

# 紫菀酮对体外破骨细胞分化和活性的影响及作用机制研究

苏珮茹<sup>1</sup>, 罗香雅<sup>1</sup>, 余丽娜<sup>2</sup>, 曾春平<sup>1</sup>, 周琳<sup>1</sup>

(1. 广州医科大学附属第五医院, 广东 广州 510700;

2. 华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063210)

**摘要** 目的:探讨紫菀酮对体外破骨细胞分化和活性的影响及作用机制。方法:①分析紫菀酮对核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL) 诱导 Raw 264.7 细胞向破骨细胞分化的影响。将 Raw 264.7 细胞分为空白对照组、阳性对照组、紫菀酮  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组,空白对照组加入完全培养基,阳性对照组加入含  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基,其余各组分别加入含有相应浓度紫菀酮及  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基,培养 5 d 后进行抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色,统计各组破骨细胞数;②分析紫菀酮对 Raw 264.7 细胞活力的影响。将 Raw 264.7 细胞分为空白对照组、紫菀酮  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组,空白对照组加入完全培养基,其余各组分别加入含有相应浓度紫菀酮的完全培养基,分别培养 48 h、120 h 后测定各组细胞活力;③分析紫菀酮对破骨细胞纤维状肌动蛋白环形成的影响。将 Raw 264.7 细胞分为空白对照组、阳性对照组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组,空白对照组加入完全培养基,阳性对照组加入含  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基,紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组分别加入含有相应浓度紫菀酮及  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基,培养 5 d 后采用鬼笔环肽和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚染色,观察各组破骨细胞纤维状肌动蛋白环形成情况。④分析紫菀酮对核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 转录活性的影响。将稳定转染 pGL4.32[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro] 载体的 RAW 264.7 细胞分为空白对照组、阳性对照组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组,空白对照组及阳性对照组加入完全培养基,紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组加入终浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫菀酮的完全培养基;培养 2 h 后,阳性对照组及紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组分别加入 RANKL 溶液,使培养基中 RANKL 的终浓度为  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;继续培养 6 h 后,检测各组细胞荧光素酶的荧光强度。⑤分析紫菀酮对核因子- $\kappa$ B 抑制蛋白激酶  $\alpha$  亚基 (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit  $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ ) 蛋白表达的影响。将 Raw 264.7 细胞分为阳性对照组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组,每组 6 孔,分别编号 1~6。待细胞贴壁后,阳性对照组加入完全培养基,紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组加入终浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫菀酮的完全培养基,继续培养 2 h 后,在 2 组的 1 号孔加入 RANKL 溶液使 RANKL 终浓度为  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,在 1 号孔加入 RANKL 溶液后 30 min、40 min、50 min、55 min,分别在 2 号、3 号、4 号、5 号孔加入 RANKL 溶液至 RANKL 终浓度为  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 1 号孔加入 RANKL 后 60 min,收集各孔细胞,采用蛋白印迹法检测 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达量。⑥分析紫菀酮对破骨细胞特异性基因转录的影响。将 Raw 264.7 细胞分为阳性对照组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组。阳性对照组加入含  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基,紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组分别加入含有相应浓度紫菀酮和  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基,培养 5 d 后,收集各组细胞,采用实时定量 PCR 检测组织蛋白酶 K、空泡型 ATP 酶 d2 亚基 (vacuolar ATPase subunit D2, V-ATPase d2)、TRAP 的 mRNA 表达量。⑦分析紫菀酮对活化 T-细胞核因子 c1 (nuclear factor of activated T cells c1, NFATc1) 蛋白表达的影响。将 Raw 264.7 细胞分为阳性对照组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组,每组 4 孔,分别编号 1~4。待细胞贴壁后,阳性对照组加入完全培养基,紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组加入终浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫菀酮的完全培养基。继续培养 2 h 后,在 2 组的 1 号孔加入 RANKL 溶液使 RANKL 终浓度为  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,在 1 号孔加入 RANKL 溶液后 2 d、4 d,分别在 2 号、3 号孔加入 RANKL 溶液使 RANKL 终浓度为  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 1 号孔加入 RANKL 后 5 d,收集各孔细胞。采用蛋白印迹法检测 NFATc1 蛋白的表达量。**结果:**①紫菀酮对 RANKL 诱导 Raw 264.7 细胞向破骨细胞分化影响的分析结果。空白对照组之外的 5 组破骨细胞数比较,差异有统计学意义 [ $(187.667 \pm 14.503)$  个,  $(180.000 \pm 14.422)$  个,  $(174.333 \pm 11.060)$  个,  $(152.667 \pm 5.033)$  个,  $(130.667 \pm 11.015)$  个,  $F = 11.767, P = 0.001$ ]。紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞数均少于阳性对照组、紫菀酮  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组 ( $P = 0.004, P = 0.000; P = 0.017, P = 0.000; P = 0.047, P = 0.001$ );紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞数少于紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组 ( $P = 0.044$ )。②紫菀酮对

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金项目(2019A1515110723)

通讯作者:周琳 E-mail:912395010@qq.com

Raw 264.7 细胞活力影响的分析结果。紫菀酮干预 48 h、120 h 时,5 组 Raw 264.7 细胞活力比较,组间差异均无统计学意义(48 h:  $0.960 \pm 0.101, 0.938 \pm 0.051, 0.916 \pm 0.072, 0.915 \pm 0.079, 1.009 \pm 0.105, F = 0.647, P = 0.641$ ; 120 h:  $1.347 \pm 0.161, 1.388 \pm 0.047, 1.423 \pm 0.473, 1.398 \pm 0.067, 1.357 \pm 0.034, F = 0.400, P = 0.805$ )。③紫菀酮对破骨细胞纤维状肌动蛋白环形成影响的分析结果。与空白对照组比较,阳性对照组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组均可见破骨细胞和纤维状肌动蛋白环;与阳性对照组比较,紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞纤维状肌动蛋白环形成均受到抑制,且其受到抑制的程度随紫菀酮干预浓度增加而增强。④紫菀酮对破骨细胞 NF- $\kappa$ B 转录活性影响的分析结果。3 组荧光素酶相对荧光强度比较,组间差异有统计学意义( $0.058 \pm 0.003, 1.000 \pm 0.044, 0.753 \pm 0.040, F = 613.132, P = 0.000$ )。阳性对照组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组的荧光素酶相对荧光强度高于空白对照组( $P = 0.000, P = 0.000$ ),紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组的荧光素酶相对荧光强度低于阳性对照组( $P = 0.000$ )。⑤紫菀酮对 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达影响的分析结果。2 组破骨细胞 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白相对表达量随诱导时间延长均呈先下降后上升趋势,但 2 组的趋势不完全一致( $1.000 \pm 0.000, 0.414 \pm 0.171, 0.285 \pm 0.104, 0.132 \pm 0.021, 0.157 \pm 0.038, 0.802 \pm 0.066, F = 49.839, P = 0.000; 0.980 \pm 0.130, 0.632 \pm 0.102, 0.347 \pm 0.037, 0.302 \pm 0.070, 0.546 \pm 0.142, 1.502 \pm 0.345, F = 21.435, P = 0.000$ );诱导 20 min、30 min、60 min,紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白相对表达量高于阳性对照组( $t = -4.018, P = 0.016; t = -4.586, P = 0.010; t = -3.444, P = 0.026$ )。⑥紫菀酮对破骨细胞特异性基因转录影响的分析结果。3 组破骨细胞 V-ATPase-d2、组织蛋白酶 K、TRAP 的 mRNA 表达量比较,组间差异均有统计学意义( $1.000 \pm 0.089, 0.879 \pm 0.100, 0.530 \pm 0.054, F = 25.553, P = 0.001; 1.000 \pm 0.030, 0.725 \pm 0.153, 0.719 \pm 0.111, F = 6.293, P = 0.034; 1.000 \pm 0.326, 0.834 \pm 0.030, 0.656 \pm 0.327, F = 88.003, P = 0.000$ )。紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞组织蛋白酶 K、TRAP 的 mRNA 表达量均低于阳性对照组( $P = 0.023, P = 0.001$ );紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞 V-ATPase-d2、TRAP 的 mRNA 表达量均低于紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和阳性对照组( $P = 0.000, P = 0.002; P = 0.000, P = 0.000$ );紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞组织蛋白酶 K 的 mRNA 表达量低于阳性对照组( $P = 0.021$ )。⑦紫菀酮对 NFATc1 蛋白表达影响的分析结果。2 组破骨细胞 NFATc1 蛋白相对表达量随诱导时间延长均呈上升趋势,但 2 组的上升趋势不完全一致( $1.000 \pm 0.000, 1.175 \pm 0.007, 4.700 \pm 0.742, 19.430 \pm 1.763, F = 250.352, P = 0.000; 1.042 \pm 0.035, 1.334 \pm 0.290, 3.531 \pm 0.583, 15.690 \pm 0.823, F = 525.669, P = 0.000$ );诱导后 5 d,紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞 NFATc1 蛋白相对表达量低于阳性对照组( $t = 3.329, P = 0.029$ )。结论:紫菀酮能够抑制体外破骨细胞的分化和活性,其作用机制与抑制 NF- $\kappa$ B 和 NFATc1 信号通路有关。

