

· 论著 ·

啤酒花活性成分黄腐酚抗骨质疏松作用研究

林柳悦¹, 夏天爽², 蒋益萍², 李常惠², 秦路平^{1,2}, 辛海量² (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 第二军医大学药学院生药教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的** 对黄腐酚在动物及成骨细胞水平上的抗骨质疏松作用进行评价。**方法** 采用去卵巢小鼠骨质疏松模型进行体内药效学验证。运用 Elisa 试剂盒及 Micro-CT 检测方法, 对小鼠血清生化指标及股骨骨密度、骨组织形态学进行评价。同时结合成骨细胞增殖、分化和矿化水平分析, 以及骨形成相关蛋白的 Western blot 检测, 对黄腐酚抗骨质疏松作用进行系统评价。**结果** 在体内药效学研究中, 黄腐酚可显著提高去卵巢小鼠雌激素水平, 降低高骨转换率; 改善骨小梁微环境, 增强骨密度。在成骨细胞水平上, 黄腐酚既可以促进成骨细胞增殖、碱性磷酸酶(ALP)活性以及骨矿化水平, 又可以提高骨桥蛋白(OPN)、骨涎蛋白(BSP)和骨形成蛋白(BMP-2)的表达。**结论** 本研究首次明确了黄腐酚具有抗骨质疏松作用, 为开发治疗骨质疏松的药物提供新的资源。

[关键词] 黄腐酚; 抗骨质疏松; 去卵巢; 成骨细胞

[中图分类号] R151 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)03-0219-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.03.006

Anti-osteoporotic study on xanthohumol, an active ingredient in *Humulus lupulus* L.

LIN Liuyue¹, XIA Tianshuang², JIANG Yiping², LI Changhui², QIN Luping^{1,2}, XIN Hailiang² (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the anti-osteoporotic effect of xanthohumol (XN) in animal and osteoblast. **Methods** The anti-osteoporotic study on XN was performed with ovariectomized mice model. Serum biochemical indexes, bone mineral density (BMD) and bone histomorphology were measured using Elisa kits and Micro-CT analysis. *In vitro* test, the effect of XN on osteoblastic proliferation, differentiation and mineralization were assayed. The expression of protein related to bone formation was measured by Western blot analysis. **Results** *In vivo* experiments, XN significantly increased the estrogen level, reduced the high bone turnover rate, improved the microenvironment and BMD in ovariectomized mice. *In vitro* experiments, XN protected bone loss not only by promoting osteoblastic proliferation, ALP activity and bone mineralization, but also through increasing the expression of osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). **Conclusion** This is the first report to confirm that XN has anti-osteoporotic effect, which provides a new approach for the clinical treatment of osteoporosis.

[Key words] xanthohumol; anti-osteoporosis; ovariectomy; osteoblast

骨质疏松症是一种以骨密度降低和骨微结构破坏为特征, 导致骨质脆性增加和易发生骨折的全身性骨代谢疾病^[1]。由于人口老龄化现象日趋严重,

骨质疏松症病例数快速增长, 骨质疏松症已成为当今社会必须面对的严重的公共健康问题^[2]。目前, 临床上常用的骨质疏松症防治药物可分为骨吸收抑制剂、骨矿化剂和骨形成促进剂, 但这些药物多具有一定的副作用^[3-5], 因此新型抗骨质疏松症药物的研发势在必行。啤酒花 *Humulus lupulus* L. 是桑科葎草属多年生草质蔓生藤本植物, 以未成熟的带花果穗入药, 是新疆药食兼用的特色资源植物。研究表明啤酒花中含有的异戊烯基黄酮类化合物具有植物雌激素样作用, 可与人体内的雌激素受体相结合^[6], 从而起到对抗骨丢失的作用。黄腐酚(xan-

[基金项目] 国家自然科学基金(U1603283)

[作者简介] 林柳悦, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理学, Tel: (021)81871305, Email: linliuyue2016@163.com

