

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.05.0562

仙茅酚苷类成分促进成骨细胞骨形成和抑制破骨细胞骨吸收

张乃丹[△], 蒋益萍[△], 薛黎明, 韩 婷, 张巧艳, 辛海量*

第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 以新生大鼠颅盖骨成骨细胞和由骨髓单核细胞诱导的破骨细胞为模型, 观察仙茅代表性酚苷类成分仙茅苷、仙茅素 A、苕黑酚葡萄糖苷和苕黑酚龙胆二糖苷的抗骨质疏松作用。**方法** MTT 法测定成骨细胞的增殖; 磷酸苯二钠法测定成骨细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)的活性; 茜素红染色观察成骨细胞骨矿化结节的形成; TRAP 染色测定破骨细胞的数目; 罗丹明-鬼笔环肽染色和激光共聚焦显微镜观察成骨细胞细胞骨架和破骨细胞肌动蛋白环的结构和形态; 将破骨细胞与骨片共同培养, 计算机图像处理测定破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝的面积。**结果** 仙茅苷在 10^{-9} 和 10^{-8} mol/L 的浓度下可促进成骨细胞的增殖($P < 0.05$), $10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L 浓度时抑制破骨细胞 TRAP 的活性($P < 0.05$)。仙茅苷、苕黑酚葡萄糖苷和苕黑酚龙胆二糖苷可减少破骨细胞的数目, 抑制破骨细胞的形成($P < 0.05$)。仙茅苷在 10^{-10} mol/L, 仙茅素 A、苕黑酚葡萄糖苷和苕黑酚龙胆二糖苷在 10^{-9} mol/L 浓度时均可增加成骨细胞 ALP 的活性和骨矿化结节的形成($P < 0.01$), 在一定程度上使 1,25-二羟维生素 D₃ 损伤的成骨细胞细胞骨架的结构得以恢复; 减少破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝面积, 破坏破骨细胞伪足和 F-actin 的结构。**结论** 仙茅酚苷类成分仙茅苷、仙茅素 A、苕黑酚葡萄糖苷和苕黑酚龙胆二糖苷均可促进成骨细胞的骨形成, 抑制破骨细胞的骨吸收, 具有显著的抗骨质疏松作用。

[关键词] 仙茅; 酚苷类化合物; 成骨细胞; 破骨细胞

[中图分类号] R 681.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)05-0562-07

Phenolic glycosides in *Curculigo orchioides* promotes osteoblastic bone formation and inhibits osteoclastic bone resorption

ZHANG Nai-dan[△], JIANG Yi-ping[△], XUE Li-ming, HAN Ting, ZHANG Qiao-yan, XIN Hai-liang*

Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the anti-osteoporotic activity of representative phenolic glycosides (curculigoside, curculigine A, orcinol glucoside and orcinol rhamnoside) in *Curculigo orchioides* on osteoblasts in neonatal rat calvaria and on osteoclasts induced by myelomonocytes. **Methods** The proliferation of osteoblasts and osteoclasts were determined by MTT assay. The alkaline phosphatase (ALP) activity of osteoblasts and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) of osteoclasts were detected by using p-PNPP-Na method. The mineralized nodule formation was determined by alizarin red-s (AR-S) staining. TRAP-positive multinucleated cells were counted through TRAP staining. The cytoskeleton of osteoblasts and F-actin ring of osteoclasts were labeled with rhodamine-conjugated phalloidin, and observed under confocal laser scanning microscope. The areas of osteoclastic bone resorption pit in co-culture of osteoblasts and osteoclasts were determined using computer image process. **Results** Curculigoside (10^{-9} mol/L and 10^{-8} mol/L) significantly promoted the proliferation of osteoblasts and inhibited the TRAP activity of osteoclasts at the concentration of $10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L ($P < 0.05$). Curculigoside, orcinol glucoside and orcinol rhamnoside significantly decreased the number of osteoclasts ($P < 0.05$). Curculigoside (10^{-10} mol/L), curculigine A (10^{-9} mol/L), orcinol glucoside (10^{-9} mol/L) and orcinol rhamnoside (10^{-9} mol/L) significantly increased the ALP activity and bone mineralized nodule formation of osteoblasts ($P < 0.01$), reduced the injury of cytoskeleton of osteoblast induced by 1,25-(OH)₂-VD₃, decreased the pit area formed by osteoclasts, and destroyed F-actin cytoskeleton structure and pseudopodia

[收稿日期] 2015-11-18 **[接受日期]** 2016-02-22

[基金项目] 国家自然科学基金(81274152), 上海市科委科研项目(13401900102). Supported by National Natural Science Foundation of China (81274152) and Scientific Project of Shanghai Science and Technology Committee (13401900102).

