

仙茅苔黑酚龙胆二糖苷调控 NF- κ B/Nrf2 通路抑制破骨细胞氧化应激及其骨吸收的研究

李鹤鸣¹, 刘梦琴^{1,2}, 虞艳玮¹, 沈 焱¹, 杜金蔓¹, 胡思婧¹, 徐金龙³, 张泉龙¹, 秦路平^{1*}, 张巧艳^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108

3. 中国人民解放军联勤保障部队第九六九医院, 内蒙古自治区 呼和浩特 010051

摘要:目的 探讨仙茅苔黑酚龙胆二糖苷 (orcinol gentiobioside, OGB) 对氧化应激诱导的破骨细胞 (osteoclasts, OCs) 的作用及机制。方法 可溶性核因子- κ B 受体活化因子配体 (soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, sRANKL) 联合 H₂O₂ 诱导 RAW264.7 细胞, 建立氧化应激诱导的 OCs 模型; CCK-8 法检测 OCs 活力; 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 染色测定 OCs 的数目; 磷酸苯二钠法测定 OCs 的 TRAP 活性; 免疫荧光法观察 OCs 的 F-actin 环结构和形态, 以及 p65 和核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 的核转位; ELISA 法测定 OCs 相关的生化指标; Western blotting 检测骨吸收关键蛋白及核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和 Nrf2 通路相关蛋白的表达。结果 OGB 显著抑制氧化应激诱导的 OCs 的形成和分化 ($P < 0.01$), 并抑制 TRAP 活性、F-actin 环的形成及其骨吸收作用 ($P < 0.05$ 、 0.01), 下调骨吸收关键蛋白 c-Fos、组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloprotein 9, MMP9) 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和还原型辅酶 II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, NOX4) 的活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 增加抗氧化酶血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1)、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (gamma-glutamyl cysteine synthetase, γ -GCS) 的活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 增强 OCs 中 Nrf2 的表达和核转位, 抑制肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 的募集、核因子- κ B 抑制因子 α (inhibitor of NF- κ B- α , I κ B α) 的降解, 并阻止 p65 的磷酸化和核转位 ($P < 0.05$)。结论 OGB 能够通过调控 NF- κ B 和 Nrf2 通路, 抑制氧化应激诱导的 OCs 形成分化和骨吸收作用。

关键词: 仙茅; 苔黑酚龙胆二糖苷; 破骨细胞; 氧化应激; 核因子- κ B 通路; 核因子 E2 相关因子 2 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)03-0822-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.013

Orcinol gentiobioside from *Curculigo orchoides* inhibits oxidative stress and bone resorption in osteoclasts by regulation of NF- κ B and Nrf2 pathways

LI Heming¹, LIU Mengqin^{1, 2}, YU Yanwei¹, SHEN Yi¹, DU Jinman¹, HU Sijing¹, XU Jinlong³, ZHANG Quanlong¹, QIN Luping¹, ZHANG Qiaoyan¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China

3. 969 Hospital of PLA Joint Logistics Support Forces, Hohhot 010051, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of orcinol gentiobioside (OGB) from *Curculigo orchoides* on osteoclasts (OCs) induced by oxidative stress. **Methods** OCs model were established from RAW264.7 cells induced by soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (sRANKL) and H₂O₂. The viability of OCs was assayed by CCK-8 method. The number of OCs was determined by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. TRAP activity of OCs was detected by using p-PPNP-

收稿日期: 2023-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973534); 国家自然科学基金资助项目 (82374003)

作者简介: 李鹤鸣, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及品质评价。E-mail: lihm0123@163.com

*通信作者: 秦路平, 博士, 教授, 研究方向为中药品质评价与资源开发利用。E-mail: lpqin@zcmu.edu.cn

张巧艳, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础及品质评价。E-mail: zqy1965@163.com

Na method. F-actin and nuclear translocation of p65 and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) were stained with immunofluorescence method. The biochemical parameters of OCs were detected by ELISA. The expressions of key proteins involved in bone resorption and nuclear factor- κ B (NF- κ B)/Nrf2 pathway were analyzed by Western blotting. **Results** OGB significantly inhibited the formation and differentiation of OCs ($P < 0.01$), and significantly suppressed TRAP activity, formation of F-actin and bone resorption of OCs ($P < 0.05, 0.01$), down-regulated the expressions of c-Fos, cathepsin K (CTSK) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) ($P < 0.05, 0.01$), reduced the levels of reactive oxygen species (ROS) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 4 (NOX4) activity ($P < 0.05, 0.01$), improved the activities of heme oxygenase-1 (HO-1), quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and gamma-glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) ($P < 0.05, 0.01$). In addition, OGB also enhanced the expression and nucleus translocation of Nrf2 in OCs, inhibited the recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), the degradation of inhibitor of NF- κ B- α (I κ B α) and prevented the phosphorylation and nuclear translocation of p65 in OCs ($P < 0.05$). **Conclusion** OGB inhibits formation, differentiation and bone resorption of OCs induced by oxidative stress through regulation of NF- κ B and Nrf2 pathways.

Key words: *Curculigo orchoides* Gaertn.; orcinol gentiobioside; osteoclasts; oxidative stress; nuclear factor- κ B pathway; nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种常见的老年性疾病, 是参与骨代谢的成骨细胞的骨形成作用和破骨细胞 (osteoclasts, OCs) 的骨吸收作用失衡, 导致骨量减少、骨组织微结构退化、骨脆性增加, 以致易于发生骨折的骨骼疾病^[1]。OCs 是唯一具有骨吸收功能的细胞, 由骨髓单核细胞在巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 和核因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 的刺激下形成的多核细胞, 其活性受丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路的调控^[2]。随着机体的衰老, 体内雌激素水平降低, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平升高, 导致氧化应激, 造成 OCs 活性增强, 致使骨量减少和 OP 的发生^[3-4]。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 通路是调节机体氧化应激的关键机制^[5], 激活 OCs 的 Nrf2 通路, 增强其抗氧化能力, 抑制其形成分化和骨吸收活性, 可以减缓 OP 的发生发展。目前, 一些抗氧化剂如维生素 E、维生素 C, 尤其是 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸 (*N*-acetyl-*L*-cysteine, NAC) 被发现能够作为 ROS 清除剂抑制 OCs 在骨形成作用中的负面影响^[6]。而天然药物含有丰富的抗氧化成分, 从中寻找能够抑制 OCs 骨吸收的活性成分, 研究其抑制 OCs 形成分化的机制, 可为中药新产品的开发及临床应用提供科学依据。

