

· 论 著 ·

秦皮乙素促进成骨细胞分化延缓增龄性骨质疏松的研究

王继荣 暴一众 杨舟鑫 吕晓玲 胡细连 王国付*

浙江医院,浙江省老年医学重点实验室,浙江 杭州 310013

中图分类号: R681;R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 07-0865-05

摘要: **目的** 探讨秦皮乙素对成骨细胞分化的调控及对增龄性骨质疏松症的治疗作用。**方法** 取 7 月龄 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、秦皮乙素 200 mg/kg 组与秦皮乙素 400 mg/kg 组,分别灌胃给予生理盐水与秦皮乙素。给药 3 个月取材,X 射线检测小鼠胫骨骨密度,qPCR 检测成骨细胞分化标记基因表达,成骨诱导液诱导 28 d 后茜素红染色检测成骨细胞矿化结节形成能力,胫骨组织 HE 染色观察骨组织形态。**结果** 10 月龄时灌胃给予 200 mg/kg 秦皮乙素的小鼠胫骨骨密度略高于对照组,而灌胃给予 400 mg/kg 秦皮乙素的小鼠胫骨骨密度明显高于对照组。HE 染色结果同样显示 400 mg/kg 组小鼠骨小梁显著多于对照组。成骨诱导分化与茜素红染色结果显示,秦皮乙素 400 mg/kg 组骨髓来源间充质干细胞矿化结节形成能力增强。qPCR 结果表明秦皮乙素剂量依赖地促进成骨细胞分化标记基因碱性磷酸酶、骨涎蛋白、Col1 与 Runx2 的表达,同时发现经典 Wnt 信号关键基因 Dkk1 与 Lef1 表达也明显升高。**结论** 秦皮乙素促进成骨细胞分化能力,进一步延缓增龄性骨质疏松症,其可能与调控经典 Wnt 信号相关。

关键词: 中医中药;秦皮乙素;骨质疏松;成骨细胞分化;骨密度

Esculetin enhances osteogenesis and prevents senile osteoporosis

WANG Jirong, BAO Yizhong, YANG Zhouxin, LÜ Xiaoling, HU Xilian, WANG Guofu*

Zhejiang Provincial Key Laboratory of Geriatrics, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China

* Corresponding author: WANG Guofu, Email:305265560@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effects of esculetin on osteoblasts differentiation and its therapeutic effects on senile osteoporosis. **Methods** 7-month-old C57BL/6 mice were assigned randomly into control group, esculetin 200 mg/kg and esculetin 400 mg/kg groups, and were intragastric administrated with saline (control group) or esculetin daily at 200 or 400 mg/kg for 3 months, respectively. After mice were sacrificed, analysis of the bone mineral density (BMD) was performed by X-ray. The expression of osteoblast specific genes were assayed by qPCR in BMSCs cells. After incubation for 28 days, cells were detected for bone nodules by alizarin-red staining and quantitative determination. The morphology of bone was tested by HE staining of paraffin sections of the proximal tibia from mice. **Results** X-ray of the proximal tibia confirmed that esculetin at both 200 and 400 mg/kg resulted in increase in bone mineral density. The result of HE staining showed that the number of trabecular bone increased significantly in the 400 mg/kg group. Moreover, esculetin not only increased mRNA levels of osteoblastogenic markers including alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), type I collagen (Col1), and Runt-related transcription factor 2 (Runx2), but also increased canonical Wnt signaling target genes including lymphoid enhancer-bindingfactor-1 (Lef1) and Dickkopf-1 (Dkk1), as well as mineralized nodule formation. **Conclusion** Esculetin promoted osteogenesis and resisted bone loss in senile osteoporosis through Wnt signaling cascades.

Key words: Chinese Traditional Medicine; Esculetin; Osteoporosis; Osteoblast differentiation; Bone mineral density

随着人口老龄化,目前我国 50 岁以上的骨质疏

松及骨量减少的人数逐年增多,预计到 2050 年,此数量将达 2.12 亿^[1]。目前应用于骨质疏松症的药物主要为西药,但这类药物多数具有严重或潜在的不良反应^[2-3]。中医药及天然药物在预防骨质疏松症方面具有很好的发展潜力。现代药理学研究显示

基金项目:浙江省医药卫生科技计划(2018KY194, 2014RCA001);浙江省中医药科技项目(2018ZA003)