[作者简介] 张乃丹, 硕士生. E-mail: daniell_znd@163.com; 蒋益萍, 硕士, 实验师. E-mail: msjyp@163.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871300, E-mail: hailiangxin@163.com

of osteoclasts. **Conclusion** Curculigoside, curculigine A, orcinol glucoside and orcinol rhamnoside, phenolic glycosides extracted from *Curculigo orchioides*, can promote osteoblastic bone formation and inhibit osteoclastic bone resorption, demonstrating a significant anti-osteoporotic activity.

[**Key words**] *Curculigo orchioides*; phenolic glycosides; osteoblasts; osteoclasts

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(5): 562-568]

骨代谢是由成骨细胞和破骨细胞参与的维持骨骼平衡和功能的重要过程。衰老、雌激素缺失和机体氧化损伤可导致成骨细胞的骨形成减少,破骨细胞的骨吸收增加,当骨吸收大于骨形成时导致骨质疏松症的发生。仙茅为常用中药,来源于石蒜科植物仙茅(*Curculigo orchioides* Gaertn.)的干燥根茎,具有补肾阳、益精血、强筋骨和行血消肿的作用,用于肾阳不足、阳痿遗精、虚痨内伤和筋骨疼痛等病症^[1]。仙茅含有酚苷、皂苷、黄酮和桉烷类化合物^[2]。我们研究发现,仙茅提取物能够增加去卵巢骨质疏松大鼠的骨密度,显示出确切的抗骨质疏松作用,并经整体动物和细胞学实验明确了仙茅酚苷类成分为抗骨质疏松的有效成分^[3]。然而,仙茅中存在3种结构类型的酚苷类成分,包括苯甲酸酯类酚苷、苔黑酚类酚苷和含氯苯酚衍生物,明确这3种酚苷类成分对成骨细胞和破骨细胞的作用及特点,可为仙茅的临床应用和资源开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 药材 仙茅购于上海华宇药材公司(产地:四川宜宾),经第二军医大学药学院生药学教研室张巧艳副教授鉴定为石蒜科植物仙茅(*Curculigo orchioides* Gaertn.)的干燥根茎。

1.2 仪器与试剂 制备液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Agilent XDBC-18(5 μ m, 9.4 mm \times 250 mm)(美国 Agilent 公司);Bruker DRX-500 型核磁共振仪;Mat-212 磁式质谱仪(EI-MS);Q-Tof micro (ESI-MS);MS(n), Agilent Series 1100 LCMSD (美国 Agilent 公司);ZF-1 型三用紫外分析仪(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司);柱层析填料,硅胶 H(200~300 目),由山东烟台芝罘硅胶开发试验厂生产;Sephadex LH-20, Amersham Pharmacia Biotech;ODS RP-18 反相硅胶(20~40 μ m), YMC 公司;D101 大孔树脂,天津正大天成公司;柱色谱所用溶剂为分析纯,高效液相色谱法(HPLC)所用试剂

为色谱纯,均由国药集团上海化学试剂公司生产。

新生 1~2 d 的 SD 大鼠由第二军医大学实验动物中心[许可证号:SCXK(沪)2007-0005]提供;II 型胶原酶、特级胎牛血清、胰蛋白酶、 α -MEM 培养基为美国 Gibco 公司产品;地塞米松购自美国 Sigma 公司。双人单面超净台(SW-CJ-2FD),苏州净化有限公司;CO₂ 恒温培养箱(MCO-15AC),日本 Sanyo 生物医学电器公司;倒置相差显微镜(CKX41),日本 Olympus 公司;酶标仪(Bio-Tex ELx 800),美国 Fisher 公司。

1.3 仙茅酚苷类化合物的分离制备 仙茅药材粉末 10 kg,10 倍量 70%乙醇回流提取 3 次,每次 120 min,合并提取液,抽滤后浓缩成浸膏至无醇味,加水溶解至体积为 10 L(药液:药材=1:1),按照 1 BV 上样量通入装有 10 kg D101 树脂的色谱柱中,用 10%、30%的乙醇洗脱,制得 D101 大孔树脂 10%乙醇洗脱部位、30%乙醇洗脱部位。采用 Sephadex LH-20 和制备液相从 D101 大孔树脂 10%乙醇洗脱部位和 30%乙醇洗脱部位得到化合物 1~8。制备液相色谱条件:进样量 0.8 mL,流速 5 mL/min,流动相为水和乙腈。通过分析化合物的核磁共振(包括¹H NMR、¹³C NMR 等)、质谱(ESI-MS)、红外光谱(IR)和紫外(UV)光谱图,并与文献对照,确定化合物 1~8 分别为 5-羟甲基糠醛(1)、2-羟基-5-(2-羟乙基)苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(2)、苔黑酚龙胆二糖苷(3)、苔黑酚葡萄糖苷(4)、苔黑酚-1-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷(5)、2,6-二甲氧基苯甲酸(6)、仙茅苷(7)和仙茅素 A(8)。仙茅苷为苯甲酸酯类酚苷,仙茅素 A 为含氯苯酚衍生物,苔黑酚葡萄糖苷和苔黑酚龙胆二糖苷为苔黑酚苷类成分,以这 4 个化合物为代表观察不同结构类型的仙茅酚苷类成分对成骨和破骨细胞的作用。

