淫羊藿苷对破骨细胞骨吸收功能的影响及其作用机制

黄 健① 张金超② 张天蓝③* 许善锦① 王 夔①*

(①北京大学医学部药学院化学生物学系, 北京 100083; ②河北大学化学与环境科学学院, 河北 071002; ③首都医科大学药学院化学生物学系, 北京 100069. * 联系人, E-mail: tlzhangcums@yahoo.com.cn, wangkuipku@gmail.com)

摘要 采用在骨片上培养日本大耳白兔破骨细胞的方法, 研究了不同浓度淫羊藿苷(icariin)对破骨细胞骨吸收功能的影响. 为了定量评价破骨细胞的骨吸收功能和探讨淫羊藿苷的作用机制, 采用显微摄影结合计算机图像分析技术测定了骨吸收造成的陷窝表面积, 并检测了细胞肌动蛋白环(actin-ring)、细胞内游离钙离子的浓度$[Ca^{2+}]_i$和超氧阴离子自由基($\dot{O}_2^-$)的变化. 结果显示, 淫羊藿苷降低了破骨细胞内的钙离子浓度, 这可能是引起肌动蛋白环回缩和细胞内超氧阴离子自由基减少的原因, 进而导致吸收陷窝面积减小, 抑制了破骨细胞的骨吸收.

关键词 淫羊藿苷 破骨细胞 肌动蛋白环 $[Ca^{2+}]_i$ 超氧阴离子自由基

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种严重威胁中老年人健康的常见病和多发病, 随着人类寿命的延长和老龄化社会的到来, OP的发生率正逐年上升. 其发病机制主要是由破骨细胞介导的骨吸收与成骨细胞介导的骨形成的动态平衡被破坏, 骨吸收大于骨形成. 目前国内外使用的一些药物(如钙制剂、维生素D、氟化物、性激素、双磷酸盐)虽有一定疗效, 但因其毒副作用引起不良反应或疗效不确切或价格昂贵, 临床应用受到限制[1~3]. 近年来, 国内外学者都十分注重从植物中提取和筛选抗骨质疏松症的有效成分, 从大豆中提取的黄酮类化合物daidzein和genistein等已被证明具有良好的抗骨质疏松作用[4]. 在众多治疗骨质疏松症的实验研究与临床应用中, 中药淫羊藿的疗效已被大家所公认, 引起了广泛的关注.

据统计, 在 100 味治疗骨质疏松的常用中药中, 淫羊藿的使用频率仅次于熟地黄居第二位. 并且无论是淫羊藿复方制剂还是单味制剂, 对骨质疏松都有一定的治疗作用[5]. 体外实验也表明, 淫羊藿提取物对骨吸收有抑制作用[6]. 淫羊藿提取物的主要有效成分为黄酮类. 许多动物实验表明, 淫羊藿总黄酮能够抑制去卵巢大鼠所产生的较高的骨转化率[7], 而且对维甲酸诱导的和长期服用糖皮质激素引发的骨质疏松也有一定的防治作用[8,9].

淫羊藿苷(icarrin, 分子式$C_{33}H_{40}O_{15}$, 分子量667.67)属黄酮类[10], 是淫羊藿中的单体成分之一. 破骨细胞(osteoclast, OC)是具有骨吸收功能的细胞. 在正常情况下, OC 的骨吸收作用对于维持稳定的血钙水平和骨重建起重要作用. 若骨吸收过分活跃, 则会引起高周转型骨质疏松. 因此骨吸收功能的调控是延缓骨质疏松症的研究重点之一. 本研究以体外培养的兔成熟破骨细胞为模型, 检测了淫羊藿苷对破骨细胞的骨吸收能力、肌动蛋白环面积、细胞内游离钙离子浓度$[Ca^{2+}]_i$和超氧阴离子自由基($\dot{O}_2^-$)水平的影响, 以考察此化合物对骨吸收功能的调控作用, 并初步探讨了其作用机制.