仙茅为石蒜科植物仙茅 *Curculigo orchoides* Gaertn. 的干燥根茎^[7], 含有酚苷、木脂素和环阿尔

廷醇型三萜皂苷等多种结构类型的化学成分, 具有补肾阳及与之相关的调节免疫、抗氧化、抗抑郁、保肝、保护心血管、抗骨质疏松及植物雌激素样作用^[8-9], 应用于二仙汤、黄芪三仙汤、调经促孕丸、更年安片、骨仙片、益气固本片等多个中药方剂和成药中, 显示出了良好的应用前景。仙茅酚苷类成分为其主要活性成分, 具有良好的抗氧化以及抗骨质疏松作用^[10], 其结构类型包括苯甲酸酯类酚苷如仙茅苷、仙茅苷乙; 苔黑酚类酚苷如苔黑酚葡萄糖苷、苔黑酚龙胆二糖苷; 含氯苯酚衍生物类酚苷如仙茅素 A^[11-12]。课题组前期研究发现, 仙茅苷能够通过对抗氧化应激增加铁超载和表达嵌合小鼠/人淀粉样蛋白前体蛋白 (Mo/HuAPP695swe) 和突变人早老蛋白 1 (PS1-dE9) 双转基因小鼠的骨形成^[13-14], 并发现其通过对抗氧化应激抑制 OCs 骨吸收的机制^[15]。仙茅苷在《中国药典》2020 年版规定的质量分数 $\geq 0.10\%$, 而研究发现苔黑酚类酚苷在仙茅中质量分数高达 1.0% ^[16], 也具有抗氧化和抗骨质疏松的作用^[17], 但其深入的机制尚不清楚。苔黑酚龙胆二糖苷 (orcinol gentiobioside, OGB) 为仙茅中主要的苔黑酚类酚苷, 其是否通过抗氧化发挥抗 OP 作用值得进一步探讨。因此, 本研究以 sRANKL 联合 H_2O_2 诱导 RAW264.7 细胞分化的 OCs 为模型, 观察 OGB 对 OCs 形成分化和骨吸收作用的影响, 研究其通过 NF- κ B 和 Nrf2 通路减缓 OCs 氧化应激和骨吸收的机制, 以期为仙茅的临床应用及资源开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞

RAW264.7 细胞购自中国科学院典型培养物保

藏委员会细胞库。

1.2 药品与试剂

OGB(批号 P23M10S84022, 质量分数 $\geq 98\%$)、NAC(批号 L17O9X7236, 质量分数 $\geq 98\%$)、Nrf2 抑制剂 ML385(批号 L17JD9L77422, 质量分数 $\geq 98\%$)、NF- κ B 抑制剂 BAY 11-7082(批号 K10J10D92650, 质量分数 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司; 重组小鼠可溶性核因子- κ B 受体活化因子配基(soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, sRANKL, 批号 0715612J1217)购自美国 PeproTech 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司; CCK-8 增殖检测试剂盒(批号 MA0218)购自大连美伦生物医药有限公司; 抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 4%多聚甲醛(批号 XS185001)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; ROS 测定试剂盒(批号 20200520)、钙测定试剂盒(批号 20201121)、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamyl cysteine synthetase, γ -GCS)测定试剂盒(批号 20200529)、小鼠 I 型胶原 C 末端肽(cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen, CTX-I) ELISA 试剂盒(批号 20201130)、小鼠 I 型前胶原氨基端前肽(procollagen type I intact N terminal propeptide, PINP) ELISA 试剂盒(批号 20201130)、小鼠醌氧化还原酶 1(quinone oxidoreductase 1, NQO1) ELISA 试剂盒(批号 20200601)、小鼠血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1) ELISA 试剂盒(批号 20200601)、小鼠还原型辅酶 II(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶 1(NADPH oxidase 1, NOX1) ELISA 试剂盒(批号 20200601)、小鼠 NADPH 氧化酶 4(NADPH oxidase 4, NOX4) ELISA 试剂盒(批号 20200601)购自南京建成生物工程研究所; 组织蛋白酶 K(cathepsin K, CTSK)抗体(批号 ab19027)、肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)抗体(批号 ab33915)购自英国 Abcam 公司; 活化 T-细胞核因子 1(nuclear factor of activated T-cells, NFATc1)抗体、Nrf2 抗体、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)抗体、磷酸化 p65(p-p65)抗体、p65 抗体、山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 CST 公司(批号分别为 8032、12721、

8047、3033、8242、7074); 核因子- κ B 抑制因子 α (inhibitor of NF- κ B- α , I κ B α)抗体、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloprotein 9, MMP9)抗体、c-Fos 抗体(批号分别为 BM3932、BA2202、BA0207-2)购自武汉博士德生物工程有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 AT0010)购自上海维景生物科技有限公司。

1.3 仪器

DMi1 型显微镜(德国 Leica 公司); Axio Imager 2 型正置显微镜、LSM880 型激光共聚焦显微镜(卡尔蔡司股份公司); 1510 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 H₂O₂ 诱导 OCs 模型的建立

将 RAW264.7 细胞在含 25 ng/mL sRANKL 的 α -MEM 完全培养基中诱导 36 h 后, 再用含 20 μ mol/L H₂O₂ 的 α -MEM 完全培养基继续诱导 36 h, 即可得到 H₂O₂ 诱导的 OCs。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中, 贴壁过夜, 用 20 μ mol/L NAC 以及不同剂量(0、1、5、10 μ mol/L)的 OGB 处理 36 h, 在给药基础上再加入 20 μ mol/L H₂O₂, 并单独设置 H₂O₂ 组, 继续处理 36 h, CCK-8 法检测细胞活力。

2.3 TRAP 染色及活性测定

设置 sRANKL 和 H₂O₂ 诱导的 OCs 模型组、NAC 处理的阳性药组以及 OGB(1、5、10 μ mol/L)给药组, 给药处理 36 h 后, 在给药基础上再加入 20 μ mol/L H₂O₂ 处理 36 h, 收集上清, 按照课题组前期建立的方法^[18]测定 TRAP 活性, 并按照试剂盒说明书进行 TRAP 染色, 显微镜下观察并拍照。