**关键词** 骨质疏松;破骨细胞;细胞分化;紫菀酮;体外研究技术;信号传导;NF- $\kappa$ B;组织蛋白酶 K;腺苷三磷酸酶;抗酒石酸酸性磷酸酶;NFATC 转录因子

## Effects of shionone on differentiation and activity of osteoclasts in vitro and its mechanism of action

SU Peiru<sup>1</sup>, LUO Xiangya<sup>1</sup>, YU Lina<sup>2</sup>, ZENG Chunping<sup>1</sup>, ZHOU Lin<sup>1</sup>

1. The Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510700, Guangdong, China

2. School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, Hebei, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the effects of shionone on differentiation and activity of osteoclasts in vitro and its mechanism of action. **Methods:** ①To analyze the effects of shionone on the differentiation of Raw 264.7 cells into osteoclasts induced by receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL). The Raw 264.7 cells were divided into blank control group, positive control group,  $1 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group,  $2.5 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group,  $5 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group and  $10 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group. The Raw 264.7 cells in blank control group were cultured in complete culture medium, the ones in positive control group were cultured in complete culture medium supplemented with  $25 \text{ ng/mL}$  RANKL, and the ones in the rest groups were cultured in complete culture medium supplemented with  $25 \text{ ng/mL}$  RANKL and shionone at concentration of  $1, 2.5, 5$  and  $10 \mu\text{mol/L}$  respectively. After 5-day culture, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was performed, and the number of osteoclasts in each group was counted. ②To analyze the effects of shionone on the viability of Raw 264.7 cells. The Raw 264.7 cells were divided into blank control group,  $1 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group,  $2.5 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group,  $5 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group and  $10 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group. The Raw 264.7 cells in blank control group were cultured in complete culture medium, and the ones in the other groups were cultured in complete culture medium supplemented with shionone at concentration of  $1, 2.5, 5$  and  $10 \mu\text{mol/L}$  respectively. After 48- and 120-hour culture, the viability of Raw 264.7 cells were detected in each group. ③To analyze the effects of shionone on the formation of fibrous actin rings (F-actin rings) in osteoclasts. The Raw 264.7 cells were divided into blank control group, positive control group,  $5 \mu\text{mol/L}$

shionone intervention group and 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group. The Raw 264.7 cells in blank control group were cultured in complete culture medium, the ones in positive control group were cultured in complete culture medium supplemented with 25 ng/mL RANKL, and the ones in the remained 2 groups were cultured in complete culture medium supplemented with 25 ng/mL RANKL and shionone at concentration of 5 and 10  $\mu\text{mol/L}$  respectively. After 5-day culture, the staining was performed with phalloidin and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to observe the formation of F-actin rings in osteoclasts in each group. ④To analyze the effects of shionone on the transcriptional activity of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ). The RAW 264.7 cells stably transfected with pGL4.32[ luc2P/NF- $\kappa\text{B}$ -RE/Hygro ] vector were divided into blank control group, positive control group and 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group. The transfected cells in blank control group and positive control group were cultured in complete culture medium, and the ones in 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group were cultured in complete culture medium supplemented with shionone at final concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$ . After 2-hour culture, the cells in positive control group and 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group were added with RANKL solution respectively till its final concentration was 25 ng/mL in the medium. After an additional 6-hour culture, the fluorescence intensity of luciferase in each group was detected. ⑤To analyze the effects of shionone on the protein expression of inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit  $\alpha$  ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ). The Raw 264.7 cells were divided into positive control group and 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group, with 6 wells in each group numbered from 1 to 6 respectively. After cell adhesion, the cells in positive control group were cultured in complete culture medium, and the ones in 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group were cultured in complete culture medium supplemented with shionone at final concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$ . After an additional 2-hour culture, the No. 1 wells in the 2 groups were added with RANKL solution respectively till its final concentration was 25 ng/mL in the medium. At 30, 40, 50, and 55 minutes after adding RANKL solution to the No. 1 wells, the No. 2, 3, 4 and 5 wells in the 2 groups were added with RANKL solution respectively till its final concentration was 25 ng/mL in the medium. At 60 minutes after adding RANKL to the No. 1 wells, the cells were collected from each well, and the protein expression level of  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  was detected by using Western blot. ⑥To analyze the effects of shionone on the transcription of osteoclast-specific genes. The Raw 264.7 cells were divided into positive control group, 5  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group and 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group. The cells in positive control group were cultured in complete culture medium supplemented with 25 ng/mL RANKL, and the ones in the other two groups were cultured in complete culture medium supplemented with 25 ng/mL RANKL and shionone at concentration of 5 and 10  $\mu\text{mol/L}$  respectively. After 5-day culture, the cells were collected from each group, and the mRNA expression levels of cathepsin K, vacuolar ATPase subunit D2 (V-ATPase d2) and TRAP were detected by using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). ⑦To analyze the effects of shionone on the protein expression of nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1). The Raw 264.7 cells were divided into positive control group and 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group, with 4 wells in each group numbered from 1 to 4 respectively. After cell adhesion, the cells in positive control group were cultured in complete culture medium, and the ones in 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group were cultured in complete culture medium supplemented with shionone at final concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$ . After an additional 2-hour culture, the No. 1 wells in the 2 groups were added with RANKL solution respectively till its final concentration was 25 ng/mL in the medium. At 2 and 4 days after adding RANKL solution to the No. 1 wells, the No. 2 and 3 wells in the 2 groups were added with RANKL solution respectively till its final concentration was 25 ng/mL in the medium. At 5 days after adding RANKL solution to the No. 1 wells, the cells were collected from each well, and the protein expression level of NFATc1 was detected by using Western blot. **Results:** ①The results of analysis on the effects of shionone on RANKL-induced differentiation of Raw 264.7 cells into osteoclasts. There was statistical difference in the number of osteoclasts among the 5 groups except for the blank control group ( $187.667 \pm 14.503$ ,  $180.000 \pm 14.422$ ,  $174.333 \pm 11.060$ ,  $152.667 \pm 5.033$ ,  $130.667 \pm 11.015$ ,  $F = 11.767$ ,  $P = 0.001$ ). The number of osteoclasts was less in 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group and 5  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group compared to positive control group, 1  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group and 2.5  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group ( $P = 0.004$ ,  $P = 0.000$ ;  $P = 0.017$ ,  $P = 0.000$ ;  $P = 0.047$ ,  $P = 0.001$ ), and it was less in 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group compared to 5  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group ( $P = 0.044$ ). ②The results of analysis on the effects of shionone on the viability of Raw 264.7 cells. There was no statistical difference in the viability of Raw 264.7 cells among the 5 groups after 48- and 120-hour intervention (48-hour:  $0.960 \pm 0.101$ ,  $0.938 \pm 0.051$ ,  $0.916 \pm 0.072$ ,  $0.915 \pm 0.079$ ,  $1.009 \pm 0.105$ ,  $F = 0.647$ ,  $P = 0.641$ ; 120-hour:  $1.347 \pm 0.161$ ,  $1.388 \pm 0.047$ ,  $1.423 \pm 0.473$ ,  $1.398 \pm 0.067$ ,  $1.357 \pm 0.034$ ,  $F = 0.400$ ,  $P = 0.805$ ). ③The results of analysis on the effects of shionone on the formation of F-actin rings in osteoclasts. Compared with the blank control group, the osteoclasts and F-actin rings were observed in positive control group, 5  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group and 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group. Compared with the positive control group, the formation of F-actin rings in osteoclasts was inhibited in 5  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group and 10  $\mu\text{mol/L}$  shionone intervention group, and the

