

# 补骨脂异黄酮抑制破骨细胞分化缓解小鼠去卵巢骨质疏松

<https://doi.org/j.issn.2095-4344.2974>

李啸群, 徐凯航, 纪方

2095-4344.2974

投稿日期: 2020-03-03

送审日期: 2020-03-07

采用日期: 2020-04-03

在线日期: 2020-07-31

中图分类号:

R459.9; R318; R681

文章编号:

2095-4344(2021)02-00186-05

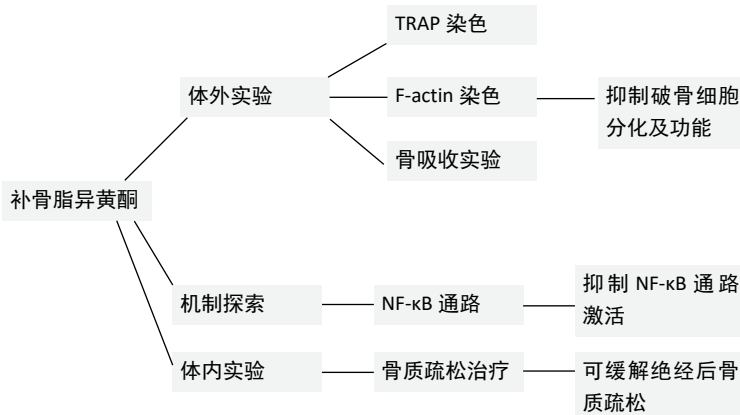
文献标识码: A

## 文章快速阅读:

### 文章描述一

△ 通过体外细胞实验, 探讨补骨脂异黄酮对破骨细胞分化和功能的影响及相关分子通路;

△ 通过动物体内实验, 探讨补骨脂异黄酮治疗绝经后骨质疏松的效应。



## 文题释义:

**破骨细胞分化:** 成熟的破骨细胞由骨髓单核细胞分化而来, 骨髓细胞在巨噬细胞克隆刺激因子的诱导下形成骨髓单核细胞, 在巨噬细胞克隆刺激因子和RANKL的诱导下, 骨髓单核细胞逐渐分化, 形成成熟破骨细胞, 成熟破骨细胞TRAP染色呈阳性, F-actin是破骨细胞行使骨吸收功能的重要结构, 帮助破骨细胞在体内行使骨吸收功能。

**绝经后骨质疏松:** 是一种与衰老有关的常见病, 主要发生在绝经后妇女, 由于雌激素缺乏导致骨量减少及骨组织结构变化, 使脆性增多, 骨折风险显著上升, 同时由骨折引起的疼痛、骨骼变形、出现合并症等严重地影响老年人的身体健康和生活质量。

## 摘要

**背景:** 骨代谢平衡由破骨细胞介导的骨吸收作用和成骨细胞介导的骨形成作用共同完成。破骨细胞的过度激活可导致一系列的骨代谢疾病如风湿性关节炎、骨质疏松等。RANKL介导的NF-κB通路激活在破骨细胞分化中发挥重要作用。

**目的:** 探究补骨脂异黄酮在RANKL介导的破骨细胞分化中的作用。

**方法:** 以0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μmol/L补骨脂异黄酮孵育RAW264.7细胞, CCK-8分析补骨脂异黄酮的细胞毒性; RANKL诱导RAW264.7细胞向破骨细胞分化, 分化过程中给予2, 5, 10 μmol/L补骨脂异黄酮, 干预5 d后采用TRAP染色分析破骨细胞数量, F-actin染色分析破骨细胞形态及功能; 干预2 d后骨吸收实验分析破骨细胞的骨吸收功能; 干预0, 15, 30, 60 min后western blot分析RANKL介导的NF-κB通路的激活情况; 然后进行体内实验, 卵巢切除小鼠每周接受10 mg/kg补骨脂异黄酮腹腔注射治疗2次, 干预6周后取小鼠股骨进行形态学分析。

