

## 淫羊藿素与 RANKL 蛋白靶点结合抑制破骨细胞分化抗骨质疏松作用研究

何丹丹<sup>1,2</sup>, 夏海建<sup>3\*</sup>, 蒋俊<sup>4\*</sup>, 徐希明<sup>4</sup>

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210029

3. 扬州大学附属医院 药剂科, 江苏 扬州 225001

4. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013

**摘要:** **目的** 探讨淫羊藿素(IT)与核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体(RANKL)蛋白靶点结合能力,并阐明其抗骨质疏松作用机制。**方法** 采用分子对接技术模拟并预测 RANKL 与 IT 的相互作用,并通过切除大鼠双侧卵巢制备骨质疏松模型,评价 IT 对模型大鼠体质量、骨吸收血清指标碱性磷酸酶(ALP)和抗酒石酸盐酸性磷酸酶-5b(TRACP-5b)、骨密度(BMD)以及骨组织形态的调节作用。**结果** IT 可与靶蛋白 RANKL 发生稳定对接,IT 组大鼠体质量较模型组显著降低( $P<0.05$ ),IT 能显著降低模型大鼠血清 ALP、TRACP-5b 水平( $P<0.01$ ),显著降低模型大鼠股骨表面积与体积比值(BS/BV)、骨小梁分离度(Tb.Sp)值( $P<0.01$ ),显著增加 BMD、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.ThN)、骨小梁数目(Tb.N)值( $P<0.01$ )。**结论** IT 能通过与 RANKL 蛋白靶点结合,抑制破骨细胞分化并发挥抗骨质疏松作用。

**关键词:** 淫羊藿素; 核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体; 蛋白靶点; 骨吸收; 骨质疏松

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)22-4707-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.018

## Icaritin exerted effect in anti-postmenopausal osteoporosis by binding to RANKL protein target and inhibiting bone resorption

HE Dan-dan<sup>1,2</sup>, XIA Hai-jian<sup>3</sup>, JIANG Jun<sup>4</sup>, XU Xi-ming<sup>4</sup>

1. Affiliated Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

3. Affiliated Hospital of Yangzhou University, Department of Pharmacy, Yangzhou 225001, China

4. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

**Abstract:** **Objective** To demonstrate that icaritin (IT) inhibits bone resorption against osteoporosis by binding to RANKL protein targets. **Methods** The effects of RANKL and IT on the osteoporosis of ovariectomized rats were established by molecular docking technique. The effects of IT on the body weight, bone resorption serum index (ALP and TRACP-5b), bone mineral density and bone morphology of OVX rats were evaluated. **Results** IT could be stably docked with target protein RANKL. The body weight of IT group was significantly lower than that of OVX group ( $P < 0.05$ ). IT could significantly decrease the levels of serum ALP and TRACP-5b ( $P < 0.01$ ), and the value of femur BS/BV and Tb.Sp ( $P < 0.01$ ) in OVX rats. Moreover, IT significantly increased BMD, BV/TV, Tb.ThN, Tb.N values ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** IT can inhibit osteoclast differentiation and play anti-osteoporosis by binding with RANKL protein target.

**Key words:** icaritin; receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand; protein target; bone resorption; osteoporosis

淫羊藿 *Epimedii Folium* 最早记录于《神农本草经》,具有祛风湿、强筋骨、补肾阳等多种功效,多用于治疗骨质疏松症(OP)<sup>[1-2]</sup>。目前全球受 OP 困

扰的约有 1 亿人<sup>[3]</sup>,中国卫生部调查表明,我国 OP 患者约有 6 940 万<sup>[4]</sup>,而且随着人口老龄化,其患病率还将进一步增加。淫羊藿的主要成分包括朝藿

收稿日期: 2017-04-24

基金项目: 南京市药学会常州四药科研项目(2016YX007); 扬州市自然科学基金面上项目(YZ2016131); 国家自然科学基金资助项目(81703773); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20170560); 江苏省博士后基金资助(1601184C)