degree of inhibition enhanced with the increasement of intervention concentration of shionone. ④The results of analysis on the effects of shionone on the NF- $\kappa$ B transcriptional activity in osteoclasts. There was statistical difference in the relative fluorescence intensity of luciferase among the 3 groups ( $0.058 \pm 0.003, 1.000 \pm 0.044, 0.753 \pm 0.040, F = 613.132, P = 0.000$ ). The relative fluorescence intensity of luciferase was higher in positive control group and  $10 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group compared to blank control group ( $P = 0.000, P = 0.000$ ), and it was higher in positive control group compared to  $10 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group ( $P = 0.000$ ). ⑤The results of analysis on the effects of shionone on the expression of I $\kappa$ B $\alpha$  protein. The relative expression level of I $\kappa$ B $\alpha$  protein in osteoclasts displayed a trend of going downward firstly and upward subsequently with the induction-time in the 2 groups, while the 2 groups were inconsistent with each other in the variation tendency ( $1.000 \pm 0.000, 0.414 \pm 0.171, 0.285 \pm 0.104, 0.132 \pm 0.021, 0.157 \pm 0.038, 0.802 \pm 0.066, F = 49.839, P = 0.000; 0.980 \pm 0.130, 0.632 \pm 0.102, 0.347 \pm 0.037, 0.302 \pm 0.070, 0.546 \pm 0.142, 1.502 \pm 0.345, F = 21.435, P = 0.000$ ). The relative expression level of I $\kappa$ B $\alpha$  protein in osteoclasts was higher in  $10 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group compared to positive control group when the cells were induced for 20, 30 and 60 minutes respectively ( $t = -4.018, P = 0.016; t = -4.586, P = 0.010; t = -3.444, P = 0.026$ ). ⑥The results of analysis on the effects of shionone on the transcription of osteoclast-specific genes. There was statistical difference in the mRNA expression levels of V-ATPase-d2, cathepsin K and TRAP in osteoclasts among the 3 groups ( $1.000 \pm 0.089, 0.879 \pm 0.100, 0.530 \pm 0.054, F = 25.553, P = 0.001; 1.000 \pm 0.030, 0.725 \pm 0.153, 0.719 \pm 0.111, F = 6.293, P = 0.034; 1.000 \pm 0.326, 0.834 \pm 0.030, 0.656 \pm 0.327, F = 88.003, P = 0.000$ ). The mRNA expression levels of cathepsin K and TRAP in osteoclasts were lower in  $5 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group compared to positive control group ( $P = 0.023, P = 0.001$ ). The mRNA expression levels of V-ATPase-d2 and TRAP in osteoclasts were lower in  $10 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group compared to  $5 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group and positive control group ( $P = 0.000, P = 0.002; P = 0.000, P = 0.000$ ). The mRNA expression level of cathepsin K in osteoclasts was lower in  $10 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group compared to positive control group ( $P = 0.021$ ). ⑦The results of analysis on the effects of shionone on the expression of NFATc1 protein. The relative expression level of NFATc1 protein in osteoclasts displayed an upward trend with the induction-time in the 2 groups, while the 2 groups were inconsistent with each other in the variation tendency ( $1.000 \pm 0.000, 1.175 \pm 0.007, 4.700 \pm 0.742, 19.430 \pm 1.763, F = 250.352, P = 0.000; 1.042 \pm 0.035, 1.334 \pm 0.290, 3.531 \pm 0.583, 15.690 \pm 0.823, F = 525.669, P = 0.000$ ). After 5-day induction, the relative expression level of NFATc1 protein in osteoclasts was lower in  $10 \mu\text{mol/L}$  shionone intervention group compared to positive control group ( $t = 3.329, P = 0.029$ ). **Conclusion:** Shionone can inhibit the differentiation and activity of osteoclasts in vitro, and its mechanism may be that it can inhibit NF- $\kappa$ B and NFATc1 signaling pathways.

**Keywords** osteoporosis; osteoclasts; cell differentiation; shionone; in vitro techniques; signal transduction; NF- $\kappa$ B; Cathepsin K; adenosine triphosphatases; tartrate-resistant acid phosphatase; NFATC transcription factors

骨质疏松症是一种临床上常见的以骨量减少、骨组织微结构紊乱,进而导致骨脆性增加、易于发生骨折为特征的全身代谢性疾病<sup>[1]</sup>。随着老年人口的不断增加,骨质疏松症的发病率逐年递增;骨质疏松性骨折具有较高的致残率和致死率,给社会造成了沉重的经济负担<sup>[2]</sup>。目前,临床上常用的抗骨质疏松药物主要有钙剂、维生素 D、双膦酸盐类药物、雌激素类药物等<sup>[3]</sup>,长期使用这些药物可引起多种不良反应<sup>[4-6]</sup>。研究表明,部分植物来源的天然化合物抗骨质疏松作用显著,且安全性高<sup>[7-8]</sup>。植物来源的天然化合物为骨质疏松症的预防和治疗提供了一种更加安全和有效的新策略。紫菀是菊科植物紫菀的干燥根和根茎,具有止咳祛痰、抗菌消炎、抗肿瘤、抗氧化等作用<sup>[9]</sup>。紫菀酮是紫菀提取物中重要的三萜类化合物之一,具有抗肿瘤、抗炎等药理作用<sup>[10-13]</sup>。王芳

等<sup>[14]</sup>研究发现,紫菀酮可通过抑制核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路的激活,抑制促炎性细胞因子的释放,进而发挥抗炎作用。NF- $\kappa$ B 信号通路在核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL) 诱导的破骨细胞分化成熟过程中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。为了进一步探讨紫菀酮对破骨细胞分化和活性的影响及作用机制,我们开展了此项研究,现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验材料** 小鼠单核巨噬细胞系 Raw 264.7 细胞株,购自美国 ATCC 公司;稳定转染 pGL4.32 [luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro] 载体的 Raw 264.7 细胞由广西医科大学再生医学重点实验室馈赠。

**1.2 实验试剂** 紫菀酮(分子量为 426.729,分子式为  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ,结构式见图 1),购自成都普瑞法科技开

发公司,批号 PRF20090446,纯度  $\geq 98\%$ 。给药前采用二甲亚砜配置成  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液,并依次稀释至各目标浓度。

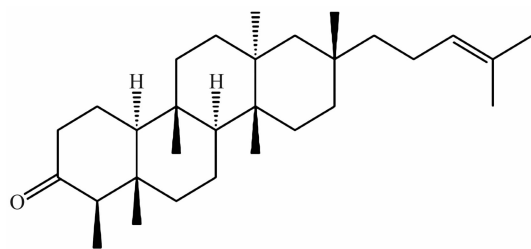


图1 紫菀酮的结构式

$\alpha$ -MEN 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司), CCK-8 试剂盒(上海贝博生物公司),重组小鼠 RANKL 蛋白(美国 R&D 公司),抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色液(美国 Sigma 公司),鬼笔环肽、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)溶液(美国索莱宝公司),Trizol 裂解液(美国 invitrogen 公司),RNA 提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司],SYBR Premix Ex Taq 试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司],荧光素酶检测试剂盒(美国 Promega 公司), $\beta$ -肌动蛋白、核因子- $\kappa$ B 抑制蛋白激酶  $\alpha$  亚基(inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit  $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ )抗体(成都正能生物科技公司),辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)G(成都正能生物科技公司),活化 T-细胞核因子 c1(nuclear factor of activated T cells c1, NFATc1)抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