[通讯作者] 秦路平, 博士, 教授, 研究方向: 中药资源与品质评价, Tel: (021)81871309, Email: qinluping@126.com; 辛海量, 博士, 副教授, 研究方向: 中药资源、中药(抗骨质疏松)药理学, Tel: (021)81871300, Email: hailiangxin@163.com

thohumol, XN) 是其中的代表性成分, 具有抗氧化、抑制癌细胞增殖^[7]、促进癌细胞凋亡^[8]、抗菌^[9]等活性。笔者采用去卵巢骨质疏松动物模型, 结合成骨细胞相关指标, 对 XN 抗骨质疏松作用进行研究。

1 材料

1.1 实验动物

去卵巢骨质疏松动物模型: 3月龄雌性 ICR 小鼠, 体重(20±2) g, 清洁级。购自上海斯莱克实验动物有限公司。动物饲养于第二军医大学药学院实验动物中心, 室温控制在(24±0.5) °C, 12 h 光照/12 h 黑暗, 自由饮食、饮水。

成骨细胞: 新生 24 h Wistar 大鼠, 购自上海斯莱克实验动物有限公司。所有实验动物均符合实验动物伦理学要求。

1.2 试剂与仪器

黄腐酚(XN, 纯度≥98%, 上海历鼎); 戊酸雌二醇(EV, 拜耳); 雌激素(E₂) Elisa 试剂盒(美国 R&D); 碱性磷酸酶(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)试剂盒(南京建成); 小鼠骨钙素(BGP)、I 型胶原 C 端肽(CTX-I)、脱氧吡啶啉(DPD) Elisa 试剂盒(上海信裕); 胎牛血清、α-MEM 培养基(Gibco); I 型胶原酶、MTT(上海博光); 骨桥蛋白(OPN)、骨涎蛋白(BSP)、骨形成蛋白(BMP-2)抗体(Abcom); 肌动蛋白(β-Actin)内参(CST); 酶标仪(美国 BIO-TEX); Micro-CT(美国 GE); CO₂ 恒温培养箱(日本 Sanyo)。

2 方法

2.1 动物分组及处理

将 3 月龄雌性 ICR 小鼠按体重随机分为假手术组(SHAM, n=6)和手术组(n=24)。水合氯醛麻醉后, 对手术组小鼠实施双侧卵巢摘除术, 假手术组小鼠切除卵巢周围与卵巢体积相似大小的脂肪团, 缝合, 术后给予青霉素预防感染。术后观察 1 周。将手术组小鼠随机分为 4 组: 模型组[OVX, 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)]、阳性药组[EV, 0.2 mg/(kg·d)]、XN 低剂量(XN 30)组[30 mg/(kg·d)]、XN 高剂量(XN 90)组[90 mg/(kg·d)], 每组 6 只。每周称量体重, 按照 0.1 ml/10 g 剂量调整给药体积。每周给药 6 次, 连续给药 12 周。末次给药后, 小鼠禁食、不禁水过夜, 隔天上午称重, 摘除眼球取血, 静置离心, 分装血清待测。剥离小鼠后肢右侧股骨, 剔除附属组织, 浸泡于 4% 多聚甲醛, 用于 Micro-CT 检测。

2.2 手术小鼠的血清生化指标的测定

按照 Elisa 试剂盒说明书要求, 检测血清中 E₂、ALP、BGP、CTX-I、TRAP 及 DPD 含量。

2.3 Micro-CT 检测

取各组小鼠右侧股骨于 Micro-CT 中扫描。扫描分辨率为 14 μm; 旋转角度为 360°; 旋转角度增量为 0.4°; 曝光时间 2 960 ms; 帧平均数为 4。使用骨骼分析软件进行数据分析处理。

2.4 原代成骨细胞分离培养

采用二次消化法从新生 Wistar 大鼠颅盖骨分离得到原代成骨细胞^[9], 用含 10% 胎牛血清的 α-MEM 培养液进行培养, 取 3~4 代成骨细胞进行增殖、分化、矿化检测以及 Western blot 分析。

2.5 成骨细胞增殖实验

将成骨细胞按 1×10³ 个/孔接种于 96 孔板, 24 h 细胞贴壁后更换为含不同浓度 XN 的培养液, 并设置空白对照组。每组设置 6 个复孔, 培养 48 h。采用 MTT 法检测药物对成骨细胞的增殖作用。

