

## · 基础研究 ·

## 淫羊藿苷对破骨细胞活性的影响

吕明波<sup>1</sup>, 刘兴炎<sup>1</sup>, 葛宝丰<sup>1</sup>, 陈克明<sup>1</sup>, 白孟海<sup>1</sup>, 汪玉海<sup>1</sup>, 顾九君<sup>1</sup>, 马丽萍<sup>2</sup>

(1. 兰州军区总医院骨科, 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州大学生命科学院)

**【摘要】**目的:观察淫羊藿苷对破骨细胞骨吸收及凋亡的影响,探讨淫羊藿苷的抗骨质疏松作用机制。方法:体外分离、培养兔破骨细胞,与玻片及骨磨片共同培养,用  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $5 \times 10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L浓度的淫羊藿苷刺激破骨细胞,倒置相差显微镜下观察活体细胞、HE染色、TRAP染色及骨吸收陷窝甲苯胺蓝染色,鉴定破骨细胞,并进行骨吸收陷窝计数和面积测量,吖啶橙染色观察凋亡破骨细胞所占的比例。结果:与空白对照组比较, $10^{-6}$ 、 $5 \times 10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L浓度的淫羊藿苷组破骨细胞凋亡率均明显增高,骨吸收陷窝数目、面积明显减少,随浓度增加抑制作用增强,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。结论:淫羊藿苷可诱导破骨细胞凋亡,抑制骨吸收,并随浓度增加抑制作用增强。

**【关键词】**破骨细胞; 淫羊藿苷; 细胞凋亡

**Effects of Icarin on osteoclastic bone resorption and apoptosis in vitro** LÜ Ming-bo\*, LIU Xing-yan, GE Bao-feng, CHEN Ke-ming, BAI Meng-hai, WANG Yu-hai, GU Jiu-jun, MA Li-ping\* Department of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital Military Command, Lanzhou 730050, Gansu, China

**ABSTRACT Objective:** To observe the effect of Icarin on osteoclastic bone resorption and apoptosis in vitro and explore the mechanism of Icarin in preventing osteoporosis **Methods:** Osteoclasts were separated from long-limb bones of new born rabbits, cultured with glass slices and bone slices, and treated by  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  mol/L Icarin. Osteoclasts were identified by observing live cells with phase contrast microscope, HE staining, TRAP staining and toluidine blue staining of bone resorption pits. The number of bone resorption pits were counted as well as the surface area of bone resorption on bone slice. Osteoclasts were stained with acridine orange. The rates of apoptotic osteoclasts were observed under fluorescence microscope. **Results:** Comparing with the blank control group, the rates of apoptotic osteoclasts increased obviously and the number and area of bone resorption pits decreased evidently with increasing dose in those groups treated by  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  mol/L Icarin. The differences between control group and those groups treated by  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  mol/L Icarin were significant if  $P < 0.05$ . **Conclusion:** Icarin can induce osteoclast apoptosis and inhibit bone resorption in dose-dependent manner

**Key words** Osteoclasts; Icarin; Apoptosis

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(8): 529-531 www.zggszz.com

中草药淫羊藿具有补肾壮阳、强筋健骨、祛风除湿之功效,是中医治疗骨质疏松最常用的药物之一。已知淫羊藿苷是淫羊藿的主要活性成分,许多研究<sup>[1]</sup>已经证实淫羊藿苷能够促进体外培养成骨细胞的增殖与分化,本实验探讨了淫羊藿苷对体外培养破骨细胞骨吸收功能和凋亡的影响,现报告如下。

## 1 材料与方

**1.1 动物** 出生 24 h 内的青紫蓝兔(兰州生物制品研究所)。  
**1.2 药品及试剂** MEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(兰州民海生物工程有限公司),淫羊藿苷(中国药品生物制品鉴定所),17 雌二醇、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒、甲苯胺蓝、吖啶橙(美国 Sigma 公司)。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 玻片和骨磨片的制备与处理** 将盖玻片用玻璃刀分

切成 1 cm × 1 cm 大小,洗净,消毒灭菌备用。取新鲜的牛股骨,用锯式切片器(LEICA SP 1600 德国)将其皮质部切成 20 μm 厚的骨片,再修剪成 0.5 cm × 0.5 cm 大小,超声波清洗后,浸泡于含青霉素 1 000 U/ml、链霉素 1 000 μg/ml 的 PBS 缓冲液中,4℃ 保存,用时更换 3 次培养液,每次 20 min。