1 实验

(ⅰ) 材料与试剂. 新生日本大耳白兔购自中国兽药监察所. 新鲜牛股骨, 保存在–70℃冰箱中; α-MEM 培养基(Gibico 公司); 胎牛血清(天津市生化制品厂); 淫羊藿苷(中国药品生物制品检定所); Hoechst 33258, 罗丹明-鬼笔环肽(Rhodamine-phalloidin), Fluo-3-AM(Molecular Probes)和氯化硝基四氮唑蓝(NBT)(Sigma).

(ⅱ) 主要仪器. 倒置相差显微镜(OLYMPUS, BH-2); 激光扫描共聚焦显微镜(TCSNT, LEICA, 德国); LEICA Q 550IW 图像分析系统 (LEICA).

(ⅲ) 破骨细胞的分离和培养. 参照于世凤等[11]的方法, 将出生 24 h内的新生乳兔断颈处死, 无菌取其四肢长骨, 去除附着在其表面的软组织和软骨骺. 将骨干纵向剖开, 轻刮骨的髓腔表面至颜色变白, 用尖吸管反复冲洗髓腔面, 去掉骨片, 保留细胞悬浮液备用.

(iv) 淫羊藿苷对破骨细胞造成的骨吸收陷窝的影响. 将上述分离的破骨细胞悬液和处理过的骨片共同培养 16 h 后, 冲掉未附着骨片的细胞, 加入含淫羊藿苷的新鲜培养液, 使淫羊藿苷的终浓度为 0, 1.00×10^{-4}, 1.00×10^{-5}, 1.00×10^{-6} 和 1.00×10^{-7} mol/L, 然后继续培养 7 d. 在倒置相差显微镜下观察, 计录每个骨片上形成的吸收陷窝数, 同时用图像分析系统计算吸收陷窝的表面积.

(v) 淫羊藿苷对细胞内游离钙离子浓度的影响. 将破骨细胞悬浮液接种于Φ35 mm 的 Petri 培养皿中, 培养 24 h 后, 吸除培养基, 加入稀释于完全培养基中的 Fluo-3-AM(5 μmol·L^{-1}), 避光培养 45 min 后, 在激光共聚焦显微镜下观察, 激发光波长为 488 nm, 发射光滤片为 LBP530. 在指定时间点加入淫羊藿苷, 使其终浓度为 10^{-6} mol/L, 每 10 秒取一张图片, 用 Leica TCSNT 软件处理, 绘制相对荧光强度-时间变化曲线.

(vi) 淫羊藿苷对肌动蛋白环的影响. 将破骨细胞悬浮液接种于 1×1 cm^2 盖玻片上. 加入含淫羊藿苷的新鲜培养液作用 4 h 后, 吸除培养基. 加入稀释于 PBS 中的 4%甲醛, 在室温下固定 30 min. 再加入稀释于 PBS 中的 Hoechst 33258(2.5 μg/mL)/罗丹明-鬼笔环肽(2 U/mL) 100 μL, 在室温下孵育染色 30 min. 用激光共聚焦显微镜观察, 分别用 366 和 543 nm 的激光激发, 在蓝绿色和红色通道成像取图. 用图像分析系统计算肌动蛋白环的表面积.

(vii) 淫羊藿苷对细胞内超氧阴离子自由基的影响. 将破骨细胞悬浮液种于 12 孔板中, 培养约 16 h 后, 冲掉未附着的细胞, 再用 0.05%胰蛋白酶/0.02% EDTA 消化细胞 10 min, 弃去消化下来的细胞, 剩余物为纯化的破骨细胞. 加入含淫羊藿苷的新鲜培养液与破骨细胞作用 24 h 后, 吸除培养基, 加入浓度为 2.0 mg/mL 的 NBT 溶液(pH 7.4) 600 μL, 在 5% CO_2, 37℃条件下孵育 30 min, 用 10%甲醛固定 30 min, 并于室温下晾干. 每孔加入浓度为 2.0 mol/L 的 KOH 溶液 300 μL, 吹打使细胞溶解. 取出 10 μL 用于测定蛋白含量. 再向剩下溶液中加入 300 μL DMSO 溶解 NBT 结晶. 于 600 nm 的波长下测定细胞内 NBT 还原后的含量.