2.4 F-actin 环的免疫荧光染色

将 RAW264.7 细胞接种于玻底细胞培养皿中, 分组给药处理 24 h, 再加入 H₂O₂ 并给药处理 12 h, 用 PBS 清洗 2 次, 4%多聚甲醛室温固定 30 min 后, 采用鬼笔环肽和 DAPI 对 OCs 细胞核及 F-actin 环进行免疫荧光染色, 最后于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

2.5 ELISA 检测 OCs 骨吸收作用

将无菌的牛皮质骨切片置于 96 孔板, 然后将 RAW264.7 细胞接种于板中, 培养 8 h 后分组给药处理 36 h, 再加入 H₂O₂ 并给药处理 36 h, 按照 ELISA

试剂盒说明书检测上清液中 Ca^{2+} 、PINP、CTX-I 的含量。

2.6 ROS 水平检测

以 sRANKL 诱导 RAW264.7 细胞得到的 OCs 为对照组, 细胞分组处理用 PBS 清洗, 每孔加入含 $10 \mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 的无血清培养基, 37°C 孵育 30 min, PBS 清洗后, 于 485 nm 激发波长和 528 nm 发射波长下检测其荧光值。

2.7 NADPH 氧化酶及抗氧化酶活性测定

将 sRANKL 诱导的 RAW264.7 细胞分化的 OCs 分组给药处理 36 h, 再加入 H_2O_2 并给药处理 24 h, PBS 清洗后低温裂解 30 min, 于 4°C 、 $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 15 min, 取上清并按照试剂盒说明书检测 NOX2、NOX4、HO-1、NQO1 和 $\gamma\text{-GCS}$ 活性。

2.8 Western blotting 检测蛋白表达

设置对照组、模型组、给药组以及 ML385 ($5 \mu\text{mol/L}$) 或 BAY 11-7082 ($1.5 \mu\text{mol/L}$) 处理的抑制剤组, 分组处理后, 收集并裂解细胞获得蛋白, 通过 BCA 法测定总蛋白浓度, 并定量为等浓度等体积的蛋白样品, 加入上样缓冲液, 100°C 加热 10 min 使蛋白变性, 蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 置于 5% 牛血清白蛋白溶液室温封闭 2 h, 分别加入 c-Fos、CTSK、MMP9、

NFATc1、TRAF6、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 、p-p65、p65、Nrf2、Keap1 及 GAPDH 抗体, 于 4°C 孵育过夜后 TBST 洗膜; 加入二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 用 ECL 化学发光法进行显影, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 p65 及 Nrf2 免疫荧光染色

将 RAW264.7 细胞接种于玻底细胞培养皿中, 分组给药处理 48 h, 再加入 H_2O_2 并给药处理 4 h, PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 继续用 PBS 清洗 2 次, 加入 5% 牛血清白蛋白于 37°C 封闭 1 h, 分别加入 p65 和 Nrf2 抗体稀释液, 4°C 孵育过夜, PBS 清洗 2 次, 加入荧光二抗室温避光孵育 30 min, PBS 清洗 2 次后加入 DAPI 室温避光染色 10 min, 用 PBS 清洗 2 次后再加入 $200 \mu\text{L}$ PBS, 于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

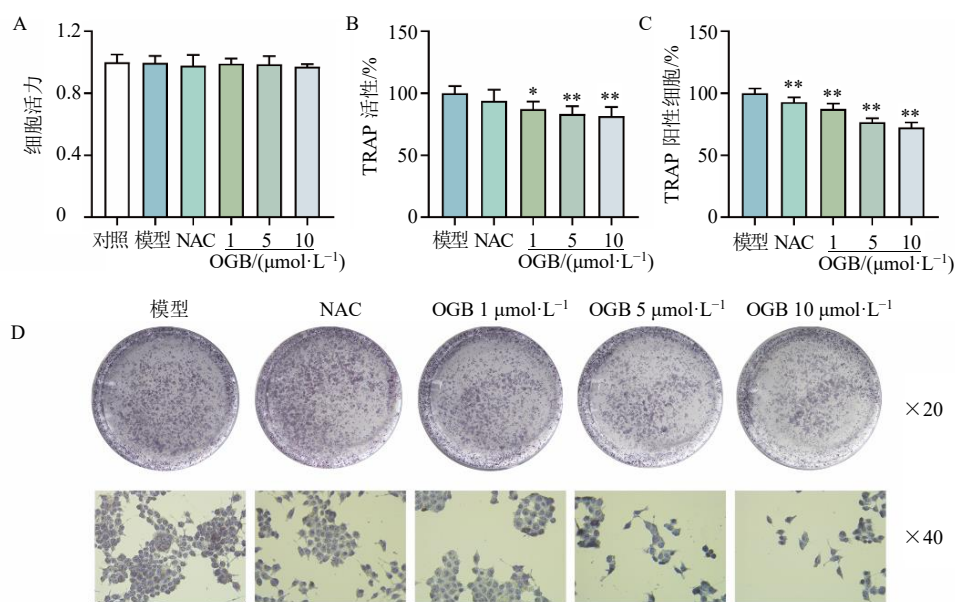
2.10 统计学分析

数据以至少 3 次独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有统计学分析使用 SPSS 25.0 软件采用单因素方差分析比较各组间差异的显著性。所有图表均使用 GraphPad Prism 8.0.2 进行绘制。

3 结果

3.1 OGB 对 RAW264.7 细胞活力及 H_2O_2 诱导的 OCs 形成和分化的影响

如图 1-A 所示, 与对照组比较, $20 \mu\text{mol/L}$ NAC



NAC-N-乙酰-L-半胱氨酸; OGB-苕黑酚龙胆二糖苷; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同。

NAC-N-acetyl-L-cysteine; OGB-orceinol gentiobioside; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 OGB 对 sRANKL 和 H_2O_2 诱导的 RAW264.7 细胞活力 (A)、TRAP 活性 (B)、TRAP 阳性细胞数 (C、D) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of OGB on RAW264.7 cells activity (A), TRAP activity (B), number of TRAP positive cells (C, D) induced by sRANKL and H_2O_2 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