1.4 成骨细胞的增殖和碱性磷酸酶(ALP)活性测定 参照刘祖德等^[4]的方法,取新生 2~3 d 的 SD 大鼠颅顶盖骨分离制备成骨细胞。第 4 代大鼠颅盖骨成骨细胞消化为细胞悬液,以 2×10^3 /孔接种于

96孔培养板,于37℃、5%CO₂培养箱培养24h后,换含有药物的培养基:阴性对照组为α-MEM培养基,其余各组分别加入药物浓度为10⁻¹⁰、10⁻⁹、10⁻⁸ mol/L仙茅苷、仙茅素A、苔黑酚龙胆二糖苷、苔黑酚葡萄糖苷的含药培养基,作用48h后,以MTT法测定成骨细胞的增殖。以浓度为10⁻¹⁰、10⁻⁹、10⁻⁸ mol/L的仙茅苷、仙茅素A、苔黑酚龙胆二糖苷、苔黑酚葡萄糖苷含药培养基处理成骨细胞,每3d换一次培养基,培养6d时,PBS震荡冲洗细胞3次后,每孔加100 μL 50 mmol/L的二乙醇胺、50 μL 2.5 mmol/L的对硝基苯酚磷酸二钠,37℃反应30 min后,再加0.3 mol/L的NaOH终止反应,于波长405 nm处测得光密度(D)值。以不同浓度的对硝基苯酚溶液在405 nm处的D值作标准曲线。每纳克蛋白释放的对硝基苯酚的微摩尔数表示ALP的活性。

1.5 成骨细胞微丝结构染色 将第3代成骨细胞以5×10⁵/mL的细胞数接种于48孔板内,用含10%胎牛血清的α-MEM培养基培养24h,换含药培养基:阴性对照组为α-MEM培养基,其余各组分别加入药物浓度为10⁻⁹ mol/L的仙茅苷、仙茅素A、苔黑酚龙胆二糖苷、苔黑酚葡萄糖苷的含药培养基,培养基中含10⁻⁸ mol/L 1, 25-二羟维生素D₃[1, 25-(OH)₂-VD₃]。48h后对微丝和细胞核进行染色:PBS轻洗,加入4%甲醛(PBS稀释),室温固定30 min,PBS浸洗3次,每次3 min,1 mL/L Triton X-100透化细胞5 min,PBS浸洗,滴加1 μmol/L的罗丹明-鬼笔环肽于湿盒中避光室温孵育40 min,PBS浸洗,5 μg/mL的Hoechst 33258溶液于37℃染核10 min。PBS冲洗后用甘油封片,保存于湿盒。样品用Leica TCS SP2型激光共聚焦显微镜进行观察。

1.6 成骨细胞骨矿化结节的测定(茜素红染色) 将成骨细胞以5×10⁴/孔接种于24孔板内,用含10%胎牛血清的α-MEM培养基培养24h,换含10%胎牛血清的骨结节诱导培养基(10 nmol/L地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠和50 μg/mL抗坏血酸),每3d换液1次,12d后换浓度为10⁻⁹ mol/L的仙茅苷、仙茅素A、苔黑酚龙胆二糖苷、苔黑酚葡萄糖苷的含药的骨结节诱导培养基,空白对照组只加含有10%胎牛血清的骨结节诱导培养基。

培养48h后进行茜素红染色。染色前,用预冷的10%中性甲醛缓冲液固定10 min,蒸馏水冲洗3次;加入0.1%茜素红-Tris-HCl染液(pH=8.3),37℃下染色30 min;加蒸馏水冲洗,干燥,封片,倒置显微镜下观察拍照。

