



冬虫夏草提取液抑制破骨细胞分化与缓解去卵巢小鼠骨量流失的研究

彭伟彪, 王婷, 冯旭, 汪家春, 张阵阵, 储智勇

Cordyceps sinensis extract protects against the ovariectomy-induced bone loss via the action on osteoclasts

PENG Weibiao, WANG Ting, FENG Xu, WANG Jiachun, ZHANG Zhenzhen, CHU Zhiyong

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202105037>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

维生素K对成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收的影响

Effects of vitamin K on osteoblastic bone formation and osteoclastic bone absorption

药学实践杂志. 2020, 38(4): 340-345 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202001077

异烟肼致肝损伤发病机制的研究进展

Research progress on the pathogenesis of isoniazid induced liver injury

药学实践杂志. 2019, 37(4): 289-293 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.001

抑郁症致病机制及中药治疗抑郁症的机制研究

Pathogenesis of depression and the mechanism research in TCM treatment of major depression

药学实践杂志. 2018, 36(3): 193-197 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.03.001

啤酒花经抗氧化途径减轻A β 损伤成骨细胞作用研究

Hops extract alleviates A β -injury to osteoblasts through antioxidant pathway

药学实践杂志. 2021, 39(6): 509-514 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202103018

心脑血管疾病的治疗新策略: 激活压力感受性反射

New strategy for cardio-cerebrovascular diseases: baroreflex activation therapy

药学实践杂志. 2017, 35(4): 294-297,345 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.002

复方滋阴颗粒对去卵巢大鼠性激素和氧化应激水平的影响

Effects of compound Ziyin granule on sex hormones and oxidative stress levels of ovariectomized rats

药学实践杂志. 2020, 38(5): 431-434 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.201912023



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

冬虫夏草提取液抑制破骨细胞分化与缓解去卵巢小鼠骨量流失的研究

彭伟彪^{1,2}, 王 婷^{1,2}, 冯 旭¹, 汪家春¹, 张阵阵¹, 储智勇^{1,2} (1. 海军特色医学中心, 上海 200433; 2. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004)

[摘要] 目的 探讨冬虫夏草提取液(*Cordyceps sinensis* extract, CSE)对去卵巢小鼠骨量流失的保护作用以及对核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)诱导的破骨细胞分化及其功能的影响。方法 从C57BL/6小鼠骨髓中提取巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMMs);在破骨细胞分化过程中,加入CSE干预处理,通过抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色分析破骨细胞数量;将接近成熟的破骨细胞种于羟基磷灰石板,观测骨陷窝面积;使用DAPI和鬼笔环肽对破骨细胞肌动蛋白环(F-actin)进行染色,观测环内细胞核数量和环形态;使用q-PCR检测DC-STAMP、ATP6V0d2、TRAP、CTSK、NFATc1的表达;使用Western blot检测MAPK通路蛋白的表达;构建去卵巢小鼠,每天灌胃给予CSE,治疗6周取小鼠股骨进行形态学分析以及ELISA检测外周血中骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(BGP)、TRAP含量。结果 CSE显著性地抑制了破骨细胞的分化,且呈剂量依赖性;并且主要作用于破骨细胞分化的早期阶段;也抑制了F-actin环的形成,减少了骨陷窝面积;同时抑制DC-STAMP、ATP6V0d2、TRAP、CTSK、NFATc1的表达和MAPK通路JNK、ERK和P38的激活;CSE治疗也可减缓小鼠的骨量流失,提高血清中ALP、BGP含量,降低TRAP含量。结论 CSE通过抑制MAPK通路激活,从而抑制破骨细胞分化及其功能,并对去卵巢小鼠的骨量流失具有良好的保护作用。

[关键词] 冬虫夏草提取液;破骨细胞;分化;功能;机制;去卵巢小鼠

[文章编号] 2097-2024(2023)02-0097-09

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202105037

Cordyceps sinensis extract protects against the ovariectomy-induced bone loss via the action on osteoclasts

PENG Weibiao^{1,2}, WANG Ting^{1,2}, FENG Xu¹, WANG Jiachun¹, ZHANG Zhenzhen¹, CHU Zhiyong^{1,2} (1. Naval Medical Center of the PLA, Shanghai 200433, China; 2. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of *Cordyceps sinensis* extract (CSE) on osteoporosis and RANKL-mediated osteoclastogenesis. **Methods** Bone marrow-derived macrophages (BMMs) was isolated from the bone marrow of C57BL/6 mice. CSE was added in osteoclast differentiation. Osteoclasts were stained by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). The nearly mature osteoclasts were planted on hydroxyapatite plates and the area of bone lacunae was observed by microscope. The F-actin belt was stained by DAPI and phalloptide and the number of nuclei was observed by confocal microscopy. The expressions of DC-STAMP, ATP6V0D2, TRAP, CTSK, and NFATC1 were detected by q-PCR. The protein expression of the MAPK pathway was detected by Western Blot. The in vivo experiments were carried out by administering CSE to the ovariectomized mice daily through gavage. After 6 weeks of intervention, mouse femurs were taken for morphological analysis. Peripheral blood was taken for ELISA. **Results** CSE represses osteoclastogenesis, bone resorption, F-actin belts formation, osteoclast specific gene expressions and MAPK signaling pathways in vitro. In vivo study indicated that CSE prevents OVX-induced osteoporosis and preserves bone volume by repressing osteoclast activity and function. It also increases the serum ALP, BGP content, and reduces TRAP content. **Conclusion** CSE can attenuate osteoclast formation and OVX-induced osteoporosis, suggesting potential clinical therapeutic effects for osteoporosis.