* 通讯作者:王国付,Email:305265560@qq.com

秦皮乙素 (esculetin, Esc) 具有多种药理作用, 如抑制 5-脂氧合酶、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等^[4]。有研究发现秦皮乙素对破骨细胞分化有调控作用^[5], 但其对成骨细胞分化尤其是整体动物中对骨量维持的作用尚不得而知。为了避免雌激素的影响, 本研究利用增龄性骨质疏松症小鼠模型观察秦皮乙素对骨量维持的作用, 并进一步利用骨髓来源的间充质干细胞 (bone marrow derived stroma cell, BMSCs) 初步探讨其对成骨细胞分化的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物: 7 月龄雄性 C57BL/6 小鼠, SPF 级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号: SCK (京) 2012-0001, 合格证编号: 11400700163033。在浙江大学城市学院动物实验中心饲养, 医学实验动物环境设施为 SPF 级。

1.1.2 主要药品与试剂: 秦皮乙素 (成都瑞芬思生物科技有限公司), RNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司), 逆转录试剂盒 (TOYOBO 公司), 荧光定量 PCR 试剂盒 (TOYOBO 公司), HE 染液 (碧云天生物技术有限公司), 茜素红染液 (美国 Sigma 公司), β -甘油磷酸钠 (美国 Sigma 公司), 地塞米松 (美国 Sigma 公司)。

1.1.3 主要仪器设备: 小动物骨密度及体成分分析仪 (韩国 InAlyzer), Roche480 荧光定量 PCR 仪 (德国 Roche 公司), 生物安全柜 (美国 Thermo 公司), 石蜡包埋机与切片机 (德国 Leica 公司), 显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与给药: 取 7 月龄 C57BL/6 小鼠 24 只, 随机分为对照组、秦皮乙素 200 mg/kg 与 400 mg/kg 给药组, 每组 8 只。对照组灌胃给予生理盐水, 秦皮乙素组分别灌胃给予秦皮乙素溶液, 药物浓度分别为 40 mg/mL 与 80 mg/mL, 给药体积为 0.5 mL/100 g。

1.2.2 取材及样品制备: 给药 3 个月后, 用 3% 戊巴比妥钠 (4 mL/kg) 腹腔注射麻醉处死小鼠, 75% 酒精消毒后, 于生物安全柜中分离小鼠左侧股骨与胫骨组织, 剔除肌肉组织, 用 1 mL 注射器抽取已经预先配好的小鼠间充质干细胞完全培养液反复冲洗骨髓腔, 直至骨发白, 收集冲洗液, 反复吹打使细胞打散, 移至灭菌的 10 mL 离心管中, 4℃ 1600rpm 离心 5 min, 弃上清, 用小鼠间充质干细胞完全培养基重悬细胞, 调整细胞密度至 5×10^6 /mL, 接种到 T25

培养瓶, 置于 5% CO₂、37℃、饱和湿度 95% 的培养箱中培养 3 d, 轻轻吸出上清, 并加入新鲜培养液继续培养, 获得骨髓来源的间充质干细胞。将右侧胫骨组织置于 4% 中性福尔马林, 固定 72 h 后, 14% EDTA (pH 7.4) 脱钙, 每 3 d 换一次脱钙液, 连续脱钙 1 个月。

1.2.3 指标检测: (1) 骨密度检测: 取固定好未脱钙的胫骨组织, 置于 InAlyzer 小动物骨密度测定仪中扫描。(2) 茜素红染色: 上述 BMSCs 细胞种于 6 孔板中, 添加成骨诱导液 (10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 0.05 mmol/L V_C, 100 mmol/L 地塞米松) 诱导, 每 3 d 换液一次, 28 d 后 PBS 冲洗 3 次; 95% 酒精固定 15 min, 蒸馏水冲洗后用茜素红染液 (0.1 mmol/L 的 Tris-HCl 100 mL (pH = 8.3), 加入 0.1 g 茜素红 S) 于 37℃ 染色 30 min, 蒸馏水冲洗后晾干拍照。(3) HE 染色: 脱钙完成后的胫骨组织用 PBS 清洗 3 次, 然后进行常规梯度酒精脱水, 苯透明, 石蜡包埋, 待石蜡凝固后 Leica 切片机进行连续切片, 厚度为 5 μ m。待切片黏附到载玻片后, 按照标准方法进行 HE 染色, 染色后进行封片并在光学显微镜下观察拍照。(4) 荧光定量 PCR: 利用 RNA 提取试剂盒提取各小鼠 BMSCs 总 RNA, 用 TOYOBO 的逆转录体系合成 cDNA, 并使用 TOYOBO 的 PCR Master Mix 来进行荧光定量 PCR。使用 Light Cycler480 (Roche) 实时定量 PCR 扩增仪进行 PCR 扩增。以 β -actin 为内参, 分析目的基因的相对表达量。扩增产物的特异性通过绘制融解曲线来进行验证。用于实时定量 PCR 的引物见表 1。

