143(1):109-115.
- [15] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:中国医药科技出版社, 2015:187-188.
- Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (1)*. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015:187-188. (in Chinese)
- [16] 周洁, 吴敏. 植物雌激素的研究. *长春中医药大学学报*, 2014, 30(3):411-413.
- Zhou J, Wu M. Studies on phytoestrogens. *Changchun University of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 30(3):411-413. (in Chinese)

(收稿日期:2016-07-26;修回日期:2017-08-06)