

老鹳草素对破骨细胞体外骨吸收功能的影响

张小超¹, 何波¹, 陈鹏¹, 陆义芹¹, 董泽军², 刘吉开², 沈志强¹

(1) 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500; 2) 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南昆明 650204)

[摘要] 目的 观察老鹳草素 (geraniin, Ge) 对体外培养破骨细胞 (OC) 的形成及其骨吸收功能的影响。方法 由 1 日龄 SD 大鼠四肢长骨分离 OC, 和象牙骨片共同培养, 或直接接种于培养板中, 分别采用抗酒石酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 和甲苯胺蓝染色技术观察不同浓度的 Ge 对体外培养 OC 形成及 OC 骨吸收功能的影响。结果 Ge 呈浓度依赖性减少体外培养的 TRAP 染色阳性多核细胞即成熟破骨细胞 (mature osteoclast, mOC) 数目; 与空白对照组比较, Ge 各浓度组均使 OC 骨吸收陷窝个数和面积减少、灰度变浅。结论 Ge 减少体外培养 OC 的形成并抑制体外培养 OC 的骨吸收功能。

[关键词] 老鹳草素; 骨质疏松; 破骨细胞; 骨吸收

[中图分类号] R973 [文献标识码] A [文章编号] 1003 - 4706 (2012) 08 - 0001 - 05

Effects of Geraniin on Osteoclastic Bone-resorption Activity

ZHANG Xiao - chao¹, HE Bo¹, CHEN Peng¹, LU Yi - qin¹, DONG Ze - jun², LIU Ji - kai², SHEN Zhi - qiang¹

(1) School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650204, China)

[Abstract] Objective To evaluate the effects of geraniin (Ge) on the generation of osteoclasts (OCs) and its bone-resorption activity in vitro. Methods OCs isolated mechanically from long bones of SD rats aged one-day were plated in 48-well plates directly or on ivory bone slices in 24-well plates for culture together with different concentrations of Ge. TRAP staining and toluidine blue staining were used to evaluate the generation of OC and bone resorption on ivory slices. Results Ge decreased the total numbers of multinucleated TRAP-positive osteoclasts in cultures. Ge decreased the number of resorption pits on slices, total areas of resorption pits on slices as well as the average luminance of pits. Conclusion Ge can inhibit the generation of OCs and the bone-resorption activity of osteoclasts in vitro.

[Key words] Geraniin; Osteoporosis; Osteoclasts; Bone resorption

破骨细胞 (osteoclast, OC) 的分化或其功能改变所导致的骨改建失衡是骨质疏松的重要病理基础。破骨细胞骨吸收功能活跃是其发生的病理生理之一, 对破骨细胞骨吸收功能的抑制是防治骨质疏松症的主要药理基础。破骨细胞的主要生

理功能是骨组织吸收, 在骨吸收与骨重建中起启动作用^[1]。

老鹳草素 (geraniin, Ge) 化学结构式见图 1。提取分离自滇产叶下珠 (Phyllanthus urinaria) 植物全草中, 纯度 99%, 属多酚类化合物。本课题组

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30660212); 云南省自然科学基金资助项目 (2004C0044M); 云南省社会发展计划基础研究专项基金资助项目 (2008CC009)

[作者简介] 张小超 (1982~), 女, 黑龙江哈尔滨市人, 硕士, 助理实验师, 主要从事药理学研究工作。

[通讯作者] 沈志强. E-mail: shzhq21cn@yahoo.com.cn

前期研究表明 Ge 具有明显的抗维甲酸致大鼠骨质疏松作用^[2]。本研究着重探讨 Ge 对 OC 的形成及其骨吸收功能的影响,从细胞水平评价老鹳草素的抗骨质疏松作用的细胞学机制。

