

# 女贞子提取物对破骨细胞分化及成骨细胞增殖的影响<sup>Δ</sup>

雷丽娟<sup>1,2,3\*</sup>, 杨晓琴<sup>1,2,3</sup>, 周英<sup>2,3,4</sup>, 王慧娟<sup>2,3</sup>, 陈丽珍<sup>2,3</sup>, 俸婷婷<sup>2,3,4#</sup> (1. 贵州大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省药食同源植物资源开发工程技术研究中心, 贵阳 550025; 3. 贵州省药食两用资源应用开发工程实验室, 贵阳 550025; 4. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)16-2247-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.16.17

**摘要** 目的: 探讨女贞子提取物对破骨细胞分化及成骨细胞增殖的影响。方法: 以 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 $D_3$ 诱导原代骨髓细胞获取破骨细胞, 经女贞子醇提物和水煎物低、中、高剂量(均为2、20、200 mg/L)处理后, 采用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)活性测定法检测各组细胞裂解液中TRACP活性及细胞中TRACP阳性细胞数, 采用甲苯胺蓝染色法检测各组细胞骨吸收陷窝数量及骨陷窝面积百分率。以 $L$ -抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸钠、地塞米松诱导小鼠颅顶前成骨细胞亚克隆14细胞获取成骨细胞, 采用MTT法检测各组细胞的相对增殖率, 采用碱性磷酸酶(APK)活性测定法检测各组细胞中APK活性。结果: 经不同剂量女贞子提取物处理后, TRACP阳性细胞数、骨吸收陷窝数量及其面积均有不同程度的改变, 其中女贞子醇提物各剂量组和水煎物高剂量组TRACP活性及阳性细胞数、骨吸收陷窝数量及面积百分率, 以及女贞子水煎物中剂量组TRACP活性及阳性细胞数、骨陷窝面积百分率均显著降低或减少, 而水煎物低剂量组细胞的骨吸收陷窝数量显著增多( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 女贞子提取物低、中剂量组细胞的相对增殖率以及提取物各剂量组细胞的APK活性均显著升高, 而女贞子提取物高剂量组细胞的相对增殖率均显著降低( $P < 0.01$ )。结论: 女贞子提取物可抑制破骨细胞的TRACP活性, 改变破骨细胞的骨吸收功能和成骨细胞的增殖行为, 并增加成骨细胞的APK活性。

**关键词** 女贞子; 醇提物; 水煎物; 破骨细胞; 成骨细胞; 骨吸收; 分化; 增殖

科罗素酸含量相对较高, 在101.5~262.7  $\mu\text{g/g}$ 之间。而路路通酸在悬钩木各部位中均未检出。这可能与所采集悬钩木药材的生长环境等因素有关<sup>[8]</sup>。

综上所述, 本研究方法准确、可靠, 专属性好, 可用于同时测定藏药悬钩木中6种三萜酸类成分的含量。

## 参考文献

- [1] 宇妥·元丹衮波. 医学四续[M]. 马世林, 毛继祖, 罗尚达, 等, 译. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 40.
- [2] 摩衍衍那. 月王药诊[M]. 毛继祖, 马世林, 译. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 116.
- [3] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 毛继祖, 罗尚达, 王振华, 等, 编译. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 135.
- [4] 马志良, 多杰. 藏药悬钩木的质量标准研究[J]. 中国药房, 2018, 29(2): 179-182.
- [5] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 38.
- [6] 孟祥娟, 刘斌, 折改梅, 等. 悬钩子属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(4): 767-775.
- [7] 甘露, 蒋凤池. 粗叶悬钩子化学成分的分离鉴定[J]. 北京

医科大学学报, 2000, 32(3): 226-228.

- [8] 李维林, 贺善安, 顾姻. 中国悬钩子属植物的利用价值概述[J]. 武汉植物学研究, 2000, 18(3): 237-243.
- [9] 傅正生, 杨爱梅, 梁卫东, 等. 悬钩子属植物化学成分及生物活性研究新进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(5): 86-91.
- [10] 孙长清, 邵小明, 王黎明, 等. 悬钩子属植物的开发利用概述[J]. 广西植物, 2004, 24(6): 578-582.
- [11] BAGLIN I, MITAINE-OFFER AC, NOUR M, et al. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2003, 3(6): 525-539.
- [12] ALLOUCHE Y, BELTRÁN G, GAFORIO JJ, et al. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(10): 2885-2890.
- [13] 青海省卫生局, 西藏自治区卫生局, 四川省卫生局, 等. 藏药标准[S]. 西宁: 青海人民出版社, 1978: 93-94.
- [14] 青海省卫生厅. 青海省藏药标准[S]. 1992-06-30.
- [15] 张世娟. 基于新型荧光标记技术的羌活主要化学成分研究[D]. 西宁: 中国科学院西北高原生物研究所, 2014.
- [16] 蔡雪萍, 李振华, 华俊磊, 等. 一测多评法测定枇杷叶有效部位中三萜酸成分的含量[J]. 中草药, 2013, 44(21): 3057-3062.

