

· 药物研究 ·

葛根素通过 NF- κ B 信号通路调节破骨细胞的分化

于冬冬^{1*} 赵丹阳² 姚啸生¹ 杨鹤祥¹ 侯德才^{1*}

1. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032

2. 沈阳市第一人民医院神经内科, 辽宁 沈阳 110041

中图分类号: R336; R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 06-0837-05

摘要: **目的** 探索葛根素抑制破骨细胞分化的实验研究。**方法** RAW264.7 细胞经 sRANKL+M-CSF 诱导 7 d 后向破骨细胞分化; WST-1 检测不同浓度的葛根素对破骨细胞增殖活性的影响; TRAP 染色检测葛根素对破骨细胞分化的影响; Osteoassay surface Multiple well plate 检测破骨细胞吸收活性; 免疫荧光检测葛根素对 NF- κ B 通路核心蛋白 p65 细胞核内转移的影响; Western blot 检测葛根素对 p65 表达的影响。**结果** 葛根素 (10^{-8} mol/L) 作用 3 h 后破骨细胞的增殖活性明显抑制, 葛根素抑制破骨细胞的分化和吸收活性, 免疫荧光检测显示葛根素抑制 p65 的细胞核内转位及 p65 的磷酸化。**结论** 葛根素通过 NF- κ B 信号通路抑制破骨细胞的分化。

关键词: 葛根素; 绝经后骨质疏松; 破骨细胞; 细胞分化; 信号通路

Puerarin inhibits osteoclast differentiation through NF- κ B signal pathway

YU Dongdong^{1*}, ZHAO Danyang², YAO Xiaosheng¹, YANG Dongxiang¹, HOU Decai^{1*}

1. Department of Orthopedics, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032

2. Department of Neurology, Shenyang First People's Hospital, Shenyang 110041, China

* Corresponding author: YU Dongdong, Email: dongdongyu10256@163.com; HOU Decai, Email: lnzyhdc@163.com

Abstract: Objective To explore the mechanism of Puerarin inhibiting osteoclast differentiation. **Methods** The RAW264.7 cells were induced by sRANKL+M-CSF for 7 days to differentiate into osteoclasts. MTS detected the effects of Puerarin on the proliferation of osteoclasts with different concentrations, and the effect of Puerarin on osteoclast differentiation was detected by TRAP staining. The absorptive activity of osteoclasts was detected by osteoassay surface multiple well plate, and the effects of Puerarin on the intracellular transfer and expression of the core protein p65 of NF- κ B signaling pathway was detected by immunofluorescence and Western blot, respectively. **Results** MTS showed that Puerarin (10^{-8} mol/L, 3 h) significantly inhibited the proliferation of osteoclasts. Puerarin obviously inhibited the differentiation and the absorptive activity of osteoclasts, inhibited the nuclear transposition of the core protein p65, and inhibited the p65 phosphorylation. **Conclusion** Puerarin inhibits osteoclast differentiation through NF- κ B pathway.

Key words: puerarin; postmenopausal osteoporosis; osteoclast; cells differentiation; signaling pathway

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是最常见的原发性骨质疏松症。PMOP 导致骨质疏松性骨折的风险增加^[1], 是老年女性骨折的主要原因之一^[2]。成骨细胞和破骨细胞的动态平衡是维持骨稳态的重要条件, 在 PMOP 的发病过

程中破骨细胞过度活化, 同时伴随着过度的骨吸收^[3]。因此, 抑制破骨细胞活性及分化仍然是目前 PMOP 防治的重要手段及方法。

葛根素作为葛根的活性成分, 作用于机体发挥不同的药理学作用, 如抗氧化、抗应激、抗感染、抗肿瘤等。笔者前期研究发现葛根素能够抑制成骨细胞的凋亡, 继而达到防治骨质疏松症的药理学作用^[4]。有研究发现葛根素能够防治卵巢切除 (OVX) 大鼠的骨质疏松、调节破骨细胞的形成, 但是具体的潜在机制还不清楚^[5]。

本实验的目的是研究葛根素对破骨细胞形成及

基金项目: 辽宁省自然科学基金重点项目 (20170540597); 辽宁省教育厅科学技术研究项目 (L201621); 沈阳市科技局科技人才应用技术研究计划 (18-014-4-47)