**结果与结论:** ①在16 μmol/L浓度以下补骨脂异黄酮无细胞毒性; ②补骨脂异黄酮可抑制RANKL介导的破骨细胞分化, 抑制作用呈浓度依赖性; ③补骨脂异黄酮可抑制破骨细胞F-actin形成和破骨细胞的骨吸收功能; ④补骨脂异黄酮可抑制RANKL介导的NF-κB通路; ⑤补骨脂异黄酮干预可缓解小鼠绝经后骨质疏松后的骨量丢失; ⑥结果表明, 补骨脂异黄酮通过抑制RANKL介导的NF-κB通路激活, 进而调控破骨细胞分化并缓解绝经后骨质疏松。

**关键词:** 骨; 补骨脂异黄酮; 破骨细胞; 通路; 骨质疏松; 小鼠; 骨吸收; 骨形成

## Corylin inhibits osteoclastogenesis and attenuates postmenopausal osteoporosis in mice

Li Xiaoqun, Xu Kaihang, Ji Fang

Department of Traumatic Orthopaedics, Shanghai Changhai Hospital, Shanghai 200433, China

Li Xiaoqun, MD candidate, Department of Traumatic Orthopaedics, Shanghai Changhai Hospital, Shanghai 200433, China

Xu Kaihang, Attending physician, Department of Traumatic Orthopaedics, Shanghai Changhai Hospital, Shanghai 200433, China

Li Xiaoqun and Xu Kaihang contributed equally to this work.

**Corresponding author:** Ji Fang, MD, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Department of Traumatic Orthopaedics, Shanghai Changhai Hospital, Shanghai 200433, China

上海长海医院创伤骨科, 上海市 200433

**第一作者:** 李啸群, 男, 1994年生, 山东省日照市人, 汉族, 海军军医大学在读博士, 主要从事骨代谢疾病相关研究。

**并列第一作者:** 徐凯航, 男, 1990年生, 山东省烟台市人, 汉族, 2014年海军军医大学毕业, 主治医师, 主要从事老年髌部骨折研究。

**通讯作者:** 纪方, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 上海长海医院创伤骨科, 上海市 200433

<https://orcid.org/0000-0001-9176-090X> (李啸群)

**基金资助:** 国家自然科学基金面上项目(81872171), 项目负责人: 纪方

**引用本文:** 李啸群, 徐凯航, 纪方. 补骨脂异黄酮抑制破骨细胞分化缓解小鼠去卵巢骨质疏松 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(2):186-190.



## Abstract

**BACKGROUND:** The balance of bone homeostasis is mediated by the osteoclast-related bone resorption and osteoblast-related bone formation. Over-activation of osteoclasts results in a series of bone metabolic diseases including rheumatoid arthritis and osteoporosis. The activation of nuclear factor- $\kappa$ B pathway induced by receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) plays an important role in osteoclastogenesis.

**OBJECTIVE:** To explore the effect of corylin on RANKL-mediated osteoclastogenesis.

**METHODS:** RAW264.7 cells were incubated with 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128  $\mu$ mol/L corylin. The cytotoxicity of corylin was detected by cell counting kit-8 assay. RANKL induced the differentiation of RAW264.7 cells into osteoclasts, during which 2, 5, 10  $\mu$ mol/L corylin was given. The number of osteoclasts was analyzed by TRAP staining after 5 days of intervention and the morphology and function of osteoclasts were analyzed by F-actin staining. Bone resorption assay was conducted after 2 days of intervention. The activation of NF- $\kappa$ B pathway was detected by western blot at 0, 15, 30, and 60 minutes of intervention. Then in vivo experiments were carried out, and the ovariectomized mice were intraperitoneally given 10 mg/kg twice a week. After 6 weeks of intervention, mouse femurs were taken for morphological analysis.

