药学实践与服务
Journal of Pharmaceutical Practice and Service
中国科技核心期刊
中国科技论文统计源期刊
中国知网、万方、维普数据库统计源期刊
CA, EBSCO, WPRIM, UPD, CMCC等收录

啤酒花及其活性成分黄腐酚抗糖皮质激素性骨质疏松的作用研究

夏天爽，丁卢颖，张嘉宝，李晓瑾，王果平，辛海量

Effects of *Humulus lupulus* L. and its active ingredient xanthohumol on preventing glucocorticoid-induced osteoporosis

XIA Tianshuang, DING Luying, ZHANG Jiabao, LI Xiaojin, WANG Guoping, XIN Hailiang

在线阅读 View online: http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202102002

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

啤酒花活性成分黄腐酚抗骨质疏松作用研究

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

药学实践杂志. 2018, 36(3): 219-223 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.03.006

啤酒花抗骨质疏松的应用及展望

Application and prospect of *Humulus lupulus* L. in anti-osteoporosis

药学实践杂志. 2020, 38(6): 492-495 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202007063

啤酒花中黄酮类成分的含量分析

Analysis of flavonoids contents of hops

药学实践杂志. 2018, 36(1): 64-67 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.013

啤酒花HPLC指纹图谱研究

Study on fingerprint of *Hupulus lupulus* by HPLC

药学实践杂志. 2019, 37(1): 42-45,54 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.010

中药啤酒花药理作用的研究进展

Advances in pharmacological effects of Traditional Chinese Medicine hops

药学实践杂志. 2019, 37(1): 5-8,13 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.002

临床药师参与1例肝衰竭患者糖皮质激素治疗的分析与药学监护

Case study and clinical pharmacists participated pharmaceutical care in glucocorticoids treatment for a patient with liver failure

药学实践杂志. 2018, 36(5): 464-467 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.019

关注微信公众号，获得更多资讯信息

·论著·

啤酒花及其活性成分黄腐酚抗糖皮质激素性骨质疏松的作用研究

夏天爽[1a], 丁卢颖[1b], 张嘉宝[1a], 李晓瑾[2], 王果平[2], 辛海量[1a]（1. 海军军医大学: a. 药学院生药学教研室, b. 长海医院药材科, 上海 200433; 2. 新疆维吾尔自治区中药民族研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002）

［摘要］ **目的**　研究对啤酒花及其活性成分黄腐酚抗糖皮质激素性骨质疏松（GIOP）作用。**方法**　腹腔注射地塞米松（DEX）造模, 并结合 Micro-CT 及 Elisa 试剂盒检测等方法, 对小鼠股骨的骨微结构、骨密度及血清骨生化指标进行评价。同时, 采用 DEX 损伤成骨细胞, 对其增殖、分化水平及骨形成相关蛋白的表达进行评价。**结果**　啤酒花提取物及黄腐酚可显著改善 GIOP 小鼠的骨微结构破坏, 增强骨密度, 改善骨小梁参数。在成骨细胞水平上, 啤酒花及黄腐酚既可促进 DEX 损伤成骨细胞的增殖、分化, 又可提高骨钙素（BGP）、骨形成蛋白 2（BMP-2）以及成骨特异性转录因子（Runx-2）的表达水平, 促进骨形成。**结论**　该研究首次明确了啤酒花及黄腐酚具有抗 GIOP 作用, 为抗骨质疏松药物的开发提供了新资源。

［关键词］ 啤酒花; 黄腐酚; 糖皮质激素性骨质疏松; 地塞米松; 成骨细胞
［中图分类号］ R285.5　［文献标志码］ A　［文章编号］ 1006-0111（2021）03-0221-05
［DOI］ 10.12206/j.issn.1006-0111.202102002

Effects of *Humulus lupulus* L. and its active ingredient xanthohumol on preventing glucocorticoid-induced osteoporosis

XIA Tianshuang[1a], DING Luying[1b], ZHANG Jiabao[1a], LI Xiaojin[2], WANG Guoping[2], XIN Hailiang[1a]（1a. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, 1b. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Xinjiang Institute of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830002, China）