1.7 骨髓源性破骨细胞的诱导培养 将新生3d的SD大鼠脱颈椎处死,75%乙醇浸泡消毒5 min,在无菌操作台中分离胫骨,用α-MEM培养基(含10%胎牛血清、10⁻⁸ mol/L 1, 25-(OH)₂-VD₃、10⁻⁷ mol/L地塞米松)将骨髓腔内的细胞冲出,PBS冲洗细胞后即得新鲜的骨髓细胞^[5-6]。将第4代成骨细胞和新鲜收集的骨髓细胞共同悬浮于α-MEM培养基(含10%胎牛血清、10⁻⁸ mol/L 1, 25-(OH)₂-VD₃、10⁻⁷ mol/L地塞米松)中,使成骨细胞的密度为1×10⁵/mL,骨髓单核细胞为1×10⁶/mL,将细胞悬液接种于预先放置灭菌的玻片或骨片的96孔培养板中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养,每3d换一次培养基,8d后破骨细胞分化成熟。

1.8 破骨细胞数目和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)的活性测定 将骨髓单核细胞接种于96孔培养板中,加入含10%胎牛血清、10⁻⁸ mol/L 1, 25-(OH)₂-VD₃、10⁻⁷ mol/L地塞米松的α-MEM培养基,24h后加入药物浓度为10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L的仙茅苷、仙茅素A、苔黑酚龙胆二糖苷、苔黑酚葡萄糖苷的含药培养基,培养8d后,进行破骨细胞TRAP染色,于显微镜下对TRAP阳性的多核细胞进行计数;或将骨髓单核细胞诱导培养8d后,加入药物浓度为10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L的仙茅苷、仙茅素A、苔黑酚龙胆二糖苷、苔黑酚葡萄糖苷的含药培养基,培养48h后测定TRAP的活性:弃上清,PBS冲洗,20 μL细胞裂解液(0.1% Triton X-100)室温破碎细胞15 min,加入100 μL反应液(0.4 g对硝基苯基磷酸二钠用去离子水溶解,加入2.0 g酒石酸钾钠,加水溶解至150 mL,HCl调节pH至3.5,加水定容至200 mL),于37℃反应30 min,快速加入100 μL 1 mol/L的NaOH终止反应,于波长405 nm处测定其D值。以对硝基苯酚溶液作标准曲线,TRAP活性用每孔破骨细胞生成的对硝基苯酚的纳摩尔数表示。

1.9 骨吸收陷窝面积检测 将骨髓单核细胞接种于96孔培养板中,加入含10%胎牛血清、10⁻⁸

mol/L $1, 25-(OH)_2-VD_3$ 、 10^{-7} mol/L 地塞米松的 α -MEM 培养基, 24 h 后加入浓度为 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 仙茅苷、仙茅素 A、苔黑酚龙胆二糖苷、苔黑酚葡萄糖苷的含药培养基, 每 3 d 换液一次, 培养 12 d 后用甲苯胺蓝对骨吸收陷窝进行染色, 于 100 倍光镜下观察, 应用计算机图像分析系统测定每张骨片上 20 个随机视野内骨吸收陷窝的面积。

1.10 破骨细胞肌动蛋白环染色 取骨髓单核细胞, 加 α -MEM 培养基 [含巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 5 ng/mL 和 10% 胎牛血清] 悬浮、培养, 24 h 后收集未贴壁细胞培养于灭菌玻片上, 3 d 后换含 50 ng/mL M-CSF 和 100 ng/mL RANKL 的 α -MEM 培养基培养 6 d, 更换含 10^{-6} mol/L 仙茅苷、仙茅素 A、苔黑酚龙胆二糖苷、苔黑酚葡萄糖苷的含药培养基, 4 h 后进行肌动蛋白环和细胞核染色, 用 Leica TCS SP2 型激光共聚焦显微镜观察肌动蛋白环的形态。

1.11 统计学处理 所有实验均重复 2 次, 每种浓度的药物各设 5 个复孔。所有实验数据均采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 法检验, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 对新生大鼠颅盖骨成骨细胞增殖、ALP 活性的影响 如表 1 所示, 作用 48 h 后, 仙茅苷在 10^{-9} 和 10^{-8} mol/L 浓度下可促进成骨细胞的增殖 ($P < 0.05$); 仙茅素 A、苔黑酚葡萄糖苷和苔黑酚龙胆二糖苷在 $10^{-10} \sim 10^{-8}$ mol/L 的浓度范围内在一定程度上抑制成骨细胞的增殖。仙茅苷在 10^{-10} mol/L 浓度下、仙茅素 A 在 10^{-9} mol/L 浓度下、苔黑酚葡萄糖苷和苔黑酚龙胆二糖苷在 10^{-10} 和 10^{-9} mol/L

