

· 论 著 ·

去甲斑蝥素通过双向调控骨吸收和骨形成用于防治骨质疏松症的体外研究

黄飞日 姜文兵 苏忠良

[摘要] 目的 通过观察去甲斑蝥素对成骨细胞和破骨细胞的作用,探讨其在防治骨质疏松症中的作用。方法 将小鼠胚胎成骨细胞前体细胞分为对照组、模型组、低剂量组和高剂量组,高、低剂量组分别予以0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 去甲斑蝥素干预。小鼠胚胎成骨细胞前体细胞用成骨培养基诱导,非对照组用脂多糖进行干预,3周后通过茜素红染色、碱性磷酸酶(ALP)染色检验成骨变化。骨髓来源巨噬细胞(BMMs)提取自6周龄的C57BL-6J小鼠,非对照组细胞培养基加入50 ng/ml RANKL向破骨细胞诱导6 d,通过抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色、细胞骨架染色观察破骨细胞形态及活性。结果 ALP染色和茜素红染色显示,与模型组比较,去甲斑蝥素干预组具有更强的碱性磷酸酶活性和更多的矿化结节,可有效改善脂多糖对成骨分化和矿化的抑制作用,增强成骨细胞活性。通过TRAP染色和细胞骨架染色观察,可见与模型组比较,去甲斑蝥素干预后,成熟破骨细胞的数量和面积均显著减少,抑制了破骨细胞分化。结论 去甲斑蝥素能通过剂量依赖性可有效增强成骨细胞活性,促进骨形成,并显著抑制破骨细胞生成,是一种治疗骨质疏松的理想药物。

[关键词] 去甲斑蝥素; 骨质疏松; 成骨细胞; 破骨细胞

Norcantharidin in the treatment of osteoporosis via dual regulation of bone resorption and bone formation in vitro study HUANG Feiri, JIANG Wenbing, SU Zhongliang. Department of Orthopaedics, Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of norcantharidin on the activity of osteoblast and osteoclast, and explore its role in the prevention of osteoporosis. **Methods** The experimental mice was divided into control group, model group, low dose group and high dose group. The high and low dose groups were intervened with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ and 1 $\mu\text{mol/L}$ norcantharidin respectively. Murine pre-osteoblast MC3T3-E1 cells were induced by osteoblast differentiation medium, and other groups were intervened by lipopolysaccharide (LPS). After three weeks, alizarin red staining and Alkaline phosphatase (ALP) staining were employed to detect osteoblast differentiation. Bone marrow-derived macrophages (BMMs) were extracted from C57BL-6J 6-week-old mice. Other groups were added 50 ng/ml RANKL to induce osteoclasts for 6 days. The morphology and activity of osteoclasts were observed by TRAP staining and cytoskeleton staining. **Results** ALP staining and alizarin red staining showed that groups intervened by norcantharidin had higher alkaline phosphatase activity and more mineralized nodules than the model group. TRAP staining and Cytoskeletal staining showed that the number and area of mature osteoclasts were significantly reduced after the treatment with norcantharidin when comparing with the model group. **Conclusion** Norcantharidin can effectively enhance osteoblast activity, promote bone formation and significantly inhibit osteoclastogenesis in a dose-dependent manner. It is an ideal drug for the treatment of osteoporosis.

[Key words] norcantharidin; osteoporosis; osteoblast; osteoclast

骨质疏松症是一种常见的全身性骨骼疾病,与年龄^[1]、性别、遗传^[2]等因素相关,表现为骨骼脆弱和

骨折风险增加,严重影响患者的生活质量。根据国际骨质疏松症基金会,全世界有超过2亿人患有这种疾病,骨质疏松性骨折等相关的发病率和死亡率的成本将是医疗保健系统的一个巨大负担^[3],是一

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.005.007

作者单位: 325000 浙江温州,温州市人民医院骨科

个严重的公共卫生问题。绝经后妇女是罹患骨质疏松症的重要人群,其发病概率远大于男性,主要是由于雌激素缺乏所致。雌激素的缺乏将导致骨吸收与骨生成稳态被打破,造成骨微结构破坏、骨量减少、骨强度下降,从而导致骨质疏松^[4]。因此,通过手术摘除卵巢的方法可有效制备骨质疏松症动物模型^[5]。

去甲斑蝥素是我国传统中药斑蝥素的重要衍生物、蛋白磷酸酶2抑制剂^[6]。现已证实去甲斑蝥素可抑制多种肿瘤细胞增殖,并诱导其凋亡^[7-9]。相关学者已经通过实验抑制蛋白磷酸酶2促进成骨细胞生成^[10]和抑制骨吸收^[11]。本实验旨在探究去甲斑蝥素在体外实验中对骨代谢的影响,为防治骨质疏松提供新的可能。