2.6 成骨细胞碱性磷酸酶活性测定

将成骨细胞按 1×10⁴ 个/孔接种于 24 孔板, 24 h 细胞贴壁后更换为含不同浓度 XN 的培养液, 并设置空白对照组。每组设置 3 个复孔, 每 2 d 换药一次, 于第 8 天裂解细胞。每孔加入 100 μl 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 收集细胞裂解液, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 按照 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度, 用 PNPP-Na 法测定细胞 ALP 活性^[11]。

2.7 成骨细胞矿化能力测定

将成骨细胞按 1×10⁴ 个/孔接种于 24 孔板, 24 h 细胞贴壁后更换为骨结节诱导液(含 50 μg/ml 抗坏血酸, 10 mmol/L β-甘油磷酸钠, 10 nmol/L 地塞米松), 每 2 d 换液一次, 于第 19 天加入含不同浓度 XN 的骨结节诱导液, 并设置空白对照组。给药 3 次后, 用 4% 多聚甲醛固定, 茜素红染液(pH=8.3)染色, 拍照。然后每孔加入 500 μl 10% 氯化十六烷基吡啶, 使骨结节溶解完全, 吸取 50 μl 溶解液于 96 孔板中, 于 570 nm 处进行吸光度(A)检测。

2.8 成骨细胞骨形成相关蛋白检测

将成骨细胞按 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板, 24 h 细胞贴壁后更换为含不同浓度 XN 的培养液, 并设置空白对照组。每 2 d 换药一次, 于第 8 天裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 进行蛋白定量。蛋白变性后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转膜、封闭后, 依次加入 OPN、BSP、BMP-2 及 β-Actin 抗体, 4 °C 孵育过夜。用洗膜缓冲液(TBST)洗膜 3 次, 加入二抗, 室温孵育 30 min。TBST 再次洗涤后, 采用化学发光

法显色试剂盒检测。

3 结果

3.1 XN 对小鼠体重的影响

各组小鼠给药前体重无显著性差异。去卵巢后,小鼠体重明显增加;而XN能显著抑制去卵巢所致的小鼠体重增加,维持体重的正常值(表1)。

表1 XN对去卵巢小鼠体重的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	给药前体重 (m/g)	给药后体重 (m/g)	体重增加值 (m/g)
SHAM组	28.45±1.42	30.04±1.48*	1.59±1.68**
OVX组	26.05±1.75	32.88±2.91	6.84±1.98
EV组	26.34±2.53	28.10±1.69**	1.76±1.88**
XN 30组	26.45±1.04	28.06±1.08**	1.61±0.73**
XN 90组	27.01±1.50	29.38±0.91**	2.38±1.82**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与OVX组比较

3.2 XN 对小鼠血清生化指标的影响

OVX组小鼠血清 E_2 水平显著降低,ALP、BGP、CTX-I、TRAP及DPD水平明显升高。XN可显著逆转去卵巢小鼠 E_2 水平的降低,抑制ALP、BGP、CTX-I、TRAP及DPD的高表达(表2)。

3.3 Micro-CT 检测

OVX组小鼠股骨ROI区域较SHAM组有明显空洞(图1);骨矿含量(BMC)、骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)及骨小梁数量(Tb.N.)显著降低,骨表面积/骨体积(BS/BV)升高。给药后,XN使去卵巢小鼠的骨微结构得到明显改善,BMD和Tb.N.显著增加(表3)。

3.4 XN 对成骨细胞增殖、分化及矿化的影响

XN在 $1.5 \mu\text{mol/L}$ 浓度下可显著促进成骨细胞增殖及骨矿化水平(图2A、图2C);XN在 5 、 $25 \mu\text{mol/L}$ 浓度下可显著提高成骨细胞ALP活性(图2B)。

表2 XN对去卵巢小鼠血清生化指标的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	E_2 ($\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	ALP (金氏单位/100 ml)	BGP ($\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$)	CTX-I ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	TRAP (U/g prot)	DPD ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
SHAM组	48.604±3.641**	10.159±0.682*	87.290±14.610**	20.760±4.510**	50.796±7.979*	61.000±9.780**
OVX组	39.028±3.228	11.295±0.819	194.610±22.440	40.930±3.540	58.630±8.173	137.570±13.600
EV组	47.637±7.178**	9.948±0.736*	104.270±16.000**	24.440±3.080**	52.030±3.711	70.530±7.880**
XN 30组	49.408±4.781**	10.244±0.870	131.910±14.720**	30.470±2.890**	11.198±7.558**	91.230±7.280**
XN 90组	42.192±6.718	9.331±1.330**	117.020±13.370**	26.800±5.040**	6.591±1.679**	77.280±13.640**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与OVX组比较