［**Abstract**］ **Objective**　To explore the effects of *Humulus lupulus* L. extract (HLE) and xanthohumol (XN) on preventing glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP). **Methods**　The GIOP model was established by intraperitoneal injection of dexamethasone (DEX). Bone microstructure, bone mineral density and serum biochemical indexes were evaluated by Micro-CT and ELISA kits. The levels of cells proliferation and ALP activity, and the expression of bone formation related proteins were assayed with primary osteoblasts injured by DEX. **Results**　HLE and XN significantly alleviated the bone microstructure damage, enhanced the bone mineral density, and improved the trabecular parameters in GIOP mice. In vitro experiments showed that HLE and XN can prevent bone loss not only by improving cell proliferation and ALP activity, but also through increasing the expression of bone γ-glutamic acid-containing proteins (BGP), bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and runt-related transcription factor 2 (Runx-2). **Conclusion**　This study confirmed that HLE and XN had anti-GIOP effects for the first time. It provides a new resource for the development of anti-osteoporosis medications.

［**Key words**］ *Humulus lupulus* L.; xanthohumol; glucocorticoid-induced osteoporosis; dexamethasone; osteoblast

糖皮质激素（glucocorticoid, GC）是一种在临床上广泛应用于治疗类风湿性关节炎、胃肠道疾病及自身免疫疾病的药物[1]。然而, 研究显示, 有超过 50% 的患者在长期接受 GC 的治疗过程中会发生骨质疏松症[2]。目前, 糖皮质激素诱导的骨质疏松（glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP）已成为病理性骨丢失的第三大常见病症, 仅次于老年性骨质疏松症和绝经后骨质疏松症。与此同时, GIOP 由于其高致残率和高发病率给社会和家庭生活造成了极大的负担, 因此, 如何预防和治疗 GIOP 成为医学上关注的热点。

啤酒花（*Humulus lupulus* L.）为桑科葎草属多年生草质蔓生藤本植物, 其雌性带花果穗不仅是酿造啤酒的添加原料, 也是全球广泛应用的药物品种, 并在欧洲广泛用于缓解更年期潮热及绝经后骨质疏松症[3]。黄腐酚（xanthohumol, XN）为啤酒花中的代表性成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌等活

［基金项目］ 国家自然科学基金资助项目（U1603283, 82004015）
［作者简介］ 夏天爽, 助教, Tel: 18305183911, Email: 18305183911@163.com
［通信作者］ 辛海量, 博士, 副教授, 研究方向: 中药资源与品质评价, Tel: （021）81871309, Email: hailiangxin@163.com

性[4]。课题组前期研究发现，啤酒花提取物及黄腐酚可显著改善去卵巢小鼠的骨丢失，防治绝经后骨质疏松症。此外，两者还可显著调节成骨细胞与破骨细胞的活性，维持骨稳态[5-6]。然而，目前对于啤酒花及黄腐酚抗 GIOP 的作用机制尚不明确。故笔者拟以地塞米松（DEX）诱导的骨质疏松小鼠及其损伤的成骨细胞为模型，采用 Micro-CT 及体外活性检测等方法，对啤酒花及黄腐酚抗 GIOP 的作用进行探究。

1　材料与方法

1.1　药材及试剂

啤酒花（PJH-01），产地新疆，购自河北安国中药材市场，经海军军医大学药学院生药学教研室辛海量副教授鉴定，密封存放于干燥阴凉处。称取啤酒花药材粉末 70 g，加入料液比为 1∶15 的 75% 乙醇，回流提取 3 次，减压浓缩干燥成浸膏，HPLC 测定得浸膏中黄腐酚含量为 0.55%[5]。使用前配制成相应浓度的提取液。

其他试剂及购买厂家：黄腐酚（纯度≥98%，上海历鼎）；地塞米松（大连美仑）；阿仑膦酸钠（上海国药）；I 型胶原 C 端肽（CTX-I）及骨钙素（BGP）Elisa 试剂盒（南京建成）；碱性磷酸酶（ALP）及抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）试剂盒（南京建成）；胎牛血清（Gibco，美国）；α-MEM 培养基等细胞培养试剂（天津灏洋）；骨形成蛋白 2（BMP-2）及成骨特异性转录因子（Runx-2）抗体（Abcam，英国）；Micro-CT（eXplore Locus SP，GE，美国）。