(viii) 数据处理. 测定结果以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 所有数据采用 SPSS 10.0 软件的方差分析, 组间 q 检验, $P<0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 淫羊藿苷对体外破骨细胞在骨片上形成的吸收陷窝数目和面积的影响

破骨细胞在骨片上培养 7 d, 与对照组相比, 浓度为 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 的淫羊藿苷使骨吸收陷窝数减少(图 1).

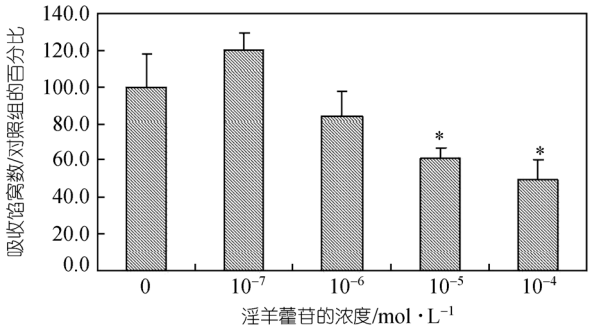

图 1 淫羊藿苷对破骨细胞骨吸收陷窝数的影响(n = 10)
* 与对照组相比较, $P<0.05$, 有显著性差异

淫羊藿苷对破骨细胞形成的骨吸收陷窝表面积的影响见图 2. 破骨细胞在骨片上培养 7 d, 与对照组相比, 淫羊藿苷浓度为 10^{-6}, 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 均可使骨吸收陷窝面积减小, 且呈现浓度依赖性.

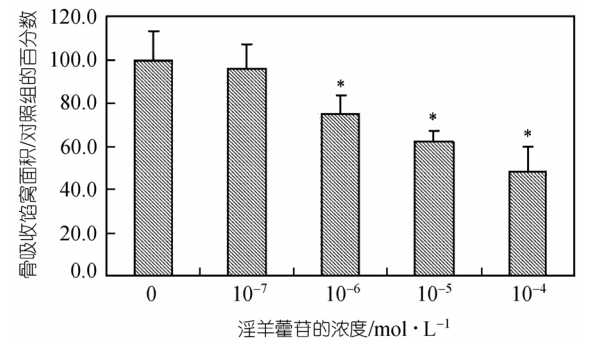

图 2 淫羊藿苷对破骨细胞骨吸收陷窝表面积的影响
(n = 10)
*与对照组相比较, $P<0.05$, 有显著性差异

2.2 淫羊藿苷对体外破骨细胞内游离钙离子浓度$[Ca^{2+}]_i$的影响

采用钙荧光探针 Fluo-3-AM, 在激光扫描共聚焦显微镜下动态测定胞浆$[Ca^{2+}]_i$变化. 结果如图 3 和 4, 加入 10^{-6} mol/L 淫羊藿苷后, 细胞内钙离子的浓度较对照组明显降低.

