

· 基础研究 ·

柚皮苷对共培养体系中成骨细胞活性及破骨细胞分化的影响

赵志虎¹ 李风波² 马信龙¹ 孙晓雷³ 马剑雄¹ 张杨⁴ 王颖⁵ 卢斌⁵ 孙磊⁶
王建宝³ 吕建伟¹

【摘要】 目的 研究在成骨细胞-破骨细胞共培养体系中,柚皮苷对成骨细胞活性和破骨细胞分化的影响。**方法** 将成骨细胞(MC3T3-E1细胞株)和破骨细胞(RAW264.7细胞株)以2:1的比例分别培养至Transwell小室的上室和下室。根据培养基是否含有柚皮苷分为对照组和柚皮苷(2 ng/ml组、20 ng/ml组、200 ng/ml组),培养7 d后对下室破骨细胞进行TRAP染色和骨吸收陷窝鉴定;荧光定量PCR分析成骨细胞骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、核因子κB受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor-κB ligand, RANKL)基因和破骨细胞分化基因活化T细胞核因子-1(NFATc-1)、活化T细胞核因子-2(NFATc-2)和核因子κB受体激活蛋白(receptor activator of NF-κB, RANK)的相对表达量。**结果** 与对照组相比,柚皮苷可以促进成骨细胞OPG、RANKL的表达量且可提高OPG/RANKL的比值,差异有统计学意义($P < 0.05$);20 ng/ml柚皮苷TRAP(+)细胞数(5.82 ± 3.37)明显少于对照组(20.56 ± 7.69),差异有统计学意义($P < 0.05$);柚皮苷可抑制破骨细胞NFATc-1、NFATc-2的表达,促进RANK的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 柚皮苷可促进共培养条件体系中成骨细胞OPG和RANKL的表达以及抑制破骨细胞的分化,与上调OPG/RANKL的比值有关。

【关键词】 柚皮苷; 共同培养技术; 成骨细胞; 破骨细胞

Effect of naringin on the activity of osteoblast and differentiation of osteoclast in a co-culture system

Zhao Zhihu¹, Li Fengbo², Ma Xinlong¹, Sun Xiaolei³, Ma Jianxiong¹, Zhang Yang⁴, Wang Ying⁵, Lu Bin⁵, Sun Lei⁶, Wang Jianbao³, Lyu Jianwei¹. ¹Biomechanics Research of Institute of Orthopedics, ²Department of Orthopaedics, ³Morphology and Material Laboratory Research, ⁴Cell and Tissue Engineering Laboratory Research, ⁵Digital Orthopaedic Research, ⁶Imaging and Tracer of Laboratory, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

Corresponding author: Ma Xinlong, Email: gukezzh@126.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of naringin on the osteoblast activity and differentiation of osteoclast in a co-culture system. **Methods** Osteoblasts (MC3T3-E1 cell line) and osteoclasts (RAW264.7 cell line) were separately cultured in the upper chamber and lower chamber of Transwell with proportion of 2:1, and divided into control group and naringin group according to whether the culture medium containing naringin. Three different doses of naringin (2 ng/ml, 20 ng/ml, 200 ng/ml) were applied in naringin group. After 7 days of culturing, the osteoclasts were processed

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-0263.2015.02.003

基金项目: 天津中医药管理局重点资助项目(13123); 国家自然科学基金青年基金(81401792); 国家自然科学基金青年基金(81501061)

作者单位: 300211 天津医院骨科研究所生物力学研究室¹, 骨科², 骨科研究所形态学与材料研究室³, 骨科研究所细胞与组织工程研究室⁴, 骨科研究所数字骨科研究室⁵, 骨科研究所影像学与体内示踪研究室⁶