以及 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ OGB 处理 36 h 后,在药物处理的同时加入 20 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 再处理 36 h,RAW264.7 细胞的活力均无明显变化。TRAP 特异性地分布于 OCs 中,如图 1-B、C、D 所示,NAC 显著减少 TRAP 阳性细胞数量 ($P<0.01$),OGB 可剂量相关性地显著降低 OCs 的 TRAP 活性 ($P<0.05$ 、 0.01),减少 TRAP 阳性细胞数目 ($P<0.01$),表明 OGB 可显著抑制 OCs 的形成和分化。

3.2 OGB 对 H_2O_2 诱导的 OCs 的 F-actin 环形成和骨吸收的影响

F-actin 环是 OCs 发挥骨吸收功能的重要结构,如图 2-A 所示, H_2O_2 诱导的 OCs 的 F-actin 环厚且完整,不同浓度的 OGB 处理后,OCs 的 F-actin 环变薄、缺失,甚至消失,表明 OGB 可抑制 OCs 的 F-actin 构建。

OCs 能够分泌骨基质降解酶,降解骨基质,释

放 Ca^{2+} 以及胶原降解产物如 CTX-I 和 PINP,因此,培养 OCs 的培养基中 Ca^{2+} 及 CTX-I 和 PINP 的水平可用于表征其骨吸收活性。如图 2-B 所示,NAC 显著降低培养基中 Ca^{2+} 、CTX-I 和 PINP 的水平 ($P<0.05$ 、 0.01);OGB 能够剂量相关性地显著降低培养基中 Ca^{2+} 的含量 ($P<0.05$ 、 0.01),降低培养基中 CTX-I 和 PINP 的水平 ($P<0.05$ 、 0.01),显示出显著抑制 OCs 骨吸收活性的作用。

3.3 OGB 对 H_2O_2 诱导的 OCs 骨吸收相关蛋白表达的影响

转录因子 NFATc1 和 c-Fos 介导 OCs 的形成分化,促进骨吸收相关蛋白 MMP9 和 CTSK 的表达,使 OCs 发挥骨吸收作用。如图 3 所示,与模型组比较,OGB 能够显著下调 H_2O_2 诱导的 OCs 的 c-Fos、CTSK 和 MMP9 的表达 ($P<0.05$ 、 0.01),但对 NFATc1 的表达无显著影响。

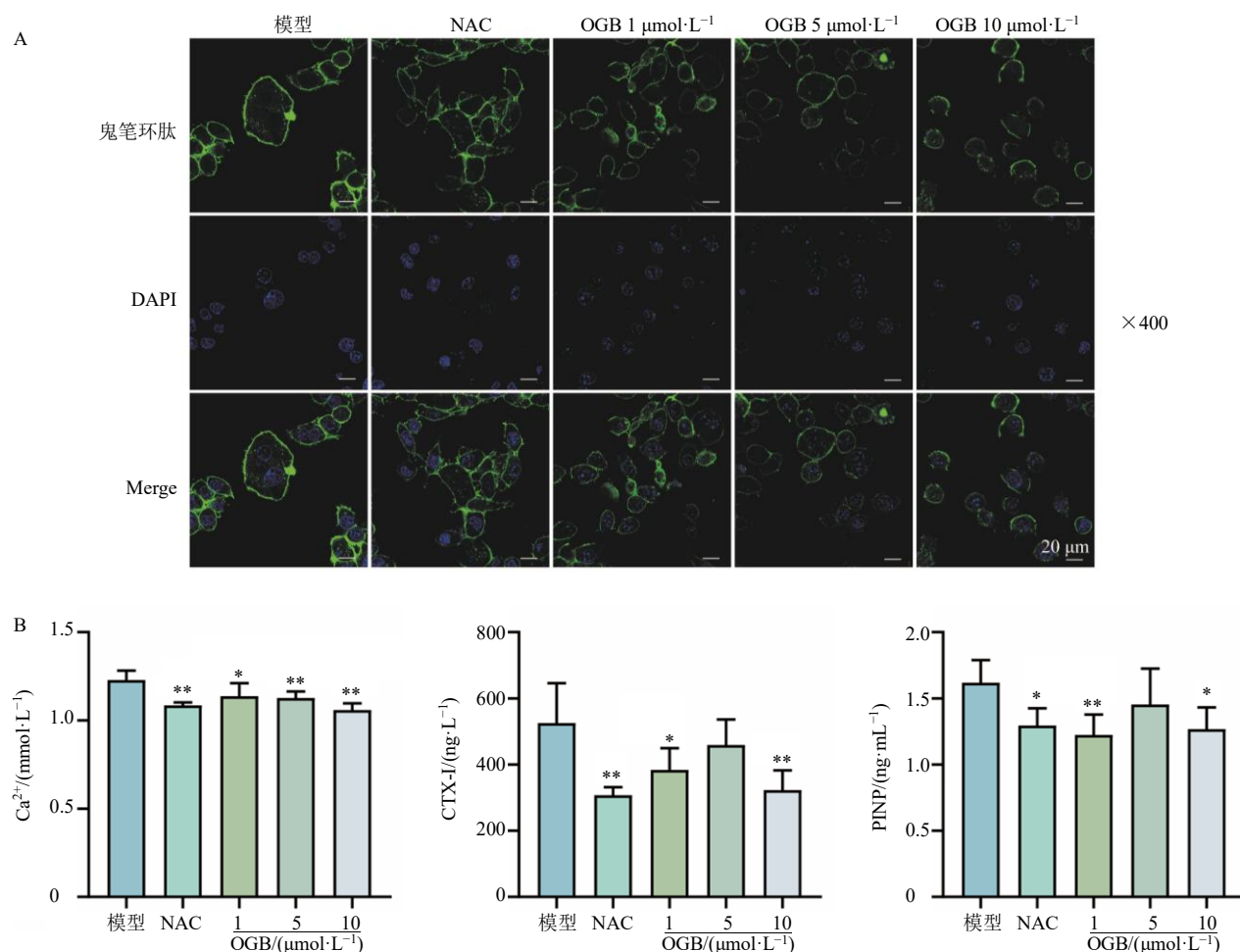


图 2 OGB 对 H_2O_2 诱导的 OCs 的 F-actin 环形成 (A) 及骨吸收活性 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 2 Effect of OGB on construction of F-actin ring (A) and bone resorption activity (B) of OCs induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

