

· 实验研究论著 ·

淫羊藿苷通过促进负调控因子 $G\alpha 13$ 的表达抑制破骨细胞形成

李志伟 任然悦 李孟伟 刘起昆 于小钧 蒋咏桥 鲍远 康皓

【摘要】 目的 研究淫羊藿苷对破骨细胞分化和鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基 $\alpha 13$ ($G\alpha 13$) 介导的信号通路的影响,探讨淫羊藿苷治疗骨质疏松的可能机制。**方法** 从 C57/BL6 小鼠四肢骨髓中提取原代单核巨噬细胞 (bone marrow derived macrophages, BMMs), 使用核因子 κB 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κB ligand, RANKL) 和巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 将 BMMs 诱导成破骨细胞。同时使用不同浓度 (0、1、10 $\mu\text{mol/L}$) 的淫羊藿苷进行干预,采用抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 和鬼笔环肽染色、qPCR 和 Western blot 等实验分析淫羊藿苷对破骨细胞形成及其对 $G\alpha 13$ 基因和 Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路相关基因表达的影响。**结果** TRAP 染色和鬼笔环肽染色结果显示淫羊藿苷可显著抑制破骨细胞形成 ($P < 0.05$)。淫羊藿苷显著促进 $G\alpha 13$ 基因及蛋白表达 ($P < 0.05$), 显著抑制 Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路相关基因及蛋白的表达 ($P < 0.05$)。**结论** 淫羊藿苷可能是通过促进负调控因子 $G\alpha 13$ 的表达,从而抑制其下游 Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路来抑制破骨细胞形成。

【关键词】 淫羊藿苷;破骨细胞;骨质疏松;鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基 $\alpha 13$

Icariin Inhibits Osteoclast Formation by Promoting the Expression of Negative Regulator $G\alpha 13$. LI Zhi-wei, REN Ran-yue, LI Meng-wei, LIU Qi-kun, YU Xiao-jun, JIANG Yong-qiao, BAO Yuan, KANG Hao. Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: KANG Hao, E-mail: kanghao100@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of icariin on osteoclastogenesis and to elucidate the mechanism of guanine nucleotide-binding protein subunit $\alpha 13$ ($G\alpha 13$) underlying this effect, and the possible mechanism of icariin in the treatment of osteoporosis. **Methods** Bone marrow derived macrophages (BMMs) were extracted from the bone marrow of the femurs and tibias of C57/BL6 mice, and the BMMs were induced into osteoclasts by receptor activator of nuclear kappa B ligand (RANKL) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). At the same time, BMMs were treated with different icariin concentrations (0, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$). TRAP and F-actin ring staining, qPCR and Western blotting were performed in this study. **Results** TRAP staining and Actin ring formation assays showed that icariin inhibited RANKL-induced osteoclast formation ($P < 0.05$). Icariin could significantly promote the expression of $G\alpha 13$ gene and its related proteins ($P < 0.05$), and significantly inhibit the expression of Akt, NFATc1 related genes and proteins. **Conclusion** Icariin significantly up-regulates the expression of negative regulator $G\alpha 13$ and activates $G\alpha 13$ to inhibit osteoclast formation through the Akt-GSK3 β -NFATC1 signaling pathway.

【Key words】 Icariin; Osteoclastogenesis; Osteoporosis; $G\alpha 13$

异三聚体 G 蛋白是一种重要的细胞信号转导器,主要传递来自 G 蛋白偶联受体的信号,使胞外信号穿膜转换为胞内信号,其有三个亚基: α 、 β 和 γ ^[1]。其中,鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基 $\alpha 13$ ($G\alpha 13$)

属于 G 蛋白超家族的 G12 亚家族,广泛表达于哺乳动物多种细胞中^[2]。已有研究报道, $G\alpha 13$ 是一种破骨细胞形成的负调控因子,其通过抑制 Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路,抑制破骨细胞形成^[3]。

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以骨量低,骨组织微结构损坏,导致骨脆性增加,易发生骨折为特征的全身性骨病^[4]。我国 60 岁以上人口已超过 2.1 亿 (约占总人口的 15.5%), 65 岁以上人口近 1.4 亿