通讯作者: 马信龙, Email: gukezzh@126.com

for TRAP staining and bone resorption lacunae identification. Fluorescent quantitative PCR were used to semiquantitative analyze the relative expression level of OPG, RANKL, NFATc⁻¹, NFATc⁻² and RANK (receptor activator of NF-κB). **Results** Compared to the control group, Naringin can promote the expression of OPG and RANKL and increase the ratio of OPG/RANKL in osteoblasts, with significant differences ($P<0.05$). The number of TRAP(+) cells in Naringin group (20 ng/ml) (5.82 ± 3.37) was less than that of control group (20.56 ± 7.69), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Naringin can inhibit the expression of NFATc-1 and NFATc-2 in osteoclasts, while promoting the expression of RANK, and the difference is statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Naringin can promote the expression OPG and RANKL of osteoblasts and inhibiting osteoclast differentiation in co-culture system, which may be related to the increasement of OPG/RANKL ratio.

【Key words】 Naringin; Coculture techniques; Osteoblasts; Osteoclasts

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是临床常见病和多发病, 它是以骨量减少并伴随骨的微结构破坏的代谢性疾病。这种全身代谢性骨病主要是成骨细胞和破骨细胞的比例失衡所致, 当成骨细胞的成骨作用减弱或破骨细胞的破骨活性增强时, 便发生骨质疏松^[1]。柚皮苷属于二氢黄酮甙类, 是骨碎补的主要活性成分之一。柚皮苷药理作用广泛, 具有抗敏、脱敏、活血解痉、改善局部微循环、抑制神经元凋亡等类植物雌激素作用^[2-3]。目前, 许多研究证实柚皮苷具有促进成骨细胞的分化、增殖, 显著提高去势大鼠的骨密度和促进骨缺损后骨形成的作用^[4-6]。本课题组前期研究证实柚皮苷不仅可促进间充质干细胞向成骨细胞分化, 还可抑制破骨细胞的分化、促进破骨细胞的凋亡^[7-9]。由于成骨细胞与破骨细胞在体内的关系十分微妙, 单纯研究柚皮苷对成骨细胞或破骨细胞的作用与体内实际的骨微环境差别较大。因此, 本研究建立了成骨细胞-破骨细胞共培养体系, 以便较好模拟体内成骨细胞与破骨细胞的相互作用环境, 进一步研究柚皮苷在共培养条件下对成骨细胞以及破骨细胞的影响。

材料与方法

一、材料

小鼠单核细胞 RAW 264.7 细胞株 (北京协和医学院基础医学细胞中心); 小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 (中国协和医科大学基础医学研究所); 骨磨片 (自制); 柚皮苷 (质量分数 98%, Sigma 公司, 美国); 小鼠重组可溶性核因子 κB 受体活因子配体 (sRANKL, Peprotech 公司, 美国); 抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒 (Sigma 公司, 美国); 高糖 DMEM 培养基、10% 胎牛血清 (FBS)、

胰蛋白酶、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) (Sigma 公司, 美国); 磷酸盐缓冲液 (PBS), D-Hank's 液 (自制); Transwell 小室 (北京康宁公司, 中国); 碱性磷酸酶染色试剂盒 (南京建成公司, 中国)。

二、仪器

细胞培养皿 (Corning 公司, 美国); 倒置显微镜 (Leica 公司, 德国); CX-21 显微镜 (Olympus 公司, 日本); CO₂ 培养箱 (Heraeus 公司, 德国); 定量 PCR 仪 (Roche, Diagnostic, 瑞士); 正置显微镜 (Nikon 公司, 日本); 硬组织切片机 (EXAKT, 德国); 透射电镜 (国家纳米技术与工程研究院, 中国)。

三、方法

(一) 骨磨片的制备及骨吸收陷窝进行破骨细胞鉴定

用切骨机将新鲜牛股骨沿长轴方向切开, 去除骨皮质和骨髓, 切成大约 100 μm 厚的 4 cm×4 cm 骨片, 75% 乙醇中浸泡过夜, 第 2 天取出后用无菌蒸馏水和超纯水各洗 3 遍, 装在培养基内封口膜封闭并储存于 4℃ 冰箱中备用。共培养 7 d 后, 用胰蛋白酶消化骨磨片细胞, 清水超声清洗 3 遍, 梯度酒精脱水抽真空干燥后于喷金镜下观察。