<sup>Δ</sup> 基金项目: 贵州省科技计划课题(No. 黔科合G字[2015]4001号); 贵州省高层次创新型人才培养项目(No. 黔科合人才[2015]4032号)

\* 硕士研究生。研究方向: 天然药物、生化药学。E-mail: 18892308020@163.com

# 通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药与民族药药理、毒理学。E-mail: ftt0809@163.com

(收稿日期: 2019-03-19 修回日期: 2019-06-28)

(编辑: 陈宏)

# Effects of *Ligustri lucidi Fructus* Extract on the Differentiation of Osteoclasts and the Proliferation of Osteoblasts

LEI Lijuan<sup>1,2,3</sup>, YANG Xiaoqin<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Ying<sup>2,3,4</sup>, WANG Huijuan<sup>2,3</sup>, CHEN Lizhen<sup>2,3</sup>, FENG Tingting<sup>2,3,4</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Research and Development Center for Medicinal and Edible Plant Resources of Guizhou, Guiyang 550025, China; 3. Medicinal and Edible Plant Resources Application and Development Engineering Laboratory of Guizhou, Guiyang 550025, China; 4. Pharmacy School, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effects of *Ligustri lucidi Fructus* extract on the differentiation of osteoclasts and the proliferation of osteoblasts. METHODS: Rabbit primary bone marrow cells were induced with  $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to obtain osteoclasts. After treated with low-dose, medium-dose and high-dose of *L. lucidi Fructus* ethanol and water extract (both 2, 20, 200 mg/L), TRACP activity determined method was used to detect the activity of TRACP in cell lysis solution and the number of TRACP positive cells. The number of cellular bone resorption lacunae and the percentage of bone lacunae area were detected by toluidine blue staining. Osteoblasts were obtained by *L*-ascorbic acid,  $\beta$ -sodium glycerophosphate and dexamethasone-induced subcloning 14 of cranial parietal anterior osteocytes in mice. MTT assay and APK activity assay were used to detect relative proliferation rate of cells and the activity of APK. RESULTS: After treated with different doses of *L. lucidi Fructus* extract, the number of TRACP positive cells, the number of bone resorption lacunae and their area were changed in varying degrees. TRACP activity, the number of its positive cells, the number of bone resorption lacunae and the percentage of bone lacunae area in different dosage groups of *L. lucidi Fructus* ethanol extract and high-dose of water extract; the TRACP activity, the number of its positive cells and the percentage of bone lacunae area in *L. lucidi Fructus* water extract medium-dose group were decreased significantly, while the number of bone resorption lacunae in *L. lucidi Fructus* water extract low-dose group was increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The relative proliferation rate of cells in *L. lucidi Fructus* extract low-dose and medium-dose groups and APK activity of cells in extract groups were significantly increased, while the relative proliferation rate of cells were decreased significantly in *L. lucidi Fructus* ethanol extract and water extract high-dose groups ( $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: *L. lucidi Fructus* extract can inhibit TRACP activity of osteoclasts, change the bone resorption function of osteoclasts and the proliferation behavior of osteoblasts and increase APK activity of osteoclasts.

**KEYWORDS** *Ligustri lucidi Fructus*; Ethanol extract; Water decoction; Osteoclasts; Osteoblasts; Bone resorption; Differentiation; Proliferation

女贞子(*Ligustri lucidi Fructus*)为木犀科植物女贞(*Ligustrum lucidum* Ait.)的干燥成熟果实,含有女贞子苷、洋橄榄苦苷、齐墩果酸、4-羟基- $\beta$ -苯乙基- $\beta$ -D-葡萄糖苷、桦木醇等活性成分<sup>[1]</sup>。该药材性凉,味甘、苦,归肝、肾经,具有滋补肝肾、明目乌发之功效,可用于治疗眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明等症,其主要药理作用包括抗肿瘤、抗骨质疏松(OP)、抗氧化、抗衰老、增强免疫力、升高白细胞、保肝强心等<sup>[1-2]</sup>。其中,抗肿瘤、抗OP作用是该药材近几年研究的热点之一。中医认为,骨由肾主导,治疗OP应从补益肝肾、强腰健膝、益气养血、活血化瘀等方面入手<sup>[3]</sup>。因此,女贞子及其活性成分具有被开发为抗OP药物的潜力。