2.3 淫羊藿苷对体外破骨细胞肌动蛋白环的影响

罗丹明-鬼笔环肽为 F-肌动蛋白探针, 可选择性

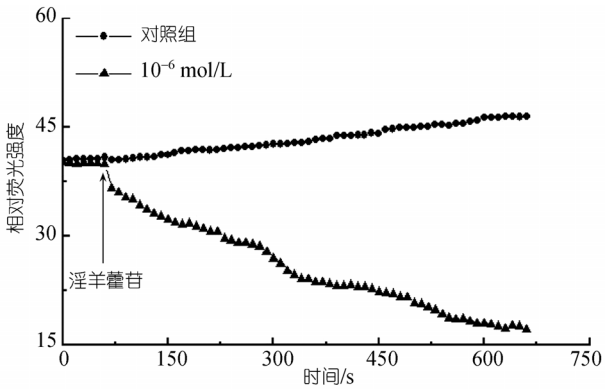

图 3 加入淫羊藿苷(10^{-6} mol/L)后破骨细胞内钙离子浓度$[Ca^{2+}]_i$随时间变化的曲线

标记由 F-肌动蛋白组成的肌动蛋白环. 由图 5 可见, 对照组破骨细胞的肌动蛋白环呈环型结构, 分布清晰而规则, 显示出细胞的正常外形; 在淫羊藿苷作用 4 h 后, 微丝收缩变短, 细胞外形皱缩. 图 6 表明淫羊藿苷的作用呈浓度依赖性. 与对照组相比, 加入药物前后肌动蛋白环的数目没有发生显著性变化(结果未显示).

2.4 淫羊藿苷对体外破骨细胞内超氧阴离子自由基的影响

通过测定 NBT 还原产物可以确定$\cdot O_2^-$的含量. NBT 被细胞内$\cdot O_2^-$还原为非水溶性的蓝黑色物质, 后者溶于 DMSO, 在 600 nm 波长处的吸光度值与超氧离子自由基的含量成正比. 由图 7 可以看到, 与对照组相比, 淫羊藿苷使破骨细胞内$\cdot O_2^-$水平降低.

3 讨论

以上实验结果显示, 淫羊藿苷具有抑制破骨细胞的骨吸收的作用, 可能是淫羊藿中抗骨吸收的一个有效成分; 还表明这一作用与降低破骨细胞内游离钙离子浓度、使肌动蛋白环回缩、以及降低细胞内超氧自由基水平等现象相联系. 但是它们之间的因果关系有待解释.

细胞内钙离子作为第二信使, 调节多种生理过程. 图 3 和 4 显示加入淫羊藿苷后, 使OC的$[Ca^{2+}]_i$迅速降低. 关利新等[12]曾报道淫羊藿苷具有阻断血管平滑肌上的受体操纵性Ca^{2+}离子通道和电压依赖性Ca^{2+}通道的作用. 李梨等[13]也发现淫羊藿黄酮通过阻止细胞内钙离子超载而表现保护神经元的作用. 因此淫羊藿苷有可能通过阻断破骨细胞膜上钙离子通道而抑制细胞Ca^{2+}离子内流, 导致细胞内游离钙离子浓度下降.

关于破骨细胞$[Ca^{2+}]_i$的变化与细胞功能的关系, 目前存在着不同的观点. 有些刺激物(如降钙素、酪氨酸激酶抑制剂和白细胞介素IL-4 等)作用于破骨细胞后, 能使$[Ca^{2+}]_i$快速升高, 并抑制破骨细胞的活性[14]. 因此, 一种观点认为, 通过升高$[Ca^{2+}]_i$抑制破骨细胞活性是阻止过度骨吸收的一个药理作用. 与上述观点不同, Berger等人[15]提出破骨细胞能够区别不同来源的$[Ca^{2+}]_i$的升高, 因此$[Ca^{2+}]_i$的升高并不总是抑制破骨细胞的活性, 在某些情况下也可能是促进作用; 反之, $[Ca^{2+}]_i$的降低在某些情况下也可能表现为对破骨细胞活性的抑制. 比如, 由细胞外的腺苷三磷酸(ATP)引起的$[Ca^{2+}]_i$增加能促进OC活性[16]. 而骨桥蛋白(osteopotin), 亲玻蛋白(vitronectin)以及合成的骨桥蛋白和骨涎蛋白(bone sialoprotein)序列片段作用于OC后, 能使$[Ca^{2+}]_i$迅速降低, 并导致附着的细胞减少, 骨吸收陷窝数目也减少[17].