(二) 药物处理

将柚皮苷粉末于 DMSO 中溶解后用 10% 高糖 DMEM 配成 200 ng/ml 母液, 而后稀释成 20 ng/ml 和 2 ng/ml 浓度。对照组采用含有相同浓度 DMSO 而不含柚皮苷的培养基培养。

(三) 共培养体系的建立

成骨细胞与破骨细胞按照 2 : 1 比例接种于 6 孔板中, 成骨细胞的种植密度为 2×10^4 / ml, 破骨细胞为 1×10^4 / ml, 此时加入 100 μg/L 的 sRANKL 诱导剂混匀诱导为破骨细胞, 将 Transwell 上室放

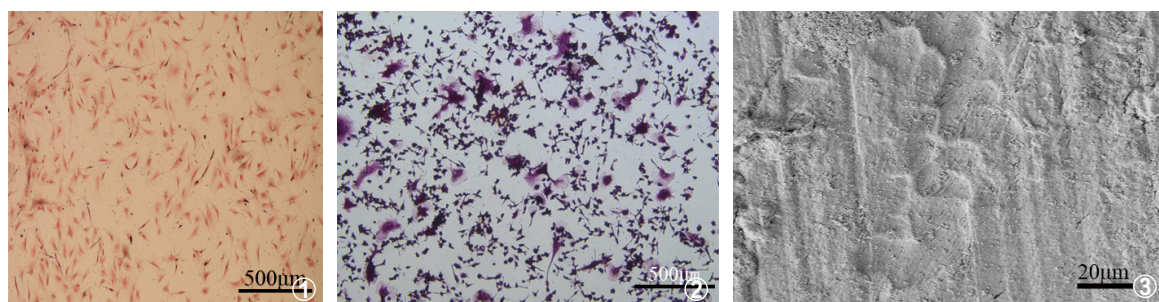


图 1 成骨细胞 ALP 染色后形成棕红样结构 图 2 成骨细胞 TRAP 染色后形成的酒红色样结构 图 3 骨磨片上形成的骨吸收陷窝

于 6 孔板上, 下室内培养液含量为 2 ml 培养基, 上室内培养液含量为 1 ml 培养基。

(四) TRAP 阳性细胞计数

对照组为不含有柚皮苷的培养基, 按照上述诱导方法, 柚皮苷组采用不同浓度柚皮苷进行诱导, 7 d 后取出玻片, 进行 TRAP 染色, 具体方法参照说明书进行操作。计数标准: 4 组分别在 100 倍视野下随机选取 10 个视野进行计数, 取平均值; 细胞呈现玫瑰红色或粉红色, 细胞核 ≥ 3 个, 上述实验重复 3 次。

(五) 成骨细胞骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)、核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 基因和破骨细胞分化基因活化 T 细胞核因子 -1 (NFATc-1)、活化 T 细胞核因子 -2 (NFATc-2)、核因子 κ B 受体激活蛋白 (receptor activator of NF- κ B, RANK) 表达量

共培养 7 d 后取出细胞, PBS 清洗后用胰酶消化并收集各组细胞加入 Trizol (Invitrogen, 美国) 裂解细胞, 使用 ReverTra Ace qPCR 逆转录试剂盒 (Toyobo Co. Ltd., 日本) 将其逆转录为 cDNA 后, 跑琼脂糖普通 PCR。检测目标分子引物如下: β -actin, 上游 5' -AGATCCTGACCGAGCGTGGC-3', 下游 5' -CCAGGGAGGAAGAGGATGCG-3'; RANKL, 上游 5' -TTGCAGGACTCGACTCTGGAGA-3', 下游 5' -CTGGCAGCATTGATGGTGAGGT-3'; OPG, 上游 5' -TCCTGGTGCTCCTGGACATCAT-3', 下游 5' -TCAGGGCAAGGGACACACAATG-3'。 β -actin 作为内参, 根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行半定量计算。使用 SYBR® Green Realtime PCR