**RESULTS AND CONCLUSION:** There was no cytotoxicity of corylin below the concentration of 16  $\mu$ mol/L. Corylin inhibited osteoclastogenesis in a dose-dependent manner. Corylin inhibited the formation of F-actin and resorption activity of osteoclasts. Corylin inhibited RANKL-mediated nuclear factor- $\kappa$ B pathway. Corylin treatment reduced the bone loss in postmenopausal osteoporosis mice. Overall, corylin inhibits osteoclastogenesis via blocking nuclear factor- $\kappa$ B pathway and attenuates postmenopausal osteoporosis.

**Key words:** bone; corylin; osteoclast; pathway; osteoporosis; mouse; bone resorption; bone formation

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 81872171 (to JF)

**How to cite this article:** LI XQ, XU KH, JI F. Corylin inhibits osteoclastogenesis and attenuates postmenopausal osteoporosis in mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2021;25(2):186-190.

## 0 引言 Introduction

骨代谢的平衡由破骨细胞介导的骨吸收作用和成骨细胞介导的骨形成作用共同完成<sup>[1]</sup>。破骨细胞过度激活可能导致一系列的骨骼代谢疾病如风湿性关节炎、骨质疏松症等<sup>[2]</sup>。研究表明,抑制破骨细胞的分化及功能,减轻破骨细胞的过度激活,是治疗骨丢失疾病的有效方法<sup>[3]</sup>。

骨质疏松症是一种常见的以骨量丢失、骨微结构改变和骨脆性增加为特点的骨骼代谢疾病,骨质疏松症患者发生骨折的风险显著增加<sup>[4]</sup>。目前,全世界有超过2亿骨质疏松患者<sup>[5]</sup>。流行病学数据显示,骨质疏松发病率与年龄和性别相关,而绝经后骨质疏松是骨质疏松症的最常见形式<sup>[6]</sup>。抑制骨吸收的药物如双膦酸盐等,是目前临床治疗骨质疏松的主要药物<sup>[7]</sup>,但是其在抑制破骨细胞骨吸收功能的同时,也对成骨细胞的骨形成功能产生了抑制,干扰了骨骼的正常重建,在长期用药过程中,还会产生一系列严重的并发症,如下颌骨坏死、非典型性骨折等<sup>[8]</sup>。寻找更好的药物治疗骨质疏松在临床工作中具有重要意义。

破骨细胞来源于单核巨噬细胞系,参与一系列的骨骼代谢疾病的病理过程<sup>[9]</sup>。破骨细胞的分化过程需要一系列细胞因子的参与和通路的激活,其中巨噬细胞克隆刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)和核因子 $\kappa$ B受体激活配体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)在其中发挥重要作用<sup>[10-12]</sup>。巨噬细胞克隆刺激因子可促进破骨前体细胞增殖和RANK的表达<sup>[13]</sup>,随后RANK与RANKL结合,TRAF家族细胞因子被募集,下游NF- $\kappa$ B、PI3K/AKT和MAPK通路被激活,破骨细胞分化相关细胞因子如NFATc1、MMP-9、CTR等表达,共同调控破骨细胞分化过程<sup>[13-14]</sup>。

补骨脂异黄酮是传统强骨中药补骨脂的提取物<sup>[15]</sup>。研究表明,补骨脂异黄酮可减轻脂多糖介导的炎症反应,增加肝癌细胞对化疗的敏感性,抑制肿瘤细胞生长<sup>[16]</sup>。在骨代谢方面,补骨脂异黄酮可促进成骨细胞分化,调控成骨细胞功能<sup>[17]</sup>。但是,补骨脂异黄酮对破骨细胞的影响尚无报道,其在骨丢失疾病中的作用仍不清楚。该研究对补骨脂异黄酮在

破骨细胞分化中的作用及分子通路进行了探索,为临床骨质疏松症的药物治理提供了参考依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学基础实验和动物体内实验。