* 通信作者: 于冬冬, Email: dongdongyu10256@163.com; 侯德才, Email: lnzyhdc@163.com

分化的影响,探索其潜在的作用机制,为葛根素防治 PMOP 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞:小鼠单核/巨噬细胞 RAW264.7 细胞(ATCC,美国)。

1.1.2 试剂:葛根素(Puerarin, PUE 缩写,南京狄尔格医药科技公司。溶于 DMSO,储存浓度 10^{-5} mol/L, -20°C 保存);sRANKL(Peprotech,美国);M-CSF(Peprotech,美国);DMEM(Hychem,美国);进口胎牛血清(Hychem,美国);TRAP 染色试剂盒(Sigma,美国);Osteoassay surface Multiple well plate(Corning,美国);NF- κ B 免疫荧光检测试剂盒(Beyotime,上海)。

1.1.3 仪器:细胞孵箱(Thermo,美国);倒置相差显微镜(Olympus,日本);免疫荧光显微镜(Olympus,日本);AMR-100 酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司,中国)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠单核/巨噬细胞 RAW 264.7 培养及诱导分化:小鼠单核/巨噬细胞 RAW 264.7 培养传代,未分化培养基含(DMEM、10%胎牛血清、不含抗生素, 37°C , 5% CO_2)。细胞接种于 6 孔板内,细胞密度: 1×10^4 细胞/孔,24 h 后换成诱导分化培养液培养(DMEM、10%胎牛血清、15 ng/mL RANKL、15 ng/mL M-CSF)继续培养 7 d。

1.2.2 WST-1 检测细胞增殖活性:分组:对照组、 10^{-6} ~ 10^{-10} mol/L 的 PUE 组。细胞平铺(5×10^3 细胞/孔)96 孔平板中,24 h 后更换分化培养基,诱导分化培养 7 d 后,细胞经 PUE 处理 3、12、24、48、72 h 后,每孔加 20 μL WST-1 检测液。在 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中孵育 1 h。490 nm 读取吸光度值。 $\text{OD 值} = (\text{处理后细胞 OD 值} - \text{对照组细胞 OD 值}) / N, n > 3$ 。

1.2.3 TRAP 染色检测破骨细胞分化:分组:A 组(对照组),B 组(sRANKL+M-SCF 组),C 组(PUE+sRANKL+M-SCF 组)。RAW264.7 细胞(5×10^4 细胞/孔)在 24 孔板内培养,在含和不含 PUE(10^{-8} mol/L)的条件下加入诱导分化培养液诱导分化 7 d。细胞 TRAP 染色根据 Sigma 染色试剂盒进行操作。

1.2.4 Osteoassay surface Multiple well plate 检测破骨细胞吸收活性:分组:A 组(对照组),B 组

(sRANKL+M-SCF 组),C 组(PUE+sRANKL+M-SCF 组)。RAW264.7 细胞(5×10^4 细胞/孔)在 Osteoassay surface Multiple well plate 板内培养(24 孔),在含和不含 PUE(10^{-8} mol/L)的条件下加入诱导分化培养液诱导分化 7 d。在培养结束时进行显微镜拍照,使用 Image J 软件测量吸收面积。

1.2.5 免疫荧光检测 NF- κ B 核转位:分组:A 组(对照组),B 组(sRANKL+M-SCF 组),C 组(PUE+sRANKL+M-SCF 组)。细胞在盖玻片上并培养过夜,在含和不含 PUE(10^{-8} mol/L)的条件下加入诱导分化培养液诱导分化 7 d。免疫固定液将细胞固定(室温 15 min),用免疫洗涤液(含 0.1%的 Triton X-100)洗涤。用 p-p65 抗体孵育细胞(以 1:400 的比例稀释)过夜,用 DAPI(5 min)染色细胞核,免疫荧光显微镜观察细胞。

1.2.6 Western blot 检测:细胞分 sRANKL+M-SCF、PUE+sRANKL+M-SCF 组。细胞加入裂解液提取蛋白、定量、上样、电泳、转膜、封闭、一抗过夜、二抗孵育、ECL 发光法曝光成像,扫描入电脑, $n > 3$ 。Image J 软件测定平均灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,采用 ANOVA 方法,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 葛根素抑制破骨细胞增殖活性