Master Mix (Toyobo Co.Ltd., 日本) 进行 QRT-PCR。

四、统计学处理

采用 SPSS 20.0 (SPSS 公司, 美国) 统计软件包进行统计学分析, TRAP 计数以及 OPG、RANKL、RANK、NFATc-1 和 NFATc-2 的相对表达量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用完全随机设计的方差分析, 两两比较用 Dunnett- t 检验, 检验水准 α 值取双侧 0.05。

结 果

一、成骨细胞与破骨细胞鉴定

ALP 染色发现成骨细胞染色后呈棕红色阳性结构, 对 Transwell 下室破骨进行 TRAP 染色后发现有酒红色的结构, 中间为多个核的破骨细胞, 骨吸收陷窝鉴定发现诱导的破骨细胞具有在骨磨片上形成典型的骨吸收陷窝, 说明诱导的破骨细胞具有骨吸收活性, 见图 1 ~ 3。图 1 为成骨细胞 ALP 染色后形成棕红样结构, 图 2 为 TRAP 染色后形成的酒红色样结构, 图 3 为骨磨片上形成的骨吸收陷窝。

二、柚皮苷对 TRAP 的影响

共培养 7 d 后, 各柚皮苷组形成 TRAP (+) 细胞数均少于对照组, 随机分析 10 个视野的 TRAP (+) 细胞数, 对照组为 (20.56 ± 7.69) 个, 2 ng/ml 柚皮苷组为 (11.00 ± 2.91) 个, 20 ng/ml 柚皮苷组为 (5.82 ± 3.37) 个, 200 ng/ml 柚皮苷组为 (8.33 ± 5.54) 个, 差异有统计学意义 ($F=48.697$, $P < 0.001$), 见图 4 ~ 7。