细胞内钙离子作为第二信使, 调节多种生理过程; 其浓度变化能反映细胞的状态和各种内外环境对细胞的影响. 细胞内钙离子在调节细胞骨架的装配与分解中所起的重要作用是通过微丝结合蛋白(microfilaments assoliated proteins, MAPS)实现的[18]. 淫羊藿苷所引起的破骨细胞内钙的降低, 虽未影响肌动蛋白环的数目, 但却明显干扰肌动蛋白环的形态, 使其收缩变小. 破骨细胞的附着是骨吸收的前提条件. 因此微丝的动态变化和其组成可作为破骨细胞活性的指示器, 且可通过观察微丝结构及破骨细胞在附着或移动时的其他特征的改变来检测体外破骨细胞的活性. 无论是肌动蛋白环的数目变化还是形态变化, 都会直接影响骨吸收. 本实验证明淫羊藿苷使肌动蛋白环回缩, 显示破骨细胞的活性降低, 从而导致骨吸收陷窝的数量和面积减小.

破骨细胞不仅通过分泌酸和蛋白水解酶来降解骨组织, 而且由破骨细胞产生的超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$)也对钙化组织的降解起促进作用. $\cdot O_2^-$一方面能促进破骨细胞前体细胞向破骨细胞的转化, 从而增加破骨细胞的数量[19]; 另一方面可激活静止状态下的破骨细胞, 增强破骨细胞的骨吸收活性[20]. 此外, $\cdot O_2^-$还可以通过损伤有机基质而直接参与骨基质降解, 从而调节骨吸收[21]. 细胞因子如PTH等可以通过增加破骨细胞内$\cdot O_2^-$的含量来促进破骨细胞的形成