OP是以骨量减少,骨微结构破坏,骨强度下降,松质骨骨小梁变细、断裂、数量减少,皮质骨多孔和变薄导致骨脆性增加,容易发生骨折及骨痛为特征的全身性骨代谢疾病,其发病机制与破骨细胞分化增强以及成骨细胞增殖减弱有关<sup>[4]</sup>。破骨细胞在维持骨代谢平衡过程中可发挥重要作用,该细胞由骨髓细胞经核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子

(M-CSF)共同刺激后分化而成,其异常分化时可造成骨吸收过度而导致骨量减少,进而引发OP<sup>[5]</sup>。成骨细胞则由间充质干细胞发育而成,可分泌细胞外基质,在骨微环境下矿化为骨基质,并进一步分化成熟形成骨细胞,主要参与骨的形成以及骨损伤的修复过程<sup>[6-7]</sup>。由此可见,调节破骨细胞的分化和成骨细胞的增殖可作为治疗OP的手段之一。鉴于此,本研究以 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素D<sub>3</sub>[ $1\alpha, 25$ -(OH)<sub>2</sub>VitD<sub>3</sub>]诱导兔原代骨髓细胞获得破骨细胞,以L-抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸钠、地塞米松诱导小鼠颅顶前成骨细胞亚克隆14细胞(MC3T3-E1Subclone 14)获得成骨细胞,并在此基础上初步探讨女贞子提取物对破骨细胞分化和成骨细胞增殖的影响,以期女贞子防治OP提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

3111型CO<sub>2</sub>培养箱、1510型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);XD20-RFL型倒置荧光相差显微镜(宁波舜宇仪器有限公司);LGJ-12型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);RE-52AA型旋转蒸发

仪(上海亚荣生化仪器厂);WH-2型微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司);KH-500DE型数控超声清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

## 1.2 药材、药品与试剂

女贞子饮片(酒制,贵州同济堂中药饮片有限公司,批号:110502)经贵州大学生命科学学院熊源新教授鉴定为木犀科植物女贞(*L. lucidum* Ait.)的干燥成熟果实。

破骨细胞 $\alpha$ -MEM培养基、成骨细胞 $\alpha$ -MEM培养基(美国Gibco公司,批号分别为1148795、1510464);甲苯胺蓝染色液(批号:BCBG4799V)、胎牛血清(批号:140502)、L-抗坏血酸(批号:A7506)、 $\beta$ -甘油磷酸钠(批号:G5422)、地塞米松对照品(批号:D1756,纯度: $\geq 98\%$ )均购自美国Sigma公司;青霉素/链霉素双抗(批号:20140718)、MTT试剂(批号:46170204106)均购自北京索莱宝科技有限公司;谷氨酰胺对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100968-201001,纯度:100%); $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{VitD}_3$ 对照品(批号:096M4039V,纯度: $\geq 98\%$ )、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)测试盒及其染色试剂盒(批号分别为20140805、SLBJ7300V)、碱性磷酸酶(AKP)测试盒(批号:20150809)均购自日本Sigma公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量测定试剂盒(批号:20140803)、Tritonx-100裂解液(批号:M2528)均购自美国MP Biomedicals公司;4%中性甲醛溶液(南京建成生物工程研究所,批号:20160115);胰酶(美国Amresco公司,批号:1812C306);其余试剂均为分析纯,水为自制纯化水。

## 1.3 动物

出生48 h内的清洁级新西兰乳兔,雌雄不限,体重量( $120 \pm 10$ )g,由贵阳经济技术开发区鹏程农业科技有限公司提供,动物生产合格证号:SCXK(黔)2012-001。

## 1.4 骨磨片与细胞

骨磨片(批号:20161015)由兰州军区兰州总医院骨科研究所提供;MC3T3-E1Subclone 14细胞由中国科学院细胞库提供。

## 2 方法

### 2.1 女贞子提取物的制备

称取女贞子饮片100 g,用75%乙醇加热回流提取3次(1 000 mL/次),每次3 h,抽滤,合并滤液,旋转蒸发,所得浸膏经冷冻干燥后,即得女贞子醇提物样品(15.23 g,提取率为15.23%)。另称取女贞子饮片100 g,用水煎煮3次(1 000 mL/次),每次分别煎煮2.5、2、1.5 h,抽滤,合并滤液,旋转蒸发,所得浸膏经冷冻干燥后,即得女贞子水煎物样品(23.83 g,提取率为23.83%)。上述提取物均置于4℃冰箱中保存,备用。