三、柚皮苷对成骨细胞 OPG、RANK、RANKL 基因表达的影响

共培养 7 d 后, 20 ng/ml 柚皮苷可以提高成

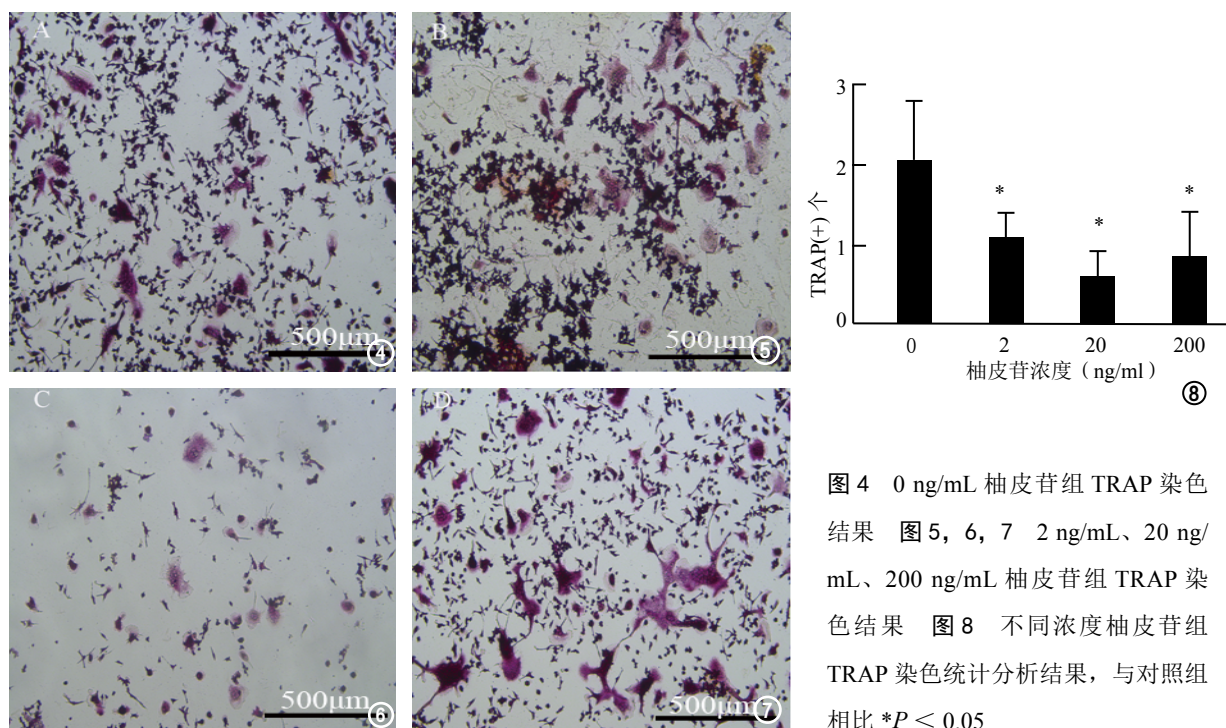


图 4 0 ng/mL 柚皮苷组 TRAP 染色结果 图 5, 6, 7 2 ng/mL、20 ng/mL、200 ng/mL 柚皮苷组 TRAP 染色结果 图 8 不同浓度柚皮苷组 TRAP 染色统计分析结果, 与对照组相比 * $P < 0.05$

骨细胞 OPG、RANKL 的表达量, 对照组和 20 ng/ml 柚皮苷组 OPG 表达量为 (1.02 ± 0.21) 和 (3.25 ± 0.37) , 差异有统计学意义 ($t = -11.721$, $P < 0.001$); 对照组和 20 ng/ml 柚皮苷组 RANKL 表达量为 (1.02 ± 0.21) 和 (2.04 ± 0.49) , 差异有统计学意义 ($t = -4.278$, $P = 0.003$)。对照组和 20 ng/ml 柚皮苷组 RANK 表达量为 (1.02 ± 0.21) 和 (2.55 ± 0.47) , 差异有统计学意义 ($t = -6.646$, $P < 0.001$)。见图 8。

四、柚皮苷对破骨细胞 NFATc-1、NFATc-2、OPG/RANKL 的影响

对照组和 20 ng/ml 柚皮苷组 NFATc-1 表达量为 (1.02 ± 0.21) 和 (0.54 ± 0.19) , 差异有统计学意义 ($t = 3.790$, $P = 0.005$)。对照组和 20 ng/ml 柚皮苷组 NFATc-2 表达量为 (1.02 ± 0.21) 和 (0.34 ± 0.24) , 差异有统计学意义 ($t = 4.767$, $P = 0.001$)。柚皮苷可以提高 OPG/RANKL 的比值, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 以 20 ng/ml 柚皮苷效果最为明显, 见图 9。

讨 论

OP 由于骨量减少或 / 和骨组织微结构破坏极易发生骨折, 而且 OP 骨折患者的愈合时间明显延长, 这使得患者致残率、死亡率较普通骨折明显升

高^[10-11]。骨重建的失衡在 OP 发生过程中发挥了重要的作用, 而骨重建过程主要由骨细胞、成骨细胞和破骨细胞介导^[12]。去势及废用性骨质疏松均由成骨细胞和破骨细胞功能失调引起, 成骨细胞是骨发生和骨形成的物质基础, 主要担当骨基质的合成、分泌以及矿化, 在骨不断的更新活动中是最重要的功能细胞, 破骨细胞直接参与骨吸收, 是骨吸收的主要功能细胞。而单独培养的成骨细胞或破骨细胞, 与共培养条件相比, 两种细胞在功能上表达明显不同, 共培养条件下成骨细胞和破骨细胞表现为相互促进的作用^[13]。

