

## 葛根素防治骨质疏松症的作用机制研究进展

张露新<sup>1</sup>, 孟璐<sup>2</sup>, 张虹<sup>2\*</sup>

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院), 河南 洛阳 471002

**摘要:** 我国骨质疏松症的患病率高, 是老年患者致残和致死的主要原因之一。葛根素是葛根中主要活性成分, 可促进成骨细胞的增殖分化、抑制骨吸收和破骨细胞的分化形成、促进骨髓间充质干细胞向成骨分化、发挥雌激素样作用。综述了葛根素防治骨质疏松症的作用机制研究进展, 为深入开展葛根素治疗骨质疏松症的基础研究和新药开发提供参考。

**关键词:** 葛根素; 骨质疏松; 成骨细胞; 破骨细胞; 骨髓间充质干细胞; 雌激素样作用

**中图分类号:** R982 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)11-2899-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.041

## Research progress on mechanism of puerarin in prevention and treatment of osteoporosis

ZHANG Lu-xin<sup>1</sup>, MENG Lu<sup>2</sup>, ZHANG Hong<sup>2</sup>

1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital/Henan Provincial Orthopedic Hospital, Luoyang 471002, China

**Abstract:** The prevalence of osteoporosis in China is high, and is one of the main causes of disability and death in elderly patients. Puerarin is the main active ingredient in *Puerariae Radix*, which can promote the proliferation and differentiation of osteoblasts, inhibit bone resorption and osteoclast differentiation, promote bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts, and exert estrogen like effects. This article reviews the research progress on mechanism of puerarin in preventing and treating osteoporosis, providing reference for further basic research and new drug development of puerarin in treating osteoporosis.

**Key words:** puerarin; osteoporosis; osteoblasts; osteoclast; bone marrow mesenchymal stem cell; estrogen like effect

骨质疏松症是一种以骨骼微结构破坏、骨量和骨质量下降为特点的全身代谢性骨病, 多见于绝经后女性和老年人, 主要表现为骨强度下降、骨密度降低、骨脆性增加、在轻微外力作用下极易发生骨折<sup>[1]</sup>。我国骨质疏松症的患病率高, 是老年患者致残和致死的主要原因之一。目前临床上用于骨质疏松症防治的药物主要包括骨健康基本补充剂(钙剂、维生素D)、骨形成促进剂、骨吸收抑制剂等<sup>[2]</sup>。临床上没有根治骨质疏松症的药物, 并且常用的化学药的治疗存在疗效不确切、依从性欠佳、不良反应多、患者不耐受等问题, 因此筛选出更多安全有效的抗骨质疏松症药物成为当务之急。葛根素提取自豆科植物野葛、粉葛, 是葛根中主要活性成分,

也是葛根中特有的一种异黄酮类化合物, 且含量最高, 《中国药典》2020年版一部规定干燥葛根中葛根素为 98.0%~102.0%<sup>[3]</sup>。研究发现, 葛根素可以调节破骨细胞与成骨细胞之间持续性的动态平衡, 对骨质疏松症的防治起到积极作用<sup>[4-5]</sup>。葛根素可促进成骨细胞的增殖分化、抑制骨吸收和破骨细胞的分化形成、促进骨髓间充质干细胞向成骨分化、发挥雌激素样作用。因此本文综述了葛根素防治骨质疏松症的作用机制研究进展, 为深入开展葛根素治疗骨质疏松症的基础研究和新药开发提供参考。

### 1 促进成骨细胞的增殖分化

成骨细胞的增殖、分化和矿化是骨形成和重建的关键因素, 来源于骨髓间充质干细胞, 在维持骨

收稿日期: 2023-09-21

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题(2022ZY1137)

作者简介: 张露新(1998—), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生。E-mail: 1376149789@qq.com