[Key words] *Cordyceps sinensis* extract; osteoclast; differentiation; function; mechanism; ovariectomized mice

[基金项目] 上海市科学技术委员会技术标准专项项目(16DZ0501400);海军医学研究所基金(16A008)

[作者简介] 彭伟彪,硕士研究生,研究方向:中药药理,Email: 18296550931@163.com

[通信作者] 储智勇,副研究员,研究方向:中药药理,Email: zhiyongchuleader@163.com;张阵阵,副研究员,研究方向:军事药学,Email: zz_jane@163.com

骨质疏松症是一种全身性骨代谢疾病,其典型特征是骨密度下降、骨脆性增加和骨微环境被破坏^[1]。骨稳态失衡是其发生的主要病理学基础。骨稳态是指成骨细胞行使的骨形成功能和破骨细胞行使的骨吸收功能处在一个相对平衡的过程^[2]。破骨细胞分化及其功能的过度活化是导致骨稳态失衡的重要因素^[3]。中国骨质疏松症流行病学调查显示,我国50岁以上人群骨质疏松发病率为19.2%,65岁以上人群发病率为32%^[4]。目前临床上治疗骨质疏松症的药物主要是骨吸收抑制剂,其在抑制骨吸收的同时,也干扰骨形成进程。因而发掘更好的治疗骨质疏松的药物是迫切需要的。

骨髓来源的巨噬细胞(BMMs)向破骨细胞分化需要重组小鼠巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)的持续刺激^[5]。M-CSF增加了早期BMMs的增殖,RANKL与受体RANK结合激活肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6),进而激活细胞凋亡信号调节激酶1(ASK1)和NF- κ B抑制物激酶(IKKs),活化的ASK1和IKKs磷酸化JNK、ERK和P38以及NF- κ B特异性抑制因子I κ B特定部位的丝氨酸,激活MAPK和NF- κ B信号。活化的MAPK和NF- κ B使c-Fos、NFATc1表达增加,促进DC-STAMP、ATP6V0d2、TRAP、CTSK等破骨细胞特异性基因的转录与表达,导致破骨细胞分化^[6]。研究表明,减弱破骨细胞分化及功能,能够有效地治疗骨质疏松症^[7]。

冬虫夏草是一味传统中药,有增强免疫、抗炎、抗氧化和延缓衰老等作用^[8]。先前的研究表明,富含锶的冬虫夏草菌丝发酵液对去卵巢骨质疏松大鼠有良好的治疗效果,其机制是提高了血清中的雌二醇水平,但是该研究仅基于整体水平解释了冬虫夏草作用于骨质疏松症的机制,对冬虫夏草的菌种也未作鉴定,并且野生的冬虫夏草提取液在骨质疏松症中的作用也未见报道^[9-11]。本研究旨在探讨冬虫夏草提取液(CSE)对去卵巢小鼠的治疗作用以及对破骨细胞分化和功能的影响,为CSE防治骨质疏松症提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF级雌性C57BL/6小鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司),12周龄24只,6周龄7只,体质量20~22g,合格证号:SCXK(沪)2018-0006。本实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准(批号JZLLSC2019-0194),且遵循中国伦理委员

会指导原则。

1.2 试剂

α -MEM培养基(美国Hyclone,批号:SH30265.01);胎牛血清(美国Gibco,批号:10099-141);重组小鼠RANKL、M-CSF蛋白(美国R&D,批号:462-TEC-010、416-ML-010);TRAP染色试剂盒(浙江卓腾生物公司);RNAiso Plus、TB Green(日本Takara,批号:9109、RR420B);p-JNK、JNK、p-ERK1/2、ERK1/2、p-P38、P38和GAPDH兔单克隆抗体(美国CST,批号:4668、9252、4370、4695、4511、8690、5174);山羊抗兔IgG H&L(IRDye®800CW)预吸附二抗(美国Abcam,批号:ab216773);冬虫夏草(上海雷允上药业有限公司);羟基磷灰石涂板/96孔板(美国Corning,批号:3989);小鼠抗酒石酸性磷酸酶、骨钙素、骨碱性磷酸酶ELISA试剂盒(上海生工,批号:D721140、D721126、D721049)。

1.3 仪器

371型细胞培养箱(美国Thermo);Cytation 5多功能酶标仪(美国Bio-Tek);CFX96型实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad);SA型近红外双色激光成像系统(美国odyssey);TI-SR型倒置显微镜(日本Nikon);RM2016型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);JB-P5型包埋机(武汉俊杰)。

2 方法

2.1 CSE制备

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)药材产地为青海玉树,购自上海雷允上药业有限公司,经海军军医大学黄宝康教授鉴定。提取详情见引文^[12]。

2.2 BMMs分离与培养

选取6周龄C57BL/6小鼠,使用颈椎脱臼法处死,取双侧股骨和胫骨,使用PBS将骨髓从骨髓腔中冲出,收集PBS并离心,弃上清液,使用 α -MEM培养基重悬,于T75培养瓶内(含10%血清,1%青霉素-链霉素溶液及30ng/ml M-CSF完全培养基)培养3d。使用PBS清洗去除未贴壁细胞,加入适量新鲜完全培养基,直至细胞数量达到 5×10^6 个^[13]。

2.3 CCK-8法检测BMMs细胞活性

在96孔板中,BMMs以 8×10^3 个/孔的密度接种,孵育过夜;分别加入0、0.125、0.25、0.5、1、2、4mg/ml CSE干预处理,培养48h或96h,加入CCK-8检测液,37℃孵育1h后在波长480nm处检测吸光度。

2.4 体外破骨细胞分化实验

在96孔板中,BMMs以 6×10^3 个/孔的密度接

种, 孵育过夜; 分别加入 0、0.5、1、2 mg/ml CSE 干预处理, 同时加入 50 ng/ml RANKL 和 30 ng/ml M-CSF, 阴性对照组不加入 RANKL; 每 2 d 更换一次培养基, 直至第 5 天对破骨细胞进行 TRAP 染色。

将同样密度的 BMMs 接种于 96 孔板, 孵育过夜; 记过夜后为第 1 天, 分别于第 1、3、5 天加入 1 mg/ml CSE 干预处理, 每 2 d 更换一次培养基至第 7 天(仅加药 1 次, 之后更换培养基均不加 CSE), 进行 TRAP 染色^[14]。

2.5 F-actin 环染色和骨吸收实验

在 96 孔板中, BMMs 以 6×10^3 个/孔的密度接种, 孵育过夜; 分别加入 0、0.5、1、2 mg/ml CSE 干预处理, 同时加入 50 ng/ml RANKL 和 30 ng/ml M-CSF, 每 2 d 更换一次培养基。第 5 天用鬼笔环肽和 DAPI 分别对 F-actin 环和细胞核进行染色。