浓度下均可促进成骨细胞 ALP 的活性 ($P < 0.01$)。 **2.2 对成骨细胞微丝的影响** 如图 1 所示, 在正常成骨细胞中, 细胞骨架蛋白微丝充满整个细胞, 以维持细胞的正常形态和结构 (图 1A)。 $1, 25-(OH)_2-VD_3$ 处理后, 成骨细胞的微丝萎缩, 细胞结构破坏, 形态呈细长的多角形, 细胞铺展面积减小 (图 1B)。仙茅酚苷类成分在 10^{-9} mol/L 浓度下作用 48 h 后, 除仙茅素 A 外, 均可在一定程度上使 $1, 25-(OH)_2-VD_3$ 损伤的成骨细胞细胞骨架结构得以恢复, 从而维持成骨细胞的形态、结构和功能 (图 1C~1F)。

表 1 仙茅酚苷类成分对新生大鼠颅盖骨成骨细胞增殖和碱性磷酸酶 (ALP) 活性的影响

Tab 1 Effects of phenolic glycosides from *Curculigo orchioides* on the proliferation of osteoblast and alkaline phosphatase (ALP) activity in neonatal rat calvaria

Group	Osteoblastic proliferation (D_{570})	Osteoblastic ALP activity ($\mu\text{mol} \cdot \text{ng}^{-1}$)
Control	0.294 ± 0.015	4.07 ± 0.28
Curculigoside $c_B / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
10^{-8}	0.328 ± 0.020 *	8.19 ± 0.36
10^{-9}	0.324 ± 0.017 *	6.68 ± 0.51
10^{-10}	0.296 ± 0.015	10.84 ± 0.14 **
Curculigine A $c_B / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
10^{-8}	0.255 ± 0.011	3.16 ± 0.63
10^{-9}	0.249 ± 0.005	13.61 ± 0.52 **
10^{-10}	0.229 ± 0.007	2.47 ± 0.25
Orcinol glucoside $c_B / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
10^{-8}	0.247 ± 0.005	2.39 ± 0.07
10^{-9}	0.252 ± 0.006	13.22 ± 0.71 **
10^{-10}	0.246 ± 0.018	11.40 ± 0.70 **
Orcinol rhamnoside $c_B / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
10^{-8}	0.233 ± 0.007	1.78 ± 0.21
10^{-9}	0.233 ± 0.007	11.34 ± 0.66 **
10^{-10}	0.246 ± 0.006	11.92 ± 0.29 **

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

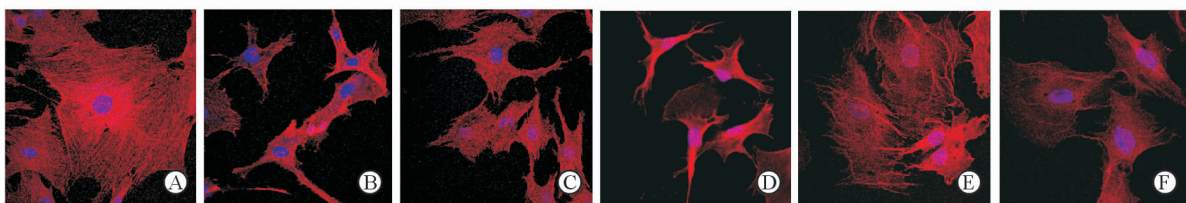


图 1 仙茅酚苷类成分对成骨细胞细胞骨架的影响

Fig 1 Effects of phenolic glycosides from *Curculigo orchioides* on the cytoskeleton of osteoblast

A: Control group; B: $1, 25-(OH)_2$ -Vitamin D_3 group; C: Curculigoside group; D: Curculigine A group; E: Orcinol glucoside group; F: Orcinol rhamnoside group. Original magnification: $\times 630$

2.3 对成骨细胞骨矿化结节形成的影响 成骨细胞在矿化诱导液的培养下,细胞成层生长逐渐形成小集落,随着胶原堆积和钙盐沉积,集落最后形成不透光的矿化结节,经茜素红染色后形成紫红色或棕褐色块状沉淀,骨矿化结节的大小和

密度代表了成骨细胞形成骨矿化结节的能力。如图2所示,与空白对照组相比,仙茅酚苷类成分仙茅苷、仙茅素 A、苔黑酚葡萄糖苷和苔黑酚龙胆二糖苷在 10^{-9} mol/L 浓度下均可促进成骨细胞骨矿化结节的形成。