1.2　实验动物

1.2.1　整体动物模型

3 月龄 ICR 小鼠，体重（20 ± 2）g，购自上海斯莱克实验动物有限公司 [实验动物质量合格证号：2013001831722；实验动物使用许可证号：SYXK（沪）2017-0004]。小鼠饲养于海军军医大学药学院实验动物中心清洁级动物房，室温（24 ± 0.5）℃，每日 12 h 光照/12 h 黑暗，自由饮食饮水，适应 1 周后开始动物实验。

1.2.2　成骨细胞

取自新生 24 h Wistar 大鼠（上海斯莱克实验动物有限公司）。所有动物实验均符合实验动物伦理学要求。

1.3　动物实验方案及样品收集

将 56 只大鼠按体重以随机区组设计分为 7 组（n=8）：空白对照组（CON），DEX 模型组（MOD，2.5 mg/kg），阿仑膦酸钠阳性对照组（ALN，1 mg/kg），啤酒花提取物低剂量组（HLE-L，1 g/kg），啤酒花提取物高剂量组（HLE-H，3 g/kg），黄腐酚低剂量组（XN-L，30 mg/kg），黄腐酚高剂量组（XN-H，90 mg/kg）。除空白组外，所有组别小鼠腹腔注射 DEX 注射液，空白对照组小鼠注射同体积的生理盐水，每周 3 次；与此同时，予相应药物灌胃，空白对照组和模型组小鼠灌胃相同体积生理盐水。每周灌胃给药 6 次，连续给药 12 周。每周称量体重，按体重 0.1 ml/10 g 调整给药体积。末次给药后，小鼠禁食、不禁水过夜，摘除眼球取血，静置离心取血清，储存于 −80 ℃ 冰箱中用于生化指标检测，剥离小鼠后肢右侧股骨用于 Mirco-CT 测定。

1.4　Micro-CT 检测

取组织固定液中的小鼠右侧股骨，剔除其表面附着的结缔组织，用高分辨率 Micro-CT 对股骨远端进行扫描。计算骨密度（BMD）、骨表面积/骨体积（BS/BV）、相对骨体积（BV/TV）、骨小梁数目（Tb.N.）及骨小梁分离度（Tb.Sp.）。

1.5　血清生化指标检测

按照试剂盒说明书步骤，对小鼠血清中 ALP、TRAP 及 CTX-I 水平进行检测。

1.6　原代成骨细胞分离培养

采用二次消化法从新生大鼠颅盖骨分离得到原代成骨细胞[7]，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、分化以及 Western blot 分析。

1.7　成骨细胞增殖及碱性磷酸酶检测

取 3 ~ 4 代成骨细胞计算其数目，配制成细胞浓度为 1×10^4 个/ml 细胞悬液接种于 96 孔板。24 h 后分别更换为含药培养液（DEX: 10 μmol/L; HLE: 100、20 μg/ml; XN: 5、1 μmol/L），除空白组外均给予 DEX 损伤。给药 48 h 后采用 MTT 法检测成骨细胞的增殖情况。

取 3 ~ 4 代成骨细胞计算其数目，配制成细胞浓度为 5×10^4 个/ml 细胞悬液接种于 24 孔板。24 h 后分别更换为含药培养液（给药浓度同上）。培养过程中每 3 d 更换 1 次含药培养液。第 8 天裂解细胞，收集细胞裂解液，于 4 ℃、13 800×g 离心 5 min。用对硝基苯磷酸二钠法测定细胞 ALP 活性[8]。

1.8　成骨细胞骨形成相关蛋白检测

将 3 ~ 4 代的成骨细胞裂解，提取细胞总蛋白，根据 BCA 试剂盒进行蛋白定量。采用 ELISA 试剂盒对成骨细胞 BGP 含量进行检测，采用 Western blot 技术[9] 对 BMP-2 及 Runx-2 水平进行检测。