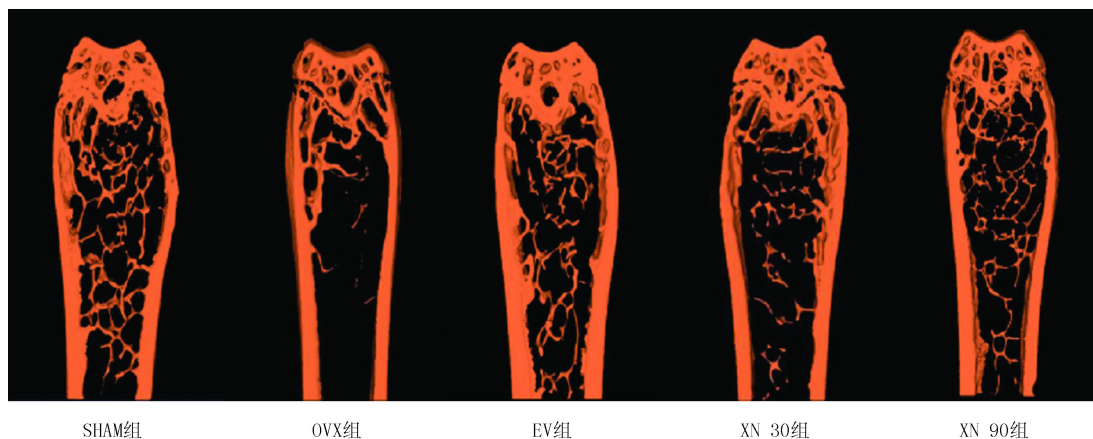


图1 各组小鼠右侧股骨Micro-CT扫描图

3.5 XN 对骨形成相关蛋白表达的影响

XN在给药浓度范围内均可促进OPN、BSP和BMP-2的表达(图3)。

4 讨论

众所周知,雌激素有助于维持骨骼的强度与稳

定。妇女绝经后雌激素水平急剧下降,导致骨转换率升高^[12],易诱发骨质疏松。本研究中,小鼠去卵巢后血清雌激素水平明显降低,骨形成指标ALP、BGP和骨吸收指标TRAP、DPD、CTX-I均显著升高,说明雌激素缺失导致小鼠的骨转换率升高。而骨小梁结构出现明显空洞,以及BMD和Tb.N.显

表3 XN对去卵巢小鼠骨组织参数的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	BMC (m/mg)	BMD (mg/cc)	BV/TV	BS/BV	Tb.N. (1/mm)
SHAM组	0.537±0.115**	212.050±28.640**	0.104±0.013**	54.549±1.139**	2.960±0.221**
OVX组	0.315±0.070	156.838±17.063	0.072±0.011	62.571±2.085	0.235±0.224
EV组	0.497±0.076**	231.981±16.658**	0.110±0.012**	58.353±3.670*	2.928±0.225**
XN 30组	0.414±0.099	184.779±9.915*	0.084±0.009*	59.176±3.411*	2.619±0.196*
XN 90组	0.440±0.075*	177.964±18.874*	0.093±0.010**	59.283±2.833*	2.735±0.239*

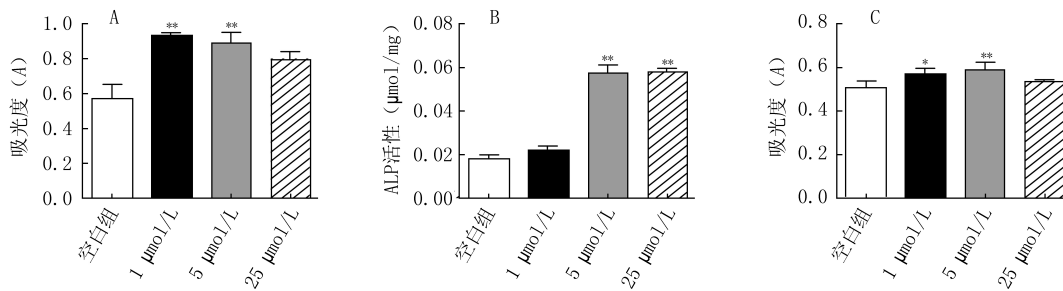
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与OVX组比较