**1.3.2 兔破骨细胞的分离和培养** 将新生兔断颈处死,75% 乙醇浸泡 15 min,无菌条件下取四肢长骨(股骨、肱骨、胫骨),剔除软组织及骨垢,置于冷的 PBS 缓冲液中洗净。然后在冷的 MEM 全培养液(含 15% 胎牛血清,青霉素 100 U/ml、链霉素 100 mg/ml)内,将骨干纵形剖开,用尖手术刀轻刮骨的内表面,并用尖吸管吸取培养液反复冲洗髓腔内,至颜色变白,静置 1 min,取细胞悬液,接种于预置骨磨片或盖玻片的 24 孔培养板上(每孔已加 1 ml MEM 全培养液,并在二氧化碳孵育箱中孵育 1 h),每孔加细胞悬液 0.5 ml,置于二氧化碳孵育箱中培养,16 h 左右更换培养液,冲洗掉未附着的细胞,继续培养。每 3 d 更换 50% 的培养液。

基金项目:“十五”全军重点项目(编号:01Q012)

通讯作者:陈克明 Tel: 0931-8975235 E-mail: Chkeming@yahoo.com.cn

**1.3.3 分组** 取无菌 24孔细胞培养板 2块,1块每孔加 1 ml MEM全培养液和 1个骨磨片,另 1块每孔加 1 ml MEM全培养液和 1个盖玻片,均分为 6组,每组 4孔,置二氧化碳孵育箱内 1 h后,每孔加入上述分离的细胞悬液 0.5 ml,5% CO<sub>2</sub>、37 °C 潮湿条件下继续培养。

**1.3.4 药物的添加** 于培养 16 h后用 PBS缓冲液冲洗掉未附着于骨磨片或盖玻片上的细胞,第 1组作为空白对照组,每孔只加入 1.5 ml MEM全培养液,不加淫羊藿苷;第 2、3、4、5组为实验组,每孔加入 1.5 ml MEM全培养液配制的淫羊藿苷溶液,浓度分别为 10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、5 × 10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L;第 6组作为阳性对照组每孔加入含 17 雌二醇为 10<sup>-7</sup> mol/L的 MEM全培养液 1.5 ml,每 3 d换液 1次,补充等量的新培养液及等量的淫羊藿苷及 17 雌二醇。

**1.4 观察项目与方法**

**1.4.1 破骨细胞的鉴定** 倒置相差显微镜下动态观察活体细胞的形态及生长情况,盖玻片 HE染色、TRAP染色,骨磨片骨吸收陷窝甲苯胺蓝染色,鉴定破骨细胞。

**1.4.2 骨吸收陷窝计数和面积测量** 培养 7 d后取出骨片,用 2.5%戊二醛固定液固定 7 min,0.25 mol/L 氢氧化氨中超声清洗 5 min × 3次,系列乙醇脱水,自然晾干,1%甲苯胺蓝染液室温染色 3~4 min,蒸馏水清洗后光镜下观察。光镜 100倍下对整张骨片作陷窝计数,每组计数 4张骨片,同时采集每张骨片的骨吸收陷窝图像,骨吸收面积用 Image Pro Plus 软件(美国 Media Cybernetics公司)分析。以上所得数据均取均值,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

**1.4.3 吖啶橙染色与破骨细胞凋亡观察** 于培养 48 h后取出盖玻片,4%多聚甲醛固定 10 min,1%醋酸酸化 30 s,PBS缓冲液清洗 1 min,入 0.01%吖啶橙染液染色 5 min,PBS缓冲液清洗 1 min,用 0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub> 分色 2 min,PBS缓冲液清洗 3次,各 10 s,以 PBS做介质封片,用激发滤片 BG-12,阻断滤片波长 515 nm,荧光显微镜下观察并计数每张盖玻片上正常和凋亡破骨细胞数目,计算每组的凋亡破骨细胞总数与该组破骨细胞总数的百分比(凋亡率)。