1.9　统计学分析

实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析，选用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行组间变量的比较分析。检验水准(α)为 0.05。

2　结果

2.1　啤酒花及黄腐酚显著改善 DEX 小鼠骨组织形态并减缓骨丢失

模型组小鼠股骨的骨组织形态与空白组相比，出现明显空洞，见图 1；药物治疗后，HLE 及 XN 显著改善 DEX 小鼠的骨组织形态及骨微结构，防止骨质空洞。

模型组小鼠 BMD、BS/TV、BV/TV 及 Tb.N.水平较空白组显著降低，Tb.Sp.水平显著升高(图 2)。药物治疗后，HLE 及 XN 显著逆转了 DEX 小鼠 BMD 及骨小梁参数的异常，防治骨质疏松。

2.2　啤酒花及黄腐酚显著改善 DEX 小鼠血清骨生化指标异常

小鼠注射 DEX 后，其血清 ALP 水平显著降低，TRAP 及 CTX-I 水平显著升高。药物治疗后，HLE 及 XN 可显著提高小鼠血清 ALP 水平，并降低 TRAP 及 CTX-I 的高表达，调节骨代谢，且药物高剂量组治疗效果更佳(图 3)。

2.3　啤酒花及黄腐酚显著提高 DEX 损伤成骨细胞的活性并促进骨形成

如图 4A-B 所示，DEX 损伤成骨细胞后，其增殖能力及 ALP 活性显著降低。药物治疗后，HLE 及 XN 可显著促进 DEX 损伤成骨细胞的增殖，提高 ALP 活性，促进成骨细胞的分化。

在骨形成相关蛋白的表达方面，HLE 及 XN 可显著促进 DEX 损伤成骨细胞中 BGP 及 BMP-2 的表达，XN 还可显著促进成骨细胞 Runx-2 的表达(图 4C-E)，促进成骨细胞骨形成。

