

加减青娥方体外对 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的影响

金树梅¹, 彭雁飞², 李红珠³, 李瓦里⁴, 崔广智², 张建梅^{2*}

1.天津市环湖医院, 天津 300060

2.天津中医药大学, 天津 300193

3.天津药物研究院, 天津 300193

4.天津市南开医院, 天津 300193

摘要: **目的** 探讨加减青娥方抑制骨质疏松的作用机制。**方法** 在体外培养的小鼠破骨前体 RAW264.7 细胞中加入不同浓度的加减青娥方提取物, 利用抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色法检测核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 诱导的 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的数量及其活性的影响; 利用荧光定量 PCR (RT-PCR) 法检测 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞雌激素受体 (ER) mRNA 表达。**结果** 加减青娥方可抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞, 该作用可能是通过调控 ER α mRNA 的表达实现的。**结论** 加减青娥方可通过调控 ER α 基因的表达, 抑制破骨细胞的分化、增殖, 从而实现增加骨密度、防治骨质疏松的作用。

关键词: 加减青娥方; RAW264.7 细胞; 破骨细胞; 核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL); 骨质疏松

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)06-0493-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.003

Effect of Modified Qing'e Formula in menopausal osteoporosis differentiated from RAW264.7 *in vitro*

JIN Shu-mei¹, PENG Yan-fei², LI Hong-zhu³, LI Wan-li⁴, CUI Guang-zhi², ZHANG Jian-mei^{2*}

1. Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

4. Tianjin Hospital of ITCWM, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objectives** To explore the molecular biology mechanism of Modified Qing'e Formula in the treatment of postmenopausal osteoporosis (PMOP). **Methods** The extractions of Modified Qing'e Formula with different doses were added into the osteoclast precursors RAW264.7 cultured *in vitro*. Then the number and activity of osteoclasts differentiated from osteoclast precursors RAW264.7 induced by receptor activator of nuclear factor κ B factor ligand (RANKL) were tested with tartrate-resistant phosphatase (TRAP) staining; and the estrogen receptor (ER) mRNA expressions of those osteoclasts were examined with fluorescence quantitative Real-time RT-PCR. **Results** Modified Qing'e Formula inhibited the RANKL-induced RAW264.7 cells to differentiate into osteoclasts, which might be achieved by regulating the expression of ER α mRNA. **Conclusion** Modified Qing'e Formula could suppress the differentiation and proliferation of osteoclasts to increase bone density and to prevent and treat PMOP via regulating the expression of ER α mRNA.

Key words: Modified Qing'e Formula; RAW264.7 cell; menopausal osteoporosis; osteoclasts

绝经后骨质疏松症是一种与衰老有关的常见病, 主要发生在绝经后妇女, 由于雌激素缺乏导致骨量减少及骨组织结构变化, 使骨吸收大于骨形成,

骨代谢的平衡状态被打破。雌激素可通过与破骨细胞膜上的雌激素受体 (ER) 结合直接作用于破骨细胞, 抑制其骨吸收功能^[1]。目前临床上用于绝经后

收稿日期: 2014-09-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81202800); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20111210120014); 天津市中医药管理局科研课题 (11025)

作者简介: 金树梅, 女, 博士, 从事病理学研究。Tel: (022)60367574 E-mail: jinshumei2012@163.com

***通讯作者:** 张建梅, 女, 博士, 副教授, 研究方向为植物雌激素与围绝经期综合征。E-mail: qiokanbai@yahoo.com

骨质疏松症治疗的药物主要是抗骨吸收药如雌激素、双磷酸盐类、钙等,效果虽好,但并不完善且副作用明显^[2]。

骨代谢过程主要由成骨细胞和破骨细胞两类细胞来完成,分别调节骨形成与骨吸收,共同维持骨代谢的动态平衡状态。破骨细胞是骨吸收的执行细胞。生理状态下,骨吸收是骨代谢的起始环节;病理条件下,许多骨代谢性疾病(如骨质疏松、骨硬化症等),都是由于骨吸收亢进或不足引起的。

RAW264.7 细胞是小鼠源性破骨细胞前体细胞,来自 Abelson 小鼠白血病病毒所致的肿瘤,被认为代表早期分化阶段的破骨前体细胞^[3]。用核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)诱导 RAW264.7 细胞可获得抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色阳性的多核细胞,这种方法所得的破骨样细胞(OCLs)不会受其他细胞污染,便于破骨样细胞形态和功能的研究。研究表明 RAW264.7 细胞是一种较好的破骨前体细胞模型^[4]。17 β -雌二醇(E2)可直接作用于体外培养的破骨细胞,抑制其骨吸收功能^[5]。