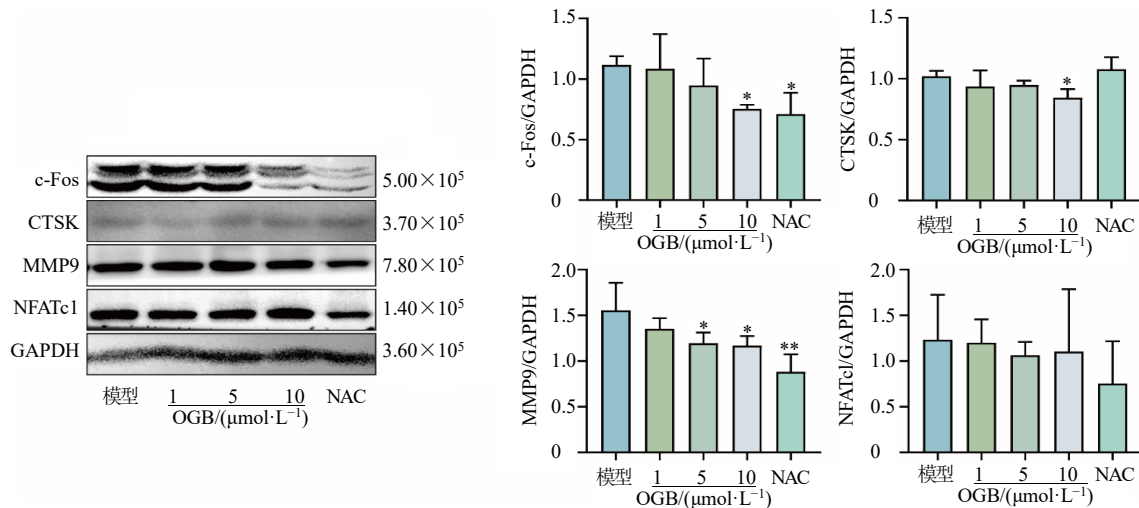


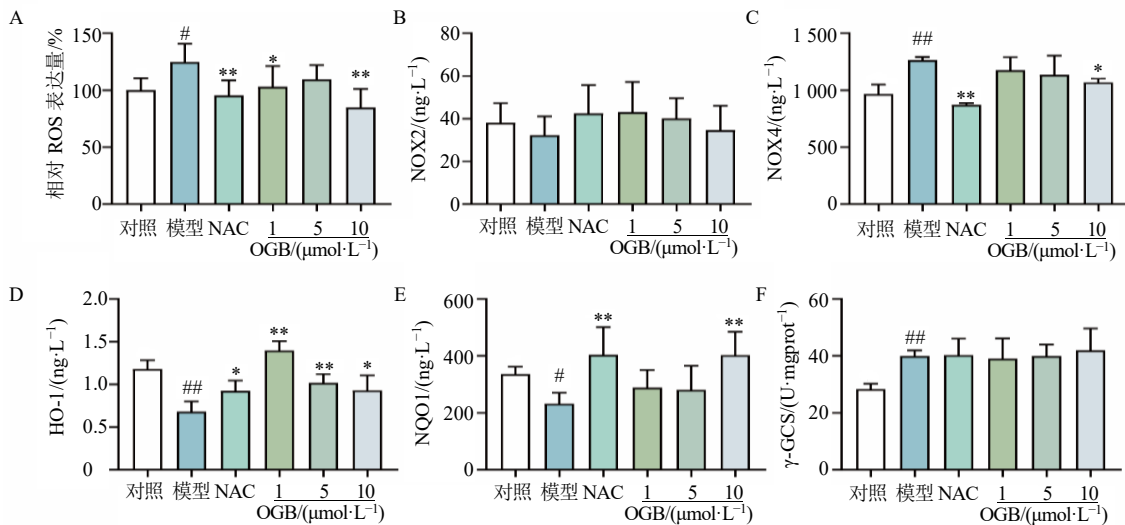
图 3 OGB 对 H₂O₂ 诱导的 OCs 骨吸收相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of OGB on expressions of bone resorption related proteins in OCs induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 OGB 对 H₂O₂ 诱导的 OCs 的 ROS 水平及 NADPH 氧化酶和抗氧化酶活性的影响

H₂O₂ 诱导增加 OCs 的 ROS 水平, 促进 OCs 的形成、分化和骨吸收活性。ROS 的产生由 NADPH 氧化酶调控, HO-1、NQO1、 γ -GCS 等抗氧化酶可对抗 ROS 对细胞产生的氧化应激。如图 4-A 所示, H₂O₂ 处理显著增加 OCs 内 ROS 的水平 ($P < 0.05$), NAC 和 OGB 可显著降低 H₂O₂ 诱导的 OCs 内 ROS 的水平 ($P < 0.05, 0.01$)。如图 4-B、C 所示, H₂O₂ 的诱导使 OCs 的 NOX4 活性显著增加 ($P < 0.01$),

NAC 和高剂量的 OGB 可以显著抑制 OCs 的 NOX4 活性 ($P < 0.05, 0.01$), 但 H₂O₂ 及 NAC 和 OGB 对 OCs 的 NOX2 活性均无明显的影响。如图 4-D、E、F 所示, H₂O₂ 显著降低 OCs 内 HO-1 和 NQO1 的活性 ($P < 0.05, 0.01$), NAC 和 OGB 处理后, HO-1、NQO1 的活性显著增加 ($P < 0.05, 0.01$); H₂O₂ 处理显著增加 OCs 的 γ -GCS 活性 ($P < 0.01$), 相较模型组, NAC 和 OGB 处理对 OCs 的 γ -GCS 活性没有显著的影响, 表明 OGB 可减缓 H₂O₂ 引起的 OCs 氧化应激。



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 4 OGB 对 H₂O₂ 诱导 OCs 的 ROS 水平 (A)、NADPH 氧化酶活性 (B、C) 及抗氧化酶活性 (D、E、F) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 4 Effect of OGB on ROS levels (A), activities of NADPH oxidase (B, C) and antioxidative enzyme (D, E, F) of OCs induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.5 OGB 对 H_2O_2 诱导的 OCs 中 Nrf2 通路的调控作用