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2022.02.012

作者单位:华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科,武汉 430030

通信作者:康皓, E-mail: kanghao100@vip.sina.com

(约占总人口的10.1%)^[5]。而且骨质疏松症及骨折的医疗和护理,需要投入大量的人力、物力和财力,因此骨质疏松症给家庭和社会造成了沉重的经济负担。

中药淫羊藿常用于治疗骨质疏松症,其主要成分淫羊藿苷可通过抑制破骨细胞的形成来抑制骨质疏松症^[6-7]。淫羊藿苷调节破骨细胞形成的正调节信号通路已有报道^[8-10],但通过调节负调节通路与负调控因子来抑制破骨细胞生成的研究较少。因此,本研究利用核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)体外诱导小鼠骨髓单核细胞(bone marrow derived macrophages, BMMs)分化成破骨细胞的模型,探讨 $G\alpha 13$ 及Akt-GSK3 β -NFATc1信号通路是否参与淫羊藿苷对破骨细胞的调控,从而研究淫羊藿苷对破骨细胞分化调节的作用机制,为临床治疗骨质疏松症提供新的思路 and 依据。

材料与方法

一、实验材料与仪器

淫羊藿苷(美国MCE公司),M-CSF(美国Pepro-Tech公司),RANKL(美国R&D公司),抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(美国Sigma公司),鬼笔环肽、DAPI染色液、SYBR qPCR Mix(上海翊圣公司),总RNA提取试剂盒(美国Omega Bio-Tek公司),PCR引物由武汉擎科生物公司合成,C57/BL6小鼠购于鼠来宝(武汉)生物科技有限公司。恒温CO₂细胞培养箱(香港Heal Force公司),光学、荧光显微镜(日本Nikon公司),凝胶电泳仪、凝胶成像分析系统、实时定量PCR仪(美国Bio-BAD公司)。

二、骨髓单核细胞的分离提取

用含有M-CSF(30 ng/mL)的 α -MEM培养基冲出C57/BL6小鼠(6到8周龄)胫骨和股骨髓腔中的骨髓单核细胞(BMMs),在培养基中培养。24 h后收集瓶底未黏附的细胞继续培养,作为纯化的BMMs使用^[11]。

三、TRAP染色鉴别破骨细胞

BMMs细胞接种于96孔板(2×10^4 个/孔),24 h后加入100 ng/mL的RANKL,诱导其向破骨细胞分化,同时加入不同浓度(0、1、10 μ mol/L)的淫羊藿苷,设一不加RANKL空白对照组,每组设3复孔。总共诱导干预5~7 d^[12]。应用TRAP染色试剂盒对诱导至终点的细胞进行染色,计算各组破骨细胞数目(破骨细胞为具有三个或更多细胞核融合而成的TRAP阳

性细胞,光学显微镜下每组随机选取5个视野)。

四、鬼笔环肽染色检测细胞骨架F-actin环形成分析

BMMs细胞接种于96孔板(2×10^4 个/孔),分组及RANKL诱导和淫羊藿苷干预同上。加入免疫染色固定液,室温固定10 min,用免疫染色洗涤液洗涤3次后,用鬼笔环肽室温避光染色30 min,加入DAPI染色液复染30 s,荧光显微镜下观察,拍照^[13]。

五、破骨细胞相关标志物基因表达水平的分析

BMMs细胞接种于6孔板(50×10^4 个/孔),实验分组同上,RANKL诱导和淫羊藿苷干预3~5 d后,提取RNA,逆转录,并行实时定量PCR检测Rank、Cathepsin K、NFATc1、 $G\alpha 13$ (表1)。

六、破骨细胞相关标志蛋白表达水平的分析

BMMs细胞接种于6孔板(50×10^4 个/孔),实验分组同上,RANKL诱导和淫羊藿苷干预5 d后,裂解细胞,提取全蛋白,各组蛋白等量上样后经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,275 mA恒流转膜90 min,5%脱脂牛奶室温封闭90 min,4 $^{\circ}$ C孵育一抗,过夜,室温孵育二抗1 h,TBST漂洗条带后在曝光机上显影。检测 $G\alpha 13$ 蛋白、破骨细胞特异标志蛋白TRAF6及相关信号通路蛋白AKT、NFATc1的表达。GADPH作内参。