1.2 时间及地点 2019年4月至2020年1月在上海长海医院中心实验室完成。

1.3 材料 补骨脂异黄酮(上海诗丹德公司);RAW264.7细胞(中科院上海细胞库);DMEM培养基(Gibco, USA);胎牛血清(Gibco, USA);RANKL(Peprotech, USA);巨噬细胞克隆刺激因子(Peprotech, USA);CCK-8试剂盒、TRAP染色试剂盒(Sigma-Aldrich, USA);I $\kappa$ B、p-I $\kappa$ B、p50、p-p50、p65、p-p65、 $\beta$ -actin(Cell Signaling Technology, USA)。

**实验动物:** 8周龄雌性C57BL/6小鼠15只,体质量22-23 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。实验过程遵循上海长海医院动物实验伦理规定(SYXK 2015-0017)。

1.4 方法

1.4.1 CCK-8检测补骨脂异黄酮的细胞毒性 RAW264.7细胞以 $1.5 \times 10^5$ /孔的密度接种于96孔板中,待细胞贴壁后,分别以0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128  $\mu$ mol/L补骨脂异黄酮孵育细胞,每组3孔,5 d后用CCK-8试剂盒检测细胞在450 nm波长处的吸光度值。

1.4.2 体外破骨细胞培养 RAW264.7细胞以 $1.5 \times 10^4$ /孔的密度接种于96孔板中,待细胞贴壁后,加入25  $\mu$ g/L巨噬细胞克隆刺激因子和100  $\mu$ g/L RANKL进行诱导,同时分别加入2, 5, 10  $\mu$ mol/L补骨脂异黄酮孵育细胞,5 d后用TRAP染色试剂盒对细胞进行TRAP染色。5个核以上的细胞被认为是破骨细胞<sup>[18]</sup>。

1.4.3 F-actin染色 RAW264.7细胞以 $1.5 \times 10^5$ /孔的密度接种于96孔板中,待细胞贴壁后,加入25  $\mu$ g/L巨噬细胞克隆刺激因子和100  $\mu$ g/L RANKL进行诱导,同时分别加入2, 5, 10  $\mu$ mol/L补骨脂异黄酮孵育细胞,5 d后用鬼笔环肽对细胞F-actin进行染色。

**1.4.4 骨吸收实验** RAW264.7 细胞诱导为成熟破骨细胞后, 加入胰酶消化, 以每孔 100 个破骨细胞接种于 12 孔骨板中, 加入 25  $\mu\text{g/L}$  巨噬细胞克隆刺激因子和 100  $\mu\text{g/L}$  RANKL, 同时分别加入 2, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  补骨脂异黄酮孵育细胞, 2 d 后加入 1% 次氯酸钠消化, 收集细胞, 在光学显微镜下拍照, 用 Image J 软件对骨板吸收面积进行分析<sup>[19]</sup>。

**1.4.5 Western blot 实验** 在 10  $\mu\text{mol/L}$  补骨脂异黄酮孵育细胞后的第 0, 15, 30, 60 分钟, 加入裂解液, 提取贴壁细胞的总蛋白并测定蛋白含量, 制定标准曲线, 然后电泳、转膜、5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 加入二抗室温孵育 2 h, 化学发光试剂显影, 对细胞的 I $\kappa$ B(1 : 400), p-I $\kappa$ B(1 : 300), p50(1 : 300), p-p50(1 : 300), p65(1 : 200), p-p65(1 : 500),  $\beta$ -actin(1 : 300) 表达水平进行分析。

**1.4.6 小鼠卵巢切除模型** C57BL/6 小鼠用 5% 水合氯醛麻醉后, 切开背部皮肤、腹膜, 暴露出卵巢, 行卵巢切除后用可吸收线进行结扎, 最后缝合背部皮肤。术后恢复 2 d 开始进行正式实验。15 只 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组: 假手术组、卵巢切除组以及药物治疗组, 每组 5 只。由预实验浓度梯度给药, 确定最终无毒给药质量浓度为 10 mg/kg。药物治疗组小鼠每周接受 10 mg/kg 补骨脂异黄酮腹腔注射治疗 2 次。药物干预 6 周后, 处死小鼠, 取小鼠股骨进行形态学分析。