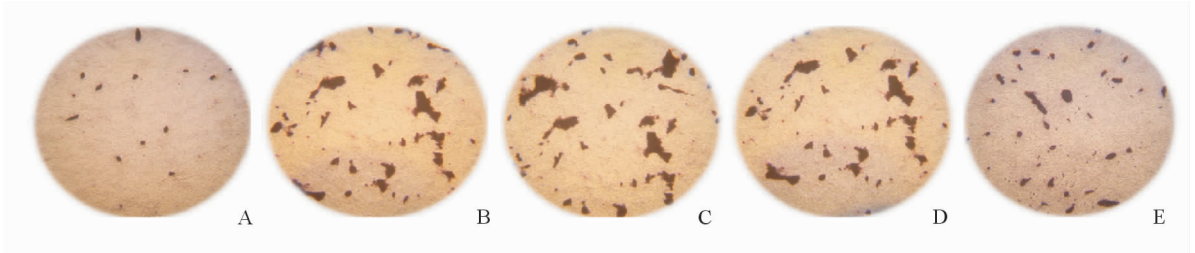


图2 仙茅酚苷类成分对成骨细胞骨矿化结节形成的影响

Fig 2 Effects of phenolic glycosides from *Curculigo orchoides* on the bone mineralized nodule formation of osteoblast

A: Control group; B: Curculigoside group; C: Curculigine A group; D: Orcinol glucoside group; E: Orcinol rhamnoside group. Original magnification: $\times 200$

2.4 对破骨细胞形成、TRAP 活性和骨吸收的影响 骨髓单核细胞在 $1, 25-(OH)_2-VD_3$ 和 10^{-7} mol/L地塞米松诱导下,8 d 后分化为破骨细胞。如表2所示,仙茅苯甲酸酯类酚苷仙茅苷和苔黑酚类酚苷苔黑酚葡萄糖苷和苔黑酚龙胆二糖苷均能减少破骨细胞的数目,抑制破骨细胞的形成 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),含氯苯衍生物仙茅素 A 对破骨细胞的数目没有显著的影响。对于分化成熟的破骨细胞,

仙茅酚苷类成分作用 48 h 后,仙茅苷在 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L 的浓度范围内抑制破骨细胞 TRAP 的活性,另外 3 种酚苷类成分对破骨细胞 TRAP 的活性没有显著的影响。在开始诱导培养破骨细胞时,加入仙茅酚苷类成分 12 d 后,与对照组相比,4 种酚苷类成分均可减少破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝的面积 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),具有抑制破骨细胞骨吸收的作用,其中仙茅苷的抑制作用最为显著。

表2 仙茅酚苷类成分对破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 和骨吸收的影响
Tab 2 Effects of phenolic glycosides from *Curculigo orchoides* on the tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity and bone resorption of osteoclast

$n=5, \bar{x} \pm s$

Group	TRAP-positive multinucleated cells per well (% control)	Osteoclastic TRAP activity (nmol per 100 cells)	Inhibitory rate on osteoclastic bone resorption (%)
Control	100	18.5 ± 2.4	
Curculigoside $c_B / (mol \cdot L^{-1})$			
10^{-7}	76.5 ± 6.8*	13.4 ± 1.8*	38.7 ± 4.5**
10^{-6}	64.2 ± 5.9**	10.6 ± 2.1*	40.5 ± 3.9**
10^{-5}	56.7 ± 6.1**	8.1 ± 1.0**	45.4 ± 5.4**
Curculigine A $c_B / (mol \cdot L^{-1})$			
10^{-7}	96.5 ± 10.5	17.8 ± 2.4	26.1 ± 3.8*
10^{-6}	92.1 ± 11.2	18.1 ± 1.9	24.5 ± 3.4*
10^{-5}	93.8 ± 11.7	16.9 ± 2.5	30.1 ± 2.9*
Orcinol glucoside $c_B / (mol \cdot L^{-1})$			
10^{-7}	67.1 ± 8.9*	15.9 ± 1.9	25.1 ± 3.1*
10^{-6}	61.4 ± 7.2**	17.2 ± 2.0	26.4 ± 3.6*
10^{-5}	52.8 ± 8.0**	18.1 ± 1.8	29.6 ± 4.0*
Orcinol rhamnoside $c_B / (mol \cdot L^{-1})$			
10^{-7}	70.6 ± 8.5*	17.3 ± 2.3	27.8 ± 3.5*
10^{-6}	65.7 ± 6.2*	18.5 ± 2.1	30.5 ± 3.7*
10^{-5}	64.8 ± 7.5**	16.7 ± 2.2	38.2 ± 4.2**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.5 对破骨细胞肌动蛋白环形成的影响 如图3所示,正常破骨细胞具有明显的伪足和肌动蛋白环,可吸附在骨组织表面进行骨吸收。仙茅苷、仙茅素 A、苔黑酚葡萄糖苷和苔黑酚龙