1.3 统计学处理

实验结果以均数值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 22.0 统计软件包统计。数据采用方差分析, 单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检测样本方差齐性, 若无显著差异采用 Dunnett 检验均数差异性, 若方差不齐则采用非参数检验 Mann-Whitney U 进行两两均数比较。P < 0.05 认为差异有统计学意义, P < 0.01 认为差异有显著统计学意义。

表 1 定量 PCR 引物

Table 1 The primers of qPCR

引物名称	上游引物	下游引物
ALP	AACAACCTGACTGACCCCTTCG	ATGGGAGCCAGACCAAGAT
BSP	AAGGGCTCACTTTCTACGG	GGCACCCCTCACTAGGCTTAC
Col1	TCAACCCCGTCTACTTCCT	CAAAGCAGAGGCCCTCCC
Runx2	GTCCCAACTTCCTCTGCTCC	TCTTCCCTCGTCCGCTCC
Lef1	GAAATCATCCAGCCAGCAA	GCATCATTATGTAGCCAGAGTA
Dkk1	TTTGCCTGTTTGCTGCTTC	TACTTGTTCGCGCCTCA
β -actin	AACAGTCCGCCTAGAAGCAC	CGTTGACATCCGTAAGACC

2 结果

2.1 秦皮乙素对小鼠胫骨骨密度的影响

利用小动物骨密度及体成分分析仪检测各组小鼠胫骨骨密度,结果如图 1 所示,200 mg/kg 秦皮乙素组骨密度与对照组相比略有增加,而秦皮乙素 400 mg/kg 组小鼠胫骨骨密度明显高于对照组。