### 2.2 骨髓细胞的分离与诱导培养

参照文献方法<sup>[8]</sup>分离骨髓细胞:脱颈处死出生48 h

内的乳兔,于无菌条件下剥离其后肢胫骨和股骨,置于4℃磷酸盐缓冲液(PBS,pH为7.2~7.3)中,去除骨周围的软组织,将骨干置于破骨细胞 $\alpha$ -MEM完全培养基(即含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素双抗、1%谷氨酰胺的破骨细胞 $\alpha$ -MEM培养基,下同)中,纵向剖开骨干,用无菌刀片轻刮其内表面至颜色变白;将完全培养基及骨渣涡旋振荡,过200目筛后制成细胞悬液,以 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个/孔的密度接种至24孔板(可根据试验需要预先放置骨磨片)中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱(下同)中培养24 h;用PBS洗掉未贴壁的细胞,再加入含 $1 \times 10^{-8}$  mol/L  $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{VitD}_3$ 的完全培养基中进行诱导,记为培养的第1天,之后每隔3天更换1次培养基,并采用自然沉降法<sup>[9]</sup>筛选出骨髓细胞(即形态统一,且呈梭状分布者)。

### 2.3 女贞子提取物对破骨细胞分化的影响

采用TRACP活性测定法检测。取“2.2”项下对数生长期的骨髓细胞适量,按 $5 \times 10^3$ 个/孔的密度接种于96孔板(勿需骨磨片)中,培养24 h。将细胞随机分为空白对照组,女贞子醇提物低、中、高剂量组(2、20、200 mg/L,按醇提物质量计,以DMSO为溶剂;剂量设置参考前期预试验结果,下同),女贞子水煎物低、中、高剂量组(2、20、200 mg/L,以水煎物质量计,以DMSO为溶剂;剂量设置参考前期预试验结果,下同),每组设置6个复孔。吸弃上清液,空白对照组加入含 $1 \times 10^{-8}$  mol/L  $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{VitD}_3$ 的破骨细胞 $\alpha$ -MEM完全培养基100  $\mu\text{L}$ ,各给药组加入含相应药物和 $1 \times 10^{-8}$  mol/L  $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{VitD}_3$ 的破骨细胞 $\alpha$ -MEM完全培养基100  $\mu\text{L}$ ,继续培养。于培养的第8天,使用0.2% TritonX-100裂解液裂解各孔细胞30 min,取裂解液20  $\mu\text{L}$ ,按TRACP测试盒说明书处理后,使用酶标仪于530 nm波长处检测各孔的吸光度(A)值,并参照测试盒说明书方法换算TRACP活性[每升裂解液与测试盒底物于37℃反应1 min产生1  $\mu\text{mol}$ 游离酚即为1个活力单位(U/L)]。同时,将细胞以PBS清洗后,于4%中性甲醇溶液中固定1 min,再用水清洗,轻轻甩干后,参照TRACP染色试剂盒说明书进行染色,使用显微镜进行观察,记录TRACP阳性细胞数(阳性细胞的胞浆呈红色)。上述试验重复3次。

### 2.4 女贞子提取物对破骨细胞骨吸收功能的影响

采用甲苯胺蓝染色法检测。按“2.3”项下方法分组、给药、培养(需骨磨片),每隔2天更换1次培养基。于培养的第8天,弃去培养基,将骨磨片用PBS清洗后,于10%中性甲醇溶液中固定10 min,再用0.25 mol/L氨水超声(功率:500 W,频率:40 kHz)清洗3次,每次5 min;经乙醇梯度脱水后,用1%甲苯胺蓝染色,再用水清洗,自然晾干;使用显微镜进行观察,采用Image Pro Plus 6.0软件统计骨吸收陷窝(镜下呈紫红色)数量和骨陷窝面积百分率[骨陷窝面积百分率(%)=骨陷窝面积/整张骨