WST-1 法检测 PUE 对破骨细胞增殖活性的影响(图 1)。结果显示,各个浓度的 PUE 均能抑制破骨细胞的增殖活性(其中 PUE 10^{-8} mol/L,预处理 3 h,与对照组比较, $P < 0.05, n > 3$),PUE(10^{-8} mol/L)作用 3 h 后具有较大的增殖活性抑制作用。因此,PUE(10^{-8} mol/L)预处理 3 h 作为实验用药浓度及作用时间。

2.2 破骨细胞的形态学观察

倒置相差显微镜观察细胞形态(图 2),未诱导分化的 RAW264.7 细胞呈圆形,透光度好,边界清晰,无触角或少量触角。加入诱导液后,细胞触角略增多,细胞略呈短梭形,细胞透光度下降,细胞融合成巨大的多核破骨细胞(破骨细胞的数量=细胞核 ≥ 3 个细胞的数量/总的细胞数量,诱导分化组 $P < 0.01$,与对照组比较, $n > 3$);加入 PUE 后,破骨细胞的分化受到抑制($P < 0.05$,与非 PUE 处理组比较, $n > 3$)。

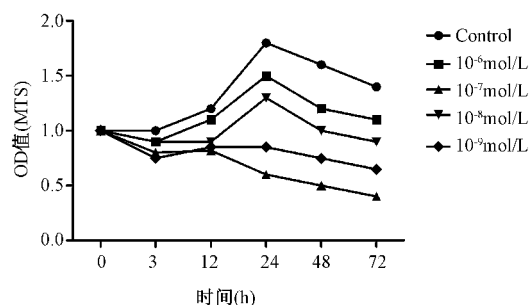


图1 葛根素抑制破骨细胞增殖

Fig.1 Puerarin inhibits osteoclast proliferation

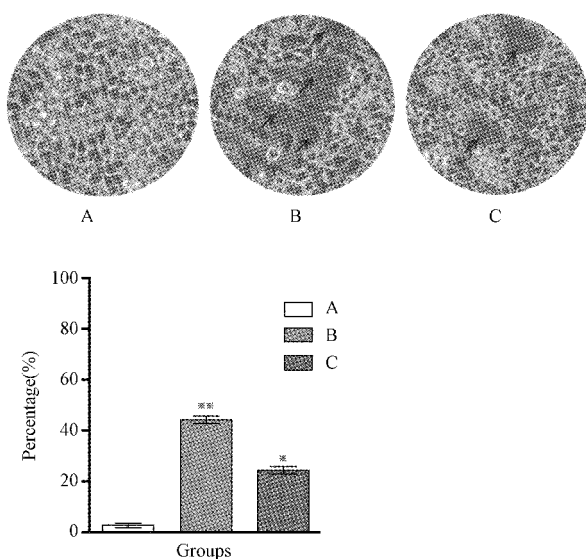


图2 形态学观 PUE 抑制破骨细胞形成 A:对照组;B:诱导分化组(sRANKL+M-CSF 诱导分化 7 d);C:PUE+sRANKL+M-CSF(PUE 10^{-8} mol/L 预处理 3 h 后,sRANKL+M-CSF 诱导分化 7 d)。

Fig. 2 Morphological observation of PUE inhibiting osteoclast formation. A: Control group; B: Induced differentiation group (sRANKL + M-CSF induced differentiation for 7 days); C: PUE + sRANKL + M-CSF (3 hours after PUE 10^{-8} mol/L pretreatment, sRANKL+M-CSF induced differentiation for 7 days).

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.3 TRAP 染色检测破骨细胞分化

TRAP 检测 PUE (10^{-8} mol/L) 对破骨细胞分化的影响(图 3),笔者前期研究发现浓度为 15 ng/mL 的 sRANKL+M-CSF 诱导分化 7 d 具有明显的诱导 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的效果^[5]。在诱导分化培养基中加入 PUE(10^{-8} mol/L)预处理 3 h 后,RAW264.7 细胞诱导分化 7 d,结果显示未加 PUE 组的破骨细胞分化明显($P<0.01$,与对照组比较, $n>$