1 资料与方法

1.1 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞的诱导及分组 本次实验时间为2019年9月至2020年1月。小鼠胚胎成骨细胞前体细胞购自上海中科院细胞库。将鼠胚胎成骨细胞前体细胞以每孔 10×10^4 个接种于24孔板中,24 h后加入含有1%甘油磷酸酯、0.01%地塞米松、0.2%抗坏血酸、1%地高辛胺、1%青霉素和链霉素的成骨培养基。将其分为对照组、模型组、低剂量组和高剂量组,模型组予以10 ng/ml脂多糖干预,低剂量组、高剂量组分别加入 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 浓度的去甲斑蝥素(由北京百奥莱博科技有限公司生产)。3周后进行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色、茜素红染色观察各组成骨变化。

1.2 ALP染色 在成骨培养基中培养3周后,对细胞进行ALP染色。吸去培养基,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤后用4%多聚甲醛中固定15 min, PBS冲洗3次,加入用ALP活性检测试剂盒(MULTI SCIENCES)配制的BCIP/NBT工作液在黑暗中浸泡10 min,然后对染色结果进行显微镜分析。

1.3 茜素红染色 成骨培养基中培养3周后,吸去培养基, PBS洗涤2次,在室温以无水乙醇固定30 min,再次PBS冲洗细胞,缓慢加入2%茜素红S染液(pH 4.2)将细胞染色20 min后,用10%氯化十六烷基吡啶(pH 7.0)孵育,于570 nm处测定分析吸光度。

1.4 小鼠骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMMs)的分离诱导及分组 选取6周的C57BL-6J小鼠,75%酒精浸泡5 min后于无菌条件下分离小鼠股骨和胫骨,剪断股骨两端,并用含有

100 U/ml青霉素、10%胎牛血清和30 ng/ml巨噬细胞集落刺激因子的DMEM培养基冲洗骨髓腔,培养过夜(第0天),24 h后,丢弃悬浮的细胞,将贴壁细胞再培养48 h,即为原代BMMs。将BMMs以每孔 10×10^4 个接种于24孔板中,分为对照组、模型组、低剂量组和高剂量组,18 h后低、高剂量组分别加入 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 浓度的去甲斑蝥素进行预处理。种板24 h后,除对照组外,其他组予以50 ng/ml核因子 κ -B配体受体致活剂刺激诱导破骨细胞分化。培养基每2天更换一次,培养第6天可见破骨细胞形成。

1.5 抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色 BMMs种板后第6天吸去培养基,用37℃预热的PBS洗涤细胞,经4%多聚甲醛固定15 min后加入用破骨细胞TRAP染色试剂盒配制好的孵育液,于37℃避光孵育1 h,吸除孵育液终止染色,再次用预热的PBS洗涤后显微镜观察,含有3个及以上细胞核的TRAP阳性细胞计为成熟破骨细胞。

1.6 细胞骨架染色 将BMMs细胞以每孔 10×10^4 个接种于放有无菌圆形爬片的24孔板中,经50 ng/ml RANKL诱导破骨细胞后第6天,用PBS洗涤2次,在冰上用预冷的4%多聚甲醛固定15 min,用0.1% Triton X-100透化10 min。然后加入ACTI-stain™ 488荧光标记的鬼笔环肽染液,室温置于黑暗中孵育30 min, PBS洗涤3次后,取出爬片,滴加含有DAPI的防荧光淬灭剂并封片。用荧光显微镜观察四组小鼠破骨细胞的肌动蛋白、细胞核和合成的变化。

1.7 统计学方法 图像分析软件采用Image Pro Plus 5.1软件包。采用SPSS 17.0统计学软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析和LSD-*t*检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四组小鼠成骨细胞的ALP染色和茜素红染色,以及破骨细胞的TRAP染色图见封二图1

由封二图1~4可见,与对照组比较,高剂量组和低剂量组在脂多糖处理后成骨细胞ALP染色着色明显减弱,茜素红染色显示极少量的矿化结节,可见去甲斑蝥素可有效改善脂多糖对成骨分化和矿化的抑制作用。与对照组比较,模型组破骨细胞TRAP阳性细胞数明显增多,颜色加深,染色面积明显增加。