Nrf2 是调控氧化应激的关键转录因子。如图 5 所示, OGB 能够增加 H_2O_2 诱导的 OCs 的 Nrf2 表达 ($P<0.05$) 及其核转位, 但对其 Keap1 的表达没有显著的影响, Nrf2 通路抑制剂 ML385 在一定程度上逆转 OGB 对 OCs 的 Nrf2 核转位的促进作用, 表明 OGB 能够通过激活 Nrf2 通路减缓 H_2O_2 诱导的 OCs 的氧化应激。

3.6 OGB 对 H_2O_2 诱导的 OCs 中 NF- κ B 通路的调控作用

进一步研究了 OGB 对 H_2O_2 诱导的 OCs 中 NF- κ B 通路的调控作用。如图 6 所示, OGB 能够显著抑制 TRAF6 的募集 ($P<0.05$), 降低 I κ B α 的降解 ($P<0.05$), 抑制 p65 的磷酸化 ($P<0.05$), 阻止 p65 的入核, 进而抑制 NF- κ B 通路的激活。当 OGB 与 NF- κ B 通路抑制剂 BAY 11-7082 联用后, OGB 对 I κ B α 降解的抑制作用增强 ($P<0.05$), 表明 OGB 能

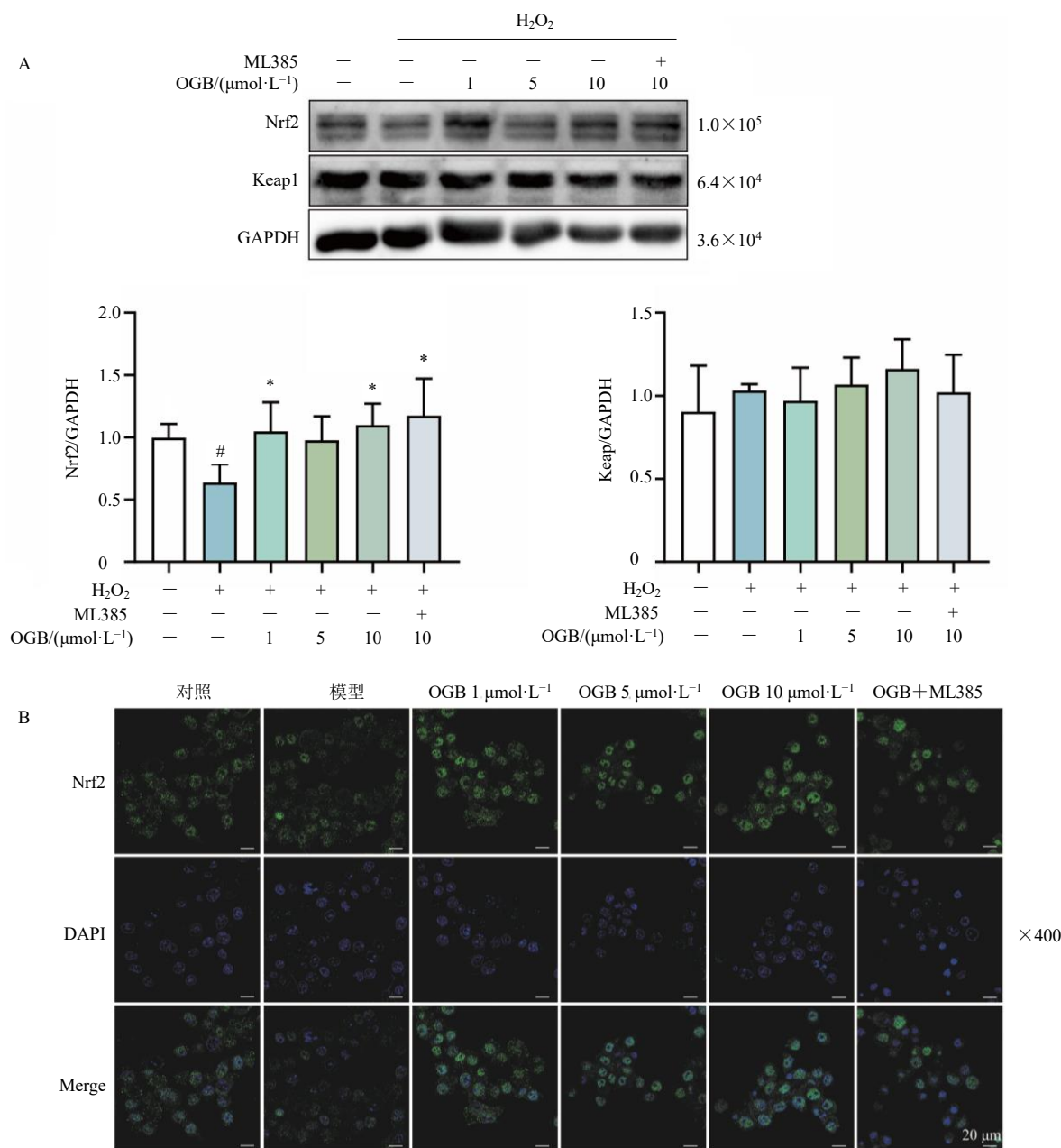


图 5 OGB 对 H_2O_2 诱导的 OCs 中 Nrf2 通路 (A) 和 Nrf2 核转位 (B) 的调控作用 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 5 Regulatory effect of OGB on Nrf2 pathway (A) and nucleus translocation of Nrf2 (B) in OCs induced by H_2O_2 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