磨片面积×100%]。上述试验重复3次。

## 2.5 女贞子提取物对成骨细胞增殖的影响

采用MTT法检测。取对数生长期的MC3T3-E1Subclone 14细胞,以 $5 \times 10^3$ 个/孔的密度接种于96孔板(勿需骨磨片)中,培养24 h后,用PBS洗掉未贴壁的细胞。将细胞随机分为空白对照组,女贞子醇提取物低、中、高剂量组,女贞子水煎物低、中、高剂量组,并设置不含细胞和药物的阴性对照组,每组设置6个复孔。吸弃上清液,空白对照组和阴性对照组加入成骨细胞 $\alpha$ -MEM完全培养基(含 $50 \mu\text{g/mL}$  L-抗坏血酸、 $10 \text{ mmol/mL}$   $\beta$ -甘油磷酸钠、 $10^{-8} \text{ mol/mL}$  地塞米松的成骨细胞 $\alpha$ -MEM培养基,下同)  $100 \mu\text{L}$ ,各给药组加入含相应药物的成骨细胞 $\alpha$ -MEM完全培养基  $100 \mu\text{L}$ ,培养48 h。弃去培养基,每孔加入 $5 \text{ mg/mL}$  MTT溶液  $20 \mu\text{L}$ ,培养4 h后,吸弃上清液,每孔加入DMSO  $150 \mu\text{L}$ ,振荡10 min,使用酶标仪于490 nm波长处检测各孔的A值,计算各组细胞的相对增殖率[相对增殖率(%)=(给药组平均A值-空白对照组平均A值)/(空白对照组平均A值-阴性对照组平均A值)×100%]。上述试验重复3次。

## 2.6 女贞子提取物对成骨细胞APK活性的影响

采用APK活性测定法<sup>[10-11]</sup>检测。取对数生长期的MC3T3-E1Subclone 14细胞,以 $1 \times 10^4$ 个/孔的密度接种于96孔板(勿需骨磨片)中,培养24 h后,用PBS洗掉未贴壁的细胞。按“2.5”项下方法分组(不设置阴性对照组)、给药,每组设置4个复孔。培养72 h后,吸弃培养基,用PBS清洗2次,使用1% TritonX-100裂解液于4℃下裂解30 min。取各孔裂解后的细胞适量,按AKP测试盒说明书处理后,使用酶标仪于520 nm波长处检测各孔的A值;采用BCA法测定各组细胞的蛋白浓度,并将A值换算AKP活性[每克组织蛋白与测试盒底物于37℃反应15 min产生1 mg游离酚即为1个活性单位(U/g prot)]。上述试验重复3次。

## 2.7 统计学方法

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 女贞子提取物对破骨细胞分化和骨吸收功能的影响

3.1.1 TRACP活性及其阳性细胞数 空白对照组TRACP阳性细胞较多,且体积较大。与空白对照组比较,各给药组TRACP阳性细胞均有不同程度的减少;其中女贞子醇提取物各剂量组和水煎物中、高剂量组细胞的TRACP活性均显著降低,TRACP阳性细胞数均显著减

少,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),详见图1、表1。

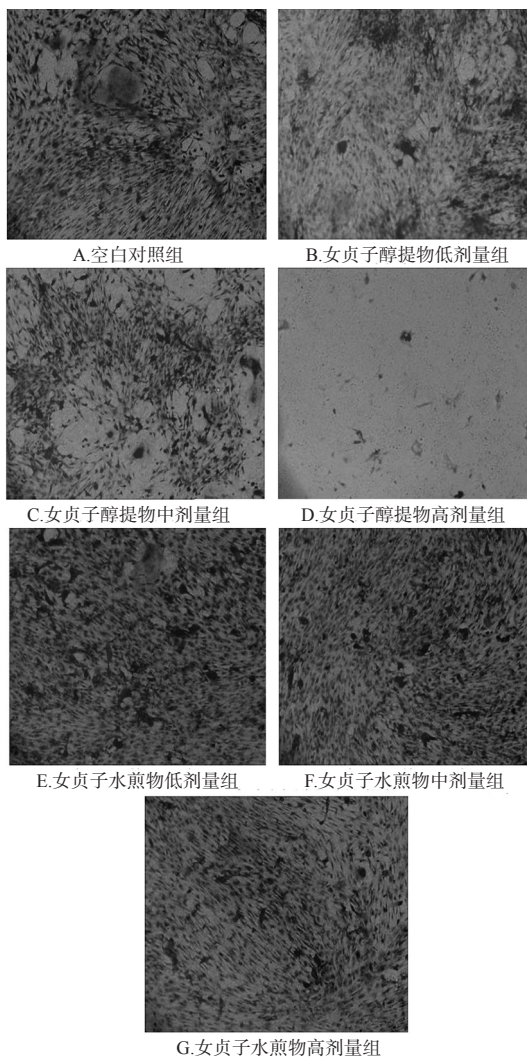


图1 女贞子提取物对破骨细胞分化影响的显微图 (TRACP染色,×40)

Fig 1 Micrographs of the effects of *L. lucidi Fructus* extract on osteoclast differentiation (TRACP staining, ×40)