**1.4.7 苏木精 - 伊红染色** 将小鼠股骨在 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 3 d, 用 EDTA 溶液进行脱钙处理 21 d, 将股骨标本石蜡包埋, 切片厚度为 4  $\mu\text{m}$ , 进行苏木精 - 伊红染色, 对小鼠骨小梁面积进行了统计。

#### 组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	探究补骨脂异黄酮对体内骨代谢的影响
选择动物的基本资料:	8 周龄性成熟的雌性 C57BL/6 小鼠
模型与所研究疾病的关系:	卵巢双侧切除模拟临床妇女绝经后骨质疏松
动物来源及品系:	C57BL/6 小鼠
造模技术描述:	麻醉后切除小鼠双侧卵巢
动物数量及分组方法:	随机对照分为假手术组、卵巢切除组以及药物治疗组, 每组 5 只
造模成功评价指标:	卵巢切除后 6 周, 观察到卵巢萎缩且骨量减少
造模后取材及观察指标:	苏木精 - 伊红染色观察股骨形态
伦理委员会批准及批号:	实验方案经过上海长海医院动物伦理委员会批准, 批准号为 SYXK 2015-0017

**1.5 主要观察指标** ①补骨脂异黄酮干预 5 d 后, RAW264.7 细胞存活情况、成熟破骨细胞数量、F-actin 阳性细胞数量; ②补骨脂异黄酮干预 2 d 后骨板吸收面积; ③补骨脂异黄酮干预后 0, 15, 30, 60 min, 破骨细胞分化 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达; ④补骨脂异黄酮干预 6 周后, 卵巢切除小鼠骨量变化。

**1.6 统计学分析** 统计分析由 Graphpad Prism 软件完成。两组间数据分析比较用 Student t 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 补骨脂异黄酮无毒剂量确定** 为排除补骨脂异黄酮细胞毒性对实验结果的影响, 用不同浓度的补骨脂异黄酮对 RAW264.7 细胞进行孵育。结果发现, 在 16  $\mu\text{mol/L}$  浓度以下时, 补骨脂异黄酮无明显细胞毒性, 见图 1。

**2.2 补骨脂异黄酮可抑制破骨细胞分化** 为探究补骨脂异黄酮对破骨细胞分化的影响, 用不同浓度补骨脂异黄酮对巨噬细胞克隆刺激因子及 RANKL 诱导下的 RAW264.7 细胞进行孵育。结果发现, 与对照组相比, RANKL 诱导组细胞形成大量成熟破骨细胞; 加入补骨脂异黄酮后, 成熟破骨细胞的数量明显减少, 在浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时破骨细胞的形成受到明显抑制。以上结果表明, 补骨脂异黄酮可抑制破骨细胞分化, 同时这种抑制作用呈浓度依赖性, 见图 2。

**2.3 补骨脂异黄酮可抑制破骨细胞 F-actin 形成** F-actin 是破骨细胞发挥骨吸收功能的重要单位<sup>[20]</sup>。为探究补骨脂异黄酮对破骨细胞功能的影响, 用不同浓度补骨脂异黄酮对巨噬细胞克隆刺激因子及 RANKL 诱导下的 RAW264.7 细胞进行孵育, 然后进行 F-actin 染色。结果发现, 与对照组相比, RANKL 诱导后有大量 F-actin 形成; 加入补骨脂异黄酮后, F-actin 形成受到明显抑制, 这种抑制作用呈浓度依赖性, 见图 3。

**2.4 补骨脂异黄酮可抑制破骨细胞的骨吸收作用** 为探究补骨脂异黄酮对破骨细胞骨吸收作用的影响, 用不同浓度补骨脂异黄酮对巨噬细胞克隆刺激因子及 RANKL 诱导下的成熟破骨细胞进行孵育。结果发现, 补骨脂异黄酮干预可显著抑制破骨细胞的骨吸收功能, 骨板吸收面积随用药浓度上升而降低, 见图 4。