**1.5 统计学分析** 实验所得数据均采用 SPSS 11.5 统计软件进行处理,吸收陷窝数目、面积进行单因素方差分析 Dunnett-t 检验,破骨细胞凋亡率的比较采用  $\chi^2$  检验。

**2 结果**

**2.1 破骨细胞的鉴定** 倒置相差显微镜下见破骨细胞贴壁生长,形态不规则,部分细胞可见有伪足,细胞内可见多个细胞核,胞浆内有时见大小不等的空泡(见图 1)。HE染色可见形态不规则的巨大细胞,胞核呈深蓝色,多核(3~20个),呈圆形、椭圆形,胞浆呈粉红色(见图 2)。TRAP染色可见破骨细胞胞浆内 TRAP活性部位形成棕红色沉淀,胞核染色呈阴性,多核,部分胞浆可见大小不一的空泡(见图 3)。骨磨片骨吸收陷窝甲苯胺蓝染色可见吸收陷窝呈紫蓝色圆形、椭圆形、腊肠形等多种形态,部分连接呈串珠样(见图 4、5)。

**2.2 骨吸收陷窝计数和面积测量** 如表 1 所示,淫羊藿苷 10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、5 × 10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L 组吸收陷窝数目、面积均比空白对照组少,除淫羊藿苷 10<sup>-7</sup> mol/L 组外(吸收陷窝数目比较 P=0.085 > 0.05,吸收陷窝面积比较 P=0.055 > 0.05),淫羊藿

苷 10<sup>-6</sup>、5 × 10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L 组与空白对照组相比差异有显著性意义(吸收陷窝数目比较 P=0.021,0.004,0.000 < 0.05,吸收陷窝面积比较 P=0.009,0.001,0.000 < 0.05),表明中、高浓度淫羊藿苷均能明显抑制破骨细胞骨吸收功能,淫羊藿苷 10<sup>-6</sup>、5 × 10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L 组随着淫羊藿苷浓度的增加,吸收陷窝数目、面积呈剂量依赖性减少,说明破骨细胞骨吸收功能随淫羊藿苷浓度的增加而降低。17 雌二醇 10<sup>-7</sup> mol/L 组吸收陷窝数目、面积明显少于空白对照组,并且两组差异有显著性意义(吸收陷窝数目比较 P=0.000 < 0.05,吸收陷窝面积比较 P=0.000 < 0.05),说明 17 雌二醇对破骨细胞骨吸收有抑制功能。

**2.3 吖啶橙染色与破骨细胞凋亡观察** 吖啶橙非特异性地结合于核酸,从而显示细胞核的形态。荧光显微镜下正常破骨细胞胞核大小一致,染色质分布均匀,吖啶橙着色浅淡。凋亡破骨细胞体积明显缩小,胞质固缩,细胞核大小不一,吖啶橙着色不均而且较深,细胞核裂解、凝固,染色质着边可成新月状,或者形成小而亮的凋亡小体(见图 6)。

如表 2 所示,淫羊藿苷 10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、5 × 10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L 组破骨细胞凋亡率均比空白对照组高,且随着淫羊藿苷浓度的增加而递增;淫羊藿苷 10<sup>-6</sup>、5 × 10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L 组与 10<sup>-7</sup> mol/L 组相比,差异均有统计学意义(P=0.000 < 0.05)。表明中、高浓度淫羊藿苷均能明显增加破骨细胞凋亡率,而低浓度淫羊藿苷(10<sup>-7</sup> mol/L)对破骨细胞凋亡率没有明显影响(P=0.320 > 0.05),淫羊藿苷 10<sup>-6</sup>、5 × 10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L 组随着浓度的增加,破骨细胞凋亡率呈剂量依赖性增加,说明破骨细胞凋亡率随淫羊藿苷浓度的增加而增加。17 雌二醇 10<sup>-7</sup> mol/L 组与空白对照组相比,两组差异有显著性意义(P=0.002 < 0.05),说明 17 雌二醇能明显增加破骨细胞凋亡率。