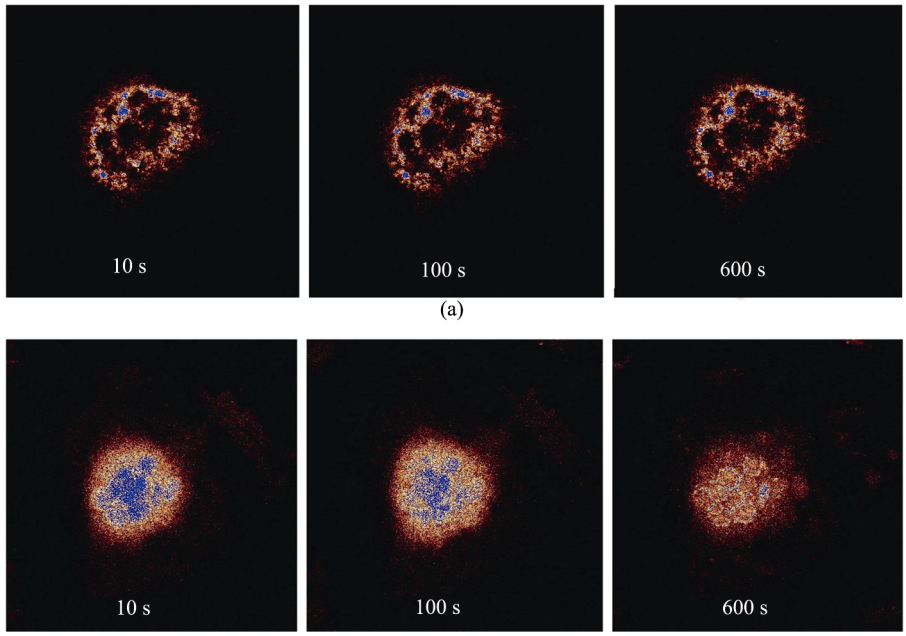

图 4 淫羊藿苷(10^{-6} mol/L)对破骨细胞内钙离子浓度$[Ca^{2+}]_i$的影响

(a) 对照组细胞的激光共聚焦扫描图像; (b) 加入淫羊藿苷(10^{-6} mol/L)后细胞的激光共聚焦扫描图像

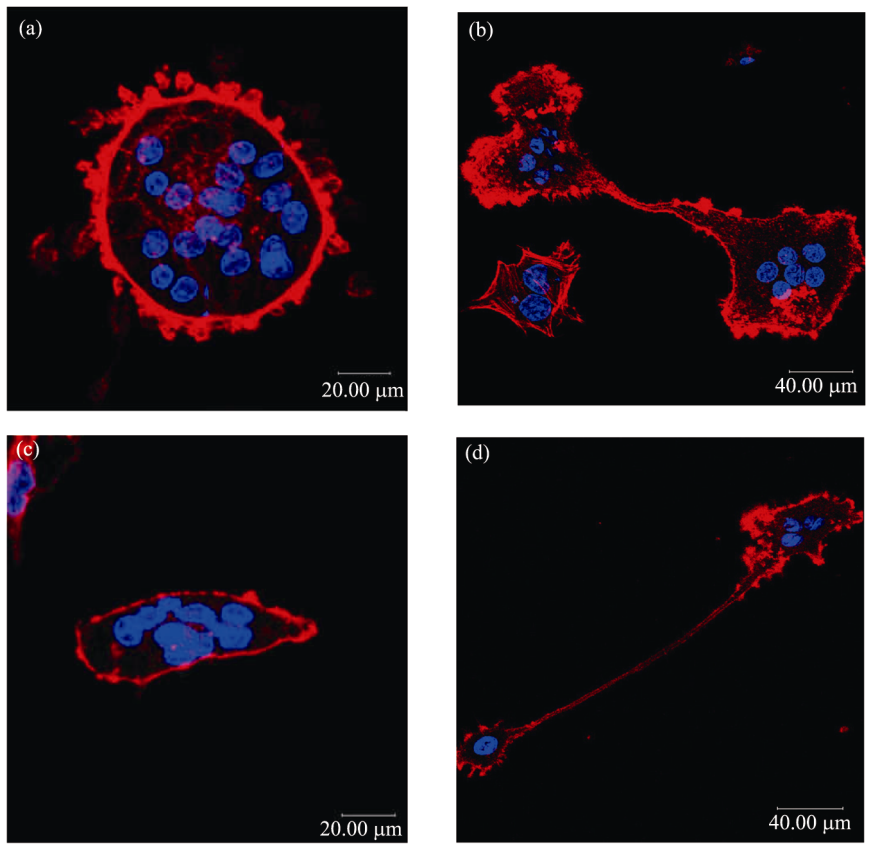

图 5 淫羊藿苷对破骨细胞肌动蛋白环面积的影响

淫羊藿苷与破骨细胞作用 4 h. (a) 对照组, 静止状态; (b) 对照组, 爬行状态; (c) 淫羊藿苷浓度为 10^{-5} mol/L, 静止状态; (d) 淫羊藿苷浓度为 10^{-5} mol/L, 爬行状态