胆二糖苷在 10^{-6} mol/L 浓度下作用 4 h 后,破骨细胞伪足消失,肌动蛋白环变细、结构遭到破坏甚至消失,破骨细胞的形态和结构也同时发生改变。

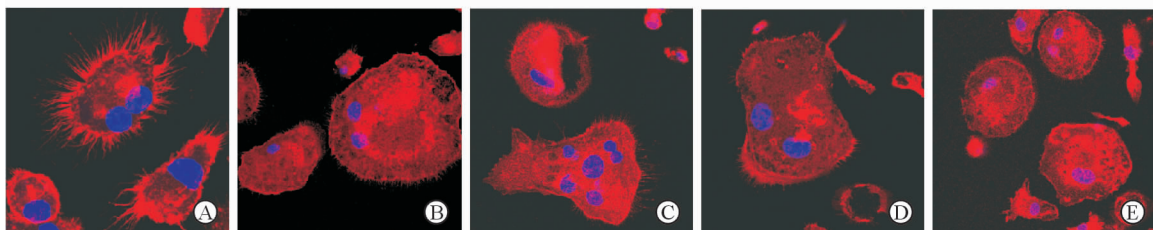


图3 仙茅酚苷类成分对破骨细胞细胞骨架的影响

Fig 3 Effects of phenolic glycosides from *Curculigo orchioides* on the cytoskeleton of osteoclast

A: Control group; B: Curculigoside group; C: Curculigine A group; D: Orcinol glucoside; E: Orcinol rhamnoside group. Original magnification: $\times 630$

3 讨论

仙茅作为壮阳、强壮健骨的中药,在中国、印度、日本和澳大利亚等地被广泛使用。仙茅乙醇提取物对去卵巢大鼠的骨丢失有保护作用^[3],可促进 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖^[7-8]。本研究发现仙茅 3 种结构类型的酚苷类成分均可促进成骨细胞的骨形成,抑制破骨细胞的骨吸收作用,从而明确了仙茅抗骨质疏松的有效成分,为仙茅的临床应用和开发利用提供了科学依据。

骨代谢是由成骨细胞和破骨细胞共同参与的代谢过程。成骨细胞和破骨细胞偶联的骨代谢活动出现异常,导致骨重建障碍。成骨细胞形成减少,骨形成功能减退;破骨细胞的形成和募集增加,骨吸收作用增强。成骨细胞和破骨细胞之间出现负平衡,使骨量减少。因此,观察药物对成骨细胞和破骨细胞的作用可明确其对骨代谢的影响。

成骨细胞的骨形成过程要经历 4 个阶段,即成骨细胞增殖、细胞外基质成熟、细胞外基质矿化和成骨细胞凋亡^[9]。成骨细胞的增殖能力和产生骨基质的能力高低反映了成骨性骨形成的程度。ALP 是成骨细胞分化过程中的标志酶,参与成骨细胞的分化和骨基质的矿化。苯甲酸酯类酚苷仙茅苷在 10^{-8} 、 10^{-9} mol/L 浓度下促进成骨细胞增殖和分化;苔黑酚类酚苷和含氯苯酚衍生物仙茅素 A 对成骨细胞的增殖没有显著的影响,但可增加成骨细胞 ALP 活性;4 种酚苷类成分均可增加成骨细胞骨矿

化结节的形成,表明仙茅酚苷类成分可促进成骨细胞的骨形成作用。

破骨细胞是一种多核巨细胞,来源于造血干细胞分化而来的单核巨噬细胞克隆形成单位。破骨细胞有丰富的胞质内酶系统,在破骨细胞前体细胞向成熟破骨细胞分化过程中产生的一系列标志性蛋白质可作为破骨细胞的识别及其分化阶段的标志。其中,破骨细胞产生的 TRAP 是破骨细胞成熟分化的标志酶。仙茅苯甲酸酯类酚苷仙茅苷在 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内不仅可减少破骨细胞的数目,抑制破骨细胞的形成,还可抑制破骨细胞 TRAP 的活性;苔黑酚类酚苷苔黑酚葡萄糖苷和苔黑酚龙胆二糖苷在 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内仅可减少破骨细胞的数目,但对破骨细胞 TRAP 的活性没有显著的影响;含氯苯酚衍生物仙茅素 A 对破骨细胞形成和 TRAP 的活性均没有显著的影响。