**2.5 补骨脂异黄酮可抑制 RANKL 介导的 NF- $\kappa$ B 通路** 为探究补骨脂异黄酮抑制破骨细胞分化及功能的分子机制, 10  $\mu\text{mol/L}$  补骨脂异黄酮干预不同时间点对 RANKL 介导的 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白进行分析。结果发现, 在 RANKL 诱导后, I $\kappa$ B, p65, p50 磷酸化水平明显上升, 在加入补骨脂异黄酮之后, NF- $\kappa$ B 通路的激活受到了抑制, 见图 5。

**2.6 补骨脂异黄酮治疗可缓解小鼠绝经后骨量丢失** 为探究补骨脂异黄酮在治疗骨丢失疾病如骨质疏松中的作用, 对小鼠施行卵巢切除术用来模拟绝经后骨质疏松状态, 术后腹腔注射补骨脂异黄酮进行治疗。6 周后股骨苏木精 - 伊红染色结果显示, 卵巢切除组小鼠骨量丢失明显, 骨小梁面积明显下降, 但是补骨脂异黄酮治疗可显著缓解小鼠的骨量丢失, 对小鼠绝经后骨质疏松具有治疗作用, 见图 6。

## 3 讨论 Discussion

骨质疏松症是一种年龄相关的慢性骨骼代谢疾病, 主要以骨量减少、骨微结构改变和骨脆性增加为特点<sup>[21]</sup>, 主要发病原因为成骨细胞介导的骨形成作用和破骨细胞介导的骨吸收作用的失衡<sup>[23]</sup>。研究表明, 雌激素缺失导致炎症因子大量表达, 同时 RANKL 介导的信号通路过度激活, 从而使破骨细胞功能失调, 是绝经后骨质疏松的重要病因<sup>[14]</sup>。因此, 抑制

体内过度激活的破骨细胞功能是治疗绝经后骨质疏松的重要方法<sup>[22]</sup>。

该研究首次报道了补骨脂异黄酮对破骨细胞分化和功能具有抑制作用，同时对其分子机制进行了探讨，发现其可抑制 RANKL 介导的 NF- $\kappa$ B 通路激活，进而影响破骨细胞的分化。通过体内实验对补骨脂异黄酮的功能进行了验证，发现其可减轻小鼠卵巢切除手术后的骨质疏松症状，对骨质疏松症具有良好的治疗效果。

骨骼代谢的平衡由成骨细胞介导的骨形成作用和破骨细胞介导的骨吸收作用共同完成<sup>[23]</sup>。当破骨细胞被过度激活时，会导致一系列的疾病，如风湿性关节炎、骨质疏松症等<sup>[24-25]</sup>。研究表明，中药提取物在肿瘤治疗、抗炎、抗氧化等方面都具有重要作用<sup>[26]</sup>。补骨脂异黄酮来源于传统健骨中药补骨脂，其可抑制肿瘤细胞生长，同时具有抗炎、抗氧化的作用<sup>[17, 27-29]</sup>。在骨代谢方面，补骨脂异黄酮可促进成骨细胞分化，促进骨形成功能<sup>[17]</sup>。然而，其在破骨细胞中发挥的作用尚不明确。成骨细胞和破骨细胞之间平衡的失调常由于免疫系统平衡的打破。因此，作者推测补骨脂异黄酮在骨质疏松症的治疗中可能发挥重要作用。

为了排除补骨脂异黄酮本身细胞毒性的影响，首先进行了 CCK-8 实验，并确定了 2, 5, 10  $\mu$ mol/L 无毒剂量来对细胞进行干预，发现补骨脂异黄酮可显著抑制 RANKL 介导的破骨细胞分化，并具有浓度依赖效应。RANK 与 RANKL 结合后，TRAF 细胞因子家族被募集，同时下游分子通路如 NF- $\kappa$ B、MAPK 和 PI3K/AKT 通路被激活。既往研究表明，补骨脂异黄酮可抑制 NF- $\kappa$ B 通路，抑制炎症反应和肿瘤转移<sup>[27, 29]</sup>。为探究补骨脂异黄酮抑制破骨细胞分化的分子通路机制，Western blot 实验检测了 I $\kappa$ B, p65, p50 磷酸化水平，结果发现补骨脂异黄酮干预可显著抑制 NF- $\kappa$ B 通路的激活。因此，补骨脂异黄酮可通过阻断 NF- $\kappa$ B 通路的激活来抑制破骨细胞的分化。