七、统计学分析

应用SPSS 22.0(IBM公司,美国)统计分析实验数据。计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本比较采用单因素方差分析检验,两样本比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、淫羊藿苷抑制破骨细胞的生成

TRAP染色结果显示,与未加淫羊藿苷干预的

表1 qPCR的引物序列

引物名称	引物序列	碱基数
GADPH 正义链	5'-CTCCCACTCTTCCACCTTCG-3'	20
GADPH 反义链	5'-TTGCTGTAGCCGTATTCATT-3'	22
RANK 正义链	5'-CAGGAGAGGCATTATGAGCA-3'	20
RANK 反义链	5'-GGTACTTTCCTGGTTCGCAT-3'	20
Cathepsin K 正义链	5'-TGTATAACGCCACGGCAAA-3'	19
Cathepsin K 反义链	5'-GGTTCACATTATCACGGTCACA-3'	22
NFATc1 正义链	5'-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3'	21
NFATc1 反义链	5'-GGGAAGTCAGAACTGGGTGGA-3'	21
$G\alpha 13$ 正义链	5'-TGCTGGTAGATGCCCGAGA-3'	19
$G\alpha 13$ 反义链	5'-GATCGTAGGCATTCTGTATACCA-3'	22

0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,给予不同浓度的淫羊藿苷干预后,破骨细胞数目明显减少,且呈浓度依赖性,差异具有统计学意义(图1, $P < 0.05$)。

鬼笔环肽和DAPI染色同样显示,与未加淫羊藿苷干预的0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,淫羊藿苷干预组显著抑制F-actin环形成,且呈浓度依赖性,差异具有统计学意义(图2, $P < 0.05$)。上述结果表明淫羊藿苷可

显著抑制破骨细胞形成。

二、淫羊藿苷促进G α 13基因的表达,抑制相关通路基因的表达

实时定量PCR检测结果表明,与未加淫羊藿苷干预的0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,淫羊藿苷干预的各组中G α 13基因的表达上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与未加淫羊藿苷干预的0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,淫

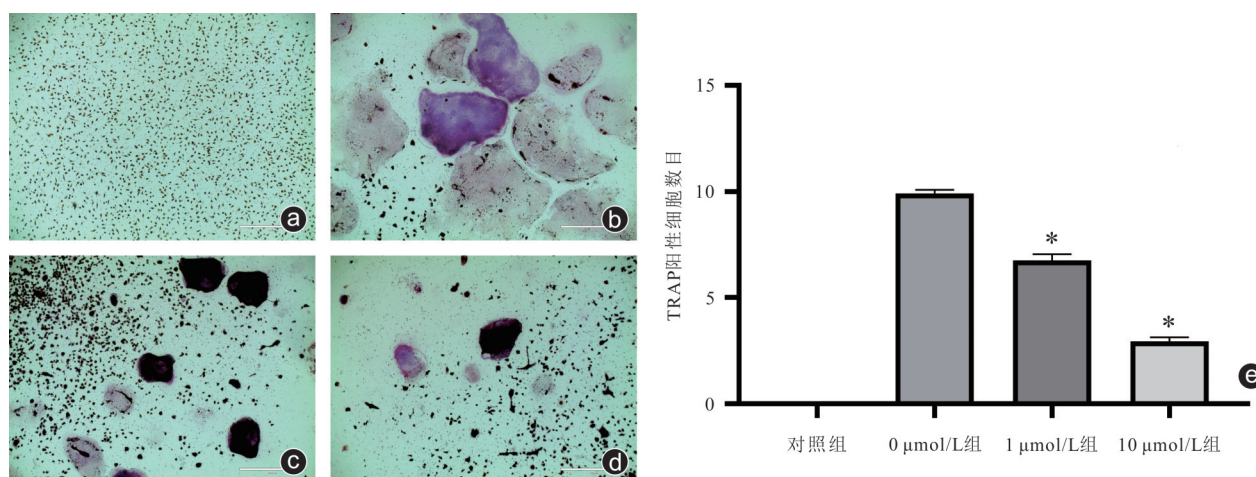


图1 淫羊藿苷干预后TRAP染色结果 a:对照组;b:0 $\mu\text{mol/L}$ 组;c:1 $\mu\text{mol/L}$ 组;d:10 $\mu\text{mol/L}$ 组;e:TRAP阳性细胞数目统计图(与未加淫羊藿苷干预的0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$)