\*通信作者 夏海建, 硕士。E-mail: 526797969@qq.com

蒋俊, 博士, 硕士生导师。E-mail: jiangjuntcm2007@hotmail.com

定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝藿苷、淫羊藿苷等<sup>[5-6]</sup>。基于 Q-TOF/MS 的体内代谢轮廓研究表明,三糖苷朝藿定 A、B、C 可代谢为二糖苷,并可进一步脱糖成单糖苷或淫羊藿素 (icaritin, IT); 二糖苷淫羊藿苷也逐步脱糖成单糖苷或 IT; 单糖苷宝藿苷体内代谢脱糖也可生成 IT。淫羊藿黄酮类成分在体内转化成 IT 的过程可能是淫羊藿维持体内骨吸收与骨形成动态平衡<sup>[7-8]</sup>,防治骨质疏松<sup>[9-11]</sup>的重要环节。因此,淫羊藿饮片中的主要成分中并没有 IT<sup>[12]</sup>,但是淫羊藿抗骨质疏松的药效物质基础可能是其代谢产物及 IT<sup>[13]</sup>。因此,研究 IT 抗骨质疏松作用机制具有重要的理论和实用价值。

正常成人的骨骼中破骨细胞与成骨细胞处于一种动态平衡,保证骨组织不断更新,以维持骨骼的强度和弹性<sup>[14]</sup>。当这种动态平衡被破坏后,便会导导致骨代谢失衡,引起 OP<sup>[15]</sup>。目前 OPG/RANKL/RANK 信号转导通路被认为是骨重塑至关重要的一条信号通路<sup>[16]</sup>,是成骨细胞与破骨细胞之间相互作用的信号通道<sup>[17]</sup>,同时也是 IT 影响骨代谢、防治骨质疏松<sup>[18]</sup>的主要途径。核因子- $\kappa$ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- $\kappa$ B, RANK) 是位于破骨细胞表面的受体<sup>[19]</sup>。RANK 的配体主要是由成骨细胞和骨髓基质细胞合成和分泌的骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 和核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL)<sup>[20]</sup>。当 RANK 被 RANKL 激活时,破骨细胞分化,促进骨吸收。OPG 与 RANKL 竞争性结合 RANK,则会促进破骨细胞凋亡,抑制骨吸收。本研究通过计算机模拟 IT 与 RANKL 蛋白靶点的结合作用强度,并结合动物模型验证 IT 抗骨质疏松的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

碱性磷酸酶 (ALP, A059-1) 和抗酒石酸盐酸性磷酸酶-5b 试剂盒 (TRACP-5b, A030-2) 均为酶联免疫吸附测定试剂盒 (南京建成生物科技有限公司); 17 $\beta$ -雌二醇 (雌二醇, 上海麦克林生化科技有限公司); IT (本实验室自制, 质量分数 98.3%); 水合氯醛 (Sinopharm 公司); 实验用水 (密理博生产的超纯水); 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 实验动物

40 只 SPF 级雌性 SD 大鼠, 体质量 (220 $\pm$ 20) g, 购自 SLAC 实验动物中心, 合格证号 SCK (沪)

2007-0005; 每 5 只大鼠关在一个笼子里, 动物房光照时间 12 h, 温度 25  $^{\circ}$ C, 湿度 55%, 标准实验室啮齿动物饮食 (钙量 0.5%)。

### 1.3 仪器

Dual energy X-ray Absorption Spectrometry (DEXA, Hologic Inc. 公司), 配备 Edition 13.1.2 版软件; CSS-4420 材料实验机 (长春机械科学研究院有限公司); eXplore Locus Micro-CT 系统 (GE Healthcare 公司), 配备 Version MicroView ABA。低温冰箱 (Sanyo 公司); BL310 电子天平 (Sartorius 公司); 微量加样器 (Eppendorf 公司); HH-4 恒温水浴箱 (常州国华电器有限公司); 101-AS-3 电热恒温干燥箱 (上海润东荣丰科学仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 分子对接实验