F-actin 参与成熟破骨细胞内封闭环的形成，是破骨细胞行使骨吸收功能的单位<sup>[20, 30]</sup>。为了进一步探究补骨脂异黄酮对破骨细胞功能的影响，进行了 F-actin 染色和骨吸收实验，结果发现补骨脂异黄酮对成熟破骨细胞的功能也具有明显的抑制作用。

目前，抑制破骨细胞骨吸收功能的药物如双膦酸盐，是目前临床上治疗骨质疏松的主要药物<sup>[31]</sup>，但双膦酸盐抑制骨吸收作用的同时会干扰骨重建的过程，抑制成骨细胞的骨形成功能<sup>[32]</sup>。研究发现，长期应用双膦酸盐药物会导致下颌骨坏死和非典型性骨折<sup>[33]</sup>。特立帕肽是一种重组甲状旁腺激素，也是目前临床上应用的唯一一种生物制剂<sup>[34]</sup>，同时抗小鼠硬化蛋白抗体也是近年来用来促进骨形成的重要药物，其安全性也正在接受临床评估<sup>[35]</sup>。生物制剂治疗病理性骨量丢失越来越受到研究者的重视。

实验进一步通过卵巢切除小鼠模型来模拟临床中绝经后骨质疏松状况<sup>[36]</sup>，并进行了补骨脂异黄酮干预体内实验。在补骨脂异黄酮治疗 6 周后，采用苏木精 - 伊红染色方法对小

鼠股骨进行了组织形态学分析，结果发现小鼠骨量丢失状况得到了明显的缓解，表明补骨脂异黄酮在体内具有非常好的治疗绝经后骨质疏松的效应。

该研究通过体内及体外实验探究了补骨脂异黄酮对破骨细胞分化和功能的抑制作用，并对相关分子通路进行了探索，证明补骨脂异黄酮在骨质疏松疾病治疗中具有非常重要的价值，但是其抑制破骨细胞分化的具体机制仍需进一步实验说明。

**作者贡献** 实验设计为李啸群、纪方；体内实验实施为李啸群、徐凯航；体外实验实施为李啸群、徐凯航；数据统计和文章撰写为李啸群。

**经费支持** 该文接受了“国家自然科学基金面上项目 (81872171)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突** 文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题** 实验方案经过上海长海医院动物伦理委员会批准，批准号为 SYXK 2015-0017。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审** 文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