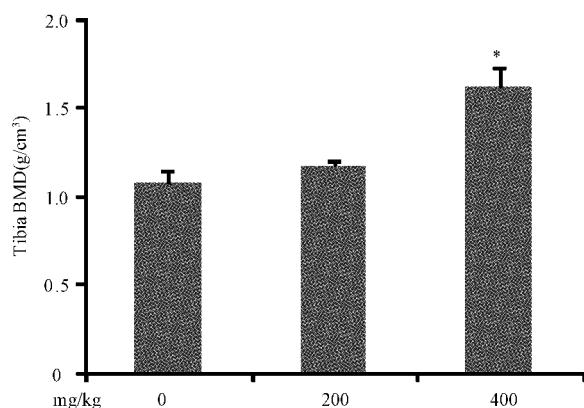


图 1 各组小鼠胫骨骨密度比较

Fig. 1 Bone mineral density of the tibia in each group

2.2 秦皮乙素对骨组织形态的影响

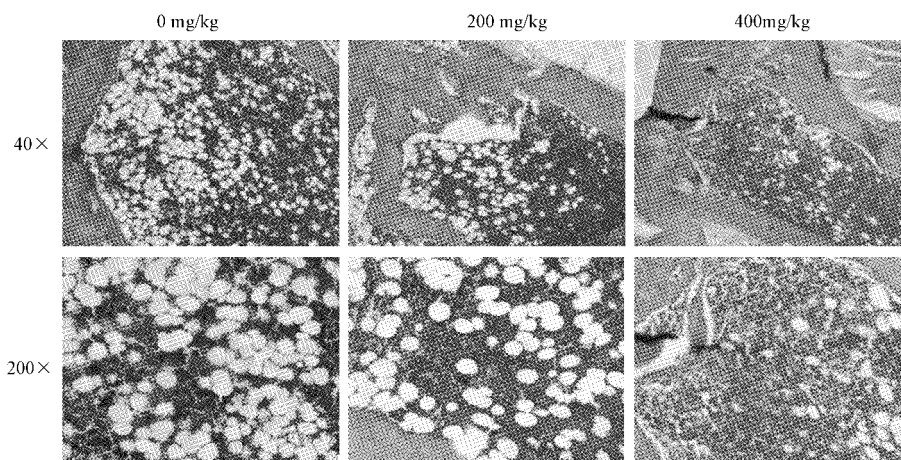


图 2 各组小鼠胫骨组织 HE 染色比较

Fig. 2 H&E staining of tibia in each group

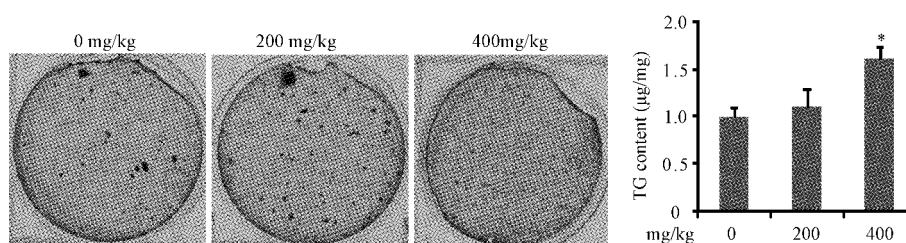


图 3 各组小鼠成骨细胞茜素红染色及定量比较

Fig. 3 Alizarin-red staining of osteoblasts and quantitative determination in each group

取小鼠胫骨组织做石蜡切片与 HE 染色,结果如图 2 所示,10 月龄对照组小鼠骨髓腔中骨小梁大量丢失,充斥着大量脂肪细胞;而秦皮乙素 200 mg/kg 组小鼠胫骨中可见少量骨小梁,但仍有大量脂肪细胞;秦皮乙素 400 mg/kg 组小鼠胫骨中骨小梁数量与对照组相比明显增多,仅见少量脂肪细胞。以上结果说明秦皮乙素可以延缓小鼠骨量丢失。

2.3 秦皮乙素影响 BMSCs 矿化结节形成能力

分离 BMSCs 细胞,成骨诱导液诱导 28 d 后进行茜素红染色,染色结果显示秦皮乙素 400 mg/kg 组 BMSCs 的矿化结节明显多于对照组,而 200 mg/kg 组与对照组相比差异并无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3,提示秦皮乙素促进成骨细胞矿化结节形成能力。

2.4 秦皮乙素对成骨细胞分化标记基因表达的影响

分离 BMSCs 细胞进行荧光定量 PCR,结果如图 4 所示,秦皮乙素剂量依赖地促进成骨细胞分化标记基因 ALP、BSP、Col1 与 Runx2 的表达。同时对经典 Wnt 信号靶基因 Dkk1 与转录因子 Lef1 的表达进行检测,结果发现秦皮乙素同样促进 Dkk1 与 Lef1

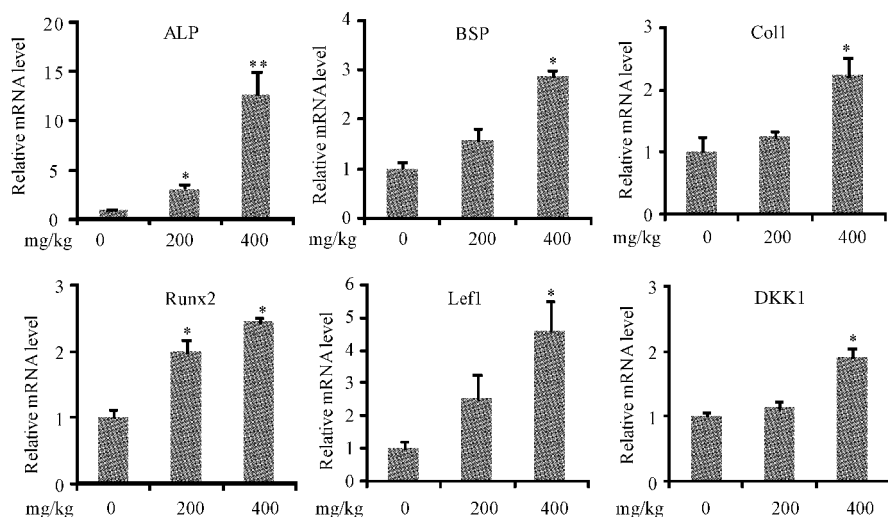


图 4 秦皮乙素对成骨细胞分化标记基因表达的影响

Fig. 4 Effect of esculentin on the expression of osteoblast differentiation marker genes