“青娥丸”为古今补肾良方,方中杜仲为君,补骨脂为臣,在此基础上再加丹参而成为加减青娥方。现代药理研究显示补骨脂、杜仲和丹参都是植物性雌激素含量较高的中药^[2]。植物雌激素不仅影响性激素的代谢及其生物活性,而且对细胞酶、蛋白质合成、生长因子、恶性细胞增生均有影响。但是目前对中药中的植物雌激素的研究较少,研究尚不够深入,且没有进一步说明其作用机制。

本文利用 RAW264.7 细胞株作为破骨前体细胞模型,用 RANKL 诱导其分化为破骨细胞,以 E2 作为阳性对照药探讨加减青娥方对 RAW264.7 向破骨细胞分化的影响,并进一步探讨其对 ER α mRNA 的表达的影响,以期探讨其作用机制,为寻找更加安全有效的抗骨质疏松药及临床研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用 RAW264.7 细胞株由协和医科大学细胞库提供。RANKL、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒、ICI182780、E2、胰蛋白酶、青链霉素双抗、DMSO 均购自 Sigma 公司。无酚红 DMEM、胎牛血清购自 Gibco 公司,其他试剂均为国产分析纯。RNAprep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒、FastQuantcDNA 第一链合成试剂盒、

SuperRealPreMix Plus(SYBR Green)均购于 Tiangen 生物有限公司,PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

本研究所用加减青娥方分别为生药的醇提和水提物,出药率及主要成分如下:补骨脂,20%出药率,主要成分为补骨脂酚、黄酮类;杜仲,12%出药率,主要成分为黄酮类、环烯醚萜、木脂素类;丹参,52.6%出药率,主要成分为丹参酮类、丹酚酸类化合物。加减青娥方的拟用生药剂量比为补骨脂-杜仲-丹参(1:2:2)。按上述比例分别称取一定量的提取物配成相当于 100 mg/mL 生药浓度储存液储存(补骨脂 20 mg/mL,杜仲 40 mg/mL,丹参 40 mg/mL),然后按实际需要药物浓度稀释。所用药物由天津中医药大学中医药研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 细胞株的复苏与培养^[6]

RAW264.7 细胞株按常规方法复苏,加适量无酚红 DMEM 加 10%胎牛血清培养液,调节细胞密度为 5×10^4 个/mL 接种于培养瓶中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,24 h 后细胞贴壁生长,细胞呈圆形或椭圆形,核居中,72 h 后细胞呈单层铺满瓶底呈融合生长,按常规方法进行细胞传代。

1.2.2 细胞培养及分组 取生长良好的 RAW264.7 细胞消化后制成细胞悬液,按需要调整细胞密度,接种于不同培养板中。待细胞贴壁后按不同浓度分组给药,分组如下:正常对照组(N)、空白对照组(R, RANKL 刺激组,刺激浓度为 100 ng/mL)、阳性对照组(E2, RANKL+E2, E2 浓度为 10^{-6} mol/L)、RANKL+E2+雌激素受体抑制剂组(E2+ICI, ICI182780 浓度为 10^{-6} mol/L)、RANKL+不同浓度(0.1、1、10、100 μ g/mL)青娥方组(Q0.1、Q1、Q10、Q100)、RANKL+不同浓度青娥方+雌激素受体抑制剂组(Q0.1+ICI、Q1+ICI、Q10+ICI、Q100+ICI),分别培养数天后,按需求分别处理细胞进行进一步检测。

1.2.3 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色 取生长良好的 RAW264.7 细胞消化后制成细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^4 个/mL 接种于含盖玻片的 24 孔板,每孔加入质量浓度为 100 ng/mL 的重组鼠 RANKL,诱导生成多核细胞,培养 1 d,然后按上述分组分别加入不同浓度的青娥方提取液,再培养 5 d,取出细胞爬片,用 PBS 缓冲液洗涤细胞,以耐酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)试剂盒测定细胞

TRAP 活性。严格按试剂盒说明书操作程序进行操作, 光学显微镜下观察, 两人双盲法将多于 3 核细胞的 TRAP-阳性细胞计数 10 个高倍视野, 比较其细胞总数并照相。