\*通信作者: 张虹(1972—), 女, 教授, 主任药师, 硕士生导师。E-mail: chinazhangh@163.com

代谢平衡、促进骨骼发育中发挥着重要的功能<sup>[6]</sup>。研究表明,葛根素通过增强成骨细胞的活性,促进成骨增殖分化,是有效治疗骨质疏松症的重要途径之一<sup>[7]</sup>。马茜等<sup>[8]</sup>进行了体外实验,将 100、10、1、0.1  $\mu\text{mol/L}$  葛根素用于 MC3T3-E1 细胞,发现葛根素能够通过激活 p38、ERK1/2 信号通路不同程度地增强 MC3T3-E1 细胞的增殖分化、细胞碱性磷酸酶 (ALP) 的活性和细胞 I 型胶原蛋白分泌水平,尤其 1  $\mu\text{mol/L}$  时作用 48 h 效果最佳,这可能是葛根素防治骨质疏松症的机制。Runx2 是骨骼发育的关键转录因子,它的表达是成骨细胞分化的开始。曾祥伟<sup>[9]</sup>研究表明葛根素可以下调靶向 Runx2 的 miR-204 的表达水平,降低 miR-204 宿主基因 TRPM3 的 mRNA 和蛋白质表达量,促进 Runx2 的表达水平,实现对小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖和分化。同时还发现葛根素能够调节成骨细胞内、外钙离子的浓度,当葛根素短时间 (2 h) 作用于细胞,会使细胞内钙离子浓度增加,促进成骨细胞的增殖分化;当葛根素作用时间延长至 48 h 时,趋势被逆转,细胞外钙离子浓度增加,提升与细胞外基质蛋白的结合率,为 MC3T3-E1 细胞矿化做准备。杨一秋等<sup>[10]</sup>研究证实经葛根素干预后的去卵巢小鼠骨小梁数量增加、连续性良好、骨髓腔扩大,表明葛根素对于绝经后骨质疏松症具有良好的治疗作用。在进一步的机制研究中发现,小鼠体内张力蛋白同源物基因 PTEN 的 mRNA 和蛋白的表达水平上调。PTEN 可对 PI3K/Akt 信号通路起到负性调节作用,而 PI3K/Akt 信号通路在骨质疏松症发病的细胞信息传导过程中扮演了重要角色,此通路可促进成骨细胞的增殖和分化,进而缓解骨质疏松症的发展<sup>[11]</sup>。自噬是细胞内的一种代谢过程,能够去除受损和长寿的细胞器和蛋白质,适当的自噬在促进成骨分化的过程中发挥着至关重要的作用<sup>[12]</sup>。参与自噬的主要介质包括自噬效应蛋白 (Beclin-1)、微管相关蛋白轻链 3 (LC3),当激活自噬时,Beclin-1、LC3-II 的表达水平上升。于冬冬等<sup>[13]</sup>发现葛根素在增强成骨细胞分化的同时也可促进自噬小体的生成,上调 LC3-II、Beclin-1 的表达。反之,在加入自噬抑制剂 3-甲基嘌呤 (3-MA),上述现象均被抑制,进一步说明了在葛根素促进成骨细胞增殖中,自噬发挥了关键的调节作用。以上研究表明,葛根素能够通过激活不同信号通路促进成骨细胞增殖分化、激活细胞自噬,发挥防治骨质疏松症的作用。

## 2 抑制骨吸收和破骨细胞的分化形成

破骨细胞是具有蚀骨作用的多核巨细胞,直接参与并影响骨骼发育和重塑过程。既往研究发现,在骨质疏松症发展的进程中,破骨细胞过度活化或分化,致使骨吸收能力增强、骨量降低、骨结构受损,最终骨组织代谢异常<sup>[14]</sup>。因此,抑制破骨细胞分化、骨吸收是骨质疏松症的治疗策略之一。刘春丽等<sup>[15]</sup>通过对单核巨噬细胞 RAW264.7 向破骨细胞分化进行体外诱导的方法来观察 10、25、50  $\mu\text{mol/L}$  葛根素对破骨细胞形成能力、破骨细胞骨架、破骨分化相关基因表达的影响,分析葛根素在破骨细胞分化成熟中的作用。CCK8 检测结果显示葛根素安全给药浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  及以下,经抗酒石酸酸性磷酸酶染色 (TRAP) 和 F-actin 染色发现,与破骨诱导组相比,各浓度葛根素组破骨细胞的形成能力显著降低,且细胞 F-actin 环变小,从而减弱骨吸收能力。同时采用 RT-PCR 检测和 Western blotting 检测进行分析,葛根素可以抑制 Notch 信号通路相关蛋白的表达量,证实了 Notch 信号通路在破骨细胞分化过程中起激动作用,而葛根素抑制破骨细胞成熟分化就是通过阻断 Notch 信号通路的激活实现的。李兰<sup>[16]</sup>通过动物和细胞实验探讨葛根素对破骨细胞内 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路转录水平的影响,分析该通路抑制骨质疏松症的作用机制。实验研究发现,葛根素可以有效延缓骨质疏松症的发展进程,其作用机制是通过抑制可溶性卷曲蛋白 2 (sFRP2) 的表达,从而升高骨组织内 Wnt4、 $\beta$ -catenin、TCF1、Cyclin D1、C-myc 基因表达水平实现的。同时小剂量葛根素可以通过促进 Wnt4 的表达来降低破骨细胞 TRAP 的表达量,进而抑制破骨细胞的骨吸收功能,达到治疗骨质疏松症的目的。基于上述研究表明,葛根素可调控破骨细胞相关的信号通路,减弱其分化和骨吸收能力,这对临床治疗骨质疏松症、骨缺损相关疾病有重要的意义。