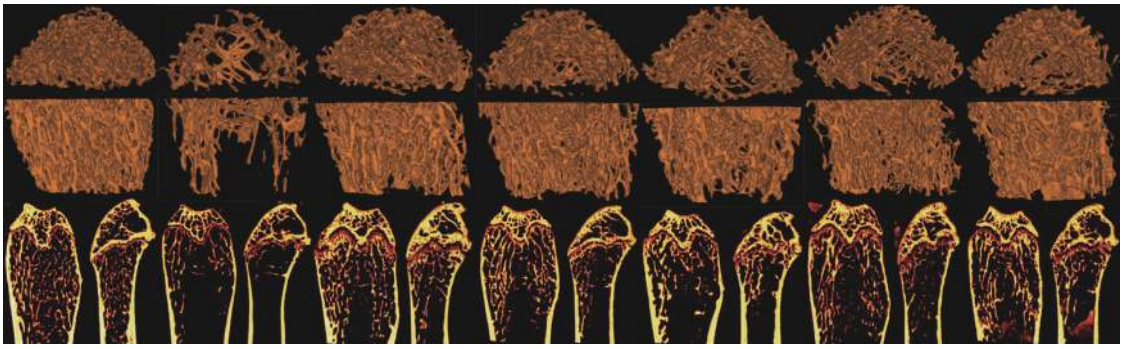

图 1　小鼠股骨 Micro-CT 扫描图

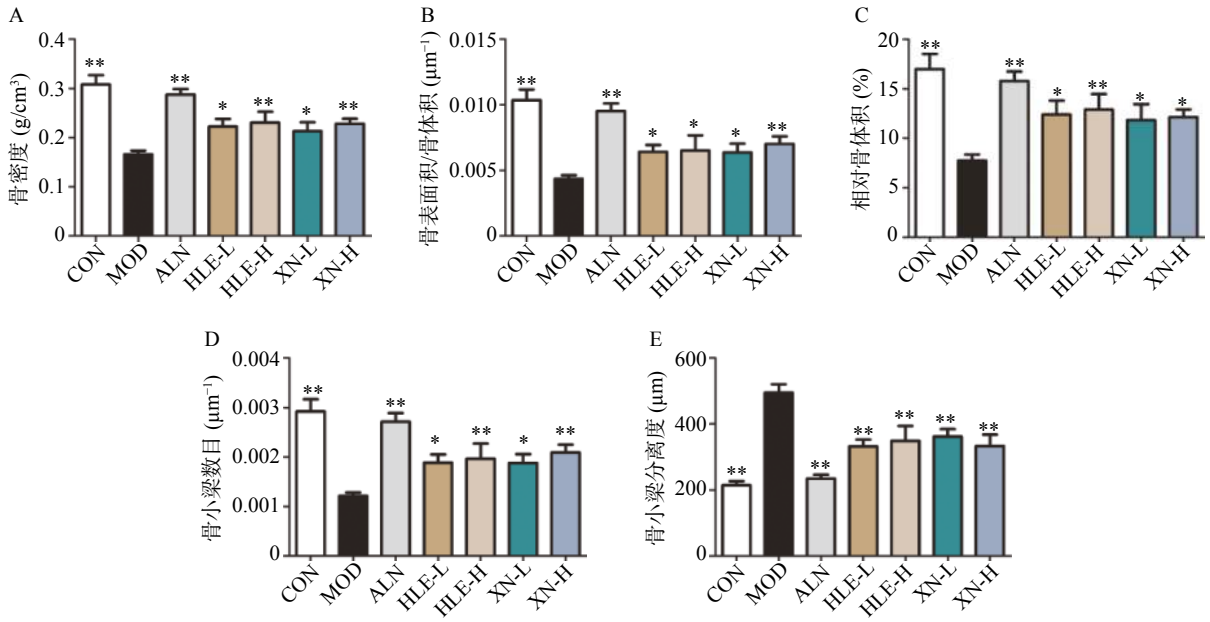

图 2　小鼠股骨骨密度（A）及骨小梁参数（B-E）（$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）