1.2.4 加减青娥方对 RANKL 诱导的破骨细胞 ER α mRNA 表达的影响 细胞总 RNA 的提取及反转录 取生长良好的 RAW264.7 细胞消化后制成细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^4 个/mL 接种于 24 孔板, 每孔加入浓度为 100 ng/mL 的重组鼠 RANKL, 诱导生成多核细胞, 培养 1 d, 然后按上述分组分别加入不同浓度的青娥方提取液, 隔日换液, 再培养 7 d, 洗涤裂解细胞, 按细胞总 RNA 的提取试剂盒操作程序提取细胞总 RNA, 反转录获得 cDNA, -20°C 保存备用。

荧光定量 PCR (RT-PCR) 根据天根生物有限公司提供的试剂盒说明书进行, 目的基因 ER α 、ER β 及参比基因 β -actin 的引物见表 1。选择退火温度分别为 60.4°C 和 56.1°C 。将上述获得 cDNA 按试剂盒操作程序配成 20 μL 反应体系, 采用三步反应法在 BIO-RAD IQ5 系统上进行 RT-PCR, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法对数据进行统计, 分析比较各组别间差异。

表 1 Real-time PCR 所需引物

Table 1 Real-time PCR primers

基因	序列	产物长度	退火温度
β -actin	Forward: TGTTACCAACTGGGACGACA	139bp	60.4°C
	Reverse: CTGGGTCATCTTTTCACG		
ER α	Forward: TCTACGCCAGTCGGGCATC	102bp	56.1°C
	Reverse: TAGGCGACACGCTGTTGAGCTG		
ER β	Forward: CATCTGGGTATCATTACGGT	111 bp	
	Reverse: TGGTACACTGATTCGTGGC		

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件分析系统进行方差分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果采用单因素方差分析 (ANOVA) 方差齐性检验后, 组间比较采用 LSD 法进行比较分析。

2 结果

2.1 RANKL 诱导 RAW264.7 TRAP 染色及细胞形态学观察

刚接种的 RAW264.7 细胞贴壁后呈圆形、椭圆形、少数呈梭形、多为单核、少数双核, 第 2 天细胞呈集落式生长 (图 1-a); RANKL 诱导培养第 3 天开始出现多核细胞 (≥ 3 核) (图 1-b); 诱导第 7 天, 细胞体积增大、核增多、部分细胞浆内出现空

泡, 细胞伸出伪足连接成片 (图 1-c)。取诱导 7 d 后细胞爬片, 经 TRAP 染色后, 正常细胞呈深蓝色 (图 1-d), 阳性细胞呈紫红色、胞浆丰富, 部分胞膜边缘不整、出现伪足伸展 (图 1-e)。

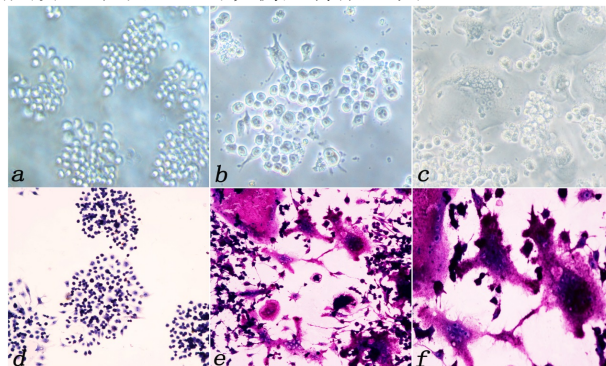


图 1 RANKL 诱导 RAW264.7 TRAP 染色及细胞形态学观察

Fig.1 RANKL- induced RAW264.7 cell with TRAP staining and morphological observation

2.2 加减青娥方对 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞分化的影响

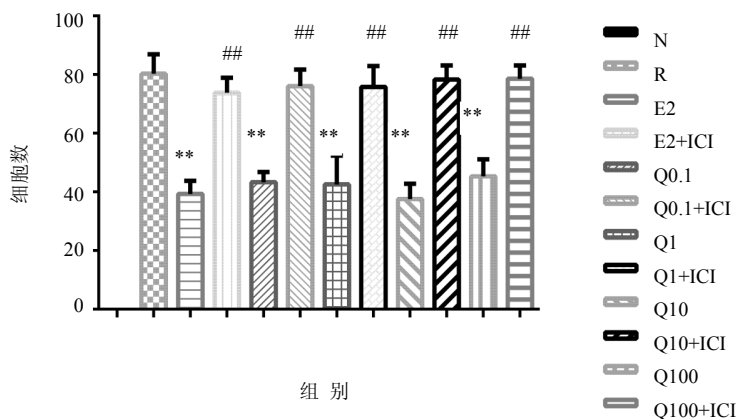
经 TRAP 染色后, RANKL 诱导组和各用药组均可见数量、大小不等的呈紫红色的 TRAP 阳性细胞, 即破骨细胞, 正常组未见呈酒红色 TRAP 阳性细胞, 各组计数结果及比较结果见图 2, RANKL 诱导组 TRAP 染色阳性细胞数明显增多, 用 E2 后, TRAP 染色阳性细胞数明显减少 ($P < 0.01$), 加入不同浓度青娥方后, TRAP 染色阳性细胞数均明显减少 ($P < 0.01$), 且与 E2 组比较无明显差异。当加入雌激素受体抑制剂 ICI182780 后, 各组的 TRAP 染色阳性细胞数与相应用药组及雌激素组比较明显增加 ($P < 0.01$)。