## 3 促进骨髓间充质干细胞向成骨分化

骨髓间充质干细胞是从骨髓中分离出的非造血干细胞,具有自我更新和多向分化的能力,在一定条件的刺激和诱导下,可分化为成骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞和软骨细胞等<sup>[17]</sup>。已有多项研究证实,葛根素可以促进骨髓间充质干细胞增殖,并向成骨细胞分化,在平衡骨代谢和维持骨结构稳定中发挥重要的作用<sup>[18-19]</sup>。宋明甲等<sup>[20]</sup>研究发现 1  $\mu\text{mol/L}$  葛根素最能增强骨髓间充质干细胞的增殖

和钙化能力,提高 ALP 活性和骨钙素含量,促进成骨相关因子 Runx-2、OSX、BMP-2、Collagen-I mRNA 的表达水平。此外该研究使用 NO 合成酶抑制剂(LNMA)预处理骨髓间充质干细胞,进一步证明了葛根素促进大鼠骨髓间充质干细胞向成骨分化是通过激活 NO 信号通路实现的。安晋阳等<sup>[21]</sup>体外实验研究发现葛根素通过核因子 E2 相关因子 2 (NRF2) 信号通路可显著升高骨髓间充质干细胞核内 NRF2 及其下游 HO1、NQO1 的蛋白表达水平,同时葛根素组中脂质过氧化产物 MDA 降低,抗氧化剂 GSH 升高,证实葛根素可以减轻骨髓间充质干细胞的氧化损伤和凋亡数量,提高其存活率,有效改善因氧化损伤所致的骨髓间充质干细胞成骨分化能力下降。含 PR 结构域的蛋白 (PRDM16) 和骨形态发生蛋白 (BMP) 可调控骨髓间充质干细胞向成骨细胞和脂肪细胞分化,在正常的生理状态下,多分化为成骨细胞。当骨骼内脂肪细胞数量高于一般水平时,其通过释放异常细胞因子对骨代谢产生一定影响,加快骨量流失,降低骨密度,最终导致骨质疏松症的发生,因此抑制骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化,可有效减少骨髓腔内脂肪细胞的堆积,进而促进骨形成<sup>[22]</sup>。齐振熙等<sup>[23]</sup>研究了葛根素抑制激素诱导大鼠骨髓间充质干细胞成脂分化的机制,发现葛根素是通过调节 Wnt 信号途径相关基因和关键蛋白  $\beta$ -catenin 表达的变化来实现的,与激素诱导组相比,葛根素组显著上调 *Wnt10b* mRNA、 *$\beta$ -catenin* mRNA 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达水平,降低了 *GSK3 $\beta$*  mRNA 的表达水平。已有学者实验证明激活 Wnt 信号途径既可以抑制骨髓间充质干细胞的成脂分化,又可以促进其向成骨细胞分化<sup>[24-25]</sup>。因此葛根素可能通过不同信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨分化,并对其氧化损伤起到保护作用,达到了治疗骨质疏松症的目的。