柚皮苷单体是从中药骨碎补中提取的有效成分, 有研究表明柚皮苷可以抑制破骨细胞分化和成骨细胞增殖^[8-9, 14-15]。从动物水平, 柚皮苷可以有效改善切除卵巢引起的骨质疏松大鼠的骨量和增加视黄酸诱导的大鼠骨质疏松模型骨密度^[9, 16]。现代的研究已经证实骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)、核因子 κB 受体活化因子配体 (receptor activator for nuclear factor- κB ligand, RANKL) 均通过旁分泌调节破骨细胞分化, 本实验发现共培养条件下柚皮苷可以促进成骨细胞骨保护素和 RANKL 的表达量, 提高 OPG/RANKL 的比值。OPG/RANKL/RANK 系统调控成骨细胞与破骨细胞之间的平衡, 成骨细胞与骨髓基质细胞表达 OPG

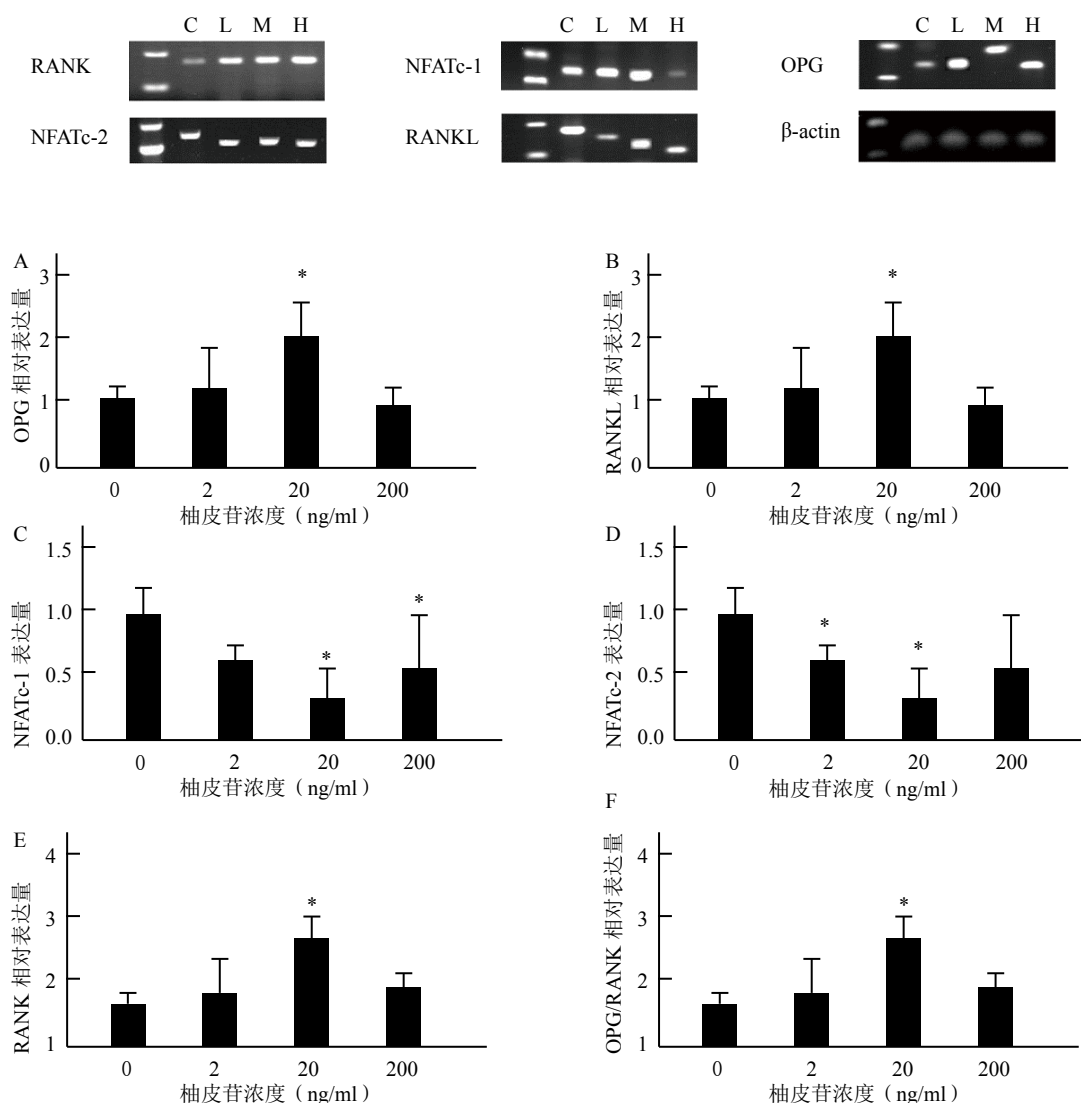


图9 共培养7 d 后成骨细胞和破骨细胞 OPG、RANKL、RANK、NFATc-1、NFATc-2 以及 OPG/RANKL 比值定量 PCR 结果, C、L、M、H 分别为 (0 ng/mL、2 ng/mL、20 ng/mL、200 ng/mL) 柚皮苷, 与对照组比较 * $P < 0.05$

与 RANKL, 破骨细胞表面表达 RANK, RANKL 与受体 RANK 结合后通过与肿瘤坏死因子受体相关蛋白 TRAF6 结合促进 NF- κ B 进入细胞核, 进而增加 c-fos 以及 NFATc-1 的表达促进破骨细胞特异性基因启动^[17-18], NFATc-2 同样作用于 NFATc-1 的启动子启动破骨细胞特异性基因。