表 1 各组骨磨片上的骨吸收陷窝数及面积比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The comparison of the number and area of bone resorption pits on bone slice in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	骨吸收陷窝数	骨吸收陷窝面积(μm <sup>2</sup> )
空白对照	148.75 ± 21.92	1 523.64 ± 109.77
淫羊藿苷(10 <sup>-7</sup> mol/L)	120.75 ± 21.41	1 326.29 ± 168.84
淫羊藿苷(10 <sup>-6</sup> mol/L)	111.00 ± 19.66	1 248.32 ± 83.80
淫羊藿苷(5 × 10 <sup>-6</sup> mol/L)	101.00 ± 17.21	1 169.15 ± 135.18
淫羊藿苷(10 <sup>-5</sup> mol/L)	76.75 ± 13.65	842.54 ± 75.44
17 雌二醇(10 <sup>-7</sup> mol/L)	81.50 ± 16.69	904.74 ± 113.84

表 2 各组破骨细胞凋亡率的比较

Tab 2 The comparison of the rate of apoptotic osteoclasts in each group

组别	破骨细胞总数	凋亡细胞数	凋亡率(%)
空白对照	250	91	36.40
淫羊藿苷(10 <sup>-7</sup> mol/L)	195	80	41.02
淫羊藿苷(10 <sup>-6</sup> mol/L)	311	170	54.66
淫羊藿苷(5 × 10 <sup>-6</sup> mol/L)	311	179	57.56
淫羊藿苷(10 <sup>-5</sup> mol/L)	294	190	64.60
17 雌二醇(10 <sup>-7</sup> mol/L)	488	237	48.57