RANKL 氨基酸序列可在实验解析蛋白结构数据库中查找得到 (PDB ID: 3URF/CHAIN: A/Length: 162 AA/Residues: 162-317)。采用 Schrodinger 2014 版软件进行数据计算。使用 Maestro 构建配体 IT 的结构, 并转化成 3D 形式。然后通过 LigPrep 和 ConfGen 模块测定配体的构象异构体、互变异构体和电离态。采用大肠杆菌 (PDBID: 1PV7) 的乳糖通透酶对 RANKL 3D 结构进行预测, 并进一步进行对接研究。通过蛋白质制备向导准备对接的靶标。模型结构的结合位点与 1PV7 相同。使用诱导拟合对接模块将配体停靠在蛋白质中, 并采用 Glide 的评分功能进行评价。

### 2.2 动物实验

**2.2.1 造模、分组及给药** SD 大鼠在 2 周的适应期后, ip 水合氯醛麻醉全部大鼠。沿腹中线打开腹腔, 找出双侧卵巢, 分别采用手术线将卵巢两端结扎后, 摘除双侧卵巢, 在腹腔中撒入大量的青霉素 (每只 80 万单位) 后, 再将腹腔缝合, 并用碘伏消毒后, 缝合最外层皮肤, 再用碘伏消毒。假手术组 ( $n=10$ ) 在腹腔打开后, 取部分脂肪组织后缝合, 其余操作同模型组。手术过程在无菌条件下操作。手术后的 4 周内, 连续 im 青霉素 (每只 40 万单位) 3 d, 并密切关注大鼠的状态和缝合部位的感染情况, 及时做好伤口修复工作。手术后的第 30 天, 大鼠被随机分为 4 组: 假手术组 (0.5%的 CMC-Na 溶液)、模型组 ( $n=10$ )、雌二醇 (100  $\mu$ g/kg) 组 ( $n=10$ )、IT (40 mg/kg<sup>[9]</sup>) 组 ( $n=10$ )。各组均 ig 给药, 连续给药 2 个月。每周记录大鼠体质量变化。

**2.2.2 指标测定** 在末次给药后, 各组大鼠眼眶取血 1.0 mL, 3 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液, 置 $-20^{\circ}\text{C}$  冷冻保存, 待测。大鼠脱颈处死后, 取出股骨, 并用中性甲醛溶液固定, 先检测骨密度 (BMD), 再进行 CT 扫描, 测定骨组织形态参数: 骨表面积与体积比值 (BS/BV)、骨小梁分离度 (Tb.Sp)、骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb.ThN)、骨小梁数目 (Tb.N)。