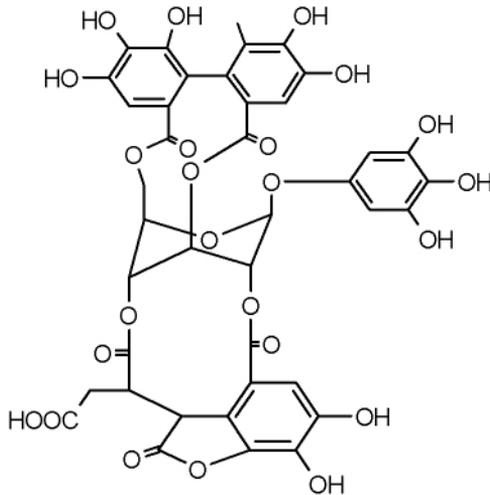


图 1 老鹳草素的化学结构式

Fig. 1 The chemical structure of geraniin

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

Ge 由中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室刘吉开教授提供;乙酰唑胺 (acetazolamide, Az) 由上海信谊制药厂提供; Medium M 199, GIBCO 公司产品;胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 杭州四季青生物制品有限公司产品;象牙骨片, 由上海复旦大学医学院放射医学研究所金慰芳教授馈赠;甲苯胺蓝, Chroma 公司产品, 上海化学试剂公司进口分装, 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 试剂盒, Sigma 公司产品。

1.2 动物

1 日龄 SD 大鼠, 昆明医科大学实验动物中心 (合格证号 SCXK (滇) 2005-008) 提供。

1.3 主要仪器

BH-2 型光学显微镜和 1×71-12 FL/PH 型倒置相差显微镜, 日本 Olympus; 病理多头显微镜, DM4000B 型徕卡高级显微摄影系统, 德国 LEICA; SB3200 型超声波清洗器, Shanghai Branson 公司; HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统, 同济大学千屏影像工程公司。

1.4 方法

1.4.1 OC 的制备与培养

1 日龄 SD 大鼠, 浸泡于 75% 乙醇中 1 min, 脱颈处死后分离四肢长骨, 按文献方法分离培养 OC^[3,4]。培养 3~5 h 后换液, 换以按照分组分别加入了相应浓度药物的完全培养液。设加入含药完全培养液的时间为 0 h。

1.4.2 Ge 对体外培养 OC 生存率的影响 分组: 空白组, Ge 10^{-8} mol/L 组、 10^{-9} mol/L 组、 10^{-10} mol/L 组和 10^{-11} mol/L 组, 乙酰唑胺 10^{-6} mol/L 组; 每组 4 孔。

OC 在 48 孔培养板中常规培养 3 d, 隔天换液。按说明书配制 TRAP 染液, 置于水浴箱中 37°C 预热。2.5% 戊二醛固定 OC 10 min, 去离子水冲洗; 加入预热的 TRAP 染液, 37°C 水浴箱中染色 1 h; 自来水冲洗后, 光学显微镜下观察 TRAP 阳性细胞。

显微镜下胞浆中有紫红色不溶性颗粒反应且胞核阴性的细胞为 TRAP 阳性细胞, 若细胞核数 ≥ 3 个, 则认为是成熟破骨细胞 (mature osteoclast, mOC), TRAP 阳性但细胞核数 < 3 个, 则认为是破骨细胞前体 (pre-osteoclast, pOC)^[5]。

显微镜 200 倍分辨率下计数每孔中所有 TRAP 阳性多核破骨细胞 (即 mOC) 和 pOC。mOC 占该孔所有 TRAP 阳性细胞的百分比为该孔的 OC 融合指数。

1.4.3 Ge 对体外培养 OC 骨吸收功能的影响 分组: 空白对照组, Ge 10^{-7} mol/L 组和 10^{-9} mol/L 组, Az 10^{-6} mol/L 组; 每组 4 孔, 每孔 1 张骨片, 每张骨片直径 1.5 cm, 厚度 $50\ \mu\text{m}$ 。