2.3 加减青娥方对 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞 ER α 、ER β mRNA 的影响

RT-PCR 结果显示, 正常培养的 RAW264.7 细胞有一定的 ER α mRNA 的表达, 用 RANKL 诱导刺激后 ER α mRNA 的表达减少 ($P < 0.01$), 加入雌激素后 ER α mRNA 的表达明显升高, 不同浓度的加减青娥方与雌激素作用相似, 当加入雌激素受体抑制剂 ICI182780 后, 各组的 ER α mRNA 表达均减少 ($P < 0.01$)。各组培养细胞均无 ER β mRNA 的表达, 见图 3。

3 讨论

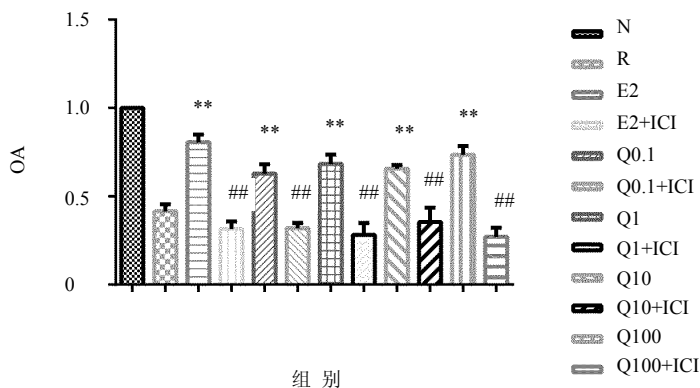
骨代谢平衡是骨量稳定的重要前提, 破骨细胞主导的骨吸收和成骨细胞主导的骨形成是维持骨代谢平衡的重要条件, 对雌激素研究证实, 雌激素直



与空白组比较: ** $P < 0.01$; 与相同浓度的加減青娥方用藥組比較: ## $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs blank group; ## $P < 0.01$ vs Modified Qing'e Formula group with same concentration

图2 加減青娥方对 RANKL 诱导的 RAW264.7 分化为破骨细胞计数的影响

Fig.2 Effect of Qing'e Formula on caculation of osteoclasts induced by RANKL from RAW264.7



与空白组比较** $P < 0.01$; 与相同浓度的加減青娥方用藥組比較## $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs blank group; ## $P < 0.01$ vs Modified Qing'e Formula group with same concentration

图3 加減青娥方对 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞 ERα mRNA 的影响

Fig.3 Effect of Qing E Formula on ER α mRNA expression of RAW264.7 cellinduced by RANKL

接参与骨代谢,与绝经后骨质疏松症有关^[7-8]。绝经后雌激素水平下降是绝经后骨质疏松症发病的主要原因,骨质疏松症治疗的目标是尽可能地抑制病理性骨吸收,增加骨形成。骨吸收的减少依赖于破骨细胞骨吸收的减少。因此,如何促进破骨细胞凋亡,在骨质疏松症的治疗中具有重要意义。雌激素通过骨细胞上 ER 介导骨代谢,绝经后骨质疏松患者雌激素水平降低导致 ER 数量和功能的下降^[9]。

植物雌激素为杂环多酚类化合物,与 E2 结构相似,可结合 ER,在不同情况下表现出类雌激素或抗雌激素作用,对多种疾病具有保护作用。因此,近年来防治绝经后骨质疏松症的中药研究开发成为医学领域的一个热点。大量研究已证实补肾中药对绝经后骨质疏松具有较好的防治效果^[10]。