骨吸收实验: BMMs 以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板, 孵育过夜; 加入含 50 ng/ml RANKL 和 30 ng/ml M-CSF 完全培养基, 每 2 d 换液, 至第 4 天出现小的破骨样细胞, 胰酶消化以 8×10^3 个/孔密度重新接种至羟基磷灰石涂板内, 并且加入 0、0.5、1、2 mg/ml CSE 处理。培养 3 d 后, 用次氯酸钠洗去细胞, PBS 清洗后晾干, 于光学显微镜下拍照, 统计每个孔的骨陷窝面积^[15]。

2.6 q-PCR 检测

在 12 孔板中, BMMs 以 5×10^4 个/孔的密度接种, 孵育过夜; 分别加入 0、0.5、1、2 mg/ml CSE 干预处理, 同时加入 50 ng/ml RANKL 和 30 ng/ml M-CSF, 每 2 d 更换一次培养基至第 5 天。抽提 RNA, 逆转录后使用 q-PCR 检测 DC-STAMP、ATP6V0d2、TRAP、CTSK、NFATc1 基因的表达, 引物序列详情见引文^[16]。

2.7 蛋白印迹法检测

在 6 孔板中, BMMs 以 5×10^5 个/孔的密度接种, 孵育过夜; 使用无血清的 α -MEM 培养基饥饿细胞 1 h, 实验组更换含 1 mg/ml 的 CSE 的完全培养基, 对照组更换含相同体积 PBS 的完全培养基, 孵育 3 h; 均使用 50 ng/ml RANKL 刺激 5、10、20、30、60 min, 未被刺激的细胞作为 0 min。刺激完成后, 抽提总蛋白。经 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 4 °C 下一抗孵育过夜, 室温下荧光素偶联的二抗孵育 1 h, 用 odyssey 成像系统扫描, 分析 JNK(1 : 2000)、p-JNK(1 : 2000)、ERK(1 : 2000)、p-ERK(1 : 2000)、P38(1 : 2000)、p-P38(1 : 2000) 的表达。

2.8 动物造模、分组及给药

在 24 只 12 周龄小鼠中随机挑选 6 只作为假手术组(Sham 组), 其余小鼠使用异氟烷气麻, 去除背部毛发, 切开皮肤和背膜, 使卵巢暴露, 切除双侧卵巢并使用可吸收缝合线结扎、缝合(假手术组仅切开背部皮肤和腹膜)^[14]。术后 1 周, 按照文献报道方法^[17], 将卵巢切除小鼠随机分为 3 组: 模型组(OVX 组)、CSE 低剂量组、CSE 高剂量组, 每组 6 只。术后 7 d 开始给药, 由预实验确定给药浓度为 312.5 和 625 mg/kg, 按照每只 200 μ l/d 连续灌胃给药 6 周。

2.9 HE 染色和 TRAP 染色

小鼠处死后取双侧股骨, 4% 多聚甲醛固定后进行脱钙处理, 之后常规脱水、石蜡包埋, 切成 4 μ m 切片, 分别进行 HE 染色和 TRAP 染色。统计破骨细胞数量/骨表面积(N. Oc/BS)、破骨细胞面积/骨表面积(Oc. S/BS)和骨体积/组织体积(BV/TV)。

2.10 ELISA 法检测血清生化指标

小鼠处死前统一摘除小鼠左眼取血, 将全血收集并在 4 °C 静置 30 min, 之后在 4 °C 下 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液置于 -80 °C 冰箱中保存。按照 Elisa 试剂盒《用户操作手册》检测血清中 TRAP、ALP、BGP 含量。

2.11 统计学方法

使用 Image J 统计破骨细胞面积和个数、F-actin 环面积和环内核数、骨陷窝面积、蛋白条带灰度值、N. Oc/BS、Oc. S/BS 和 BV/TV。使用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较使用方差分析, 以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 CSE 对 BMMs 细胞活力的影响

CCK-8 结果显示, 与空白组比较, CSE 浓度范围在 0.125 ~ 4 mg/ml 时, 48 h 内和 96 h 内 CSE 对 BMMs 无细胞毒性(图 1)。据此结果选择 0.5、1、2 mg/ml 作为之后的细胞实验浓度。

3.2 CSE 对 RANKL 诱导的破骨细胞分化的影响

TRAP 染色显示, 与空白组比较, RANKL 组的 BMMs 分化为成熟的 TRAP 阳性多核巨噬细胞(有完整的圆形状细胞形态且细胞核数目 ≥ 3)。与 RANKL 组比较, CSE 不同剂量组的 TRAP 阳性多核巨噬细胞数量明显减少, 且呈剂量依赖的方式下降, 并且破骨细胞的大小也被显著抑制(图 2A-

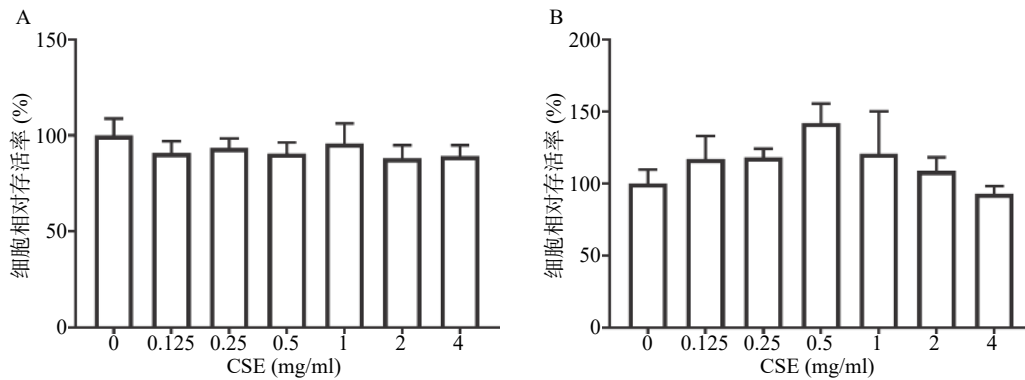


图1 CSE对BMMs细胞活力的影响(n=3)