3),PUE 能够明显抑制破骨细胞的分化($P<0.05$,与非 PUE 处理组比较, $n>3$)。

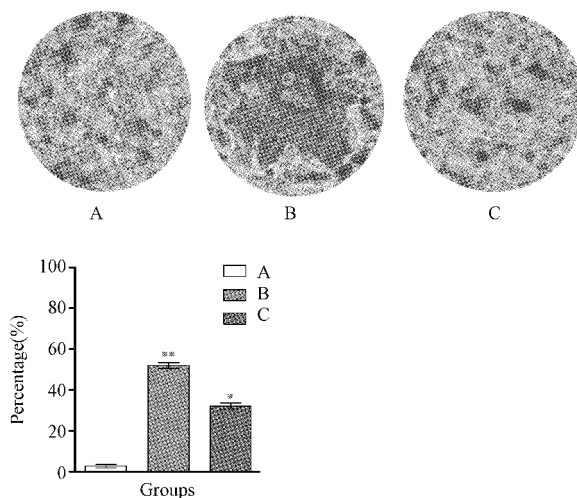


图3 PUE 抑制破骨细胞的分化 A:对照组;B:诱导分化组(sRANKL+M-CSF 诱导分化 7 d);C:PUE+sRANKL+M-CSF(PUE 10^{-8} mol/L 预处理 3 h 后,sRANKL+M-CSF 诱导分化 7 d)。

Fig.3 PUE inhibits osteoclast differentiation. A: Control group; B: Induced differentiation group (sRANKL + M-CSF induced differentiation for 7 days); C: PUE + sRANKL + M-CSF (3 hours after PUE 10^{-8} mol/L pretreatment, sRANKL + M-CSF induced differentiation for 7 days).

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.4 Osteo Assay Surface 检测破骨细胞吸收活性

破骨细胞分化后,会吞噬 Osteoassay plate 的仿生物的骨组织,进而形成吸收池(absorb pit),吸收池的大小与破骨细胞的吸收活性呈正相关。本研究结果显示(图 4),诱导分化组形成明显的吸收池,达到视野的 30%以上($P<0.01$,与对照组比较, $n>3$),加入 PUE 后,吸收池缩小,提示破骨细胞的吸收活性受到抑制($P<0.05$,与非 PUE 处理组比较, $n>3$)。

2.5 免疫荧光检测 NF- κ B 核转位

NF- κ B 未被激活时被转运到细胞核内促进 NF- κ B 依赖的基因转录。通过免疫染色检测 NF- κ B 的主要亚基 p65 是否被转移到细胞核内,就可以判断 NF- κ B 是否被激活。本研究结果显示(图 5),破骨细胞分化后,p65 向细胞核内转位,PUE 能够抑制其向细胞核内转位。

2.6 Western blot 结果检测

进一步分析 PUE 抑制成骨细胞分化的潜在机制(图 6),免疫印迹检测通路蛋白显示,sRANKL+M-CSF 促进细胞核内 p65 的磷酸化,其中加入诱导

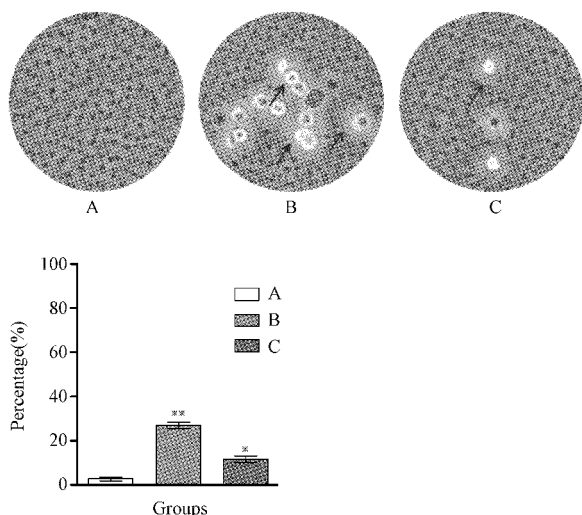


图4 PUE抑制破骨细胞的吸收活性 A:对照组;B:诱导分化组(sRANKL+M-CSF诱导分化7d);C:PUE+sRANKL+M-CSF(PUE 10^{-8} mol/L预处理3h后,sRANKL+M-CSF诱导分化7d)。

Fig.4 PUE inhibits the absorptive activity of osteoclasts. A: Control group; B: Induced differentiation group (sRANKL + M-CSF induced differentiation for 7 days); C: PUE + sRANKL + M-CSF (3 hours after PUE 10^{-8} mol/L pretreatment, sRANKL+M-CSF induced differentiation for 7 days).