表1 女贞子提取物对破骨细胞分化和骨吸收功能的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1 Effects of *L. lucidi Fructus* extract on osteoclast differentiation and bone resorption function ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	TRACP活性, U/L	TRACP阳性细胞数, 个	骨吸收陷窝, 个	骨陷窝面积百分率, %
空白对照组	22.753 ± 0.220	368.250 ± 66.430	125.333 ± 0.577	100
女贞子醇提取物低剂量组	18.801 ± 0.163**	196.750 ± 26.718**	100.333 ± 2.082**	81.193 ± 0.741*
女贞子醇提取物中剂量组	16.331 ± 0.229**	128.750 ± 34.045**	83.667 ± 8.021**	66.788 ± 0.503**
女贞子醇提取物高剂量组	0.845 ± 0.291**	52.750 ± 24.404**	7.667 ± 2.082**	13.223 ± 0.559**
女贞子水煎物低剂量组	24.290 ± 0.634	405.500 ± 56.052	143.333 ± 2.517**	102.756 ± 1.015
女贞子水煎物中剂量组	19.700 ± 0.261**	231.250 ± 52.376**	117.667 ± 5.132	90.723 ± 0.760*
女贞子水煎物高剂量组	17.078 ± 0.418**	198.250 ± 54.775**	95.000 ± 2.000**	78.501 ± 1.077*

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

3.1.2 骨吸收功能 空白对照组骨吸收陷窝数量较多,且面积较大。与空白对照组比较,各给药组骨吸收陷窝数及面积均有不同程度的变化;其中,女贞子醇提物各剂量组和水煎物高剂量组细胞的骨吸收陷窝数量及骨吸收陷窝面积百分率,以及水煎物中剂量组细胞骨陷窝面积百分率均显著减少或降低,而水煎物低剂量组细胞骨吸收陷窝数量显著增多,差异均有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),详见图2、表1。

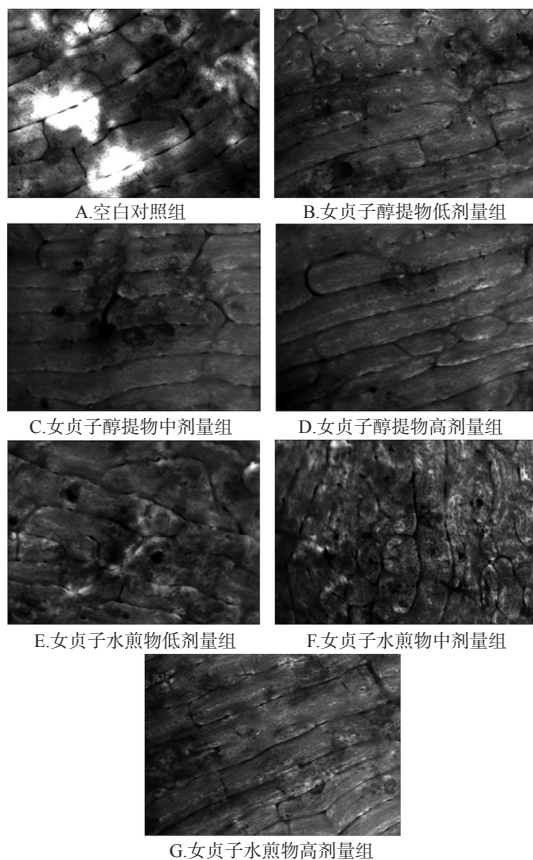


图2 女贞子提取物对破骨细胞骨吸收功能影响的显微图(甲苯胺蓝染色,  $\times 100$ )

Fig 2 Micrographs of the effects of *L. lucidi Fructus* extract on osteoclast resorption function (toluidine blue staining,  $\times 100$ )

### 3.2 女贞子提取物对成骨细胞增殖的影响

与空白对照组比较,女贞子醇提物和水煎物低、中剂量组细胞的相对增殖率( $>0$ )均显著升高,而两者高剂量组细胞的相对增殖率( $<0$ )均显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),详见表2。

### 3.3 女贞子提取物对成骨细胞APK活性的影响

与空白对照组比较,女贞子醇提物和水煎物各剂量组细胞的APK活性均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),详见表2。

## 4 讨论

现代药理研究表明,女贞子具有保肝、调节免疫、强心、抗炎、抗OP及抗肿瘤等作用,且其多种活性成分(如

表2 女贞子提取物对成骨细胞增殖和APK活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 Effects of *L. lucidi Fructus* extract on osteoblast proliferation and AKP activity ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	相对增殖率, %	APK活性, U/g prot
空白对照组	0	1.440 $\pm$ 0.196
女贞子醇提物低剂量组	19.142 $\pm$ 0.291**	12.554 $\pm$ 0.231**
女贞子醇提物中剂量组	23.354 $\pm$ 0.229**	15.995 $\pm$ 0.244**
女贞子醇提物高剂量组	-84.631 $\pm$ 0.163**	23.246 $\pm$ 0.743**
女贞子水煎物低剂量组	20.815 $\pm$ 0.418**	5.276 $\pm$ 0.132**
女贞子水煎物中剂量组	15.527 $\pm$ 0.261**	21.279 $\pm$ 0.589**
女贞子水煎物高剂量组	-19.144 $\pm$ 0.633**	15.549 $\pm$ 0.267**