A.CSE处理48h后的BMMs细胞相对存活率;B.CSE处理96h后的BMMs细胞相对存活率

C)。结果表明CSE不仅抑制破骨细胞的分化也阻碍了破骨细胞前体细胞的融合。

在RANKL持续刺激的BMMs中按时段加入CSE。染色结果显示,与空白组比较,0d组的BMMs几乎全部分化为成熟的破骨细胞,数量多,且形状完整。与0d组比较,给予CSE1~3d组的BMMs分化为成熟破骨细胞的数量最少,3~5d组其次,5~7d组最多(图2D、2E、2F)。结果表明CSE对破骨细胞生成的任一阶段均有作用,在早期阶段作用最为明显。

3.3 CSE对RANKL诱导的破骨细胞F-actin环形成和骨吸收功能的影响

鬼笔环肽和DAPI染色显示,RANKL组的F-actin环形成完整,数量多且面积大,环内细胞核数量多。与RANKL组比较,CSE不同剂量组的F-actin环数量和大小均下降,环内细胞核数量也明显减少(图3A、3B、3C)。

骨板吸收显示,RANKL组未被吸收面积为70%,1mg/ml CSE组未被吸收面积为85%,2mg/ml CSE组为95%,与RANKL组比较,不同剂量的CSE均有效的减少了骨板吸收的面积(图3D、3E)。结果表明CSE显著抑制了成熟破骨细胞骨吸收的功能。

3.4 CSE对RANKL诱导的破骨细胞特异性基因表达的影响

q-PCR结果显示,与RANKL组比较,CSE中、高剂量组显著性地抑制了破骨细胞特异性基因TRAP、CTSK、ATP6V0d2、DC-STAMP和NFATc1的表达,且呈剂量依赖性(图4)。这与CSE抑制破骨细胞分化及功能的结果相一致。

3.5 CSE对破骨细胞分化过程中MAPK通路的影响

Western-blot结果显示,RANKL组各时间段JNK、ERK和P38蛋白磷酸化显著。与RANKL

组比较,CSE组p-JNK蛋白表达在第10~30min明显下降,p-ERK蛋白表达在第20~60min明显下降和p-P38蛋白表达在第10~60min明显下降,见图5。结果表明在破骨细胞的分化过程中,CSE作用于MAPK通路JNK、ERK和P38的磷酸化。

3.6 CSE对卵巢切除小鼠的影响

HE和TRAP染色显示,与假手术组比较,OVX组小鼠的骨小梁数目和面积明显减少(BV/TV值下降)且间距变大,骨小梁表面破骨细胞数量增多、面积变大(N.Oc/BS、Oc.S/BS值上升)。与OVX组比较,CSE低剂量和高剂量组小鼠的骨小梁数目和面积均增加(BV/TV值上升)且间距减小,骨小梁表面破骨细胞数量减少、面积变小(N.Oc/BS、Oc.S/BS值下降),见图6。结果表明,CSE可以增加卵巢切除小鼠骨小梁数目,抑制破骨细胞活性,缓解骨量流失。

3.7 CSE对TRAP、ALP、BGP含量的影响

ELISA结果显示,与假手术组比较,OVX组小鼠血清中的TRAP含量明显增加,BGP含量明显减少,ALP含量无明显变化;CSE高剂量组小鼠血清中的TRAP、BGP含量无明显变化,ALP含量明显增加。与OVX组比较,CSE低剂量和高剂量组小鼠血清中的ALP、BGP含量明显增加,TRAP含量明显减少(图7)。结果表明,CSE可以调节骨代谢相关指标,具有平衡骨稳态作用。

4 讨论

骨质疏松症是一种与年龄相关的骨代谢疾病,骨重建失衡是其发生的主要原因,因绝经造成的骨质疏松占骨质疏松症的绝大部分。研究表明,雌激素对骨骼的生长、发育和维持至关重要,因雌激素缺失致使RANKL介导的信号通路过度活化,进而使破骨细胞功能异常,是绝经后骨质疏松症主要原