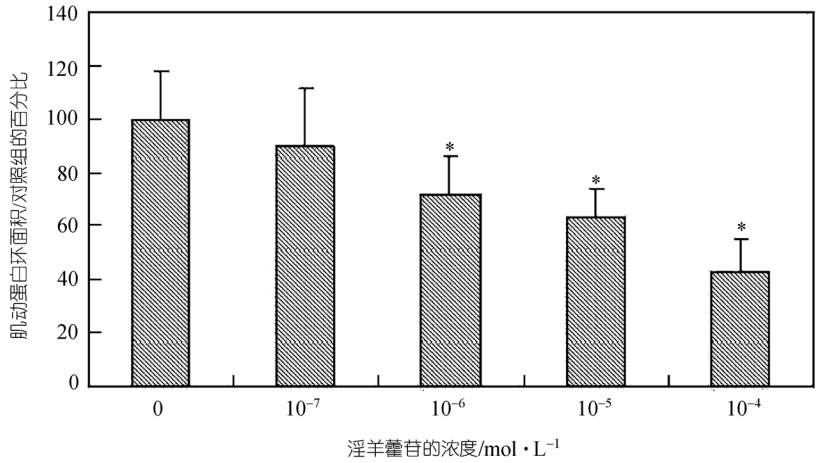

图 6 不同浓度的淫羊藿苷对破骨细胞肌动蛋白环面积的影响

* 与对照组相比较, $P < 0.05$, 差异显著, $n = 20$

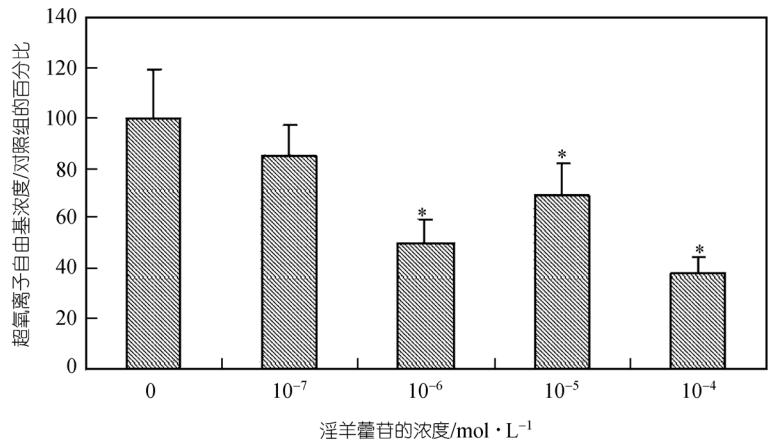

图 7 不同浓度的淫羊藿苷对破骨细胞内超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$)的影响

* 与对照组相比较, $P < 0.05$, 差异显著, $n = 6$

和活化[22]. 而超氧化物歧化酶则可通过清除$\cdot O_2^-$而降低破骨细胞的骨吸收作用[23]. 因此破骨细胞内的$\cdot O_2^-$可以用来评估破骨细胞的活性变化. 在本研究中, 我们观察到了淫羊藿苷的加入使得细胞内$\cdot O_2^-$含量下降. 尽管目前已知的实验证据尚不足以阐明细胞内超氧阴离子产生的确切的细胞信号途径, 但细胞内钙是一个潜在的调节剂; 原因在于, 降钙素和细胞外钙的升高不仅抑制了$\cdot O_2^-$的产生和降低了破骨细胞的活性, 同时也诱导细胞内钙的瞬间变化[24]. 因此, 细胞内钙的变化更像是自由基产生的主要中介.

综上所述, 淫羊藿苷可能通过降低破骨细胞内钙离子的浓度而引起肌动蛋白环回缩和细胞内超氧阴离子自由基的减少, 并导致吸收陷窝数目和面积的减小, 从而抑制了破骨细胞的骨吸收活性.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 20271005, 20571006)和北京市自然科学基金(批准号: 2062007)资助项目.

参 考 文 献

1 Pfister T, Atzpodien E, Bauss F. The renal effects of minimally nephrotoxic doses of ibandronate and zoledronate following single and intermittent administration in rats. Toxicology, 2003, 91: 159—167[DOI]

2 Neven P, Goldstein S R, Ciaccia A V, et al. The effect of raloxifene on the incidence of ovarian cancer in postmenopausal women. Gynecologic Oncology, 2002, 85: 388—390[DOI]

3 Stepan J J, Alenfeld F, Boivin G, et al. Mechanisms of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. Endocrine Regulations, 2003, 37: 225—238

4 Setchell K D, Lydeking-Olsen E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observa-

tional, and dietary intervention studies. Am J Clin Nutr, 2003, 78: 593S—609S

5 Qin L, Zhang G, Shi YY, et al. Prevention and treatment of osteoporosis with traditional herbal medicine. In: Deng H W, eds. Current topics in osteoporosis. New Jersey: World Scientific Publisher, 2005. 513—531