2.2 四组的ALP活性矿化结节量化分析见图1

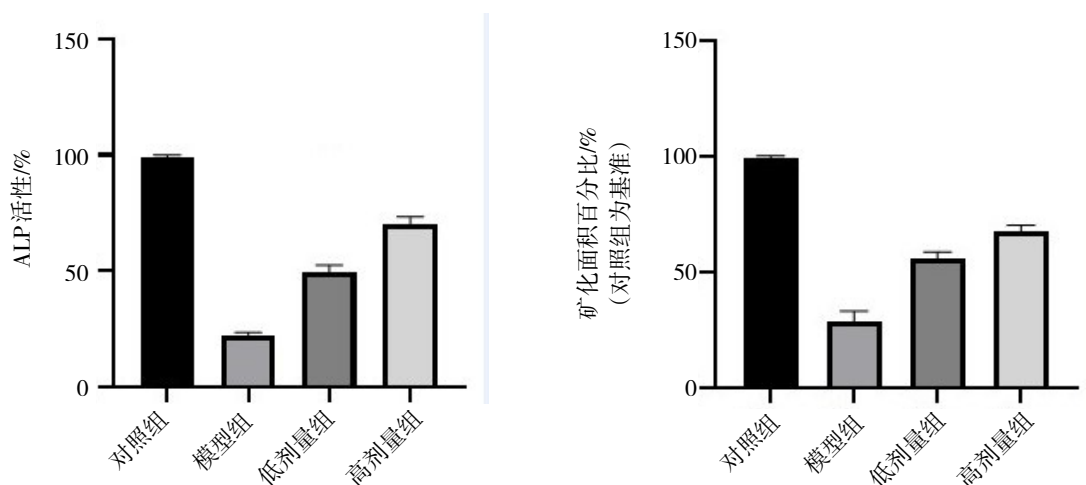


图1 四组ALP活性测定和茜素红染色的矿化结节分析结果

由图1可见,低剂量组和高剂量组的ALP活性及矿化结节面积均明显高于模型组,差异均有统计学意义(LSD-*t* 分别=13.22、23.05; 10.87、15.71, P 均 <0.05)。

2.3 四组破骨细胞的肌动蛋白、细胞核和合成的免疫荧光示意图见封三图5~8

由封三图5~8可见,四组细胞骨架染色结果具有相同的趋势,模型组可见清晰完整的破骨细胞骨架F-actin环,而高剂量组和低剂量组在去甲斑螋素干预后破骨细胞F-actin环形态和大小均降低,完整性下降,且呈现一定的剂量相关性。

2.4 四组破骨细胞计数及TRAP阳性面积见图2

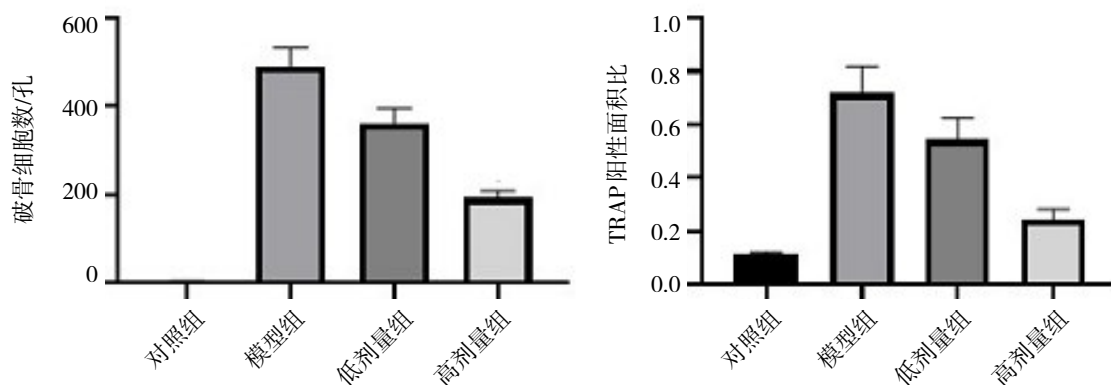


图2 四组破骨细胞计数和Trap阳性面积比较

由图2可见,高剂量组和低剂量组破骨细胞计数和TRAP阳性面积明显低于模型组,差异均有统计学意义(LSD-*t* 分别=7.68、4.49; 17.91、12.14, P 均 <0.05)。

3 讨论

骨质疏松症是一种常见的全身性骨病,骨量和密度下降是本病的主要特征,正常骨代谢是破骨细胞骨吸收和成骨细胞骨形成之间的动态平衡^[12,13],成骨细胞活性降低以及破骨细胞的过度形成和活化是导致骨量和密度下降的主要因素。