的表达,此结果提示秦皮乙素可能通过经典 Wnt 信号调控成骨细胞分化。

3 讨论

女性较男性更易出现骨质疏松,因为绝经后的妇女雌激素缺乏,导致成骨细胞分泌核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL),促进破骨细胞分化,使骨吸收加速,而骨形成没有相应增加,最终引起骨小梁结构改变,骨脆性增加^[6-7]。因此,雌激素缺乏引起骨重建负平衡,使骨量丢失加重,是骨质疏松的一个重要原因。尽管雌激素对于提高骨密度、降低骨折风险有很好的疗效,但是长期使用雌激素提高了患乳腺癌、子宫出血与心血管疾病的风险^[8-9]。对于非雌激素缺乏引发的增龄性骨质疏松症的治疗仍是一项任重而道远的工作。C57BL/6 小鼠骨量在 4~8 个月时达到高峰,随后随着年龄增大骨量逐渐丢失,类似于增龄性骨质疏松症^[10-11]。本研究利用 C57BL/6 小鼠构建增龄性骨质疏松症模型,选取骨密度高峰期 7 月龄进行干预,避免了雌激素的影响。本实验结果发现 200 mg/kg 秦皮乙素组小鼠胫骨骨密度虽有略微增加,但差异并无统计学意义,而且 BMSCs 矿化结节形成能力也并未见明显增强。秦皮乙素 400 mg/kg 能显著延缓小鼠的骨量丢失,10 月龄时与对照组相比,骨小梁数量明显增多,且脂肪空泡减少。

目前应用于骨质疏松症的药物主要为西药,但这类药物多数具有严重或潜在的不良反应,如长期

使用双膦酸盐会导致严重的骨失常、肌肉疼痛与骨折^[12-13]。中药及天然药物在预防骨质疏松症方面具有很好的发展潜力。对传统中药进行 2 次开发,特别是开发有效部位制剂,其质量标准易于和国际公认标准接轨,是中药现代化发展的趋势之一。本研究中的秦皮乙素是一类广泛存在于自然界植物中的香豆素类化合物,容易获得,且具有安全无毒副作用,具有一定的临床应用价值。

成骨细胞骨形成与破骨细胞骨吸收动态平衡对维持生理状态骨代谢平衡具有关键作用,目前临床治疗骨质疏松策略是抑制骨吸收,而针对骨形成的靶点药物尚未有很好的应用^[14]。有研究发现秦皮乙素通过调控 NFATc1 与 c-Fos 的表达影响破骨细胞分化与功能^[5]。本研究发现秦皮乙素可以剂量依赖性地促进 BMSCs 细胞的矿化结节形成能力,同时提高成骨细胞分化标记基因 ALP、BSP、Col1 与 Runx2 的表达,提示秦皮乙素可以促进成骨细胞分化能力,对于骨形成靶点药物的研发具有一定的提示作用。

Wnt 信号通路是生物体内广泛存在的信号通路,激活经典 Wnt 信号通路引起 β -actin 蛋白在细胞质内的稳定、积累并进入细胞核,增加下游淋巴样增强因子 1 (lymphoid enhancer-binding factor 1, Lef1) 和 T 细胞因子 (T cell factors, TCF) 等转录因子的活性,促进下游基因转录^[15]。因此经典 Wnt 信号通路在胚胎的骨骼发育和个体的骨量维持方面发挥着至关重要的作用^[16]。本研究发现秦皮乙素剂量依赖性

(下转第 899 页)

- turnover in patients with spinal metastases after resistance training under radiotherapy- a randomized trial[J]. *Bmc Cancer*, 2016, 16(1):1-7.
- [10] 印平, 马远征, 马迅, 等. 骨质疏松性椎体压缩性骨折的治疗指南[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 18(6):643-648.
- Yin P, Ma YZ, Ma X, et al. Guidelines for the treatment of osteoporotic vertebral compression fracture [J]. *Chin J Osteoporos*, 2015, 18(6): 643-648. (in Chinese)
- [11] 公爱凤. 骨代谢标志物 25(OH)D₃、 β -CTX 和 Total-P I NP 在老年骨质疏松症患者髋部脆性骨折诊断中的检测价值[J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(6):555-558.
- Gong AF. Bone metabolic markers 25(OH)D₃, β -CTX and total-P I NP in the diagnosis of fragile fracture of the hip in elderly osteoporotic patients [J]. *Clinical and Experimental Medicine Journal*, 2017, 16(6): 555-558. (in Chinese)
- [12] 及金宝, 林兴喜, 朱翔蓉, 等. 骨代谢标志物对社区绝经后骨质疏松症患者发生髋部骨质疏松及骨折的评估作用[J]. *中国全科医学*, 2016, 19(14):1625-1628.
- Ji JB, Lin XX, Zhu XR, et al. Evaluation of bone metabolism markers on hip osteoporosis and fracture in community postmenopausal osteoporosis patients [J]. *China General Practice*, 2016, 19(14): 1625-1628. (in Chinese)
- [13] 宁四清, 李兆元, 刘曾. 全身骨显像联合肿瘤标志物检测对乳腺癌骨转移诊断、病情评价及放疗疗效评估的临床意义[J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(7):61-65.
- Ning SQ, Li ZY, Liu Z. Bone imaging combined with tumor markers in bone metastasis of breast cancer and evaluate the curative effect of radiotherapy in diagnosis and evaluating the clinical significance of [J]. *Practical Journal of Clinical Medicine*, 2016, 20(7): 61-65. (in Chinese)
- [14] 朱巧俐. 仙灵骨葆胶囊联合钙剂治疗乳腺癌患者术后内分泌治疗后骨质疏松及对骨代谢的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(5):670-674.
- Zhu QL. Effect of Xianlinggubao capsule combined with calcium on osteoporosis and bone metabolism after endocrine therapy of breast cancer patients [J]. *Chin J General Surg*, 2017, 26(5): 670-674. (in Chinese)