**3 讨论**

淫羊藿为中国传统补肾中药,具有补肾壮阳、强筋骨、祛

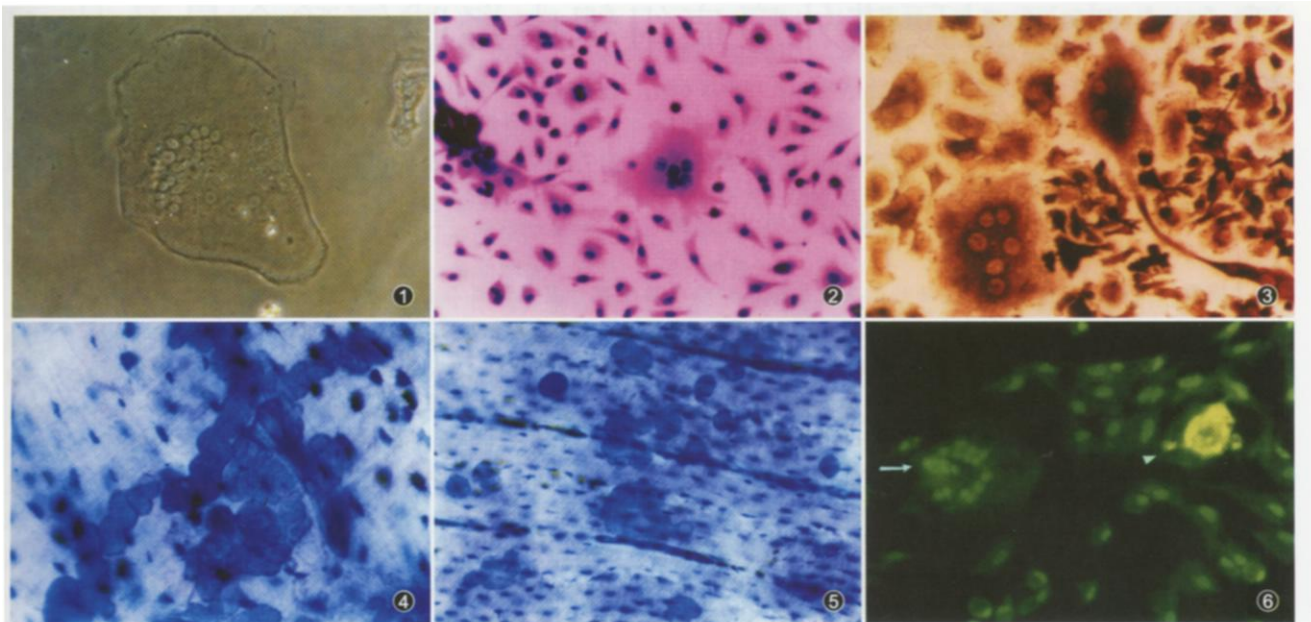


图 1 破骨细胞细胞活体观察,可见细胞多核和伪足形成 (×200) 图 2 破骨细胞 HE 染色,胞核呈深蓝色,多核,胞浆呈粉红色 (×200) 图 3 破骨细胞 TRAP 染色,可见胞浆呈棕红色,胞核染色呈阴性 (×200) 图 4 空白对照组骨吸收陷窝甲苯胺蓝染色,可见吸收陷窝呈蓝色,连接呈串珠样 (×200) 图 5  $10^{-5}$  mol/L 淫羊藿苷组骨吸收陷窝甲苯胺蓝染色,可见吸收陷窝与空白对照组相比明显减少 (×200) 图 6 破骨细胞吖啶橙染色,正常破骨细胞,细胞核染色均匀,吖啶橙着色浅淡,凋亡破骨细胞,细胞体积明显缩小,细胞核裂解、凝固,吖啶橙着色不均而且较深 (×200)

**Fig 1** Observation of live osteoclasts with inverted light microscope showed multinucleated cells and pseudopodia (×200) **Fig 2** HE staining of osteoclasts showed blue nuclei and pink cytoplasm of multinucleated cells (×200) **Fig 3** TRAP staining of osteoclasts showed brownish red cytoplasm and nuclei were stained negative (×200) **Fig 4** Toluidine blue staining of bone resorption pits of control group showed blue resorption pits connecting into bunches (×200) **Fig 5** Toluidine blue staining of bone resorption pits of the group treated by  $10^{-5}$  mol/L Kariin showed the resorption pits obviously decreased comparing with control group (×200) **Fig 6** Acridine orange staining of osteoclasts showed the nuclei of normal osteoclast (arrow) were stained uniformly and thinly, whereas the volume of apoptotic osteoclast (arrowhead) shrunk obviously and the nuclei fragmented and condensed, were stained unevenly and thickly (×200)

风除湿的功效,淫羊藿苷的抗骨质疏松作用已经为许多研究所证实<sup>[2]</sup>。骨吸收陷窝数目和面积是判断体外培养破骨细胞骨吸收功能的主要指标,本实验结果显示淫羊藿苷能明显抑制破骨细胞骨吸收功能,并且具有剂量依赖性。关于淫羊藿苷抑制破骨细胞骨吸收功能的作用机制目前还不清楚,本实验中混有一些成骨细胞,有研究显示<sup>[3]</sup>,淫羊藿苷可下调成骨细胞中 RANKL 的表达,而 RANKL 是调节破骨细胞分化和骨吸收功能的关键因子<sup>[4]</sup>,本研究不能排除淫羊藿苷通过成骨细胞间接作用于破骨细胞的可能性,具体机制还有待于进一步研究。本实验结果显示只有中、高浓度淫羊藿苷能增加破骨细胞凋亡率,而低浓度淫羊藿苷对破骨细胞凋亡率没有明显影响。对于淫羊藿苷诱导破骨细胞凋亡的机制,目前尚无报道,但有报道<sup>[5]</sup>淫羊藿苷可明显抑制肿瘤细胞端粒酶的活性,下调凋亡相关基因 bcl-2 和 c-myc mRNA 和蛋白质的表达,至于淫羊藿苷诱导破骨细胞凋亡的机制是否与其相似还有待进一步研究。本实验在细胞水平观察了淫羊藿苷对体

外破骨细胞的影响,发现淫羊藿苷具有抑制体外培养破骨细胞骨吸收功能和促进其凋亡的作用,这将为淫羊藿苷治疗骨质疏松提供新的理论依据,并为临床调节破骨细胞功能提供新的手段。

#### 参考文献

- 殷晓雪,陈仲强,党耕町,等.淫羊藿苷对人成骨细胞增殖与分化的影响.中国中药杂志,2005,30(4):289-291.
- 鲍加荣,杨继文,李树峰,等.淫羊藿苷对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响.卫生研究,2005,34(2):191-193.
- 张秀珍,杨黎娟.淫羊藿苷对大鼠成骨细胞护骨素、RANKL 表达的影响.中华内分泌杂志,2006,22(3):222-225.
- Fuller K, Wong B, Fox S, et al. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. J Exp Med, 1998, 188(5):997-1001.
- 张玲,王芸,毛海婷,等.淫羊藿苷抑制肿瘤细胞端粒酶活性及其调节机制的研究.中国免疫学杂志,2002,18(3):191.

(收稿日期:2006-12-26 本文编辑:连智华)