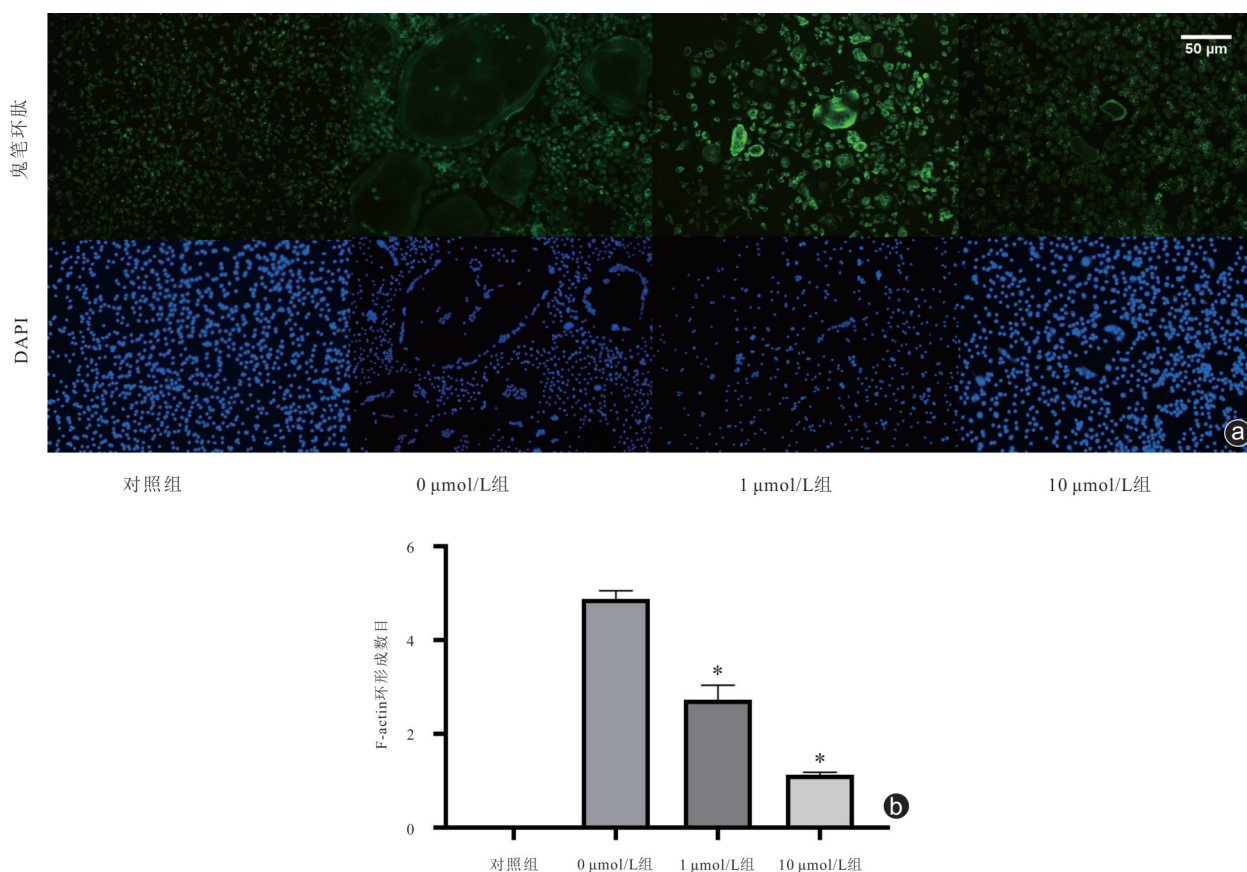


图2 淫羊藿苷显著抑制破骨细胞F-actin环数目 a:鬼笔环肽和DAPI染色结果;b:破骨细胞F-actin环形成数目(与未加淫羊藿苷干预的0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$)