(收稿日期: 2018-01-19; 修回日期: 2018-03-02)

(上接第 868 页)

地增加了 BMSCs 细胞中经典 Wnt 信号的靶基因 Lef1 与 Dkk1 的表达, 因此笔者猜测秦皮乙素可能参与调控经典 Wnt 信号。

综上, 本研究利用增龄性骨质疏松症小鼠模型发现秦皮乙素可能通过调节经典 Wnt 信号促进成骨细胞分化, 从而延缓骨量丢失, 但详细的分子机制仍待进一步研究, 因此开发新的治疗骨质疏松症药物仍是一项任重而道远的工作。

【参 考 文 献】

- [1] Lin X, Xiong D, Peng YQ, et al. Epidemiology and management of osteoporosis in the People's Republic of China: current perspectives. *Clin Interv Aging*, 2015, 10: 1017-1033.
- [2] Hough FS, Brown SL, Cassim B, et al. The safety of osteoporosis medication. *South African Medical Journal*, 2014, 104(4):279-282.
- [3] Yoshiki F, Nishikawa A, Taketsuna M, et al. Efficacy and safety of teriparatide in bisphosphonate-pretreated and treatment-naive patients with osteoporosis at high risk of fracture: Post hoc analysis of a prospective observational study. *J Orthop Sci*, 2017, 22(2):330-338.
- [4] Liang C, Ju W, Pei S, et al. Pharmacological activities and synthesis of esculetin and its derivatives: A Mini-review. *Molecules*, 2017, 22(3):387.
- [5] Baek JM, Park SH, Cheon YH, et al. Esculetin attenuates receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-mediated osteoclast differentiation through c-Fos/nuclear factor of activated T-cells c1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461(2):334-341.
- [6] Seeman E. The structural and biomechanical basis of the gain and loss of bone strength in women and men. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2003, 32(1):25-38.
- [7] 李微, 张博, 张雨薇, 等. 雌激素调节骨代谢作用的研究进展. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(2):262-266.
- Li W, Zhang B, Zhang YY, et al. Review on the research of estrogen in regulating bone metabolism. *Chin J Osteopor*, 2017, 23(2):262-266. (in Chinese)
- [8] Zhou Z, Chen C, Zhang J, et al. Safety of denosumab in postmenopausal women with osteoporosis or low bone mineral density: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(5): 2113-2122.
- [9] Compston J. Safety of long-term denosumab therapy for osteoporosis. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2017, 5(7): 485-487.
- [10] Watanabe K, Hishiyama A. Mouse models of senile osteoporosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005, 26(3):221-231.
- [11] Huang C, Zhang GF, Han J, et al. Retraction: Mechanism of age-related changes of bone marrow mesenchymal stem cells in senile osteoporosis. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2017, 30(1). [Epub ahead of print].
- [12] Licata AA. Discovery, clinical development, and therapeutic uses of bisphosphonates. *Annals of Pharmacotherapy*, 2005, 39(4):668-677.
- [13] Sugiyama T, Oda H. Osteoporosis therapy: bone modeling during growth and aging. *Frontiers in Endocrinology*. 2017, 8:46.
- [14] Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473(2):201-209.
- [15] Ahmadzadeh A, Norozi F, Shahrabi S, et al. Wnt/beta-catenin signaling in bone marrow niche. *Cell and Tissue Research*, 2016, 363(2):321-335.
- [16] Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2017, 74(9):1649-1657.

(收稿日期: 2017-12-28; 修回日期: 2018-01-19)