而 OPG 分子作为一种诱饵受体, 通过与 RANKL 结合, 或者结合其他 TNF 配体家族成员, 如 TNF 相关凋亡诱导配体 (TRAIL), 阻断 RANKL 与 RANK 结合, 从而阻止破骨细胞的形成和成熟过程^[19-20]。故柚皮苷可以通过 OPG/RANKL、RANK 系统发挥对破骨细胞的调节作用。Hofbauer 等^[21]发现柚皮苷与 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 诱导成骨细胞分泌 OPG 具有

协同作用, 这进一步证实了柚皮苷可以调节 OPG/RANKL/RANK 通路。另外本研究发现 20 ng/mL 柚皮苷剂量效果最佳, Wang 等^[22]通过 UMR-106 成骨样细胞株发现柚皮苷可能通过 Akt 和 AMPK 信号通路促进骨形成。柚皮苷可以抑制破骨细胞骨吸收水平, 表现为 TRAP 细胞形成数量减少, 同时柚皮苷可以抑制破骨细胞分化的重要促进基因人活化 T-细胞核因子 1 (NFATc-1) 和人活化 T-细胞核因子 2 (NFATc-2) 的表达。同时破骨细胞分化还有另外一条重要的通路, 是 RANKL 激活 Jnk 信号通路, 同样使 C-fos 和 C-Jun 结合启动 NFATc-1 启动子^[23]。

本研究采用 100 $\mu\text{g/L}$ 的 RANKL 诱导剂可以成功诱导出有骨吸收活性的 OC, 和以前使用 M-CSF

因子相比,减少了经济成本。另外从共培养体系下研究柚皮苷对成骨细胞和破骨细胞活性的影响,进一步阐释柚皮苷的作用机理,为柚皮苷的临床应用提供基础依据。

本研究存在以下不足:(1)仅从基因转录水平进行研究,而未从蛋白水平对柚皮苷的作用机制进一步深入研究;(2)未加入抗体中和剂观察柚皮苷是否通过 RANK 受体对破骨细胞分化进行调节;(3)柚皮苷对成骨细胞和破骨细胞作用机制是否激活其他通路。以上这些将是下一步研究的重点。