6 王晶, 于世凤, 庞淑珍. 淫羊藿抑制颌骨骨吸收的体外实验研究. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(3): 277—279

7 Xie F, Wu C F, Lai W P, et al. The osteoprotective effect of Herba epimedii (HEP) extract in vivo and in vitro. Evid Based Complement Alternat Med, 2005, 2: 353—361[DOI]

8 李青南, 廖进民, 吴铁, 等. 淫羊藿提取液防治激素所致大鼠骨质疏松的实验研究. 中国药学杂志, 1996, 31: 467—470

9 马慧萍, 贾正平, 白孟海, 等. 淫羊藿总黄酮对大鼠实验性骨质疏松生化学指标的影响. 中国药理学通报, 2003, 19(2): 187—190

10 Pitta P G, Mauri P L, Manera E, et al. An improved HPLC determination of flavonoids in medical plant extracts. Chromatographia 1989, 27: 509—512[DOI]

11 史凤芹, 于世凤. 体外破骨细胞分离培养方法的建立. 中华骨科杂志, 1994, 14(1): 43—46

12 关利新, 依欣, 杨履艳, 等. 淫羊藿苷扩血管作用机制的研究. 中国药理学通报, 1996, 12(4): 320—322

13 李梨, 石京山, 周歧心. 淫羊藿对缺血/再灌致神经元损伤的保护作用. 四川生理科学杂志, 2004, 26(4): 175

14 Datta H K, Horrocks B R. Mechanisms of calcium disposal from osteoclastic resorption hemivacuole. J Endocrinol, 2003, 176: 1—5[DOI]

15 Berger C E M, Rothod H, Gillepie J, et al. Scanning electrochemical microscopy at the surface of bone-resorbing osteoclasts: evidence for steady-state disposal and intracellular functional compartmentation of calcium, J Bone Miner Res, 2001, 16: 2092—2102[DOI]

16 Morrison M S, Turin L, King B F, et al. ATP is a potent stimulator of activation and formation of rodent osteoclasts. J Physiol, 1998, 511: 495—500[DOI]

17 Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield E M, et al. Recognition of osteopotin and related peptides by an $\alpha_v\beta_3$ intergrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts, J Biol Chem, 1991, 266(30): 20369—20374

18 Kajiya H, Okabe K, Okamoto F, et al. Protein tyrosine kinase inhibitors increase cytosolic calcium and inhibit actin organization as resorbing activity in rat osteoclasts. J Cell Physiol, 2000, 183: 83—90[DOI]

19 Suda N, Morita I, Kuroda T, et al. Participation of oxidative stress in the process of osteoclast differentiation. Biochim Biophys Acta 1993, 1157: 318—323

20 Garrett I R, Boyce B F, Oreffo R O, et al. Oxygen derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. J Clin Invest, 1990, 85: 632

21 Nesbitt S A, Horton M A. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. Science, 1997, 276: 266—269[DOI]

22 Datta H K, Rathod H, Manning P, et al. Parathyroid hormone induces superoxide anion burst in the osteoclast: evidence for the direct instantaneous activation of the osteoclast by the hormone. J Endocrinol, 1996, 149: 269—275[DOI]

23 Collin-Osdoby P, Linda R L L, Anderson F, et al. Inhibitor of Avian osteoclast bone resorption by monoclonal antibody 121F: a mechanism involving the osteoclast free radical system. J Bone Miner Res, 1998, 13(1): 67—78[DOI]

24 Datta H K, Manning P, Rathod H, et al. Effect of calcitonin, elevated calcium and extracellular matrices on superoxide anion production by rat osteoclasts. Exp Physiol, 1995, 80: 713—719

(2006-09-05 收稿, 2006-11-21 接受)