**1.3 实验仪器** DMI6000B 倒置荧光显微镜(德国徕卡公司),Epoch2 微孔板分光光度计(美国伯腾仪器有限公司),ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司),Glomax Navigator 微孔板发光检测仪(美国 Promega 公司),ChemiDoc XPS<sup>+</sup> 化学发光成像系统(美国伯乐公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养方法** 在直径 10 cm 的培养皿中加入含 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 完全培养基,接种小鼠单核巨噬细胞系 Raw 264.7 细胞,置于温度  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  浓度 5% 的恒温孵育箱中培养。培养至细胞汇合度达 80% 以上时,接种于培养板上用于以下实验。

### 2.2 紫菀酮对破骨细胞分化影响的分析方法

#### 2.2.1 紫菀酮对 RANKL 诱导 Raw 264.7 细胞向破骨

细胞分化影响的分析方法 将 2.1 中的 Raw 264.7 细胞按照每孔约  $1.5 \times 10^3$  个接种于 96 孔板,共接种 18 孔,分为空白对照组、阳性对照组、紫菀酮  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组,每组 3 孔。空白对照组加入完全培养基,阳性对照组加入含  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基,紫菀酮  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组分别加入含有相应浓度紫菀酮及  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基,于温度  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  浓度 5% 的恒温孵育箱中培养 5 d。去除培养基,加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,加入 TRAP 染色液染色 20 min,于 DMI6000B 倒置荧光显微镜下观察并统计每孔中破骨细胞数(具有 3 个或 3 个以上细胞核的 TRAP 染色阳性细胞为破骨细胞)。

#### 2.2.2 紫菀酮对 Raw 264.7 细胞活力影响的分析方法

将 2.1 中的 Raw 264.7 细胞按照每孔约  $1.5 \times 10^3$  个接种于 96 孔板,共接种 30 孔,分为空白对照组、紫菀酮  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组,每组 6 孔。培养 24 h 后,空白对照组加入完全培养基,紫菀酮  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组分别加入含有相应浓度紫菀酮的完全培养基,置于温度  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  浓度 5% 的恒温孵育箱中培养 48 h。每组中取 3 孔,去除培养基,并加入含 10% CCK-8 溶液的无血清培养基孵育 2 h,采用 Epoch2 微孔板分光光度计测量 450 nm 波长处的吸光度,计算细胞活力;培养 120 h 时,采用上述方法测定每组另外 3 孔 Raw 264.7 细胞活力。

### 2.3 紫菀酮对破骨细胞纤维状肌动蛋白环形成影响的分析方法

将 2.1 中的 Raw 264.7 细胞按照每孔约  $1.5 \times 10^3$  个接种于 96 孔板,共接种 12 孔,分为空白对照组、阳性对照组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组,每组 3 孔。空白对照组加入完全培养基,阳性对照组加入含  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基,紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组分别加入含有相应浓度紫菀酮及  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基,于温度  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  浓度 5% 的恒温孵育箱中培养 5 d。去除

细胞培养基,加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 2 次, 0.5% Triton X-100 透化处理 3 min, 加入鬼笔环肽染色液, 避光孵育 30 min, 弃染色液, PBS 清洗 2 次, 加入 DAPI 复染细胞核约 30 s, 于 DMI6000B 荧光显微镜下观察拍照。

## 2.4 紫菀酮对 NF- $\kappa$ B 信号通路影响的分析方法

### 2.4.1 紫菀酮对 NF- $\kappa$ B 转录活性影响的分析方法

将稳定转染 pGL4. 32 [ luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro ] 载体的 RAW 264. 7 细胞参照 2. 1 的方法进行培养, 按照每孔约  $1.5 \times 10^5$  个接种于 48 孔板, 共接种 9 孔, 分为空白对照组、阳性对照组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组, 每组 3 孔。待细胞贴壁后, 空白对照组及阳性对照组加入完全培养基, 紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组加入终浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫菀酮的完全培养基, 继续培养 2 h。阳性对照组及紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组分别加入 RANKL 溶液, 使培养基中 RANKL 的终浓度为  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 继续培养 6 h。收集细胞, 加入细胞裂解液, 于  $4^\circ\text{C}$  以  $12\,000 \text{ g}$  离心 20 min, 取上清液, 参照荧光素酶检测试剂盒说明书进行实验, 用 Glomax Navigator 微孔板发光检测仪测定荧光素酶的荧光强度, 并进行标准化处理。

### 2.4.2 紫菀酮对 I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达影响的分析方法

将 2. 1 中的 Raw 264. 7 细胞按照每孔约  $5 \times 10^4$  个接种于 6 孔板, 共接种 12 孔, 分为阳性对照组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组, 每组 6 孔, 分别编号 1 ~ 6。待细胞贴壁后, 阳性对照组加入完全培养基, 紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组加入终浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫菀酮的完全培养基, 继续培养 2 h 后, 在 2 组的 1 号孔加入 RANKL 溶液至 RANKL 终浓度为  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 在 1 号孔加入 RANKL 溶液后 30 min、40 min、50 min、55 min, 分别在 2 号、3 号、4 号、5 号孔加入 RANKL 溶液至 RANKL 终浓度为  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 1 号孔加入

RANKL 后 60 min, 收集各孔细胞, 分别加入细胞裂解液裂解各孔细胞, 于  $4^\circ\text{C}$  以  $12\,000 \text{ g}$  离心 20 min, 取上清液, 加入蛋白上样缓冲液,  $100^\circ\text{C}$  煮沸 5 min, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每个蛋白样品做 3 个重复。电泳结束后, 将凝胶上的蛋白湿转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。将 PVDF 膜置于 PBST 中洗涤, 用 5% 脱脂奶粉于室温下封闭 2 h。加入  $\beta$ -肌动蛋白、I $\kappa$ B $\alpha$  抗体, 于  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, PBST 洗膜; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 常温孵育 1 h, PBST 洗膜; 加入增强化学发光液。采用 ChemiDoc XPS<sup>+</sup> 化学发光成像系统显影、拍照, 用 imageJ 软件分析蛋白条带灰度值, 以  $\beta$ -肌动蛋白为参考, 计算 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的相对表达量。

## 2.5 紫菀酮对 NFATc1 信号通路影响的分析方法

### 2.5.1 紫菀酮对破骨细胞特异性基因转录影响的分析方法

将 2. 1 中的 Raw 264. 7 细胞按照每孔约  $5 \times 10^4$  个接种于 6 孔板, 共接种 3 孔, 分为阳性对照组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组。阳性对照组加入含  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基, 紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组分别加入含有相应浓度紫菀酮和  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  RANKL 的完全培养基, 于温度  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  浓度 5 % 的恒温孵育箱中培养 5 d。收集细胞, 采用 Trizol 裂解液裂解细胞, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 逆转录获得 cDNA, 进行实时定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR), 检测破骨细胞特异性基因组织蛋白酶 K、空泡型 ATP 酶 d2 亚基 (vacuolar ATPase subunit D2, V-ATPase d2)、TRAP 的 mRNA 表达量。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  计算破骨细胞特异性基因 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5'—3')
组织蛋白酶 K	上游引物 TGTGGTTCCTGTTGGGCTTT
	下游引物 TGCACGTATTGGAAGGCAGT
空泡型 ATP 酶 d2 亚基	上游引物 CCTTTGTTTGACGCTGTCCG
	下游引物 CCTGTTGAATGCCAGCACAT
抗酒石酸酸性磷酸酶	上游引物 GTGGAAGCCTCTGGAAATC
	下游引物 CTCCTCCCTCACACCCGTTA
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	上游引物 GGCATTGTGGAAGGGCTCAT
	下游引物 GGACACATTGGGGGTAGGAAC