注:与空白对照组比较, \*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \*\* $P < 0.01$

齐墩果酸、熊果酸、红景天苷、环烯醚萜苷、酪醇特女贞苷等)都具有抗OP的活性<sup>[12-13]</sup>。目前学者普遍认为,女贞子提取物可通过促进成骨细胞分化、阻滞破骨细胞激活或增殖、抑制基质金属酶表达等途径来发挥抗OP作用<sup>[14-15]</sup>,但目前尚鲜见其对破骨细胞分化及成骨细胞增殖影响的相关报道。

本研究以 $1\alpha, 25-(OH)_2VitD_3$ 诱导兔原代骨髓细胞来获取破骨细胞,以抗坏血酸、甘油磷酸钠、地塞米松诱导MC3T3-E1Subclone 14细胞来获取成骨细胞,初步探讨了不同剂量女贞子醇提物和水煎物对破骨细胞分化及骨吸收功能、破骨细胞增殖及相关酶活性的影响。 $1\alpha, 25-(OH)_2VitD_3$ 是参与破骨细胞形成与激活过程的必要因子,可通过诱导骨髓干细胞分化而形成破骨细胞;同时,其可诱导破骨细胞前体细胞(如骨髓单核细胞)形成阳性多核细胞,并使破骨细胞具有骨吸收功能<sup>[16]</sup>。其中,TRACP活性可用以衡量破骨细胞分化及其骨吸收能力,该酶被公认为破骨细胞的标志性酶<sup>[17]</sup>。此外,骨吸收陷窝是破骨细胞骨吸收直接作用的结果,其数量及面积大小亦可直接反映破骨细胞的骨吸收功能<sup>[18]</sup>。为此,本研究考察了女贞子提取物对破骨细胞分化和骨吸收功能的影响。结果显示,女贞子醇提物及水煎液各剂量组TRACP阳性细胞、骨吸收陷窝数及面积均有不同程度的变化,其中女贞子醇提物各剂量组和水煎物高剂量组的TRACP活性及阳性细胞数、骨吸收陷窝数量及面积百分率,以及水煎物中剂量组的TRACP活性及阳性细胞数、骨吸收陷窝面积百分率均较空白对照组均显著降低或减少,而水煎物低剂量组细胞的骨吸收陷窝数量显著增多。这提示不同剂量女贞子提取物可不同程度地抑制破骨细胞分化,且醇提物和水煎物对其骨吸收功能的影响存在差异,这可能与提取物中的成分差异有关,但有待后续研究予以证实。

当骨吸收大于骨形成时,可使机体骨量丢失从而导致OP等相关骨疾病的发生<sup>[4]</sup>。成骨细胞是骨形成的物



质基础,其增殖可产生丰富的胶原基质,并通过矿化作用形成更多的骨质,因此调节成骨细胞增殖可能是治疗OP的途径之一<sup>[19]</sup>。MC3T3-E1Subclone 14细胞是一种亚克隆体,主要是由表型各异的MC3T3-E1细胞系分离克隆而得,其增殖行为与颅顶前成骨细胞类似,是体外研究的理想模型<sup>[20]</sup>。为此,本研究采用MC3T3-E1Subclone 14细胞诱导获得成骨细胞,并考察了女贞子提取物对成骨细胞增殖的影响。结果显示,女贞子提取物低、中剂量组细胞的相对增殖率(>0)均较空白对照组显著升高,而提取物高剂量组细胞的相对增殖率(<0)均较空白对照组显著降低。这提示不同剂量女贞子提取物可改变成骨细胞的增殖行为,且中、低剂量的女贞子提取物可促进成骨细胞的增殖,而高剂量则可抑制成骨细胞的增殖。APK是参与骨代谢的同源二聚体糖蛋白,可促进细胞的成熟与钙化,被认为是细胞外基质成熟的早期标志<sup>[21]</sup>,且由于该酶的表达也会随着细胞分化而增强,故其活性也是评估成骨细胞增殖的指标之一<sup>[22]</sup>。为此,本研究考察了女贞子提取物对APK活性的影响。结果显示,女贞子醇提物和水煎物各剂量组细胞APK活性均较空白对照组显著升高。这提示不同剂量女贞子提取物均可明显提高成骨细胞中APK的活性。