*P<0.05, **P<0.01, 与 MOD 组比较。

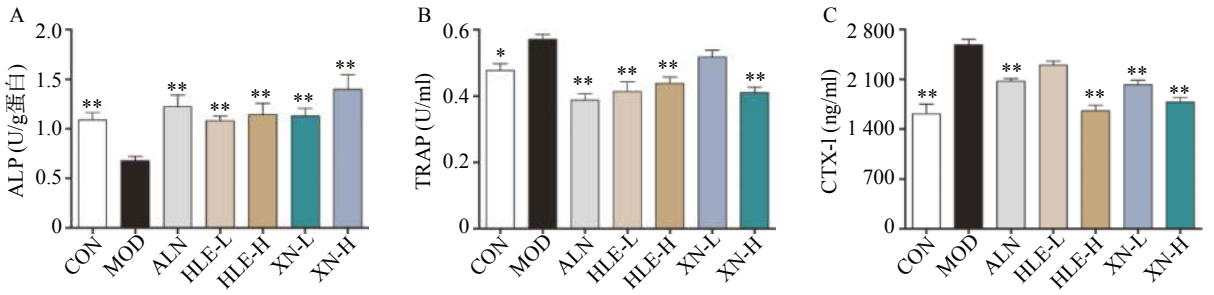

图 3　小鼠血清生化指标（$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）

*P<0.05, **P<0.01, 与 MOD 组比较。

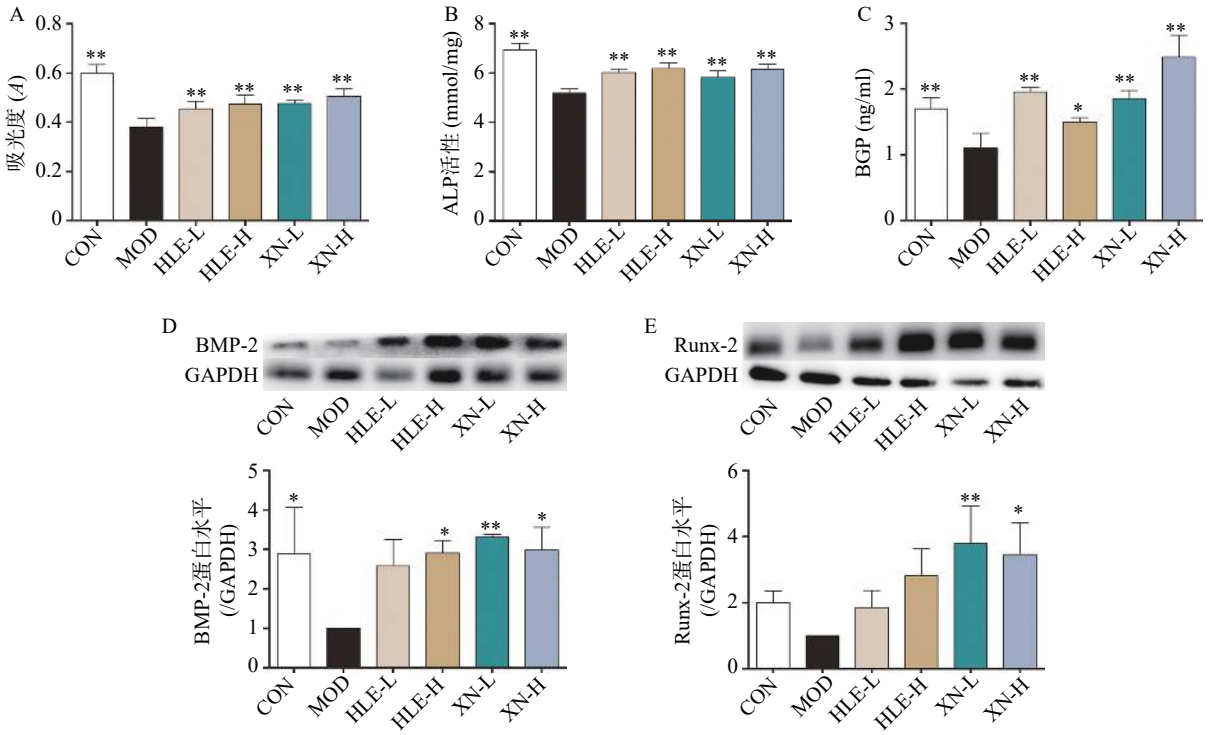

图 4　成骨细胞的增殖（A）、分化（B）水平及骨形成相关蛋白（C-E）的表达（$n = 4$，$\bar{x} \pm s$）

*P<0.05, **P<0.01, 与 MOD 组比较。

3　讨论

DEX 作为临床上常用的一种合成糖皮质激素，在抗炎抗免疫反应方面均具有良好的疗效。与其他糖皮质激素类似，长期使用 DEX 会引起严重的不良反应，尤其是对骨骼的影响，可大大增加骨质疏松及生理性骨折的发病风险[10]。本研究中，小鼠注射 DEX 后，其股骨的骨微结构显著破坏，骨质明显空洞，骨密度及骨小梁参数显著降低，且血清骨生化指标异常，提示小鼠处于典型的骨质疏松状态。药物治疗后，啤酒花提取物及黄腐酚均可显著改善 GIOP 小鼠的骨微结构破坏，增强骨密度，改善骨小梁参数，防治骨质疏松。ALP 和 TRAP 分别为评价骨形成与骨吸收的常用指标，而 CTX-I 为成熟胶原降解的标志物，其活性水平与骨密度呈显著的负相关[11]。本研究中，啤酒花提取物及黄腐酚可显著提高 ALP 含量，抑制 TRAP 及 CTX-I 的高表达，表明两者可通过调节骨代谢的平衡防治骨丢失。

在 GIOP 细胞层面的发病机制中，GC 对成骨细胞的影响占主导地位[12]。在成骨细胞活性检测中，MTT 值及 ALP 活性分别代表成骨细胞的增殖及分化水平。其中，ALP 合成于骨基质成熟阶段，利于骨基质矿化[13]。本研究中，DEX 损伤成骨细胞后，其 MTT 值及 ALP 活性均显著下降，表示糖皮质激素抑制了成骨细胞的增殖及分化。药物治疗后，啤酒花提取物及黄腐酚可显著提高损伤成骨细胞的 MTT 值及 ALP 活性，有效促进了细胞的增殖与分化，提高成骨细胞活性。BGP、BMP-2 及 Runx-2 均为典型的骨形成相关蛋白，其中 BGP 是由非增殖期的成骨细胞特异合成并分泌的非胶原