**2.5.2 紫菀酮对 NFATc1 蛋白表达影响的分析方法** 将 2.1 中的 Raw 264.7 细胞按照每孔约  $5 \times 10^4$  个接种于 6 孔板,共接种 8 孔,分为阳性对照组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组,每组 4 孔,分别编号 1~4。待细胞贴壁后,阳性对照组加入完全培养基,紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组加入终浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫菀酮的完全培养基。继续培养 2 h 后,在 2 组的 1 号孔加入 RANKL 溶液至 RANKL 终浓度为  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,在 1 号孔加入 RANKL 溶液后 2 d、4 d,分别在 2 号、3 号孔加入 RANKL 溶液至 RANKL 终浓度为  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 1 号孔加入 RANKL 后 5 d,收集各孔细胞。采用蛋白免疫法检测 NFATc1 蛋白的相对表达量,检测方法同 2.4.2,其中加入 NFATc1 抗体进行孵育。

**2.6 数据统计方法** 采用 SPSS23.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。Raw 264.7 分化破骨细胞数、Raw 264.7 细胞活力、荧光素酶相对荧光强度及破骨细胞特异性基因 V-ATPase-d2、组织蛋白酶 K、TRAP 的 mRNA 相对表达量的组间比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验;破骨细胞 IκBα、NFATc1 蛋白相对表达量的比较均采用重复测量资料的方差分析;检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

### 3 结果

#### 3.1 紫菀酮对破骨细胞分化影响的分析结果

##### 3.1.1 紫菀酮对 RANKL 诱导 Raw 264.7 细胞向破

骨细胞分化影响的分析结果 阳性对照组、紫菀酮  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组的破骨细胞数比较,差异有统计学意义。紫菀酮  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和阳性对照组破骨细胞数两两比较,差异均无统计学意义 ( $P = 0.442, P = 0.194, P = 0.567$ );紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞数均少于阳性对照组、紫菀酮  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组 ( $P = 0.004, P = 0.000; P = 0.017, P = 0.000; P = 0.047, P = 0.001$ );紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞数少于紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组 ( $P = 0.044$ )。见图 2、表 2。

**3.1.2 紫菀酮对 Raw 264.7 细胞活力影响的分析结果** 紫菀酮干预 48 h、120 h 时,5 组 Raw 264.7 细胞活力比较,组间差异均无统计学意义(表 3、表 4)。

**3.2 紫菀酮对破骨细胞纤维状肌动蛋白环形成影响的分析结果** 与空白对照组比较,阳性对照组、紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组可见破骨细胞和纤维状肌动蛋白环;与阳性对照组比较,紫菀酮  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和紫菀酮  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞纤维状肌动蛋白环形成均受到抑制,且其受到抑制的程度随紫菀酮干预浓度增加而增强(图 3)。

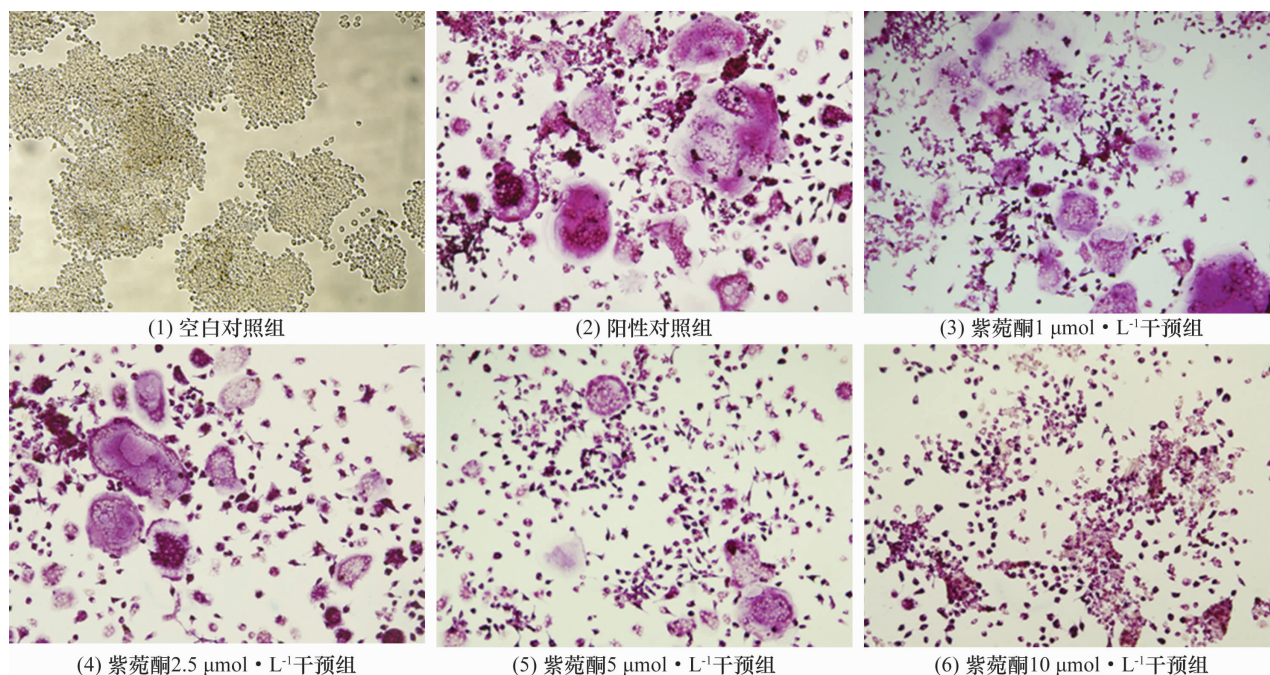


图 2 不同浓度紫菀酮对破骨细胞分化影响的观察结果(抗酒石酸性磷酸酶染色,  $\times 100$ )

表 2 5 组 Raw 264.7 细胞分化破骨细胞数

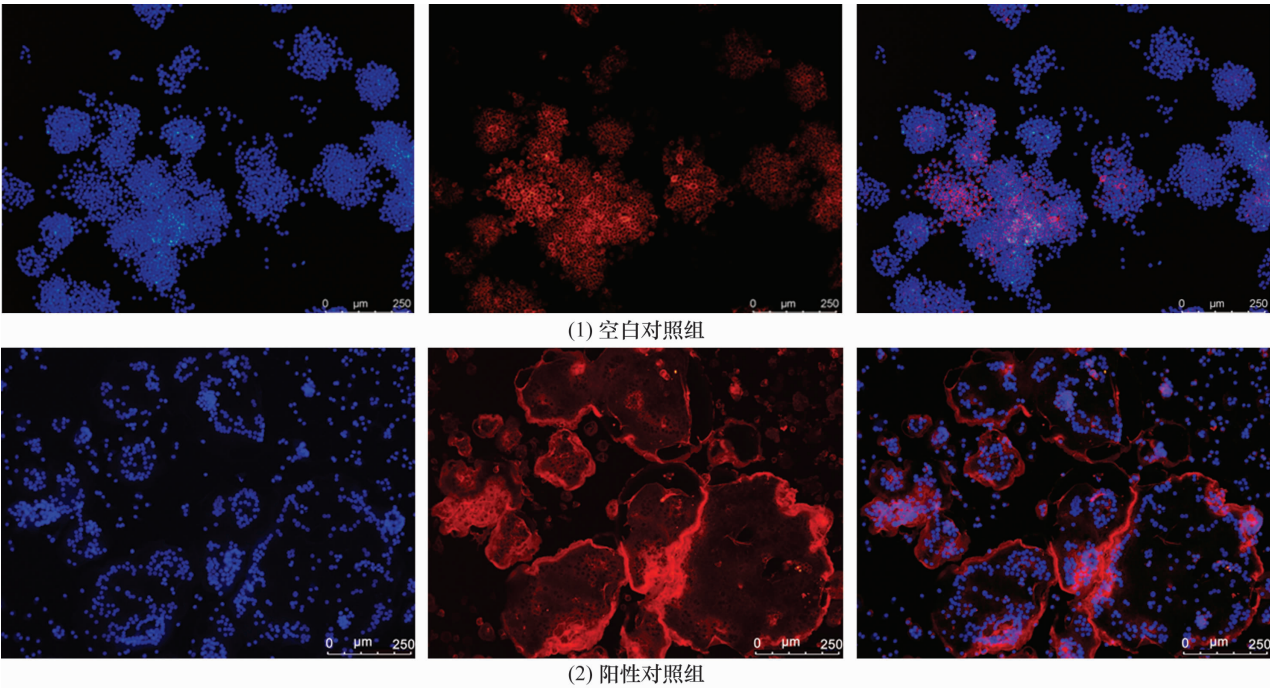
组别	样本量/孔	破骨细胞数/( $\bar{x} \pm s$ , 个)
阳性对照组	3	187.667 ± 14.503
紫菀酮 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	180.000 ± 14.422
紫菀酮 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	174.333 ± 11.060
紫菀酮 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	152.667 ± 5.033
紫菀酮 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	130.667 ± 11.015
<i>F</i> 值		11.767
<i>P</i> 值		0.001