在骨吸收的过程中,破骨细胞的溶酶体酶在破骨细胞与骨基质间形成一个局部酸性微环境,由此集中的不同酸性水解酶溶解骨基质中的无机盐和有机质,经破骨细胞吸收后排到细胞外液,使骨的局部形成吸收陷窝。观察破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝的数目和面积可直观反映破骨细胞的骨吸收作用。仙茅苷、仙茅素 A、苔黑酚葡萄糖苷和苔黑酚龙胆二糖苷均可减少破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝的面积,显示出确切的抑制骨吸收作用。

细胞骨架是真核细胞中由微管、微丝、中间纤维等构成的三维网络结构,其主要功能为维持细胞的

结构和形态,协同细胞运动^[10],并在细胞的增殖、分化、凋亡等活动中发挥重要作用^[11]。成骨细胞在 1, 25-(OH)₂-VD₃ 作用下,细胞骨架萎缩、解体,从而使细胞的形态发生改变,功能减退。仙茅苯甲酸酯类酚苷和苔黑酚类酚苷可对抗 1, 25-(OH)₂-VD₃ 对成骨细胞细胞骨架的破坏作用,维持其形态和功能。肌动蛋白环是破骨细胞特有的进行骨吸收的细胞骨架蛋白,仙茅 3 种结构类型的酚苷类成分均可破坏破骨细胞肌动蛋白环和伪足的结构,从而影响破骨细胞的黏附和迁移,抑制破骨细胞的骨吸收。

值得注意的是仙茅酚苷类成分仙茅苷在 10⁻⁸ mol/L 和 10⁻⁹ mol/L 浓度下促进成骨细胞的增殖,在 10⁻¹⁰ mol/L 的浓度下对成骨细胞的增殖没有显著的影响,但却能增加成骨细胞 ALP 的活性,这可能与成骨细胞在增殖分化的不同阶段受不同的基因调控有关。仙茅苷对成骨细胞增殖基因的调控作用弱于其对分化基因的调控作用,所以仙茅苷促进成骨细胞增殖的浓度高于促进 ALP 活性的浓度,但具体的机制有待深入研究。另外,仙茅酚苷类成分作用于破骨细胞的有效浓度(10⁻⁷~10⁻⁵ mol/L)远远高于作用于成骨细胞的浓度(10⁻¹⁰~10⁻⁸ mol/L),然而我们前期的 MTT 实验发现,在这种浓度下 4 种仙茅酚苷类成分对骨髓单核细胞和破骨细胞活力没有显著的影响。因此,仙茅酚苷类成分的抑制骨吸收作用不是由细胞毒作用引起的,而是抑制了破骨细胞的形成和分化。

本研究结果表明仙茅酚苷类成分为抗骨质疏松的有效物质,可促进成骨细胞的增殖、分化,抑制破骨细胞的形成、分化和骨吸收作用,这为仙茅资源的开发利用提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2015:102.
- [2] He Y, Dong X, Jia X, Li M, Yuan T, Xu H, et al.

Qualitative and quantitative analysis on chemical constituents from *Curculigo orchoides* using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2015, 102: 236-245.

- [3] Cao D P, Zheng Y N, Qin L P, Han T, Zhang H, Rahman K, et al. *Curculigo orchoides*, a traditional Chinese medicinal plant, prevents bone loss in ovariectomized rats [J]. Maturitas, 2008, 59: 373-380.
- [4] 刘祖德,臧鸿声. 新生大鼠颅骨成骨性细胞体外生长过程研究[J]. 解剖学报,1995,26:157-160.
- [5] Li B, Yu S. Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation[J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26: 780-786.
- [6] Zhang Q, Qin L, He W, Van Puyvelde L, Maes D, Adams A, et al. Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity [J]. Planta Med, 2007, 73: 13-19.
- [7] Liu M, Li Y, Yang S T. Curculigoside improves osteogenesis of human amniotic fluid-derived stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2014, 23: 146-154.
- [8] Shen Q, Zeng D, Zhou Y, Xia L, Zhao Y, Qiao G, et al. Curculigoside promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells from ovariectomized rats [J]. J Pharm Pharmacol, 2013, 65: 1005-1013.
- [9] 童安莉,陈璐璐,丁桂芝. 成骨细胞骨形成机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,1999,5:60-64.
- [10] Fletcher D A, Mullins R D. Cell mechanics and the cytoskeleton[J]. Nature, 2010, 463: 485-492.
- [11] Yu B Y, Chou P H, Sun Y M, Lee Y T, Young T H. Topological micropatterned membranes and its effect on the morphology and growth of human mesenchymal stem cells (hMSCs) [J]. J Member Sci, 2006, 273: 31-37.

[本文编辑] 尹 茶