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

液30 min时p65的磷酸化明显增多,而60 min时其磷酸化降低。加入PUE后第30 min,p65的磷酸化受到抑制,说明PUE发挥其抑制破骨细胞分化的药效学机制通过抑制NF- κ B信号通路完成($P<0.01$,与PUE+sRANKL+M-CSF作用组比较, $n>3$)。

3 讨论

PMOP导致骨质疏松性骨折的风险增加^[6-7]。在PMOP的发病过程中,破骨细胞过度形成及分化,因此,抑制破骨细胞形成及分化仍然是PMOP治疗的重要策略^[3]。

目前临床使用的抗PMOP的药物,长期使用都有一些局限性。例如,长期使用双膦酸盐治疗会引起相关的心房颤动、颌骨坏死和严重抑制骨转换^[8]。此外,长期使用SRMS药物(雷洛昔芬)导致静脉血栓栓塞和致命中风已被报道^[9]。因此,需要一种不仅可以提高骨密度、而且还可以促进新骨的形成、长期用药没有严重副作用的新药。

葛根素作为葛根的活性成分,抵抗机体各种疾病,如心血管系统疾病、脑部疾病、肿瘤、及炎症等。

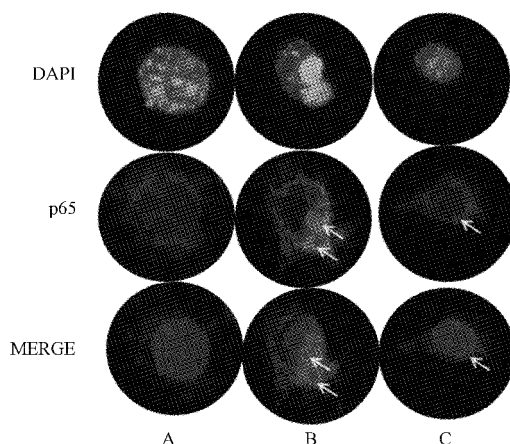


图5 PUE抑制NF- κ B核转位 A:对照组;B:诱导分化组(sRANKL+M-CSF诱导分化7d);C:PUE+sRANKL+M-CSF(PUE 10^{-8} mol/L预处理3h后,sRANKL+M-CSF诱导分化7d)。

Fig.5 PUE inhibits nuclear translocation of NF- κ B. A: Control group; B: Induced differentiation group (sRANKL + M-CSF induced differentiation for 7 days); C: PUE + sRANKL + M-CSF (3 hours after PUE 10^{-8} mol/L pretreatment, sRANKL + M-CSF induced differentiation for 7 days).

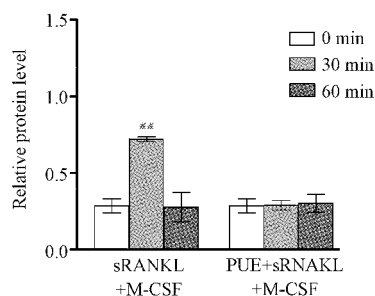
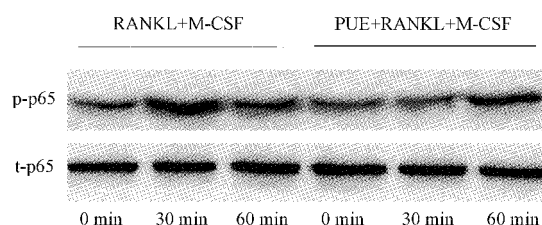


图6 PUE抑制P65磷酸化

Fig.6 PUE inhibits P65 phosphorylation

注:与PUE+sRANKL+M-CSF作用组比较,** $P<0.01$ 。

葛根素具有抗骨质疏松的药效学作用,能够预防去卵巢(OVX)大鼠的骨丢失,提高骨量,而且不增加雌激素样的作用。最近的研究报道,葛根素能够抑制破骨细胞形成,抑制骨丢失^[4],但潜在的还不清楚。

本研究发现,葛根素能够抑制破骨细胞的分化,加入葛根素后破骨细胞不仅数量减少。同时吸收池实验显示,加入葛根素后破骨细胞的吸收能力明显下降,说明破骨细胞的活性受到抑制,这对于防治PMOP来说,具有非常重要的意义。