蛋白[14], BMP-2 是参与成骨细胞分化阶段的主要蛋白[15], 而 Runx-2 是早期成骨细胞分化的调节因子, 三者在骨骼形态发生阶段均起着关键作用[16]。本研究发现, 啤酒花提取物及黄腐酚可显著促进 DEX 损伤成骨细胞中 BGP、BMP-2 及 Runx-2 的表达, 进一步证实了其可通过促进成骨细胞的骨形成对抗 GIOP。以上研究为深入探讨啤酒花及其活性成分黄腐酚抗骨质疏松的作用机制以及相关药物的研发奠定了基础。

【参考文献】

[1] CAIN D W, CIDLOWSKI J A. Immune regulation by glucocorticoids[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(4): 233-247.

[2] IOANNIDIS G, PALLAN S, PAPAIOANNOU A, et al. Glucocorticoids predict 10-year fragility fracture risk in a population-based ambulatory cohort of men and women: Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos)[J]. Arch Osteoporos, 2014, 9: 169.

[3] AGHAMIRI V, MIRGHAFOURVAND M, MOHAMMAD-ALIZADEH-CHARANDABI S, et al. The effect of Hops (*Humulus lupulus* L.) on early menopausal symptoms and hot flashes: a randomized placebo-controlled trial[J]. Complement Ther Clin Pract, 2016, 23: 130-135.

[4] LIU M, HANSEN P E, WANG G Z, et al. Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*)[J]. Molecules, 2015, 20(1): 754-779.

[5] XIA T S, LIN L Y, ZHANG Q Y, et al. *Humulus lupulus* L. extract prevents ovariectomy-induced osteoporosis in mice and regulates activities of osteoblasts and osteoclasts[J]. Chin J Integr Med, 2021, 27(1): 31-38.

[6] 林柳悦, 夏天爽, 蒋益萍, 等. 啤酒花活性成分黄腐酚抗骨质疏松作用研究[J]. 药学实践杂志, 2018, 36(3): 219-223.

[7] GU G, HENTUNEN T A, NARS M, et al. Estrogen protects primary osteocytes against glucocorticoid-induced apoptosis[J]. Apoptosis, 2005, 10(3): 583-595.

[8] 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.

[9] 夏天爽, 林柳悦, 蒋益萍, 等. 苦味酸类成分蛇麻酮和葎草酮对大鼠成骨细胞和破骨细胞的干预作用[J]. 第二军医大学学报, 2019, 40(1): 25-30.

[10] CAMOZZI V, BETTERLE C, FRIGO A C, et al. Vertebral fractures assessed with dual-energy X-ray absorptiometry in patients with Addison's disease on glucocorticoid and mineralocorticoid replacement therapy[J]. Endocrine, 2018, 59(2): 319-329.

[11] 张萌萌. 中国老年学学会骨质疏松委员会骨代谢生化指标临床应用专家共识[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(11): 1263-1272.

[12] BERENDSEN A D, OLSEN B R. Osteoblast-adipocyte lineage plasticity in tissue development, maintenance and pathology[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(3): 493-497.

[13] XIA T S, DONG X, LIN L Y, et al. Metabolomics profiling provides valuable insights into the underlying mechanisms of *Morinda officinalis* on protecting glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 166: 336-346.

[14] 阙文君, 冯正平. 骨转换生化标志物的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(5): 575-579.

[15] NGUYEN H T, ONO M, OIDA Y, et al. Bone marrow cells inhibit BMP-2-induced osteoblast activity in the marrow environment[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(2): 327-332.

[16] XIA T S, DONG X, JIANG Y P, et al. Metabolomics profiling reveals rehmanniae *Radix* preparata extract protects against glucocorticoid-induced osteoporosis mainly via intervening steroid hormone biosynthesis[J]. Molecules, 2019, 24(2): E253.

［收稿日期］ 2021-02-02　［修回日期］ 2021-04-22
［本文编辑］ 李睿旻