淫羊藿苷干预组中有 Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路的 NFATc1 基因和破骨细胞特异性基因 Rank、Cathepsin K 的表达显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$,图3)。

三、淫羊藿苷促进 G α 13 蛋白的表达,抑制 Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路相关蛋白的表达

Western Blot 检测相关蛋白表达情况显示,与未加淫羊藿苷干预的 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,淫羊藿苷干预组的 G α 13 蛋白表达量显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。淫羊藿苷抑制 Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路相关蛋白 Akt、NFATc1 及破骨细胞特异标志蛋白 TRAF6 的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4)。

讨 论

原发性骨质疏松症是一种以骨质量、骨强度和骨微结构系统性损坏为特征的代谢性疾病,给社会经济和公共卫生造成了严重威胁^[14]。一些研究表明,骨质疏松症是由过度异常的破骨细胞活动引起的病理性骨吸收^[15-17]。骨吸收增加表明破骨细胞在骨质疏松的发生、发展中起着关键作用,因此,抑制破骨细胞的异常形成和激活可能是治疗骨质疏松症有效的策略之一^[18]。

中药淫羊藿常用于治疗骨质疏松症,淫羊藿苷是淫羊藿中含量最丰富的类黄酮成分,对骨质疏松症、骨折愈合和关节疾病均有疗效^[19]。研究报道,淫

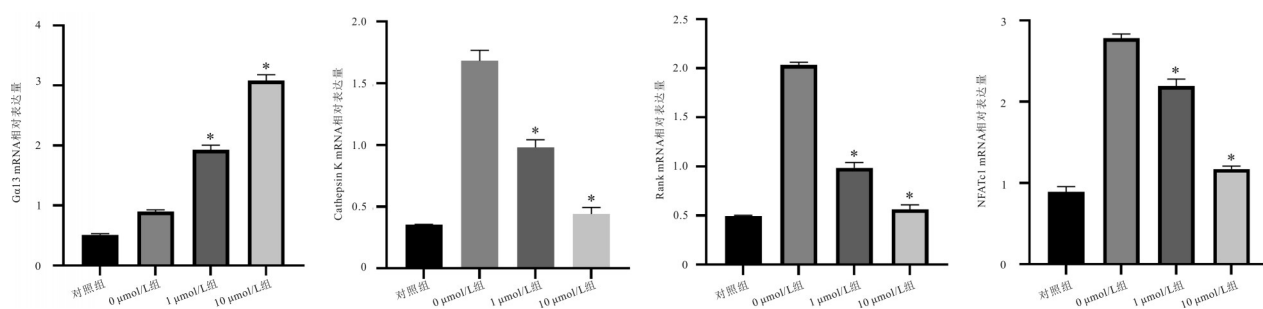


图3 淫羊藿苷促进 G α 13 基因的表达,抑制其下游 Akt-GSK3 β -NFATc1 相关通路基因的表达(与未加淫羊藿苷干预的 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, * $P < 0.05$)