图2 XN对成骨细胞增殖、分化及矿化作用

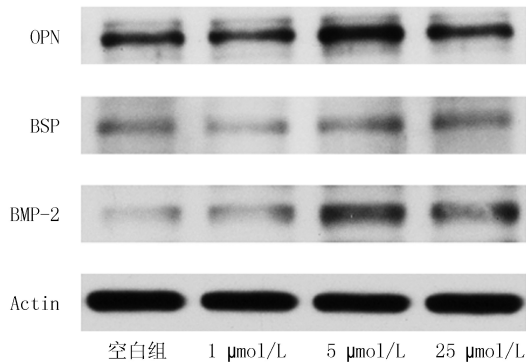
A. MTT吸光度值; B. ALP活性; C. 骨结节吸光度值; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白组比较

图3 XN对骨形成相关蛋白表达的作用

著降低等现象,提示去卵巢小鼠处于典型的骨质疏松状态。给药12周后,XN能够显著提高去卵巢小鼠血清中的雌激素水平,降低骨转换指标水平,抑制高骨转换率。同时,XN使去卵巢小鼠的骨微结构得到明显改善,BMD、BMC明显增加,Tb.N.显著提高,表明XN对雌激素缺失所引起的高转换型骨质疏松症具有防治作用。

成骨细胞是骨组织中最重要功能细胞之一,主要参与骨基质的合成、分泌和矿化^[13]。本研究中,XN可显著促进成骨细胞的增殖,提高成骨细胞ALP活性,促进成骨细胞的骨矿化水平。提示XN可调节骨形成过程的各个阶段:从早期增殖、分化到末期骨基质矿化。此外,OPN、BSP、BMP-2可调节成骨细胞活性,控制骨矿物质的沉淀^[14],同样是反映成骨细胞骨形成和骨转换的关键指标。本研究中

XN可显著提高OPN、BSP和BMP-2的表达,进一步证实了其抗骨质疏松作用。然而,XN抗骨质疏松的具体作用机制尚不明确,有待今后进一步研究。

【参考文献】

- [1] Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis[J]. Am J Med, 1993, 94(6): 646-650.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 20(5): 413-443.
- [3] 王 磊,胡肇衡,陈 玲,等. 口服双膦酸盐用药史对静脉注射唑来膦酸治疗骨质疏松发热不良反应的影响[J]. 北京大学学报(医学版), 2016, 48(4): 680-682.
- [4] 李 华. 唑来膦酸和雷洛昔芬治疗绝经后骨质疏松的疗效和不良反应对比分析[J]. 中国处方药, 2017, 15(5): 56-57.
- [5] Papapoulos S, Lippuner K, Roux C, et al. The effect of 8 or 5 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the FREEDOM Extension study[J]. Osteoporos Int, 2015, 26(12): 2773-2783.
- [6] Stevens JF, Page JE. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! [J]. Phytochemistry, 2004, 65(10): 1317-1330.
- [7] Slawińska-Brych A, Król SK, Dmoszyńska-Graniczka M, et al. Xanthohumol inhibits cell cycle progression and proliferation of larynx cancer cells *in vitro* [J]. Chem Biol Interact, 2015, 240: 110-118.
- [8] Zhang B, Wei C, Peng W, et al. Xanthohumol induces generation of reactive oxygen species and triggers apoptosis through inhibition of mitochondrial electron transfer chain

- complex I[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89(1): 486.
- [9] Gerhäuser C. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49(9): 827.
- [10] 翟远坤,牛银波,潘亚磊,等. 柚皮苷对体外培养乳鼠颅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.
- [11] 张乃丹. 基于分子对接策略的熟地黄防治糖尿病性骨质疏松症有效成分及其作用机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
- [12] Carson JA, Manolagas SC. Effects of sex steroids on bones and muscles: similarities, parallels, and putative interactions in health and disease[J]. *Bone*, 2015, 80(1): 67-78.
- [13] 童安莉,陈璐璐,丁桂芝. 成骨细胞骨形成机制研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 1999(3): 63-67.
- [14] Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions [J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 343(2): 289-302.
- [收稿日期] 2018-03-20 [修回日期] 2018-04-27
[本文编辑] 李睿旻