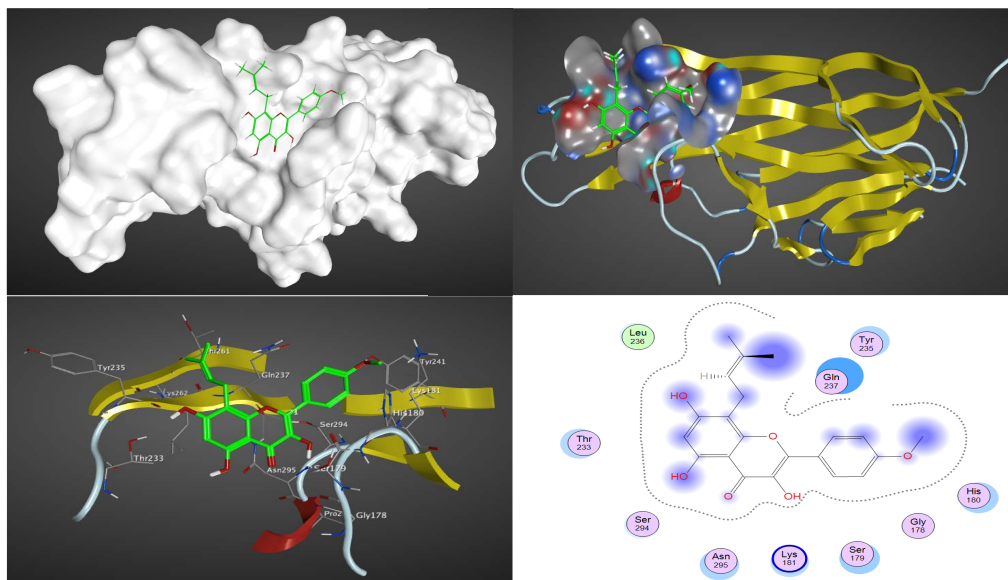


图 1 IT 与 RANKL 蛋白结合位点的相互作用

Fig. 1 Interaction of IT in binding site of RANKL

### 3.2 IT 对去卵巢大鼠各项指标的影响

**3.2.1 各组大鼠体质量的变化** 各组大鼠体质量在造模初期没有显著差异。造模后的 8 周, 各组大鼠的体质量均呈逐渐增加趋势, 其中假手术、雌二醇、IT 组大鼠体质量增加值较模型组显著降低 ( $P<0.05$ ), 结果见图 2。

**3.2.2 各组大鼠血清中骨吸收指标变化** 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 ALP、TRACP-5b 水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 雌二醇组与 IT 组大鼠血清 ALP、TRACP-5b 水平明显降低 ( $P<0.01$ ), 结果见图 3。

**3.2.3 大鼠 BMD 及骨组织形态参数变化** 与假手术组比较, 模型组大鼠股骨 BS/BV、Tb.Sp 显著增加 ( $P<0.01$ ), BMD、BV/TV、Tb.ThN、Tb.N 显著减少 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 雌二醇组与 IT 组大鼠股骨 BS/BV、Tb.Sp 水平均显著降低 ( $P<0.01$ ); BMD、BV/TV、Tb.ThN、Tb.N 水平显著升高 ( $P<0.05$ ); 与雌二醇组比较, IT 组大鼠股骨

## 3 结果

### 3.1 IT 与 RANKL 蛋白靶点的分子对接

Autodock 计算机模拟结果显示, IT 可与 RANKL 发生对接, 且 IT 与 RANKL 的对接得分为 $-5.799\ 098\ 97$ , 具体结果见图 1。结果表明 IT 与 RANKL 蛋白结合, 预示了 IT 有一定的与 RANK 竞争性结合 RANKL 靶蛋白的能力, 即具有一定的抑制破骨细胞分化而抑制骨吸收作用。