Ge 各浓度组和 Az 组的含药完全培养液中二甲基亚砜的终浓度低于 0.01%, PBS 缓冲液的终浓度低于 0.1%。空白对照组加入完全培养液。

骨片用超声波清洗器在冰蒸馏水中清洗 3 min, 共 3 次; 骨片每面各用紫外灯照射消毒 4 h; 使用前用无血清培养液浸泡于 24 孔培养板中, 至接种细胞悬液前吸出培养液。

OC 接种于象牙骨片上, 常规条件下与骨片共同培养, 隔天换液。分别在培养至 3 d 和 9 d 时每组固定染色 2 个孔的骨片: 骨片经戊二醛固定、清洗、系列酒精脱水后, 以 1% 甲苯胺蓝染色, 用光学显微镜下观计数 OC 在骨片上形成的吸收陷窝, 图文分析系统计算陷窝面积和每个陷窝的平均灰度。

1.5 统计学处理

用 SPSS 版统计软件处理所得数据。选用单因素方差分析 (One-way ANOVA) LSD 方法统计, 结果均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 Ge 对体外培养 OC 生存率的影响

2.1.1 mOC 计数 TRAP 染色后见 OC 形态各异, 核数不等, 大小不一, 胞浆深染为紫红色, 而胞核阴性. mOC 计数结果表明, Ge 10^{-8} mol/L 和 10^{-9}

mol/L 组及乙酰唑胺组的 mOC 数均比空白对照组少 ($P < 0.01$). Ge 各浓度组的 mOC 个数都高于乙酰唑胺组 ($P < 0.05$), 见表 1.

2.1.2 pOC 计数 与空白组 pOC 计数相比, 在 10^{-8} mol/L 到 10^{-11} mol/L 范围内, 随 Ge 浓度的下降 pOC 有增加的趋势, 但仅 10^{-8} mol/L 组与空白组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$). 乙酰唑胺组的 pOC 数最低 ($P < 0.01$), 见表 2.

表 1 老鹳草素对体外培养成熟破骨细胞形成的影响 (TRAP 染色) [$n = 4 (\bar{x} \pm s)$]

Tab. 1 Effects of geraniin on the formation of mature osteoclasts in vitro [$n = 4 (\bar{x} \pm s)$]

组别	药物浓度 (mol/L)	mOC 数 (个)	抑制率 (%)
空白组	-	21.50 ± 3.51	-
Ge 组	10^{-8}	13.50 ± 2.52** [▲]	37.21
	10^{-9}	15.25 ± 2.75** ^{▲▲}	29.07
	10^{-10}	19.00 ± 1.83 ^{▲▲}	11.63
	10^{-11}	20.00 ± 2.58 ^{▲▲}	6.98
Az 组	10^{-6}	9.25 ± 0.96**	56.98

与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与 Az 组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$.

表 2 老鹳草素对体外培养破骨细胞前体形成影响 (TRAP 染色) [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]

Tab. 2 Effects of geraniin on the formation of pre-osteoclasts in vitro [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]

组别	药物浓度 (mol/L)	pOC 数 (个)
空白组	-	344.75 ± 49.07
Ge 组	10^{-8}	276.00 ± 20.87** ^{△△}
	10^{-9}	308.75 ± 19.92 ^{△△}
	10^{-10}	335.00 ± 30.84 ^{△△}
	10^{-11}	350.00 ± 30.14 ^{△△}
Az 组	10^{-6}	202.00 ± 16.57**

与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与 Az 比较, ^{△△} $P < 0.01$.

2.1.3 融合指数 与空白对照组比较, Ge 10^{-8} mol/L 和 10^{-9} mol/L 组的融合指数降低 ($P < 0.05$), Ge 10^{-10} mol/L 和 10^{-11} mol/L 组的融合指数高于乙酰唑胺组 ($P < 0.05$), 而与空白对照组之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$). Ge 10^{-11} mol/L ~ 10^{-8} mol/L 各组的融合指数虽然有依浓度的上升而下降的趋势, 但各组之间的差异都没有统计学意义. Az 组的融合指数低于空白对照组 ($P < 0.01$), 见表 3.