综上所述,女贞子提取物可抑制破骨细胞分化,并可改变破骨细胞的骨吸收功能和成骨细胞的增殖行为,可为女贞子的抗OP作用提供理论基础,但其具体机制、作用剂量和活性成分仍有待后续深入研究。

## 参考文献

- [1] 张明发,沈雅琴.女贞子及其有效成分的保肝作用研究进展[J].药物评价研究,2014,37(3):280-284.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:45-46.
- [3] 陈丽珍,周英,黄俊飞,等.大血藤对破骨细胞活性及成骨细胞增殖分化作用的研究[J].中国中药杂志,2015,40(22):4463-4468.
- [4] KAWAHARA M, IWASAKI Y, SAKAGUCHI K, et al. Involvement of GCMB in the transcriptional regulation of the human parathyroid hormone gene in a parathyroid-derived cell line PT-r: effects of calcium and 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [J]. *Bone*, 2010, 47(3): 534-541.
- [5] 陈晓虎,孙瑜隆,蹇爱荣,等.破骨细胞的形成和活化研究进展[J].中国细胞生物学报,2014,36(2):258-266.
- [6] 秦腊梅,肖永华,周丽珍,等.4味中药对体外培养成骨样细胞增殖的影响:对通补强骨方中主要组成药物的研究[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(2):18-21.
- [7] ENSRUD KE, CRANDALL CJ. Osteoporosis[J]. *Ann Intern Med*, 2018. DOI: 10.7362/L17-0587.
- [8] 甄茹,俸婷婷,赵致,等.黑骨藤抑制破骨细胞分化及骨吸收能力的活性部位研究[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(1):112-116.
- [9] MING LG, LV X, MA XN, et al. The prenyl group contributes to activities of phytoestrogen 8-prenynaringenin in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption in vitro[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(3): 1202-1214.
- [10] XU L, XU W, XU G, et al. Effects of cell surface α2-3 sialic acid on osteogenesis[J]. *Glycoconj J*, 2013, 30(7): 677-685.
- [11] SUH KS, LEE YS, SEO SH, et al. Effect of zinc oxide nanoparticles on the function of MC3T3-E1 osteoblastic cells[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2013, 155(2): 287-294.
- [12] 刘亭亭,王萌.女贞子化学成分与药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(14):228-234.
- [13] 刘先芳,梁敬钰,孙建博,等.女贞子化学成分和药理活性研究进展[J].海峡药学,2018,30(1):1-8.
- [14] DONG XL, ZHANG Y, FAVUS MJ, et al. Ethanol extract of Fructus Ligustri lucidi increase circulating 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by inducing renal 25-hydroxyvitamin D-1α hydroxylase activity[J]. *Menopause*, 2010, 17(6): 1174-1181.
- [15] LI G, ZHANG XA, ZHANG JF, et al. Ethanol extract of Fructus Ligustri lucidi promotes osteogenesis of mesenchymal stem cells[J]. *Phytother Res*, 2010, 24(4): 571-576.
- [16] 葛冬霞,李良,吴江,等.1,25(OH)<sub>2</sub>维生素D<sub>3</sub>诱导大鼠骨髓单核细胞形成破骨细胞[J].四川大学学报(医学版),2007,38(2):213-216.
- [17] 杨荣平,邓改改,罗友成,等.青娥丸不同萃取部位对成骨细胞增殖分化及破骨细胞活性的影响[J].时珍国医国药,2011,22(11):2588-2590.
- [18] 吕享,周英,陈克明,等.8-异戊烯基柑橘素抑制骨髓细胞向破骨细胞分化及骨吸收活性[J].药学报,2013,48(3):347-351.
- [19] LIU Y, CUI L, WU T, et al. Effects of emodin on the proliferation and differentiation of osteoblast isolated from neonatal rat calvarium in vitro[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2005, 21(2): 235-240.
- [20] 郑磊,徐贵英,徐岚,等.MC3T3-E1Subclone4体外诱导成骨细胞模型的建立[J].中国血液流变学杂志,2012,22(1):16-19.
- [21] ZHANG JF, LI G, CHAN CY, et al. Flavonoids of herba Epimedii regulate osteogenesis of huamn mesenchymal stem cells through BMP and Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 314(1): 70-74.
- [22] 张英,袁月,孙富丽.成骨细胞胞内胞外碱性磷酸酶含量比较[J].中国医科大学学报,2011,40(10):874-876,884.  
(收稿日期:2018-10-11 修回日期:2019-05-10)  
(编辑:张元媛)