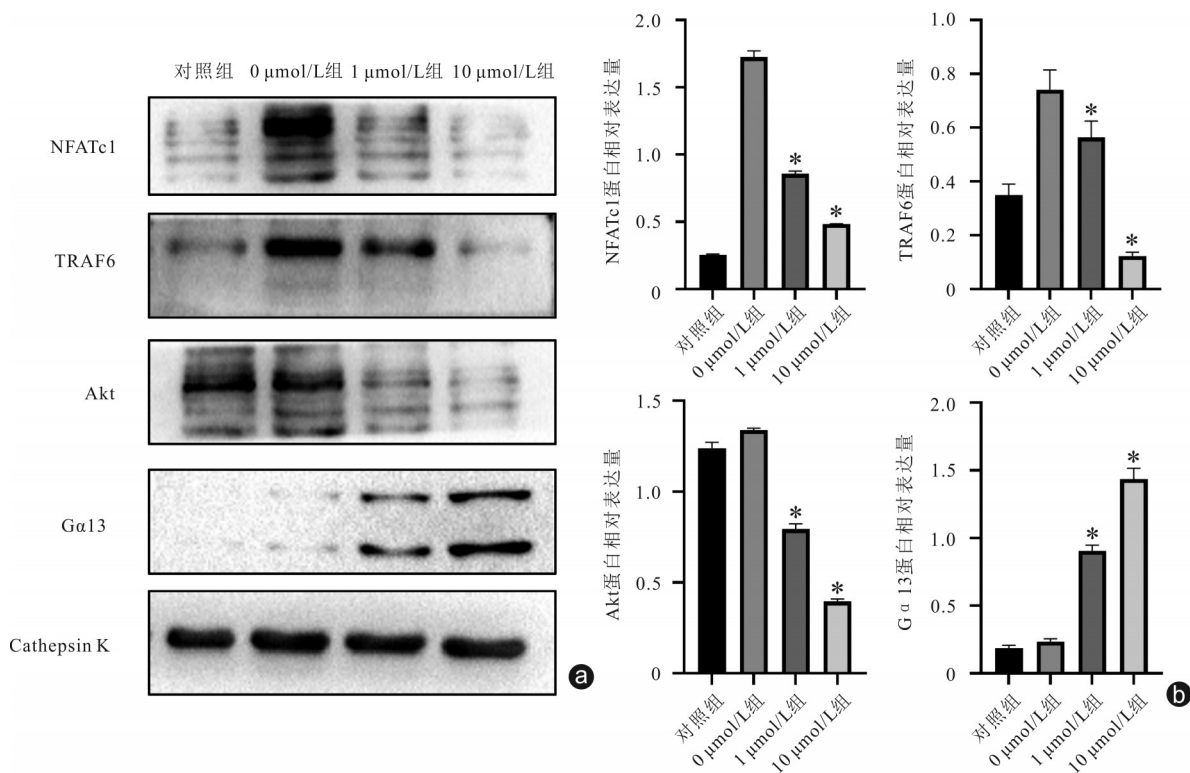


图4 淫羊藿苷促进 G α 13 蛋白的表达,抑制 Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路相关蛋白的表达 a:淫羊藿苷干预后各蛋白条带;b:淫羊藿苷干预后各蛋白相对表达量(与未加淫羊藿苷干预的 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, * $P < 0.05$)

羊藿苷有多种生物活性,包括促进成骨细胞增殖、抑制破骨细胞形成、防止骨丢失^[20]。淫羊藿苷通过调节许多破骨细胞形成的正调节信号通路已经被报道,如淫羊藿苷通过调节 NF- κ B 和 MAPK 等通路来抑制 RANKL 诱导的破骨细胞生成^[10,21],但通过调节负调节通路及负调节因子来抑制破骨细胞生成的研究较少。

G α 13 属于 G 蛋白超家族的 G12 亚家族,是一种内源性破骨细胞的负调控因子,可通过调节 Rho-GEF-RhoGTPase 信号通路来调节细胞骨架组织、线粒体功能,还可通过调节 RhoA 因子的活化、Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路等多种途径抑制破骨细胞形成^[22-23]。本研究结果显示,不同浓度淫羊藿苷干预后,破骨细胞数目明显减少,破骨细胞相关基因 RANK 和相关蛋白 TRAF6 表达量明显降低,表明淫羊藿苷可明显抑制破骨细胞生成,抑制作用与淫羊藿苷浓度正相关。淫羊藿苷处理后,G α 13 基因及蛋白表达量明显上调,其下游 Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路中 Akt、NFATc1 基因及蛋白量显著下降。上述结果表明 G α 13 可能参与了调控淫羊藿苷抑制破骨细胞形成的相关通路。

综上所述,G α 13 可能参与了调控淫羊藿苷抑制破骨细胞形成的相关通路,淫羊藿苷可能通过促进负调控因子 G α 13 的表达,从而抑制其下游 Akt-GSK3 β -NFATc1 信号通路来抑制破骨细胞形成。本研究就淫羊藿苷对破骨细胞分化调节的作用机制进行探讨,为临床治疗骨质疏松症提供了新的思路 and 参考。