2.2 Ge 对体外培养 OC 骨吸收作用的影响

2.2.1 骨片陷窝计数 培养 3 d, 骨片上的陷窝形态多样, 边缘清晰, 多为单个圆形或椭圆形等, 有少数陷窝融合呈不规则形, 有时成串出现. 培养 9 d 时, 空白对照组的陷窝比 3 d 时的陷窝多, 且较大, 融合多. 3 d 和 9 d 的加药组陷窝计数明显比

相应时间点空白对照组的陷窝计数少 ($P < 0.05$). Az 组的陷窝比同一时间点 Ge 组的陷窝少 ($P < 0.05$). 虽然 3 d 时, Ge 10^{-7} mol/L 组的陷窝均数比 10^{-9} mol/L 组小, 但该差异没有统计学意义; 而 9 d 时, 10^{-9} mol/L 组的陷窝比 10^{-7} mol/L 组明显增多 ($P < 0.01$). 除空白对照组外, 其它 3 个组的陷窝计数在 3 d 和 9 d 两个时间点之间无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 4.

2.2.2 骨片陷窝面积 与 OC 同骨片共培养 3 d 比较, 共培养 9 d 后, 空白对照组、Ge 组和 Az 组 9 d 时的陷窝面积明显增大, 但药物对陷窝面积的抑制率也增加. 3 d 和 9 d 时间点的 Ge 和 Az 骨片陷窝面积都明显小于同一时间点的空白对照组 ($P < 0.05$). 3 d 时, 3 个加药组之间的陷窝面积无统计学意义. 9 d 时, Ge 10^{-9} mol/L 组的陷窝面积比 10^{-7} mol/L 大, 面积比值较高, 抑制率较低, 见表 5、6.

2.2.3 骨片陷窝平均灰度 空白对照组 3 d 和 9 d 时间点的灰度值相近 ($P > 0.05$). Ge 和 Az 组的陷窝平均灰度均低于同一时间点的空白对照组 ($P < 0.05$). Ge 10^{-9} mol/L 组 9 d 的平均灰度比 3 d 的低. 同一时间点内 3 个加药组之间的陷窝平均灰度无统计学差异 ($P > 0.05$). 与 3 d 比较, 9 d 时 Ge 10^{-7} mol/L 和 Az 10^{-6} mol/L 组的灰度值的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 7.

表 3 老鹳草素对体外培养 OC 融合指数的影响 [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]Tab. 3 Effects of geraniin on fusion index of osteoclasts in vitro [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]

组别	药物浓度 (mol/L)	融合指数 (%)	抑制率 (%)
空白组	-	5.90 ± 0.82	-
Ge 组	10 ⁻⁸	4.63 ± 0.48**	21.53
	10 ⁻⁹	4.68 ± 0.59*	20.68
	10 ⁻¹⁰	5.41 ± 0.89 [▲]	8.31
	10 ⁻¹¹	5.40 ± 0.45 [▲]	8.47
Az 组	10 ⁻⁶	4.37 ± 0.14**	25.93

与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Az 组比较, [▲] $P < 0.05$.

表 4 老鹳草素对 OC 与骨片共同培养 3 d 和 9 d 时骨片陷窝计数的影响 [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]Tab. 4 Effects of geraniin on the number of pits on slices of osteoclasts and bone slices co-cultured for 3 d and 9 d [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]

分组	药物浓度 (mol/L)	3 d		9 d	
		陷窝计数 (个/视野)	抑制率 (%)	陷窝计数 (个/视野)	抑制率 (%)
对照组	-	16.25 ± 3.304	-	23.50 ± 3.317 ^{△△}	-
Ge 组	10 ⁻⁷	9.00 ± 1.633 ** [▲]	44.62	6.25 ± 1.500 ** ^{▲###}	73.40
	10 ⁻⁹	12.00 ± 4.320 ** ^{▲▲}	26.15	12.25 ± 1.708 ** ^{▲▲}	47.87
Az 组	10 ⁻⁶	4.50 ± 1.915**	72.31	1.50 ± 0.577**	93.62

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 3 d 的对照组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与 Az 比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; 与 Ge 10⁻⁹ mol/L 比较, ^{###} $P < 0.01$.