表 3 不同浓度紫菀酮干预 48 h 后的 Raw 264.7 细胞活力

组别	样本量/孔	细胞活力( $\bar{x} \pm s$ )
空白对照组	3	0.960 ± 0.101
紫菀酮 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	0.938 ± 0.051
紫菀酮 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	0.916 ± 0.072
紫菀酮 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	0.915 ± 0.079
紫菀酮 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	1.009 ± 0.105
<i>F</i> 值		0.647
<i>P</i> 值		0.641

表 4 不同浓度紫菀酮干预 120 h 后的 Raw 264.7 细胞活力

组别	样本量/孔	细胞活力( $\bar{x} \pm s$ )
空白对照组	3	1.347 ± 0.161
紫菀酮 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	1.388 ± 0.047
紫菀酮 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	1.423 ± 0.473
紫菀酮 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	1.398 ± 0.067
紫菀酮 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	1.357 ± 0.034
<i>F</i> 值		0.400
<i>P</i> 值		0.805





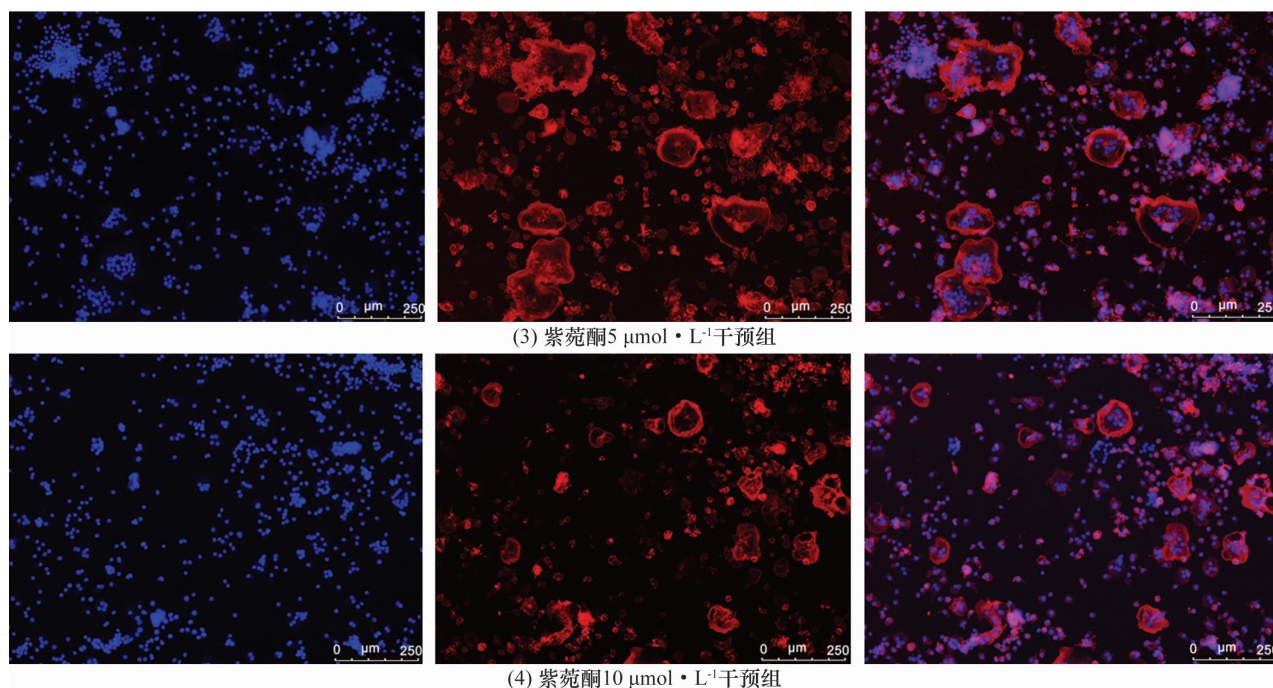


图 3 紫菀酮对破骨细胞纤维状肌动蛋白环形成影响的观察结果(×10)

注:左侧图为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶染色,蓝色为细胞核;中间图为鬼笔环肽染色,红色环状结构为破骨细胞的纤维状肌动蛋白环;右侧图为左侧图和中间图的合并图。

### 3.3 紫菀酮对破骨细胞 NF-κB 信号通路影响的分析结果

**3.3.1 紫菀酮对破骨细胞 NF-κB 转录活性影响的分析结果** 空白对照组、阳性对照组和紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组荧光素酶相对荧光强度比较,组间差异有统计学意义。阳性对照组和紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组的荧光素酶相对荧光强度高于空白对照组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ),紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组的荧光素酶荧光强度低于阳性对照组 ( $P = 0.000$ )。见表 5。

**3.3.2 紫菀酮对 IκBα 蛋白表达影响的分析结果** 时间因素和分组因素存在交互效应;2 组破骨细胞 IκBα 蛋白相对表达量总体比较,组间差异有统计学意义,即存在分组效应;干预后不同时间点 IκBα 蛋白相对表达量的差异有统计学意义,即存在时间效应;2 组破骨细胞 IκBα 蛋白相对表达量随诱导时间延长均呈先下降后上升趋势,但 2 组的趋势不完全一致;未诱导及诱导 5 min、10 min,2 组破骨细胞 IκBα 蛋白相对表达量比较,组间差异无统计学意义;诱导 20 min、30 min、60 min,紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞 IκBα 蛋白相对表达量高于阳性对照组(表 6、图 4)。

### 3.4 紫菀酮对 NFATc1 信号通路影响的分析结果

**3.4.1 紫菀酮对破骨细胞特异性基因转录影响的分析结果** 3 组破骨细胞 V-ATPase-d2、组织蛋白酶 K、

TRAP 的 mRNA 表达量比较,组间差异均有统计学意义。紫菀酮 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组与阳性对照组破骨细胞 V-ATPase-d2 的 mRNA 表达量比较,差异无统计学意义 ( $P = 0.128$ );紫菀酮 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞组织蛋白酶 K、TRAP 的 mRNA 表达量均低于阳性对照组 ( $P = 0.023, P = 0.001$ );紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞 V-ATPase-d2、TRAP 的 mRNA 表达量均低于紫菀酮 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组和阳性对照组 ( $P = 0.000, P = 0.002; P = 0.000, P = 0.000$ );紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞组织蛋白酶 K 的 mRNA 表达量低于阳性对照组 ( $P = 0.021$ ),和紫菀酮 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组比较,差异无统计学意义 ( $P = 0.948$ )。见表 7。

**3.4.2 紫菀酮对 NFATc1 蛋白表达影响的分析结果** 时间因素和分组因素存在交互效应;2 组破骨细胞 NFATc1 蛋白相对表达量总体比较,组间差异有统计学意义,即存在分组效应;干预后不同时间点 NFATc1 蛋白相对表达量的差异有统计学意义,即存在时间效应;2 组破骨细胞 NFATc1 蛋白相对表达量随诱导时间延长均呈上升趋势,但 2 组的上升趋势不完全一致;未诱导及诱导 1 d、3 d,2 组破骨细胞 NFATc1 蛋白相对表达量比较,组间差异无统计学意义;诱导后 5 d,紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组破骨细胞 NFATc1 蛋白相对表达量低于阳性对照组(表 8、图 5)。