本课题组在前期研究显示,加減青娥方具有植物雌激素样作用,显著增加去卵巢骨质疏松大鼠胫骨近、远端的骨密度,而且明显降低血脂含量,但机制尚未阐明。本研究通过离体研究探讨该药治疗骨质疏松尤其是绝经期妇女骨质疏松症的作用机制,因此利用小鼠源性破骨细胞前体细胞 RAW264.7 细胞为模型,观察加減青娥方对 RANKL 诱导破骨细胞分化效应的影响,结果发现不同浓度加減青娥方均可以减少 RANKL 诱导的破骨细胞的数量,其作用与 E2 效果相似,当向细胞培养液中加入雌激素受体抑制剂 ICI182780 后,这种抑制作用消失,间接说明加減青娥方对 RANKL 诱导破骨细胞分化效应的影响可能通过雌激素受体起作用。为了证明这种机制的存在,观察了不同浓度加減青

娥方及 ICI 干预的 RAW264.7 细胞 ER α 和 ER β mRNA 的表达, 结果发现各组细胞中均有 ER α mRNA 的表达, 而没有 ER β mRNA 表达, 与以往报道一致^[11-12]。说明 ER α 和 ER β 在介导雌激素调节骨代谢的过程中扮演了不同的角色, 对于理解雌激素受体的作用机制及开发新型的选择性雌激素受体调节剂具有重要的意义, 本实验结果提示加减青娥方对 RANKL 诱导破骨细胞的影响可能通过 ER α 发挥作用, 而对 ER β 无明显影响, 其具体作用机制有待进一步研究。

另外, 本研究通过对各组细胞内 ER α mRNA 表达量的比较发现, E2 可以提高 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞中 ER α mRNA 的表达, 不同浓度的加减青娥方与 E2 有相似的作用。当用雌激素受体抑制剂 ICI182780 与雌激素或者加减青娥方一起共孵育 RAW264.7 细胞时, RANKL 诱导的 RAW264.7 ER α mRNA 的表达受到了抑制, 进一步证实了不同浓度的加减青娥方均可增加 ER α mRNA 的表达, 与以往研究结果相似^[1]。然而, 本实验只证明了加减青娥方对破骨细胞分化的影响及其机制, 骨代谢是一个由成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收构成的动态平衡的过程, 药物如何通过影响骨代谢过程中成骨细胞的活性影响骨代谢过程, 将在下一步实验中进行进一步研究。

综上所述, 加减青娥方可抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 向破骨细胞分化及活性发挥雌激素样作用, 这种作用是通过增加破骨细胞 ER α mRNA 的表达而实现的。这种机制的存在, 为进一步研究加减青娥方防治骨质疏松症的研究提供新思路, 为其开发利用提供新的理论依据。

参考文献

[1] Rozkydal Z, Janicek P. The effect of alendronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2003, 104(10):309-313.

- [2] 张晓晓, 刘 胜, 薛晓红. 具有雌激素类似作用的中药研究进展 [J]. *中西医结合学报*, 2005, 3(2): 149-153.
- [3] Battaglini R, Kim D, Fu J, *et al.* c-myc is required for osteoclast differentiation [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(5):763-773
- [4] 肖新华, 廖二元, 董源媛, 等. 小鼠单核细胞 RAW264.7 的细胞生物学特征 [J]. *南华大学学报:医学版*, 2008, 36(3): 282-285.
- [5] Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, *et al.* Bisphosphonates inhibit I- β production by human osteoblast-like cells [J]. *Scand J Rheumatol*, 1998, 27: 38-41.
- [6] 巫松辉, 钟招明, 陈建庭. RANKL 诱导破骨细胞前体细胞分化成熟 [J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(6): 963-965.
- [7] Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, *et al.* Minireview: osteoprotective action of estrogen mediated by osteoclastic estrogen receptor- α [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(5): 877-885.
- [8] Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, *et al.* Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of Fas ligand in osteoclasts [J]. *Cell*, 2007, 130(5):811-823.
- [9] Lanyon L, Armstrong V, Ong D, *et al.* Is estrogen receptor α key to controlling bones' resistance to fracture? [J]. *J Endocrinol*, 2004, 182(2):183-191.
- [10] 武密山, 李 恩, 赵素芝, 等. 补肾方含药血清对大鼠成骨细胞 ER α mRNA 及其蛋白表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(10):1396-1397.
- [11] Guo Z, Krucke J, Benten W P, *et al.* Estradiol-induced non-genomic calcium signaling regulates geotropic signaling in macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(9): 7044-7050.
- [12] Garcia P V, Robinson L J, Borysenko C W, *et al.* Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 cells by estrogen and phytoestrogens [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(14): 13720-13727.