#### 4 发挥雌激素样作用

雌激素水平降低是引发骨质疏松症的原因之一,雌激素缺乏会导致对破骨细胞的抑制作用减弱,减少破骨细胞凋亡,并增加其数量<sup>[26-27]</sup>。雌激素抑制骨吸收主要是与破骨细胞、成骨细胞上的雌激素受体结合,从而提升成骨细胞活力,降低破骨细胞的重吸收,减少钙质沉着。葛根素作为一种植物雌激素,可以刺激成骨细胞的增殖和分化,抑制破骨细胞的骨吸收活性,改善骨代谢,有效防治骨量流失<sup>[28]</sup>。赵艳威等<sup>[29]</sup>研究证明葛根素可以发挥雌

激素样作用,提高人成骨样 MG-63 细胞中 ALP 活性和 I 型胶原蛋白的分泌,从而促进成骨细胞成熟分化,除此之外,该研究应用雌激素受体 (ER) 阻断剂 ICI 182、780 和小 RNA 干扰技术进一步证实葛根素发挥该调节作用是通过 ER 途径,由 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  共同介导的。吕海宏等<sup>[30]</sup>探讨了葛根素和 ER $\alpha$  甲基化之间的关系以及对大鼠成骨细胞代谢调控的具体机制,经体外细胞实验观察,随着葛根素浓度不断升高,成骨细胞 ER $\alpha$  基因启动子 A 区甲基化的程度则随之减弱,细胞 ER $\alpha$  mRNA 表达显著增加,同时成骨细胞 ALP 活性与成骨细胞分化促进率也明显提高,葛根素的适宜浓度为 25  $\mu$ mol/L。

#### 5 结语

葛根素具有一定的抗骨质疏松症活性,这与其能促进成骨细胞增殖分化、抑制破骨细胞的骨吸收活性、诱导骨髓间充质干细胞向成骨分化、发挥雌激素样作用有关,体现了中药活性成分可以通过多途径、作用于多个靶点来调节骨代谢以对抗骨质疏松症<sup>[31-32]</sup>。同时葛根素可以与各种复合材料支架联用,在动物实验中取得显著的成果,不但为治疗骨质疏松、骨缺损相关疾病提供了科学依据,并且拓宽了葛根素的药用价值和临床适用范围。目前关于葛根素抗骨质疏松症的细胞实验和动物实验已有较多报道,但是临床应用才是研究葛根素防治骨质疏松症的最终目的,建议临床上加强相互之间的协作,增加大样本、多中心的临床对照研究,有助于该药深入的开发、利用<sup>[33]</sup>。葛根素已经在骨质疏松症防治领域表现出巨大的潜力和研究价值,随着中药材分子生物学、药理学、人工智能技术的不断发展,该药能够更加安全、高效的用于临床。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会,章振林.原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)[J].中国全科医学,2023,26(14):1671-1691.
- [2] Management of osteoporosis in postmenopausal women: the 2021 position statement of The North American Menopause Society [J]. *Menopause*, 2021, 28(9): 973-997.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
- [4] 蒋华,李盼盼,张涛,等.葛根素通过下调 miR-23a 促进小鼠前成骨细胞增殖和分化的研究 [J]. 解剖科学进展, 2023: 1-7.
- [5] 吕立桃,范卫闯.葛根素对去卵巢大鼠骨代谢平衡的影响 [J]. 西部中医药, 2023, 36(7): 27-30.