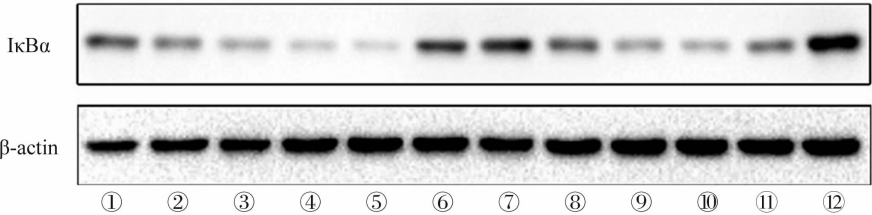
表 5 3 组破骨细胞荧光素酶相对荧光强度

组别	样本量/孔	荧光素酶相对荧光强度( $\bar{x} \pm s$ )
空白对照组	3	0.058 ± 0.003
阳性对照组	3	1.000 ± 0.044
紫菀酮 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	0.753 ± 0.040
<i>F</i> 值		613.132
<i>P</i> 值		0.000

表 6 2 组破骨细胞核因子- $\kappa\text{B}$  抑制蛋白激酶  $\alpha$  亚基蛋白相对表达量

组别	样本量/孔	核因子- $\kappa\text{B}$ 抑制蛋白激酶 $\alpha$ 亚基蛋白相对表达量( $\bar{x} \pm s$ )							<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
		①	②	③	④	⑤	⑥	合计		
阳性对照组	3	1.000 ± 0.000	0.414 ± 0.171	0.285 ± 0.104	0.132 ± 0.021	0.157 ± 0.038	0.802 ± 0.066	0.465 ± 0.344	49.839	0.000
紫菀酮 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	0.980 ± 0.130	0.632 ± 0.102	0.347 ± 0.037	0.302 ± 0.070	0.546 ± 0.142	1.502 ± 0.345	0.718 ± 0.450	21.435	0.000
合计	6	0.990 ± 0.083	0.523 ± 0.173	0.316 ± 0.078	0.217 ± 0.104	0.352 ± 0.232	1.152 ± 0.443	0.591 ± 0.415	63.393 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
<i>t</i> 值		0.273	-1.885	-0.977	-4.018	-4.586	-3.444	14.931 <sup>1)</sup>	<i>F</i> = 7.104 <sup>2)</sup>	
<i>P</i> 值		0.798	0.132	0.384	0.016	0.010	0.026	0.018 <sup>1)</sup>	<i>P</i> = 0.001 <sup>2)</sup>	

注:①为未加入核因子- $\kappa\text{B}$  受体活化因子配体诱导;②③④⑤⑥为加入核因子- $\kappa\text{B}$  受体活化因子配体诱导 5 min、10 min、20 min、30 min、60 min;1)主效应的 *F* 值和 *P* 值;2)交互效应的 *F* 值和 *P* 值。



I $\kappa$ B $\alpha$  为核因子- $\kappa\text{B}$  抑制蛋白激酶  $\alpha$  亚基; $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白;①为阳性对照组未加入核因子- $\kappa\text{B}$  受体活化因子配体诱导;②③④⑤⑥分别为阳性对照组加入核因子- $\kappa\text{B}$  受体活化因子配体诱导 5 min、10 min、20 min、30 min、60 min;⑦为紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组未加入核因子- $\kappa\text{B}$  受体活化因子配体诱导;⑧⑨⑩⑪⑫分别为紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预组加入核因子- $\kappa\text{B}$  受体活化因子配体诱导 5 min、10 min、20 min、30 min、60 min。

图 4 2 组破骨细胞核因子- $\kappa\text{B}$  抑制蛋白激酶  $\alpha$  亚基蛋白表达蛋白印迹法检测结果

表 7 3 组破骨细胞特异性基因的 mRNA 相对表达量

组别	样本量/孔	空泡型 ATP 酶 d2 亚基( $\bar{x} \pm s$ )	组织蛋白酶 K( $\bar{x} \pm s$ )	抗酒石酸酸性磷酸酶( $\bar{x} \pm s$ )
阳性对照组	3	1.000 ± 0.089	1.000 ± 0.030	1.000 ± 0.326
紫菀酮 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	0.879 ± 0.100	0.725 ± 0.153	0.834 ± 0.030
紫菀酮 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	0.530 ± 0.054	0.719 ± 0.111	0.656 ± 0.327
<i>F</i> 值		25.553	6.293	88.003
<i>P</i> 值		0.001	0.034	0.000

4 讨 论

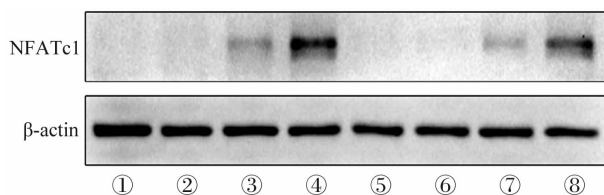
成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收共同维持着人体骨组织的生长与重塑<sup>[16-17]</sup>。二者之间的动态平衡被打破会导致骨质疏松症、佩吉特病、关节炎等疾病的发生<sup>[18-19]</sup>。破骨细胞病理性活化引起的骨吸收相对增强是导致骨质疏松症发生的关键性因素<sup>[20]</sup>。成骨细胞分泌的 RANKL 与破骨细

胞前体表面的 RANK 结合,并在巨噬细胞刺激因子的刺激下,激活 NF- $\kappa\text{B}$  等信号通路,诱导破骨细胞形成<sup>[21-22]</sup>。因此,通过抑制与 RANKL 相关的下游信号通路来抑制破骨细胞的形成可能成为治疗骨质疏松症的新策略。研究表明,紫菀酮具有和 NF- $\kappa\text{B}$  抑制剂类似的效果,能够抑制 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的激活<sup>[14]</sup>。鲜恩英等<sup>[11]</sup>研究发现,紫菀酮能通过抑制 Hela 细胞

表 8 2 组破骨细胞活化 T-细胞核因子 c1 蛋白相对表达量

组别	样本量/ 孔	活化 T-细胞核因子 c1 蛋白相对表达量( $\bar{x} \pm s$ )					F 值	P 值
		①	②	③	④	合计		
阳性对照组	3	1.000 ± 0.000	1.175 ± 0.007	4.700 ± 0.742	19.430 ± 1.763	6.576 ± 7.945	250.352	0.000
紫菀酮 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组	3	1.042 ± 0.035	1.334 ± 0.290	3.531 ± 0.583	15.690 ± 0.823	5.399 ± 6.302	525.669	0.000
合计	6	1.021 ± 0.032	1.254 ± 0.203	4.115 ± 0.875	17.560 ± 2.390	5.988 ± 7.039	672.458 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
t 值		-2.069	-0.951	2.146	3.329	11.316 <sup>1)</sup>	F = 8.967 <sup>2)</sup>	
P 值		0.174	0.442	0.098	0.029	0.028 <sup>1)</sup>	P = 0.002 <sup>2)</sup>	

注:①为未加入核因子- $\kappa\text{B}$ 受体活化因子配体诱导;②③④为加入核因子- $\kappa\text{B}$ 受体活化因子配体诱导 1 d、3 d、5 d;1) 主效应的 F 值和 P 值;2) 交互效应的 F 值和 P 值。



NFATc1 为活化 T-细胞核因子 c1;  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白; ①为阳性对照组未加入核因子- $\kappa\text{B}$ 受体活化因子配体诱导;②③④分别为阳性对照组加入核因子- $\kappa\text{B}$ 受体活化因子配体诱导 1 d、3 d、5 d;⑤为紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组未加入核因子- $\kappa\text{B}$ 受体活化因子配体诱导;⑥⑦⑧分别为紫菀酮 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组加入核因子- $\kappa\text{B}$ 受体活化因子配体诱导 1 d、3 d、5 d。