NF- κ B 信号通路在调节破骨细胞的形成及分化中发挥重要作用^[10]。本研究发现,葛根素抑制 NF- κ B 的核心蛋白 p65 的磷酸化,抑制其从细胞浆向细胞核转位,进而防止破骨细胞形成。因此,葛根素通过 NF- κ B 信号通路抑制破骨细胞的分化,进而达到防治 PMOP 的药理学作用。

目前研究骨质疏松症的发病机理虽然较多,但是基于 NF- κ B 信号通路,从破骨细胞分化为研究的切入点,探索中医药活性成分葛根素对破骨细胞分化机制的相关研究较少。因此,本研究对于中医药临床防 PMOP 具有一定的意义。

【参 考 文 献】

- [1] Akkawi I, Zmerly H. Osteoporosis: Current concepts [J]. Joints, 2018, 6(2):122-127.
- [2] Baim S. The future of fracture risk assessment in the management of osteoporosis [J]. J Clin Densitom, 2017, 20(3):451-457.
- [3] Lewiecki EM. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7: 631-663.
- [4] Park KH, Gu DR, Jin SH, et al. Pueraria lobate inhibits RANKL-Mediated osteoclastogenesis via downregulation of CREB/PGC1 β /c-Fos/NFATc1 Signaling [J]. Am J Chin Med, 2017, 45(8):1725-1744.
- [5] 于冬冬, 赵丹阳, 姚啸生. 中药复方鹿角胶丸通过 PI3K/AKT 信号通路调节破骨细胞凋亡 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(7):874-878.
- [6] Cosman F. Long-term treatment strategies for postmenopausal osteoporosis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2018, 30(4):420-426.
- [7] Fakkert IE, Teixeira N, Abma EM, et al. Bone mineral density and fractures after surgical menopause: systematic review and meta-analysis [J]. BJOG, 2017, 124(10):1525-1535.
- [8] Kennel KA, Drake MT. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management [J]. Mayo Clin Proc, 2009, 84(7):632-638.
- [9] An KC. Selective estrogen receptor modulators [J]. Asian Spine J, 2016, 10(4):787-791.
- [10] Ahn KS, Sethi G, Chaturvedi MM, et al. Simvastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand through modulation of NF- κ B pathway [J]. Int J Cancer, 2008, 123(8):1733-1740.
- (收稿日期: 2018-08-05; 修回日期: 2018-09-06)
- (上接第 832 页)
- [10] Nakatoh S. Effect of osteoporosis medication on changes in bone mineral density and bone turnover markers after 24-month administration of daily teriparatide: comparison among minodronate, raloxifene, and eldecacitol [J]. J Bone Miner Metab, 2018, 36(2):221-228.
- [11] Losada BR, Zanchetta JR, Zerbin C, et al. Active comparator trial of teriparatide vs alendronate for treating glucocorticoid-induced osteoporosis: results from the Hispanic and non-Hispanic cohorts [J]. J Clin Densitom, 2009, 12(1): 63-70.
- [12] Wijbrandts CA, Klaasen R, Dijkstra MGW, et al. Bone mineral density in rheumatoid arthritis patients 1 year after adalimumab therapy: arrest of bone loss [J]. Ann Rheum Dis, 2009, 68(3): 373.
- [13] van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis [J]. Osteoporos Int, 2002, 13(10): 777-787.
- [14] Glüer C, Marin F, Ringe JD, et al. Comparative effects of teriparatide and risedronate in glucocorticoid-induced osteoporosis in men: 18-month results of the Euro GIOPs trial [J]. J Bone Miner Metab, 2013, 28(6): 1355-1368.
- [15] Manabe T, Mori S, Mashiba T, et al. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates natural fracture healing process in the femoral osteotomy model of cynomolgus monkeys [J]. Bone, 2007, 40(6): 1475-1482.
- [16] Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, et al. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures [J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(2): 404-414.
- [17] Bultink IE, Vis M, Ie HB, et al. Inflammatory rheumatic disorders and bone [J]. Curr Rheumatol Rep, 2012, 14(3): 224-230.
- (收稿日期: 2018-07-27; 修回日期: 2018-08-22)