参 考 文 献

- [1] Weis WI, Kobilka BK. The molecular basis of g protein-coupled receptor activation[J]. Annu Rev Biochem, 2018, 87: 897-919.
- [2] Worzfeld T, Wettschureck N, Offermanns S. G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease[J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29(11): 582-589.
- [3] Wu M, Chen W, Lu Y, et al. Author correction: G α 13 negatively controls osteoclastogenesis through inhibition of the Akt-GSK3 β -NFATc1 signalling pathway[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5341.
- [4] Armas LA, Recker RR. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2012, 41(3): 475-486.
- [5] 夏维波, 章振林, 林华, 等. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(3): 281-309.
- [6] Zhang G, Qin L, Shi Y. Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial[J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(7): 1072-1079.
- [7] 鲍加荣, 杨继文, 李树峰, 等. 淫羊藿苷对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响[J]. 卫生研究, 2005, 34(2): 191-193.
- [8] Kim B, Lee KY, Park B. Icaritin abrogates osteoclast formation through the regulation of the RANKL-mediated TRAF6/NF- κ B/ERK signaling pathway in Raw264.7 cells [J]. Phytomedicine, 2018, 51: 181-190.
- [9] Chen KM, Ge BF, Liu XY, et al. Icaritin inhibits the osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor in mouse bone marrow culture [J]. Pharmazie, 2007, 62(5): 388-391.
- [10] Xu Q, Chen G, Liu X, et al. Icaritin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis via modulation of the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(3): 902-906.
- [11] Huang JM, Ren RY, Bao Y, et al. Ulinastatin inhibits osteoclastogenesis and suppresses ovariectomy-induced bone loss by down-regulating uPAR [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1016.
- [12] Jing X, Du T, Chen K, et al. Icaritin protects against iron overload-induced bone loss via suppressing oxidative stress [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 10123-10137.
- [13] Pang C, Wen L, Qin H, et al. Sotrastaurin, a PKC inhibitor, attenuates RANKL-induced bone resorption and attenuates osteochondral pathologies associated with the development of OA [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(15): 8452-8465.
- [14] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future [J]. Lancet, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [15] Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases [J]. Science, 2000, 289(5484): 1508-1514.
- [16] Holt G, Murnaghan C, Reilly J, et al. The biology of aseptic osteolysis [J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 460: 240-252.
- [17] Zhu X, Bai W, Zheng H. Twelve years of GWAS discoveries for osteoporosis and related traits: advances, challenges and applications [J]. Bone Res, 2021, 9(1): 23.
- [18] Phan TC, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease [J]. Histol Histopathol, 2004, 19(4): 1325-1344.
- [19] Zhang X, Liu T, Huang Y, et al. Icaritin: does it have an osteoinductive potential for bone tissue engineering? [J]. Phytother Res, 2014, 28(4): 498-509.
- [20] Ming LG, Chen KM, Xian CJ. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icaritin in regulating bone remodeling [J]. J Cell Physiol, 2013, 228(3): 513-521.
- [21] Wang Z, Wang D, Yang D, et al. The effect of icaritin on bone metabolism and its potential clinical application [J]. Osteoporos Int, 2018, 29(3): 535-544.
- [22] Nakano S, Inoue K, Xu C, et al. G-protein G α (13) functions as a cytoskeletal and mitochondrial regulator to restrain osteoclast function [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 4236.
- [23] Wu M, Chen W, Lu Y, et al. G α 13 negatively controls osteoclastogenesis through inhibition of the Akt-GSK3 β -NFATc1 signalling pathway [J]. Nat Commun, 2017, 8: 13700.

(收稿日期: 2021-10-19)

(本文编辑: 龚哲妮)

引用格式

李志伟, 任然悦, 李孟伟, 等. 淫羊藿苷通过促进负调控因子 G α 13 的表达抑制破骨细胞形成 [J]. 骨科, 2022, 13(2): 155-159. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2022.02.012.