图 5 2 组破骨细胞活化 T-细胞核因子 c1 蛋白  
表达蛋白印迹法检测结果

发生上皮间质转化,进而减弱 Hela 细胞的侵袭与迁移能力,抑制肿瘤的发生发展。艾奎等<sup>[23]</sup>研究发现,紫菀酮能通过调节 Toll 样受体的表达抑制炎症反应,进而改善哮喘幼鼠气道的炎症反应。然而,目前尚无紫菀酮对破骨细胞分化和活性影响的相关研究。我们采用体外实验探讨紫菀酮对破骨细胞分化和活性的影响及作用机制,以期对骨质疏松症的治疗提供新思路。

TRAP 是破骨细胞成熟和发挥骨吸收功能的标志物<sup>[24]</sup>。本研究通过 TRAP 染色识别破骨细胞,染色结果显示,破骨细胞数随着紫菀酮浓度的升高而减少;而紫菀酮对 Raw 264.7 细胞活力影响的分析结果表明,浓度为 1 ~ 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫菀酮对 Raw 264.7 细胞活力无影响。因此,紫菀酮对破骨细胞的分化具有显著的抑制作用,且这种抑制作用并非抑制 Raw 264.7 细胞活性所致。纤维状肌动蛋白环是破骨细胞特有的骨架蛋白,能够反映破骨细胞的骨吸收活性<sup>[25]</sup>。本研究发现,紫菀酮能够显著抑制纤维状肌

动蛋白环的形成,提示紫菀酮能够抑制破骨细胞的活性。NF- $\kappa\text{B}$  信号通路是调控破骨细胞分化的经典信号通路之一<sup>[15]</sup>。当机体受到外源因素刺激时,与 NF- $\kappa\text{B}$ 结合的 I $\kappa\text{B}$  蛋白被磷酸化并快速降解,游离的 NF- $\kappa\text{B}$  进入细胞核,参与调控破骨细胞相关基因的表达<sup>[15]</sup>。本研究发现,紫菀酮能抑制 NF- $\kappa\text{B}$  的转录活性,并能够抑制 I $\kappa\text{B}\alpha$  的降解,提示紫菀酮可能通过抑制 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的传导发挥抑制破骨细胞活性的作用。NFATc1 是重要的转录因子,其在破骨细胞分化和骨吸收过程中发挥重要作用<sup>[26-27]</sup>。Winslow 等<sup>[28]</sup>研究发现,NFATc1 基因缺失的小鼠表现出严重的骨硬化,且其破骨细胞分化受到明显抑制。Yang 等<sup>[29]</sup>研究发现,NFATc1 能够调控 V-ATPase d2、组织蛋白酶 K 及 TRAP 的表达。本研究发现,紫菀酮能够抑制 NFATc1 蛋白的表达以及 V-ATPase d2、组织蛋白酶 K 及 TRAP 等破骨细胞特异性基因的转录。因此,我们认为紫菀酮抑制破骨细胞分化和活性的作用机制与抑制 NFATc1 信号通路有关。

本研究结果表明,紫菀酮能够抑制体外破骨细胞的分化和活性,其作用机制与抑制 NF- $\kappa\text{B}$  和 NFATc1 信号通路有关。

## 参考文献

- [1] 蔡俊民,周后德. 免疫性骨质疏松及其研究进展[J]. 中华内分泌代谢杂志,2022,38(7):558-566.
- [2] WANG L, YU W, YIN X, et al. Prevalence of osteoporosis and fracture in China: the China osteoporosis prevalence study[J]. JAMA Netw Open, 2021, 4(8):e2121106.
- [3] 陈镜,冯正平. 骨质疏松症治疗药物研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2021,27(5):776-780.
- [4] 祝晓雨,张伟光,赵志刚. 骨质疏松症国内外药物治疗的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(5):588-592.

- [5] KHORSAND I, KASHEF R, GHASANFARPOUR M, et al. The beneficial and adverse effects of Raloxifene in menopausal women: a mini review [J]. J Menopausal Med, 2018, 24(3): 183 – 187.
- [6] REID I R, BILLINGTON E O. Drug therapy for osteoporosis in older adults [J]. Lancet, 2022, 399 ( 10329 ): 1080 – 1092.
- [7] HONG G, CHEN Z, HAN X, et al. A novel RANKL-targeted flavonoid glycoside prevents osteoporosis through inhibiting NFATc1 and reactive oxygen species [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(5): e392.
- [8] MARTINIAKOVA M, BABIKOVA M, OMELKA R. Pharmacological agents and natural compounds: available treatments for osteoporosis [J]. J Physiol Pharmacol, 2020, 71 ( 3 ): 307 – 320.
- [9] 韩杨杨, 高凡, 秦飘然, 等. 紫菀的研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(3): 655 – 664.
- [10] XU N, HU J, HAN K, et al. Shionone suppresses the growth, migration and invasion of human breast cancer cells via induction of apoptosis and inhibition of MEK/ERK and STAT3 signalling pathways [J]. J BUON, 2020, 25 ( 4 ): 1821 – 1826.
- [11] 鲜恩英, 边巴卓玛, 格央, 等. 紫菀酮抑制 HeLa 细胞迁移侵袭的作用及机制 [J]. 高原科学研究, 2021, 5(2): 57 – 63.
- [12] ZHANG B, XUE Y, ZHAO J, et al. Shionone attenuates sepsis-induced acute kidney injury by regulating macrophage polarization via the ECM1/STAT5 pathway [J]. Front Med ( Lausanne ), 2022, 8: 796743.
- [13] WANG X, YIN H, FAN L, et al. Shionone alleviates NLRP3 inflammasome mediated pyroptosis in interstitial cystitis injury [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 90: 107132.
- [14] 王芳, 任刚, 潘玲玲, 等. 紫菀酮基于 NF- $\kappa$ B 信号通路的体外抗炎机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4): 1430 – 1433.
- [15] YAO Z, GETTING S J, LOCKE I C. Regulation of TNF-induced osteoclast differentiation [J]. Cells, 2021, 11 ( 1 ): 132.
- [16] YUAN F L, WU Q Y, MIAO Z N, et al. Osteoclast-derived extracellular vesicles: novel regulators of osteoclastogenesis and osteoclast-osteoblasts communication in bone remodeling [J]. Front Physiol, 2018, 9: 628.
- [17] YAHARA Y, NGUYEN T, ISHIKAWA K, et al. The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair [J]. Development, 2022, 149 ( 8 ): dev199908.
- [18] RABJOHNS E M, HURST K, GHOSH A, et al. Paget's disease of bone: osteoimmunology and osteoclast pathology [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2021, 21 ( 4 ): 23.
- [19] MCDONALD M M, KHOO W H, NG P Y, et al. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption [J]. Cell, 2021, 184(5): 1330 – 1347.
- [20] KIM J M, LIN C, STAVRE Z, et al. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis [J]. Cells, 2020, 9(9): 2073.
- [21] YASUDA H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system [J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 2 – 11.
- [22] TAKAYANAGI H. RANKL as the master regulator of osteoclast differentiation [J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 13 – 18.
- [23] 艾奎, 李楨. 紫菀酮改善 OVA 诱导哮喘 SD 幼鼠的免疫反应及 TLRs 的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 76 – 81.
- [24] HE J, CHEN K, DENG T, et al. Inhibitory effects of rhaponticin on osteoclast formation and resorption by targeting RANKL-induced NFATc1 and ROS activity [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 645140.
- [25] TEITELBAUM S L. Bone resorption by osteoclasts [J]. Science, 2000, 289 ( 5484 ): 1504 – 1508.
- [26] 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.
- [27] ONO T, NAKASHIMA T. Recent advances in osteoclast biology [J]. Histochem Cell Biol, 2018, 149(4): 325 – 341.
- [28] WINSLOW M M, PAN M, STARBUCK M, et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass [J]. Dev Cell, 2006, 10(6): 771 – 782.
- [29] YANG M, XIE J, LEI X, et al. TUBEIMOSIDE I suppresses diabetes-induced bone loss in rats, osteoclast formation, and RANKL-induced nuclear factor- $\kappa$ B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80: 106202.

(收稿日期: 2022-09-26 本文编辑: 吕宁)