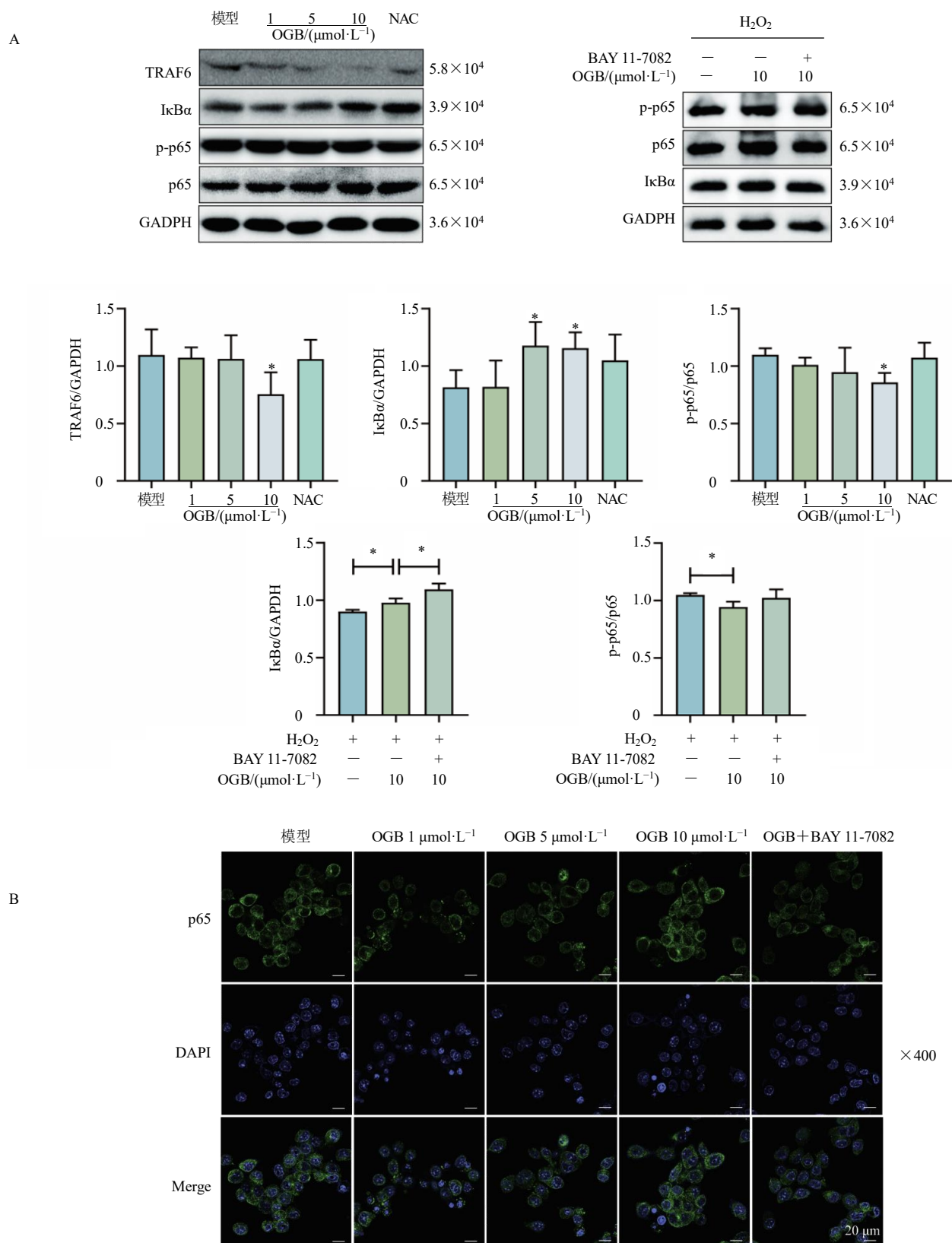


图 6 OGB 对 H₂O₂ 诱导的 OCs 中 NF- κ B 通路 (A) 和 p65 核转位 (B) 的调控作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 6 Regulatory effect of OGB on NF- κ B pathway (A) and nucleus translocation of p65 (B) in OCs induced by H₂O₂
 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

够通过抑制 NF- κ B 通路的激活,抑制 OCs 的形成和分化。

4 讨论

雌激素缺失和衰老导致的机体氧化应激已被证实是 OP 发生的关键因素^[19],减缓机体的氧化应激状态成为调控骨代谢、减少骨丢失的新策略。抗氧化剂 NAC 能够阻止 RANKL 介导的 NF- κ B、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 以及细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 通路的激活,抑制 OCs 的形成分化^[20]。许多中药及天然化合物如白藜芦醇、红景天苷等也被证实能够调控机体氧化应激,具有减少骨丢失的作用^[6]。课题组前期发现仙茅酚苷类成分对去卵巢大鼠和快速老化小鼠的骨丢失具有确切的防治作用^[17,21],并可通过对抗氧化应激降低 ROS 对成骨细胞功能的损伤作用和对 OCs 功能的激活作用^[22],仙茅苔黑酚葡萄糖苷也被证实可通过与 p38 结合,促进成骨细胞活性,减缓糖皮质激素所致 OP 小鼠的骨丢失^[23]。本研究进一步发现 OGB 抑制氧化应激 OCs 的形成分化和骨吸收的作用,并揭示了 OGB 发挥这一作用的机制。

OCs 作为唯一进行骨吸收的功能细胞,其形成分化受转录因子 NFATc1 和 c-Fos 的调节^[24]。OCs 通过 F-actin 环附着在骨基质上,分泌 TRAP、MMP9 和 CTSK,降解骨矿物质和骨胶原,进行骨吸收^[25]。研究发现,抗氧化剂 NCA 以及 OGB 可显著减少 H₂O₂ 诱导的 OCs 的 TRAP 活性及 TRAP 阳性细胞的数目,抑制其转录因子 c-Fos 的表达、F-actin 环的形成及骨基质降解酶 MMP9 和 CTSK 的活性,降低骨基质降解产物 Ca²⁺、CTX-I 和 PINP 的释放,显示出良好的抑制 H₂O₂ 诱导的 OCs 形成分化和骨吸收活性作用,与阳性药 NAC 相比,OGB 具有相同甚至更好的抗 OP 作用。

氧化应激诱导 OCs 的形成和分化。NADPH 氧化酶,如 NOX1、NOX2 和 NOX4 参与调控 OCs 中 ROS 产生,骨骼中过多的 ROS 将直接增加 OCs 活性^[26]。氧化应激状态下,ROS 激活的 OCs 骨吸收作用是由转录因子 Nrf2 调控的^[27],稳态条件下,Nrf2 被细胞质中的 Keap1 结合,进行泛素介导的降解,而氧化应激则导致 Keap1 释放,阻止了 Nrf2 的降解,此时 Nrf2 被激活并转位到细胞核中,促进 HO-1、NQO1、 γ -GCS 和 G6PD 等抗氧化基因的转录和表达,调节 OCs 内 ROS 水平,调控 RANKL 依赖