参 考 文 献

- Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi M, et al. Osteoprotection by semaphorin 3A [J]. *Nature*, 2012, 485(7396): 69-74.
- Rong W, Wang J, Liu X, et al. Naringin treatment improves functional recovery by increasing BDNF and VEGF expression, inhibiting neuronal apoptosis after spinal cord injury [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(8): 1615-1623.
- Jain M, Parmar HS. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation [J]. *Inflamm Res*, 2011, 60(5): 483-491.
- 徐展望,李念虎.柚皮苷对体外培养骨髓间充质干细胞 Runx-2 和 Osterix 表达及骨质疏松模型大鼠骨强度的影响 [J]. *中医正骨*, 2013, 25(12): 7-10.
- 孙晓雷,马信龙,张晨,等.柚皮苷环境下微应变对成骨细胞增殖与分化的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(11): 3599-3601.
- Wong RW, Rabie AB. Effect of naringin collagen graft on bone formation [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 1824-1831.
- 马信龙,孙晓雷,杜育任,等.微应变环境下柚皮苷对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. *中草药*, 2013, 44(22): 3200-3205.
- 李风波,孙晓雷,马剑雄,等.柚皮苷对破骨细胞分化的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(2): 308-312.
- Li F, Sun X, Ma J, et al. Naringin prevents ovariectomy-induced osteoporosis and promotes osteoclasts apoptosis through the mitochondria-mediated apoptosis pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(3): 629-635.
- 邱贵兴.老年骨质疏松性骨折的治疗策略 [J/CD]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2015, 1(1): 1-5.
- Taguchi A, Ohtsuka M, Tsuda M, et al. Risk of vertebral osteoporosis in post-menopausal women with alterations of the mandible [J]. *Dentomaxillofac Radiol*, 2007, 36(3): 143-148.
- Li J, Wan Z, Liu H, et al. Osteoblasts subjected to mechanical strain inhibit osteoclastic differentiation and bone resorption in a co-culture system [J]. *Ann Biomed Eng*, 2013, 41(10): 2056-2066.
- 杨德鸿,金大地,陈建庭,等.共育体系中成骨细胞和破骨细胞生物学特性观察 [J]. *中华骨科杂志*, 2001, 21(11): 32-36.
- Wu JB, Fong YC, Tsai HY, et al. Naringin-induced bone morphogenetic protein-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun and AP-1 pathway in osteoblasts [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 588(2/3): 333-341.
- 翟远坤,牛银波,潘亚磊,等.柚皮苷对体外培养鼠颌骨成骨细胞增殖和分化成熟的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(1): 105-111.
- Wei M, Yang Z, Li P, et al. Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model [J]. *Am J Chin Med*, 2007, 35(4): 663-667.
- Zhao Q, Wang X, Liu Y, et al. NFATc1: functions in osteoclasts [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(5): 576-579.
- Wong BR, Besser D, Kim N, et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src [J]. *Mol Cell*, 1999, 4(6): 1041-1049.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 337-342.
- Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(12): 5050-5055.
- Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2004, 4(3): 268-275.
- Wang D, Ma W, Wang F, et al. Stimulation of Wnt/ β -Catenin signaling to improve bone development by naringin via interacting with AMPK and Akt [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4): 1563-1576.
- 游涛.柚皮苷在 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 诱导成骨细胞分泌骨保护素和抑制破骨细胞形成过程中的协同作用 [D]. 重庆:重庆医科大学, 2013.

(收稿日期: 2015-8-11)

(本文编辑: 吕红芝)

赵志虎,李风波,马信龙,等.柚皮苷对共培养体系中成骨细胞活性及破骨细胞分化的影响 [J/CD]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2015, 1(2): 13-18.