蛋白磷酸酶2A是一种主要的丝氨酸/苏氨酸磷

酸酶,是由结构亚单位A、调节亚单位B和催化亚单位C构成的异三聚体,广泛参与DNA复制、转录、翻译及翻译后修饰、细胞周期调节等多种细胞活动过程^[14]。据文献报道,蛋白磷酸酶2A选择性抑制剂可通过抑制RANKL诱导的核因子- κ B和c-Jun N-末端激酶信号通路来抑制破骨细胞生成并减轻破骨细胞的吸收^[15]。去甲斑螋素作为一种蛋白磷酸酶2A抑制剂,本次研究探讨其对小鼠骨微结构的影响及对成骨细胞和破骨细胞活性的作用,探讨其防治骨质疏松症的可行性。

本次研究小鼠成骨细胞ALP染色、茜素红染色

均显示,去甲斑蝥素可减轻脂多糖引起的成骨活性抑制,具有促进成骨细胞活化及矿化的作用,且呈剂量依赖性;另一方面,肌动蛋白纤维是构成细胞骨架的主要部分,被认为是破骨细胞活化的功能性标志物,与破骨细胞的迁移和骨吸收功能密切相关^[16]。通过TRAP染色和细胞骨架染色,去甲斑蝥素在体外剂量依赖性地减少了成熟破骨细胞的数量和面积,降低了破骨细胞肌动蛋白纤维环的大小及完整性,显著抑制了破骨细胞的活性。

综上所述,去甲斑蝥素改善了去势小鼠骨质疏松模型的骨微结构,减少了骨量的丢失,同时可有效增强成骨细胞活性,促进骨质矿化,并抑制破骨细胞的分化,是治疗骨质疏松症的一种潜在选择。

参考文献

- 1 Yu B, Wang CY. Osteoporosis: The result of an "aged" bone microenvironment[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(8): 641-644.
- 2 Gao ST, Lv ZT, Zhou CK, et al. Association between IGF-1 polymorphisms and risk of osteoporosis in Chinese population: A meta-analysis [J]. BMC Musculoskel Dis, 2018, 19(1): 141.
- 3 Kling JM, Clarke BL, Sandhu NP. Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review [J]. J Women's Health (2002), 2014, 23(7): 563-572.
- 4 Khosla S, Monroe DG. Regulation of bone metabolism by sex steroids[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018, 8(1): a031211.
- 5 李延红, 党晓谦, 龚福太. 骨质疏松动物模型的研究进展及文献回顾[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(12): 1956-1961.
- 6 Wang G, Dong J, Deng L. Overview of Cantharidin and its Analogues[J]. Curr Med Chem, 2018, 25(17): 2034-2044.
- 7 Mei L, Sang W, Cui K, et al. Norcantharidin inhibits proliferation and promotes apoptosis via c-Met/Akt/mTOR pathway in human osteosarcoma cells [J]. Cancer Sci, 2019, 110(2): 582-595.
- 8 Han Z, Li B, Wang J, et al. Norcantharidin inhibits SK-N-SH neuroblastoma cell growth by induction of autophagy and apoptosis[J]. Technol Cancer Res Treat, 2017, 16(1): 33-44.
- 9 Yang PY, Hu DN, Kao YH, et al. Norcantharidin induces apoptosis in human prostate cancer cells through both intrinsic and extrinsic pathways [J]. Pharmacol Rep, 2016, 68(5): 874-880.
- 10 Murata T, Shirakawa S, Takehara T, et al. Protein phosphatase inhibitors, okadaic acid and calyculin A, induce alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria[J]. Biochem Mol Biol Int, 1995, 36(2): 365-372.
- 11 Goad DL, Meurer EA, Voelkel EF, et al. Protein phosphatase inhibitors and bone resorption: inhibition by okadaic acid and biphasic actions of calyculin-A[J]. Endocrinology, 1992, 130(6): 3402-3410.
- 12 Li D, Liu J, Guo B, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10872.
- 13 Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: A multitude of signals within the basic multicellular unit[J]. Bonekey Rep, 2014, 3: 481.
- 14 O'Connor CM, Perl A, Leonard D, et al. Therapeutic targeting of PP2A[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 96: 182-193.
- 15 Wang L, Guo X, Zhou W, et al. Protein phosphatase 2A as a new target for downregulating osteoclastogenesis and alleviating titanium particle-induced bone resorption [J]. Acta Biomater, 2018, 73: 488-499.
- 16 McMichael BK, Lee BS. Actin organizing proteins in regulation of osteoclast function[A]. Schatten H. The cytoskeleton in health and disease[M]. New York: Springer, 2015: 337-361.

(收稿日期 2020-01-06)

(本文编辑 蔡华波)