的 OCs 形成和分化,减缓骨质的破坏^[28]。研究发现,OGB 能够降低 H₂O₂ 诱导的 OCs 中 NOX4 水平,促进 Nrf2 的表达和核转位,进而提高抗氧化酶 HO-1、NQO1 和 γ -GCS 的水平,清除 ROS,表明 OGB 可激活 Nrf2 通路减缓 OCs 的氧化应激。

氧化应激状态下,ROS 还将作为第二信使激活 OCs 的 NF- κ B 信号通路^[29]。在 OCs 分化和成熟的过程中,RANKL 和 ROS 促进 TRAF6 的募集,激活下游 NF- κ B 通路,I κ B 被 I κ B 激酶复合物磷酸化并从三聚体解离,p65 表现出核转位的活性,入核后诱导 OCs 转录因子 c-Fos 的表达,调节 MMP9、CTSK 以及 TRAP 的表达和活性,促使 OCs 的骨吸收作用^[30]。本研究证实 OGB 能够抑制氧化应激 OCs 的 TRAF6 募集,抑制 I κ B α 的降解、p65 的磷酸化及其核转位,表明 OGB 可通过抑制 H₂O₂ 诱导 OCs 的 NF- κ B 通路激活,抑制 OCs 的形成分化和骨吸收作用。

综上,本研究阐明了 OGB 通过调节 NF- κ B 和 Nrf2 通路减缓 H₂O₂ 诱导的 OCs 氧化应激和骨吸收的机制,结合前期文献报道可为仙茅酚苷类成分的开发利用,以及仙茅防治 OP 的临床应用提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Manolagas S C, Jilka R L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 1995, 332(5): 305-311.
- [2] Roodman G D. Advances in bone biology: The osteoclast [J]. *Endocr Rev*, 1996, 17(4): 308-332.
- [3] Finkel T, Holbrook N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. *Nature*, 2000, 408(6809): 239-247.
- [4] Pignolo R J, Law S F, Chandra A. Bone aging, cellular senescence, and osteoporosis [J]. *JBM R Plus*, 2021, 5(4): e10488.
- [5] Karunatileke N C, Fast C S, Ngo V, et al. Nrf2, the major regulator of the cellular oxidative stress response, is partially disordered [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7434.
- [6] Marcucci G, Domazetovic V, Nediani C, et al. Oxidative stress and natural antioxidants in osteoporosis: Novel preventive and therapeutic approaches [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(2): 373.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 105-106.
- [8] Ge J F, Gao W C, Cheng W M, et al. Orcinol glucoside produces antidepressant effects by blocking the

- behavioural and neuronal deficits caused by chronic stress [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014, 24(1): 172-180.
- [9] 周芳, 姚萌, 吴倩, 等. 仙茅的化学成分和药理活性研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2238-2247.
- [10] Jiao L, Cao D P, Qin L P, *et al*. Antiosteoporotic activity of phenolic compounds from *Curculigo orchoides* [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(9): 874-881.
- [11] Wang Z H, Huang J, Ma X C, *et al*. Phenolic glycosides from *Curculigo orchoides* Gaertn. [J]. *Fitoterapia*, 2013, 86: 64-69.
- [12] Zuo A X, Shen Y, Jiang Z Y, *et al*. Three new phenolic glycosides from *Curculigo orchoides* G [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(7): 910-913.
- [13] Zhang Q L, Zhao L, Shen Y, *et al*. Curculigoside protects against excess-iron-induced bone loss by attenuating Akt-FoxO1-dependent oxidative damage to mice and osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 9281481.
- [14] Zhao L, Liu S, Wang Y, *et al*. Effects of curculigoside on memory impairment and bone loss via anti-oxidative character in APP/PS1 mutated transgenic mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133289.
- [15] Liu M Q, Liu S, Zhang Q, *et al*. Curculigoside attenuates oxidative stress and osteoclastogenesis via modulating Nrf2/NF- κ B signaling pathway in RAW264.7 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114129.
- [16] 汪滢, 刘雷, 徐金龙, 等. 仙茅中酚苷类成分高效液相色谱法测定方法的建立 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(5): 375-379.
- [17] 刘梦琴, 张奇, 朱露琳, 等. 仙茅苷黑酚类酚苷对去卵巢大鼠骨代谢和破骨细胞形成分化的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(2): 99-107.
- [18] 张乃丹, 蒋益萍, 薛黎明, 等. 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 [J]. *第二军医大学学报*, 2016, 37(5): 562-568.
- [19] Manolagas S C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis [J]. *Endocr Rev*, 2010, 31(3): 266-300.
- [20] Ha H, Kwak H B, Lee S W, *et al*. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 301(2): 119-127.
- [21] Gong W, Liu M Q, Zhang Q, *et al*. Orcinol glucoside improves senile osteoporosis through attenuating oxidative stress and autophagy of osteoclast via activating Nrf2/Keap1 and mTOR signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 5410377.
- [22] 白鸿爱, 何勇静, 张奇, 等. 基于 FoxO1 通路探讨仙茅苷对 H₂O₂ 诱导成骨细胞氧化损伤的保护作用及机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(11): 1296-1304.
- [23] He X Y, Zhao W L, Yao L P, *et al*. Orcinol glucoside targeted p38 as an agonist to promote osteogenesis and protect glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 154953.
- [24] Takayanagi H. Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(4): 292-304.
- [25] Zhang X W, Zhou C, Zhu H D, *et al*. Inhibition of osteoclastogenesis by 6-[10'(Z)-heptadecenyl]salicylic acid from *Syzygium tetragonum* Wall via preventing nuclear translocation of NFATc1 [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(7): 960-965.
- [26] Schröder K. NADPH oxidases in bone homeostasis and osteoporosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 132: 67-72.
- [27] Hyeon S, Lee H, Yang Y, *et al*. Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 789-799.
- [28] Kanzaki H, Shinohara F, Kanako I, *et al*. Molecular regulatory mechanisms of osteoclastogenesis through cytoprotective enzymes [J]. *Redox Biol*, 2016, 8: 186-191.
- [29] Cui Q, Chen F Y, Chen H Y, *et al*. Benzo[a]pyrene (BaP) exposure generates persistent reactive oxygen species (ROS) to inhibit the NF- κ B pathway in medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. *Environ Pollut*, 2019, 251: 502-509.
- [30] Fang Q, Zhou C, Nandakumar K S. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 3830212.

[责任编辑 李亚楠]