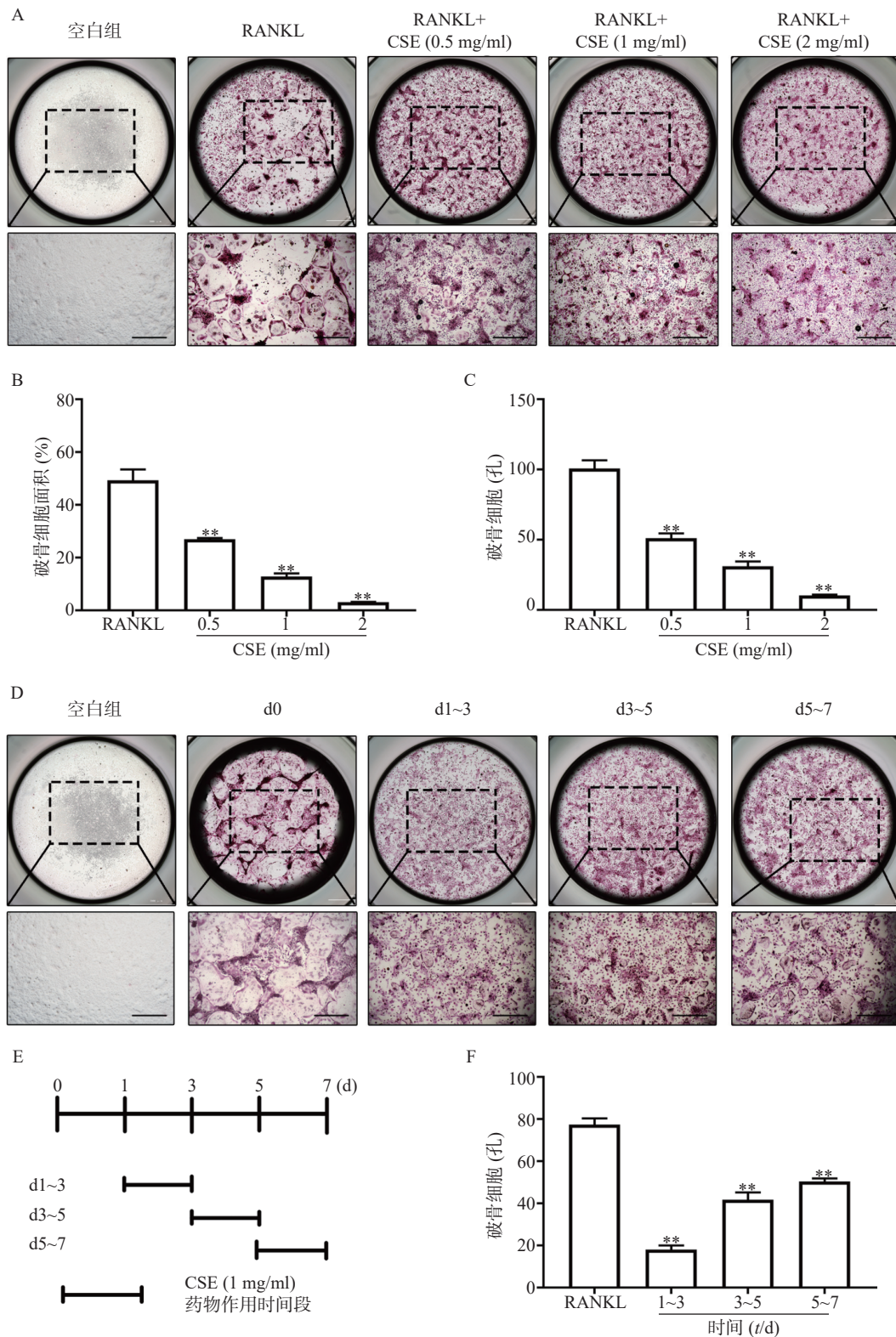


图2 CSE对破骨细胞分化的影响(n=3)

A.破骨细胞图像($\times 40$); B.每孔 TRAP 阳性多核细胞(细胞核数 ≥ 3)面积百分比; C.每孔 TRAP 阳性多核细胞(细胞核数 ≥ 3)个数; D.不同时间段加入 CSE 处理后的破骨细胞图像($\times 40$); E.加药时间示意图; F.每孔 TRAP 阳性多核细胞(细胞核数 ≥ 3)个数

** $P < 0.01$, 与 RANKL 组比较

因^[18]。因而抑制破骨细胞的分化及其功能是治疗骨质疏松的有效途径^[19]。在本研究中,我们发现 CSE 通过抑制 MAPK 信号通路的激活来抑制

RANKL 介导的破骨细胞生成,同时对 OVX 小鼠的骨质流失具有良好的保护作用。

研究表明,在 RANKL 的刺激下, BMMs 中的

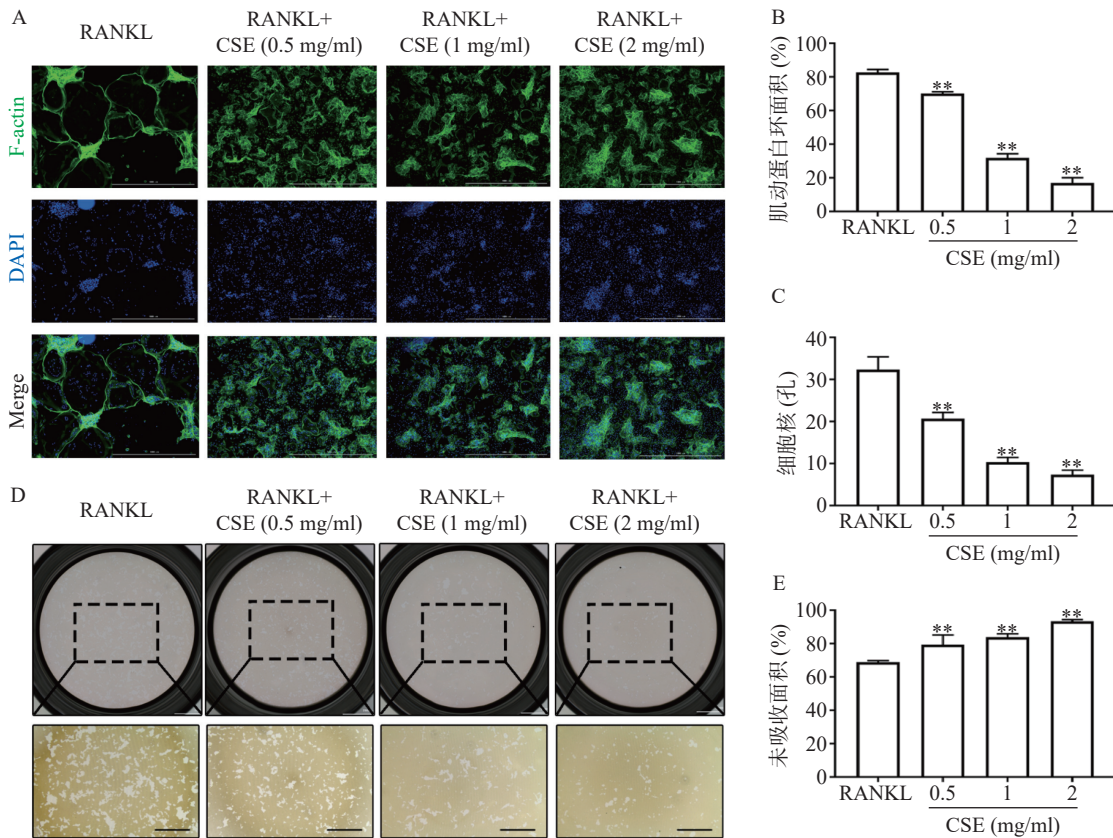


图3 CSE对破骨细胞F-actin环形成和骨吸收功能的影响 (n=3)

A.F-actin环和细胞核共聚焦图像(×100); B.每孔内F-actin环面积百分比; C.单个F-actin环内细胞核个数; D.骨陷窝图像(×40); E.每孔未吸收面积百分比