表 5 老鹳草素对 OC 与骨片共同培养 3 d 的骨片陷窝面积的影响 [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]Tab. 5 Effects of geraniin on total areas of pits on slices of osteoclasts and bone slices co-cultured for 3 d [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]

分组	药物浓度 (mol/L)	陷窝面积 (μm^2 /视野)	面积比值 (%)	抑制率 (%)
对照组	-	459.18 ± 62.84	0.49 ± 0.07	-
Ge 组	10 ⁻⁷	293.66 ± 23.77*	0.32 ± 0.03	36.05
	10 ⁻⁹	352.44 ± 24.66*	0.38 ± 0.03	23.24
Az 组	10 ⁻⁶	345.95 ± 39.88**	0.37 ± 0.04	24.66

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 6 老鹳草素对 OC 与骨片共同培养 9 d 的骨片陷窝面积的影响 [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]Tab. 6 Effects of geraniin on total areas of pits on slices of osteoclasts and bone slices co-cultured for 9 d [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]

分组	药物浓度 (mol/L)	陷窝面积 (μm^2 /视野)	面积比值 (%)	抑制率 (%)
对照组	-	1165.90 ± 123.03	1.25 ± 0.13	-
Ge 组	10 ⁻⁷	570.41 ± 32.62** ^{△△}	0.61 ± 0.04	51.08
	10 ⁻⁹	836.42 ± 19.86** ^{△△▲▲}	0.90 ± 0.02	28.26
Az 组	10 ⁻⁶	195.57 ± 52.01**	0.21 ± 0.06	83.23

与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 Az 组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与 Ge 10⁻⁷ mol/L 比较, ^{▲▲} $P < 0.01$.

表 7 老鹳草素对 OC 与骨片共同培养 3 d 和 9 d 的骨片陷窝平均辉度的影响 [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]Tab. 7 Effects of geraniin on average luminance of pits of osteoclasts and bone slices co-cultured for 3 d and 9 d [$n = 4, (\bar{x} \pm s)$]

分 组	药物浓度 (mol/L)	3 d			9 d		
		<i>n</i>	陷窝灰度	抑制率 (%)	<i>n</i>	陷窝灰度	抑制率 (%)
对照组	-	16	145.69 ± 37.40	-	11	141.91 ± 34.61	-
Ge 组	10 ⁻⁷	11	120.91 ± 28.19*	16.98	10	100.00 ± 23.88**	29.53
	10 ⁻⁹	9	113.78 ± 30.28*	21.90	10	85.20 ± 29.50** [△]	39.96
Az 组	10 ⁻⁶	7	95.29 ± 21.17**	34.60	5	86.60 ± 24.98**	38.98

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 3 d 的 Ge 10⁻⁹ mol/L 组比较, [△] $P < 0.05$.

3 讨论

经体外破骨细胞分离培养, 细胞体积大, 有多个核, 且有伪足样运动. 同时破骨细胞胞浆内含有丰富的 TRAP, 它是酸性磷酸酶的同功酶, 而且更具有特异性. 本研究从新生大鼠乳鼠长骨中分离的破骨细胞具有多核、伪足样运动、TRAP 强阳性等特点, 符合破骨细胞的鉴定标准, 因此本方法分离培养破骨细胞是可行的. 如在玻片上培养 OC, 一般于 24 h 细胞开始凋亡, 说明破骨细胞在玻片上培养一般只能存活 24 h 左右^[6].