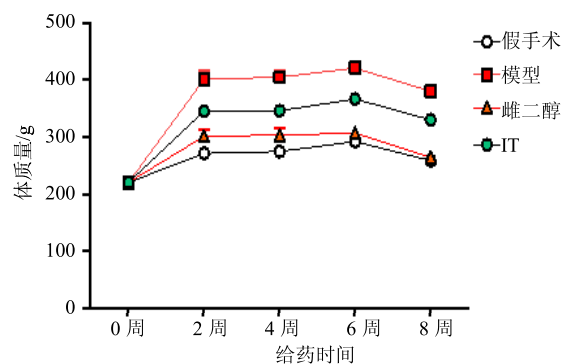


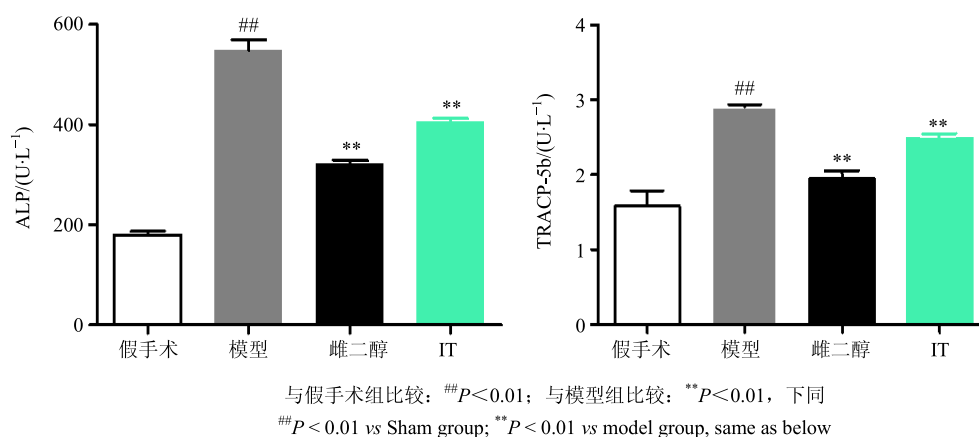
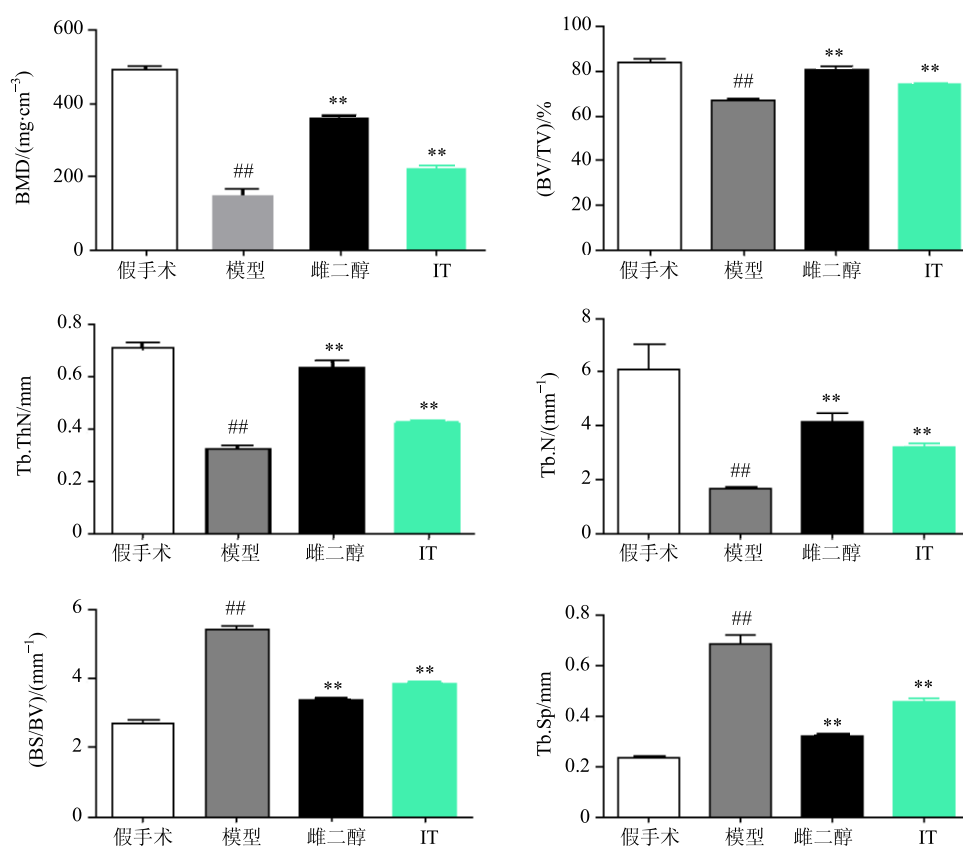
图 2 各组大鼠体质量的变化

Fig. 2 Changes of body weight of rats in each group

BS/BV、Tb.Sp 水平显著升高, BMD、BV/TV、Tb.ThN、Tb.N 水平显著降低 ( $P<0.05$ )。结果见图 4。

## 4 讨论

分子对接 (molecular docking) 是预测靶标-配体相互作用方式的分子计算模拟方法, 其本质是 2 个或多个分子之间的识别过程, 涉及分子之间的空

图3 各组大鼠血清 ALP 及 TRACP-5b 变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Fig. 3 Changes of ALP and TRACP-5b in serum of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )图4 各组大鼠 BMD 及骨组织形态参数变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Fig. 4 Changes of BMD and MicroCT bone parameters in femur of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