**P<0.01, 与RANKL组比较

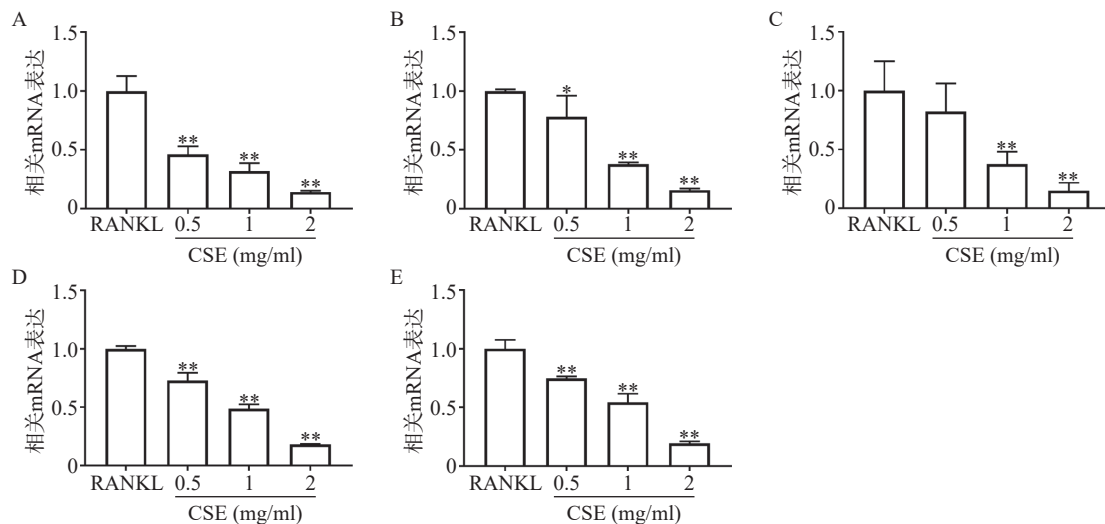


图4 CSE对破骨细胞特异性基因表达的影响 (n=3)

A.TRAP; B.CTSK; C.ATP6V0d2; D.DC-STAMP; E.NFATc1

*P<0.05, **P<0.01, 与RANKL组比较

MAPK 通路被激活, 进而刺激破骨细胞特异性基因的表达, 促进 BMMs 分化为破骨细胞^[19-21]。NFATc1 和 DC-STAMP 是破骨细胞分化和前体破骨细胞融合的主要调控者, TRAP、CTSK、ATP6V0d2 是反映破骨细胞活性和骨吸收状态的特异性指标^[22-23]。

研究表明, CSE 显著抑制 RANKL 介导的破骨细胞分化, 而且在破骨细胞分化的早期阶段作用最为明显。其机制是抑制 JNK、ERK 和 P38 的激活, 进而抑制破骨细胞特异性基因的表达。

F-actin 环是分化成熟的破骨细胞在骨面上极

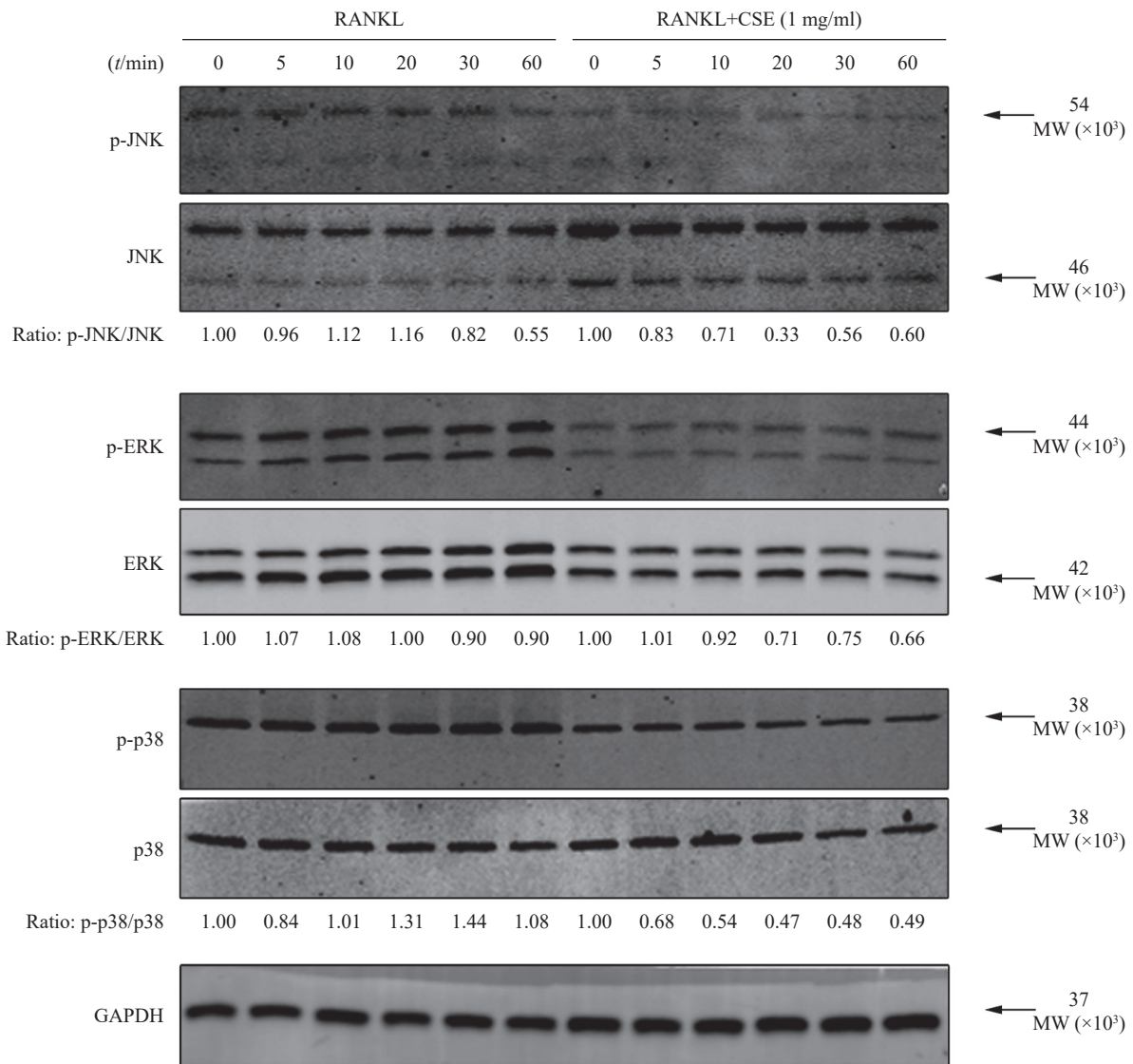


图5 CSE对p-JNK、JNK、p-ERK、ERK、p-P38、P38蛋白表达的影响

化,使骨架重排,F-actin 紧密排列形成的一个环,是破骨细胞进行骨吸收的先决条件。因而阻碍破骨细胞前体细胞的融合,能够有效抑制 F-actin 环的形成和骨吸收功能^[24]。本研究发现 CSE 显著性地抑制 F-actin 环的形成,并降低了环内细胞核数以及骨陷窝面积,这表明 CSE 阻碍了破骨细胞前体细胞的融合和骨吸收功能,与 CSE 抑制破骨细胞分化及其特异性基因表达的结果相一致。