(上接第218页)

细胞的药物泵出,从而影响药物的吸收。将CS组作用后的细胞中ABC家族转运蛋白表达基因的变化与PNS组比较,共有5个ABC家族基因发生了显著下调。而对于其他组,ABC家族基因均未发生显著变化。在PNS透膜吸收过程中,CS对ABC家族蛋白基因的表达有较为显著的影响,能够抑制ABC蛋白的表达,CS能够抑制PNS吸收中的外排作用,从而促进其吸收,而HPMC和Car对PNS外排作用无显著抑制效果。

在对ABC和SLC两大转运蛋白编码基因的变化进行分析时发现,CS和Car在提高PNS的透膜吸收的过程中改变了SLC转运蛋白编码基因的表达,HPMC对SLC家族基因表达无显著影响。分析作用后的ABC家族基因的变化,Car和HPMC对PNS吸收过程中ABC家族基因表达无显著影响,CS能使ABC家族基因发生显著下调,因此,CS促吸收另一个原因可能为抑制PNS吸收过程中的外排作用。通过基因芯片实验,得到了很多转运蛋白基因变化趋势,但是这些蛋白的表达变化也存在相互调控,还需进一步设计实验对本研究结果进行完善。

【参考文献】

- [1] Liu L, Ning B, Cui J, et al. miR-29c is implicated in the cardioprotective activity of Panax notoginseng saponins against isoproterenol-induced myocardial fibrogenesis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 1-4.
- [2] Wu JH, Leung GPH, Kwan YW, et al. Suppression of diet-induced hypercholesterolaemia by saponins from Panax notoginseng in rats[J]. *J Funct Foods*, 2013, 5(3): 1159-1169.
- [3] Zhou N, Tang Y, Keep RF, et al. Antioxidative effects of Panax notoginseng saponins in brain cells [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(10): 1189-1195.
- [4] Fan JS, Liu DN, Huang G, et al. Panax notoginseng saponins attenuate atherosclerosis via reciprocal regulation of lipid metabolism and inflammation by inducing liver X receptor alpha expression[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(3): 732-738.
- [5] Xu L, Liu JT, Liu N, et al. Effects of Panax notoginseng saponins on proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 226-230.
- [6] Li Y, Zhang Y, Zhu CY. Pharmacokinetics and correlation between in vitro release and in vivo absorption of bio-adhesive pellets of panax notoginseng saponins [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(2): 142-151.
- [7] 张运,朱春燕. 生物黏附材料对三七总皂苷肠吸收的影响[J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(14): 1215-1220.
- [8] Feng H, Chen W, Zhu C. Pharmacokinetics study of bio-adhesive tablet of Panax notoginseng saponins [J]. *Int Arch Med*, 2011, 4(1): 18.
- [9] 黄聪. 微阵列技术在基因表达分析中的应用[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2010, 13(3): 475-476.
- [10] 廖晓波,周新民,杨进福,等. 应用基因微阵列初步研究风湿性心脏病所致心力衰竭的基因表达谱[J]. *中国循环杂志*, 2009, 24(3): 217-220.
- [11] Khan S, Elshaer A, Rahman AS, et al. Genomic evaluation during permeability of indomethacin and its solid dispersion [J]. *J Drug Target*, 2011, 19(8): 615-623.
- [12] Khan S, Elshaer A, Rahman AS, et al. Systems biology approach to study permeability of paracetamol and its solid dispersion [J]. *Int J Pharm*, 2011, 417(1-2): 272-279.
- [13] Schlessinger A, Matsson P, Shima JE, et al. Comparison of human solute carriers [J]. *Protein Sci*, 2010, 19(3): 412-428.
- [14] Yang YH, Dudoit S, Luu P, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(4): e15.
- [收稿日期] 2017-06-26 [修回日期] 2018-01-20
[本文编辑] 陈盛新