TRAP 特异性分布于 OC 的胞浆中, 通常作为鉴别 OC 的重要标志. TRAP 的表达与破骨细胞的功能密切相关, 是破骨细胞重要的酶组织化学识别标志. 通常用偶氮偶联组化分析技术, 在含酒石酸钾钠的酸性条件下, TRAP 将奈酚 AS-BI 磷酸盐水解产生奈酚 AS-BI, 后者即与染液中六偶氮副品红结合, 在酶活性部位形成不溶性红色沉淀. TRAP 染色阳性的多核细胞计数是以破骨细胞特征性酶组织化学反应为基础的检测方法, 用于研究处理因素对破骨细胞的短期作用时, 方法简便、灵敏度高^[7].

本研究发现, 10⁻⁸ mol/L 和 10⁻⁹ mol/L 的 Ge 可降低体外培养 TRAP 阳性 mOC 的存活率, 显示出明显的抑制作用. 并且与乙酰唑胺相似, Ge 同时也表现出阻止 pOC 融合分化的作用. 说明浓度 10⁻⁸ mol/L 和 10⁻⁹ mol/L 的 Ge 影响体外培养 OC 的生存率. 但 Ge 只在 10⁻⁸ mol/L 浓度时才减少 pOC 数目, 说明 Ge 首先抑制 pOC 融合为多核 OC, 较高浓度时才影响 pOC 的存活. 从而进一步抑制 mOC 的生成.

本实验中空白对照组的 OC 可以在象牙骨片上形成典型的陷窝. 所有加药组 3 d 和 9 d 的陷窝计数、陷窝面积和陷窝平均灰度都低于同一时间点的空白对照组, 说明 10⁻⁷ mol/L 与 10⁻⁹ mol/L 的 Ge 和 Az 10⁻⁶ mol/L 一样可抑制体外培养 OC 的骨吸收

功能, 减少陷窝的数目、面积和灰度. 在 3 d 时, Ge 10⁻⁷ mol/L 和 10⁻⁹ mol/L 的陷窝计数、面积和平均灰度无明显浓度差异, 但到 9 d 时 10⁻⁷ mol/L 组的陷窝个数和面积均小于 10⁻⁹ mol/L 组. Ge 同一浓度组 2 个时间点间的陷窝个数和灰度无明显差异, 但陷窝面积则是 9 d 的大于 3 d 的, 此时 9 d 组的抑制率也高于 3 d 组. 提示 Ge 抑制 OC 性骨吸收与 Ge 浓度和作用时间都有关, Ge 浓度高、作用时间长, 则形成的陷窝少、面积小.

本研究结果提示, Ge 抑制体外培养 OC 的骨吸收功能, 可能与其减少 OC 的形成密切相关.

[参考文献]

- [1] MATSUO K, IRIE N. Osteoclast-osteoblast communication [J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473 (2): 201 - 209.
- [2] 吴鹰, 何波, 刘淑娟, 等. 老鹳草素对实验性骨质疏松症及破骨细胞生成的影响 [J]. 昆明医学院学报, 2006, 27(6): 9 - 15.
- [3] PATRICK G, OLIVIER B, INGER B, et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases [J]. J Biol Chem, 1998, 273(48): 32 347 - 32 352.
- [4] JEROME C, MISSBACH M, GAMSE R. Balicatib, a cathepsin K inhibitor, stimulates periosteal bone formation in monkeys [J]. Osteoporos Int, 2012, 23: 339 - 349.
- [5] TAKESHITA S, KAJI K, KUDO A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts [J]. J Bone Miner Res, 2000, 15 (8): 1 477 - 1 488.
- [6] CHAMBER T J, REVELL P A, FULLER K, et al. Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts [J]. J Cell Sci, 1984, 66: 3 832 - 3 861.
- [7] 谭新, 黄海, 刘泽. 补肾壮骨冲剂治疗老年男性骨质疏松症骨转换指标的对比分析 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(7): 17 - 20.

(2012 - 05 - 02 收稿)