我们构建了去卵巢小鼠模型模拟绝经后的骨质疏松症,经 CSE 灌胃给药 6 周后,采用 HE 和 TRAP 染色对小鼠股骨进行骨组织形态学分析以及 ELISA 检测血清中 ALP、TRAP、BGP 含量。TRAP 是酸性磷酸酶的同工酶,其血清浓度可反映破骨细胞的活性^[25]。ALP 是一种磷酸单酯酶,由成骨细胞分泌,能有效地反映成骨细胞的活性^[27]。BGP 由成骨细胞合成及分泌,绝大部分的 BGP 随

成骨细胞矿化在骨基质中沉积,仅有一小部分进入到血液循环^[14]。血液中的 BGP 是成骨细胞分泌完成后直接进入血液,并非是破骨细胞降解骨基质而进入血液,因而检测血液中的 BGP 含量,对评判机体经药物治疗后变化有较大的参考价值。结果显示,CSE 能有效缓解骨量丢失,表现在 CSE 各剂量组小鼠的骨小梁数量增多,间距减少,以及骨表面破骨细胞数量和面积减少,表明了 CSE 对去卵巢小鼠的骨量流失具有良好的保护作用。同时 CSE 提高了血清中 ALP 含量,使 BGP 和 TRAP 含量回归正常水平,说明其可抑制破骨细胞分化,减弱骨吸收功能,具有缓解骨量流失和调节骨代谢作用。

总之,本研究发现 CSE 在体外抑制了 RANKL 诱导的破骨细胞分化及其骨吸收功能,其可能机制部分归因于 CSE 抑制了级联信号中 ERK、JNK 和 P38 的激活,在体内有效的缓解了因卵巢切除造成

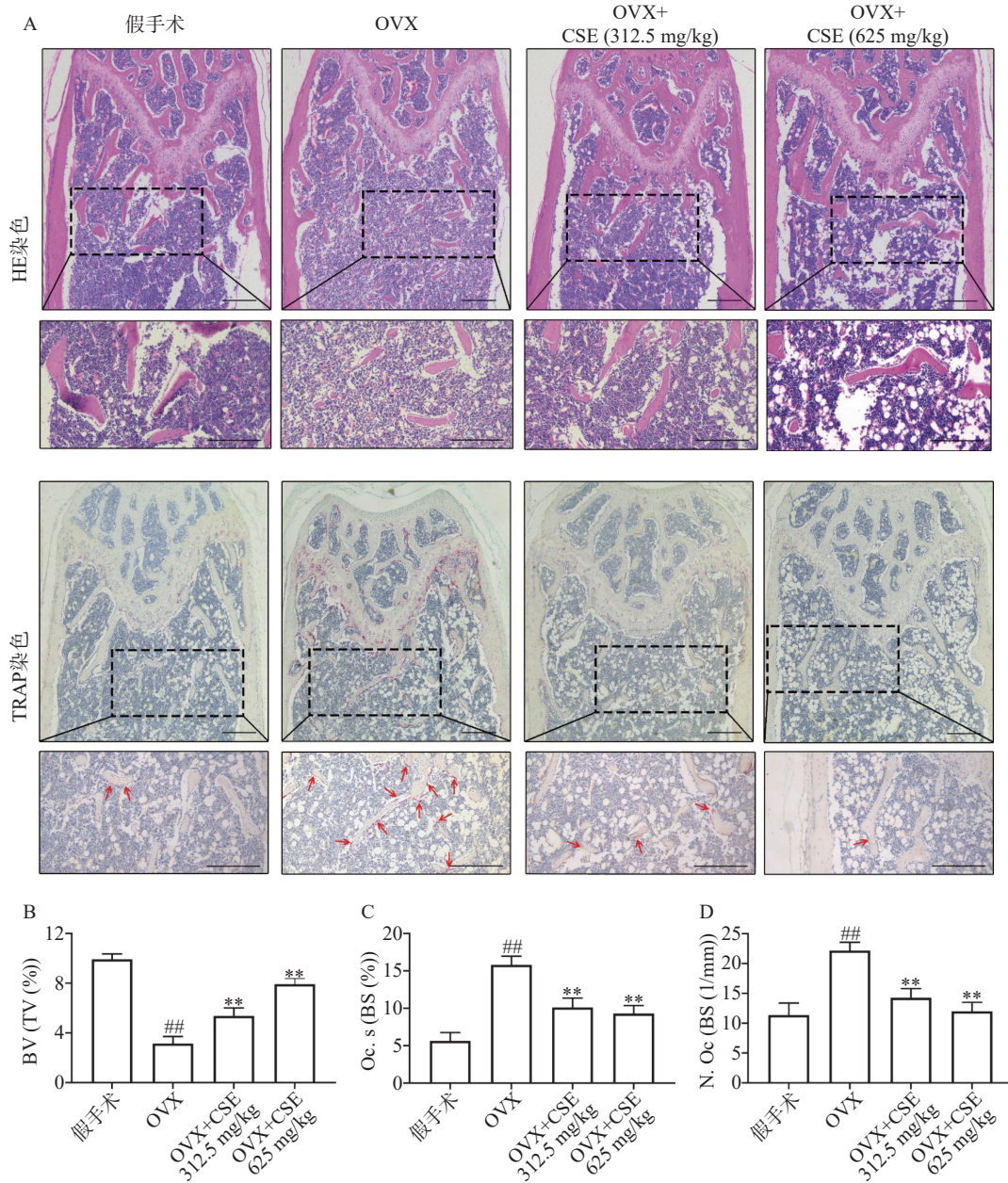


图6 CSE对去卵巢小鼠股骨破骨细胞数量和骨小梁的影响 (n=6)