间匹配和能量匹配。计算机模拟结果表明, IT 可以与 RANK 竞争性地与 RANKL 靶点蛋白发生分子对接, 理论上可能具有抑制破骨细胞分化, 即抑制骨吸收过程, 从而抑制骨质疏松的作用。

大鼠双侧卵巢切除模型是研究原发性 OP 的经典模型<sup>[21]</sup>。在理论上, 采用该模型进行靶标-

配体相互作用的药效验证。与假手术组相比, 模型组大鼠脂代谢能力下降, 体质量均有所增加, 这与卵巢切除后的肾上腺分泌雄烯二酮在外周组织转化增加有关, 同时雌激素减少, 负反馈机制作用于垂体和下丘脑<sup>[22-23]</sup>。与模型组比较, 雌二醇组与 IT 组大鼠体质量增加明显减缓 ( $P < 0.05$ ), 这表明 IT

存在一定的雌激素样作用。

血清总 ALP 能反映成骨细胞的活性,可作为评价骨形成的特征指标<sup>[24]</sup>。TRACP-5b 位于破骨细胞微粒体,参与骨基质中固体钙磷矿化底物降解,浓度与破骨细胞数量呈正相关<sup>[25]</sup>,血清中的 TRACP-5b 也是反映骨吸收的重要特异指标<sup>[26]</sup>。原发性 OP 模型大鼠骨代谢特点为高转换型,骨吸收和骨形成均增加,而骨吸收速率大于骨形成导致骨质疏松。本实验模型大鼠术后血清中 ALP 和 TRACP-5b 均较假手术组显著升高,表明骨转换率增加,符合原发性 OP 特点,说明切除卵巢制备的骨质疏松模型成功。与模型组比较,雌二醇组与 IT 组大鼠血清 ALP、TRACP-5b 水平明显降低 ( $P < 0.01$ );表明 IT 能够一定程度上抑制切除卵巢后骨质疏松大鼠破骨细胞分化,从而抑制骨吸收。

BMD 和 MicroCT 骨参数是骨量的主要测量指标。各参数显示相对于模型组,IT 组与雌二醇组大鼠骨量均有所增加,且骨吸收相关指标呈下降趋势,进一步说明 IT 能够通过抑制破骨细胞的合成,促进骨吸收,进而发挥抗骨质疏松作用。因此,IT 能够通过和 RANK 竞争性地与 RANKL 蛋白靶点结合,抑制破骨细胞分化,降低骨吸收速率,实现骨重塑,起到防治骨质疏松的作用。

#### 参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] Wang Y, Wang Y S, Song S L, *et al.* Icaritin inhibits atherosclerosis progress in Apoe null mice by downregulating CX3CR1 in macrophage [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(4): 845-850.

[3] Melton L J, Johnell O, Lau E, *et al.* Osteoporosis and the global competition for health care resources [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(7): 1055-1058.

[4] Mithal A, Kaur P. Osteoporosis in Asia: A call to action [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2012, 10(4): 245-247.

[5] 赵冰洁, 宋捷, 章丽, 等. 淫羊藿醇提物对去卵巢大鼠骨质疏松治疗作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(11): 1919-1925.

[6] 甘井山, 马艳, 王宗艳, 等. 淫羊藿中化学成分的上 UPLC/Q-TOF-MS 分析 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(4): 349-352.

[7] Liu Z C, Xu Y, Chen S Z. Study on pharmacokinetics and tissue distribution of icaritin in rats by HPLC-UV assay [J]. *Chin Pharm J*, 2008, 43(11): 848-851.

[8] Zhao Y H, Jia X B, Chen Y, *et al.* Studies on rat intestinal absorption of the total flavones of epimedium in situ [J].

*Chin Pharm J*, 2008, 43(3): 188-191.