- [6] 钟海波, 郭祥, 黄琳惠. 葛根素通过 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路刺激成骨分化和骨形成的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 78-83.
- [7] Zhou Y, Zhang H, Peng C. Puerarin: A review of pharmacological effects [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(7): 961-975.
- [8] 马茜, 陈智华, 史冬雪, 等. 葛根素通过激活 p38 MAPK 信号通路促进 MC3T3-E1 细胞增殖的研究 [J]. 中国兽医科学, 2021, 51(7): 925-931.
- [9] 曾祥伟. TRPM3 在葛根素促成骨细胞增殖、分化和矿化中的作用 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [10] 杨一秋, 李兰, 解继胜, 等. 葛根素介导 PTEN-PI3K-AKT 信号通路抑制绝经后骨质疏松症的机制研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(3): 347-351.
- [11] Xi J, Zang H, Guo L, *et al.* The PI3K/AKT cell signaling pathway is involved in regulation of osteoporosis [J]. *Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 640-645.
- [12] Feng Q, Cheng S, Yang R, *et al.* Puerarin promotes the viability and differentiation of MC3T3-E1 cells by enhancing LC3B-mediated autophagy through downregulation of miR-204 [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(2): 883-890.
- [13] 于冬冬, 赵丹阳, 杨鹤祥. 自噬在葛根素促成骨细胞分化调节中的作用 [J]. 中国医科大学学报, 2021, 50(9): 779-784.
- [14] 赵常红, 李世昌, 李沛鸿, 等. 调节破骨细胞功能的相关信号分子的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(9): 1361-1365.
- [15] 刘春丽, 闫雨娟, 莫礼文, 等. 葛根素对 RAW264.7 细胞破骨分化的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(32): 5114-5119.
- [16] 李兰. 葛根素通过 Wnt4/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制绝经后骨质疏松的机制研究 [D]. 百色: 右江民族医学院, 2021.
- [17] Lin Z, He H, Wang M, *et al.* MicroRNA-130a controls bone marrow mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblastic and adipogenic fate [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(6): e12688.
- [18] Yang X, Yang Y, Zhou S, *et al.* Puerarin stimulates osteogenic differentiation and bone formation through the ERK1/2 and p38-MAPK signaling pathways [J]. *Curr Mol Med*, 2018, 17(7): 488-496.
- [19] Yang Y, Chen D, Li Y, *et al.* Effect of puerarin on osteogenic differentiation *in vitro* and on new bone formation *in vivo* [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 2885-2900.
- [20] 宋明甲, 文益民, 柴晓亮, 等. 葛根素通过 NO 信号通路促进体外培养大鼠骨髓间充质细胞成骨性分化 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(17): 2124-2130.
- [21] 安晋阳, 蒋娜, 刘进进, 等. 葛根素通过核因子 E2 相关因子 2 通路对骨髓间充质干细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(5): 684-688.
- [22] 黄月琴, 王松波. 骨髓间充质干细胞成肌和成脂分化的调控 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(7): 604-610.
- [23] 齐振熙, 张占勇, 万甜, 等. 葛根素干预激素诱导骨髓间充质干细胞成脂分化的 Wnt 信号途径 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(10): 1502-1507.
- [24] Kang S, Bennett C N, Gerin I, *et al.* Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(19): 14515-14524.
- [25] Li B, Wang Y, Gong S, *et al.* Puerarin improves OVX-induced osteoporosis by regulating phospholipid metabolism and biosynthesis of unsaturated fatty acids based on serum metabolomics [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154198.
- [26] Khosla S, Monroe D G. Regulation of bone metabolism by sex steroids [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018, 8(1): a031211.
- [27] Wang P P, Zhu X F, Yang L, *et al.* Puerarin stimulates osteoblasts differentiation and bone formation through estrogen receptor, p38 MAPK, and Wnt/beta-catenin pathways [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14(9): 897-905.
- [28] 申彦菊, 沈亚非. 葛根素联合阿仑膦酸钠对绝经后骨质疏松症患者骨密度的影响 [J]. 北方药学, 2019, 16(7): 93-94.
- [29] 赵艳威, 李宗旻, 宋光明, 等. 葛根素促进人成骨样 MG-63 细胞分化的分子机制研究 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 536-540.
- [30] 吕海宏, 汤旭磊, 傅松波. 葛根素影响雌激素受体  $\alpha$  启动子甲基化调控成骨细胞增殖分化的研究 [J]. 河北医科大学学报, 2015, 36(4): 385-390.
- [31] 丁聚贤, 谢兴文, 许伟, 等. 葛根素治疗骨质疏松症相关分子机制研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(8): 1172-1175.
- [32] Huang W, Guo Y, Han X, *et al.* Effect and mechanisms of puerarin on the treatment of postmenopausal osteoporosis: A preliminary pre-clinical study [J]. *Asian J Surg*, 2023, 46(3): 1332-1333.
- [33] 袁斯远, 孔蓓蓓, 盛彤, 等. 葛根素干预小鼠成骨细胞分化相关特征性蛋白 mRNA 的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(42): 6732-6736.