A.HE染色和TRAP染色; B.BV/TV; C.Oc. S/BS; D.N. Oc/BS;
**P<0.01,与OVX组比较; #P<0.01,与假手术组比较

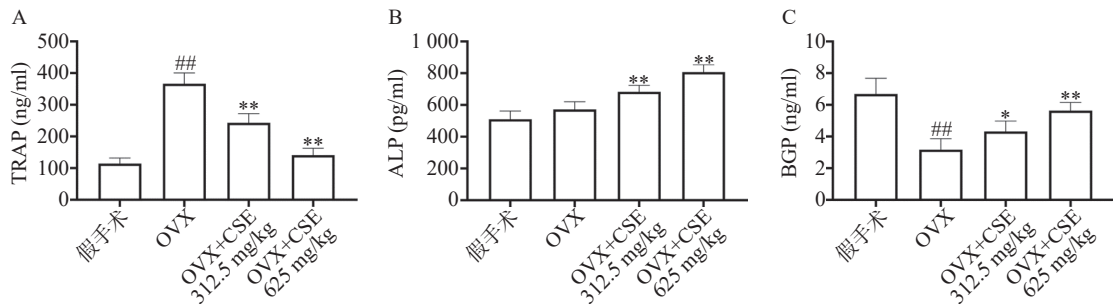


图7 CSE对TRAP、ALP和BGP含量的影响 (n=6)

A.TRAP; B.ALP; C.BGP;
*P<0.05, **P<0.01,与OVX组比较; #P<0.01,与假手术组比较

的骨量丢失, 这为 CSE 防治骨质疏松症提供了初步的药理学证据。

【参考文献】

- [1] PAN J X, XIONG L, ZHAO K, et al. YAP promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation by regulating β -catenin signaling[J]. *Bone Res*, 2018, 6: 18.
- [2] 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.
- [3] LANGDAHL B, FERRARI S, DEMPSTER D W. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis[J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2016, 8(6): 225-235.
- [4] 国家卫生健康委员会. 关于骨质疏松症的那些事[EB/OL]. (2018-11-09)[2021-06-25]. <http://www.nhc.gov.cn/interview/webcontroller.do?titleSeq=23761&gecstype=1>.
- [5] 王梦蝶, 吴虹, 王荣慧, 等. RANKL介导的诱导破骨细胞分化的相关经典信号通路研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(7): 898-902.
- [6] LI Y, LIN S, LIU P, et al. Carnosol suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and attenuates titanium particles-induced osteolysis[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(3): 1950-1966.
- [7] CHELLAIAH M A, MOORER M C, MAJUMDAR S, et al. L-Plastin deficiency produces increased trabecular bone due to attenuation of sealing ring formation and osteoclast dysfunction[J]. *Bone Res*, 2020, 8: 3.
- [8] 栾洁, 张阵阵, 汪家春, 等. 冬虫夏草药理学活性研究进展[J]. *中华航海医学与高压医学杂志*, 2019, 26(1): 76-78.
- [9] QI W, WANG P J, GUO W J, et al. The mechanism of *Cordyceps sinensis* and strontium in prevention of osteoporosis in rats[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 143(1): 302-309.
- [10] QI W, YAN Y B, WANG P J, et al. The co-effect of *Cordyceps sinensis* and strontium on osteoporosis in ovariectomized osteopenic rats[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 141(1-3): 216-223.
- [11] QI W, YAN Y B, LEI W, et al. Prevention of disuse osteoporosis in rats by *Cordyceps sinensis* extract[J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(9): 2347-2357.
- [12] 魏闪闪, 彭伟彪, 汪家春, 等. 冬虫夏草提取液对辐照诱导小鼠睾丸组织细胞凋亡的影响[J]. *海军医学杂志*, 2021, 42(2): 175-179.
- [13] JIANG P, GAO W, MA T, et al. CD137 promotes bone metastasis of breast cancer by enhancing the migration and osteoclast differentiation of monocytes/macrophages[J]. *Theranostics*, 2019, 9(10): 2950-2966.
- [14] WANG Q Q, CHEN D L, JIN H M, et al. Hymenialdisine: a marine natural product that Acts on both osteoblasts and osteoclasts and prevents estrogen-dependent bone loss in mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(8): 1582-1596.
- [15] LIU Y, WANG C, WANG G, et al. Loureirin B suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and ovariectomized osteoporosis via attenuating NFATc₁ and ROS activities[J]. *Theranostics*, 2019, 9(16): 4648-4662.
- [16] SUN X, ZHANG C, GUO H, et al. Pregnenolone inhibits osteoclast differentiation and protects against lipopolysaccharide-induced inflammatory bone destruction and ovariectomy-induced bone loss[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 360.
- [17] 王玥, 刘启玲, 徐守竹, 等. 抗疏健骨颗粒对去卵巢骨质疏松大鼠血清骨代谢及骨组织自噬水平的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(4): 487-491, 507.
- [18] MANOLAGAS S. Steroids and osteoporosis: the quest for mechanisms[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 3182.
- [19] PANG Y, SU L, FU Y, et al. Inhibition of furin by bone targeting superparamagnetic iron oxide nanoparticles alleviated breast cancer bone metastasis[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(3): 712-720.
- [20] CHIU Y H, SCHWARZ E, LI D, et al. Dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) regulates osteoclast differentiation via the Ca²⁺/NFATc₁ axis[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(9): 2538-2549.
- [21] HAN G H, ZUO J, HOLLIDAY L. Specialized roles for actin in osteoclasts: unanswered questions and therapeutic opportunities[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(1): 17-32.
- [22] 邹斌华, 郑洁煌, 李晓娟. 破骨细胞融合相关分子的研究进展[J]. *中国骨科临床与基础研究杂志*, 2020, 12(3): 161-168.
- [23] SOUSA D M, CONCEIÇÃO F, SILVA D I, et al. Ablation of Y1 receptor impairs osteoclast bone-resorbing activity[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33470.
- [24] YANG R S, LIN W L, CHEN Y Z, et al. Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts[J]. *Bone*, 2005, 36(2): 276-283.
- [25] ORIMO H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease[J]. *J Nippon Med Sch*, 2010, 77(1): 4-12.

[收稿日期] 2021-05-12 [修回日期] 2021-09-22
[本文编辑] 李春德