[9] Jiang J, Feng L, Sun E, *et al.* Metabolic profiling of isomeric aglycones central-icarin (c-IT) and icaritin (IT) in osteoporotic rats by UPLC-QTOF-MS [J]. *Drug Test Anal*, 2015, 7(4): 309-319.

[10] Jiang J, Li J, Jia X. The antiosteoporotic activity of central-icarin (CIT) on bone metabolism of ovariectomized rats [J]. *Molecules*, 2014, 19(11): 18690-18704.

[11] 蒋俊, 崔莉, 孙娥, 等. 基于淫羊藿黄酮类化合物的体内代谢阐述其抗骨质疏松药效物质基础 [J]. *中草药*, 2014, 45(5): 721-729.

[12] Kang H K, Choi Y H, Kwon H, *et al.* Estrogenic/antiestrogenic activities of a *Epimedium koreanum* extract and its major components: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(8): 2751-2759.

[13] 叶海涌, 刘健, 楼宜嘉. 淫羊藿苷衍生物的制备及其雌激素样作用研究 [J]. *浙江大学学报*, 2005, 34(2): 131-136.

[14] 王想福, 孙凤歧, 叶丙霖, 等. 破骨细胞与骨质疏松症的关系研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(11): 1420-1424.

[15] Sharma S M, Hu R, Bronisz A, *et al.* Genetics and genomics of osteoclast differentiation integrating cell signaling pathways and gene networks [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2006, 16(3): 253-277.

[16] Xu F, Dong Y, Huang X, *et al.* Pioglitazone affects the OPG/RANKL/RANK system and increase osteoclastogenesis [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2289-2296.

[17] Ominsky M S, Li X, Asuncion F J, *et al.* RANKL inhibition with osteoprotegerin increases bone strength by improving cortical and trabecular bone architecture in ovariectomized rats [J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(5): 672-682.

[18] Jiang J, Li J, Zhang Z, *et al.* Mechanism of enhanced antiosteoporosis effect of icaritin by self-assembled nanomicelles *in vivo* with suet oil and sodium deoxycholate [J]. *Int J Nanomed*, 2015, 25(10): 2377-2389.

[19] Chamoux E, Bisson M, Payet M D, *et al.* TRPV-5 mediates a receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) ligand-induced increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in human osteoclasts and down-regulates bone resorption [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(33): 25354-25362.

[20] Kohli S S, Kohli V S. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling

- and its immunopathologic implications [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2011, 15(3): 175-181.
- [21] Uppel M E, Miller L M, Burr D B. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility [J]. *Osteoporos Int*, 2008, 19(9): 1251-1265.
- [22] Allaway H C, Southmayd E A, De Souza M J. The physiology of functional hypothalamic amenorrhea associated with energy deficiency in exercising women and in women with anorexia nervosa [J]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2016, 25(2): 91-119.
- [23] Sunay D, Ozdiken M, Arslan H, *et al.* The effect of acupuncture on postmenopausal symptoms and reproductive hormones: A sham controlled clinical trial [J]. *Acupunct Med*, 2011, 29(1): 27-31.
- [24] Wen X D, Shu F D, Xiao L Y, *et al.* *Panax notoginseng* saponins suppress radiation-induced osteoporosis by regulating bone formation and resorption [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(9): 813-819.
- [25] Fu R, Peng F, Liu H, *et al.* Clinical significance of osteoblast precursors and osteoclast precursors in earlier diagnosis and monitoring of myeloma bone disease [J]. *Ann Hematol*, 2016, 95(7): 1099-1106.
- [26] Maria S, Swanson M H, Enderby L T, *et al.* Melatonin-micronutrients osteopenia treatment study (MOTS): A translational study assessing melatonin, strontium (citrate), vitamin D3 and vitamin K2 (MK7) on bone density, bone marker turnover and health related quality of life in postmenopausal osteopenic women following a one-year double-blind RCT and on osteoblast-osteoclast co-cultures [J]. *Aging (Albany NY)*, 2017, 9(1): 256-285.