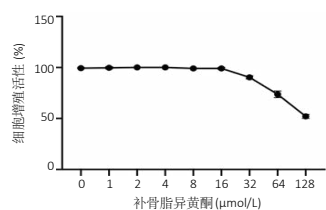
**生物统计学声明** 文章统计学方法已经通过海军军医大学统计学专家审核。

**文章版权** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

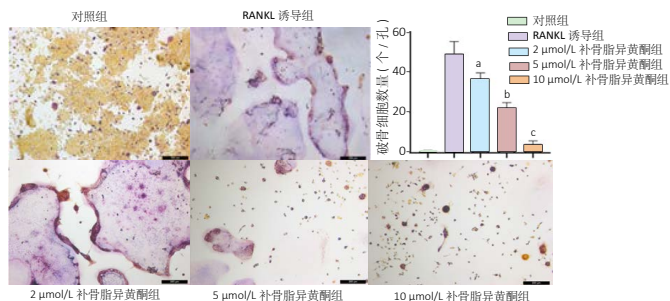
**开放获取声明** 这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名 - 非商业性使用 - 相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] SIMS NA, MARTIN TJ. Osteoclasts Provide Coupling Signals to Osteoblast Lineage Cells Through Multiple Mechanisms. *Annu Rev Physiol*. 2020;82:507-529.
- [2] HUANG J, LIN D, WEI Z, et al. Parathyroid Hormone Derivative with Reduced Osteoclastic Activity Promoted Bone Regeneration via Synergistic Bone Remodeling and Angiogenesis. *Small*. 2020;16(6):e1905876.
- [3] HASEGAWA T, KIKUTA J, SUDO T, et al. Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1. *Nat Immunol*. 2019;20(12):1631-1643.
- [4] SIPIŁÁ S, TÖRMÄKANGAS T, SILLANPÄÄ E, et al. Muscle and bone mass in middle-aged women: role of menopausal status and physical activity. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020 Feb 3. doi: 10.1002/jcsm.12547. [Epub ahead of print]
- [5] DE MARTINIS M, SIRUFO MM, GINALDI L. Osteoporosis: Current and emerging therapies targeted to immunological checkpoints. *Curr Med Chem*. 2019 Jul 30. doi: 10.2174/0929867326666190730113123. [Epub ahead of print]
- [6] RUCHLEMER R, AMIT-KOHN M, TVITO A, et al. Bone loss and hematological malignancies in adults: a pilot study. *Support Care Cancer*. 2018;26(9):3013-3020.
- [7] ZEBIC L, PATEL V. Preventing medication-related osteonecrosis of the jaw. *BMJ*. 2019;365:l1733.
- [8] MCCLUNG MR, O'DONOGHUE ML, PAPAIOULOS SE, et al. Odanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis: results of the LOFT multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial and LOFT Extension study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(12):899-911.
- [9] VELETIC I, MANSHOURI T, MULTANI AS, et al. Myelofibrosis osteoclasts are clonal and functionally impaired. *Blood*. 2019;133(21):2320-2324.
- [10] OIKAWA T, OYAMA M, KOZUKA-HATA H, et al. Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *J Cell Biol*. 2012;197(4):553-568.
- [11] MA QL, FANG L, JIANG N, et al. Bone mesenchymal stem cell secretion of sRANKL/OPG/M-CSF in response to macrophage-mediated inflammatory response influences osteogenesis on nanostructured Ti surfaces. *Biomaterials*. 2018;154:234-247.
- [12] KWON OC, CHOI B, LEE EJ, et al. Negative Regulation of Osteoclast Commitment by Intracellular Protein Phosphatase Magnesium-Dependent 1A. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(5):750-760.
- [13] ETHIRAJ P, OTTINGER AM, SINGH T, et al. Proteasome inhibition suppresses microgravity elevated RANK signaling during osteoclast differentiation. *Cytokine*. 2020;125:154821.



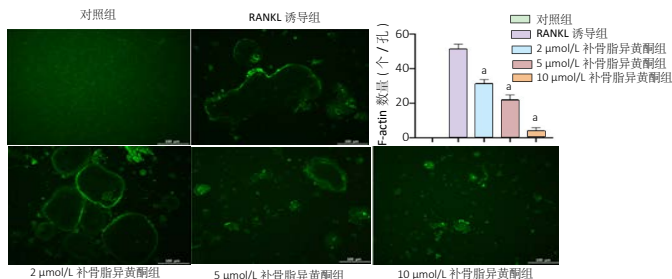
**图1 | CCK-8 实验检测补骨脂异黄酮干预后的细胞增殖活性**  
**Figure 1 | Cell counting kit-8 assay for cell proliferative activity after intervention with corylin**



**图注:** RANKL 诱导组细胞形成大量成熟破骨细胞, 加入补骨脂异黄酮后成熟破骨细胞的数量明显减少, 在浓度为 10 μmol/L 时破骨细胞的形成受到明显抑制。与 RANKL 诱导组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01, <sup>c</sup>*P* < 0.001

**图2 | 破骨细胞 TRAP 染色 (标尺为 200 μm)**

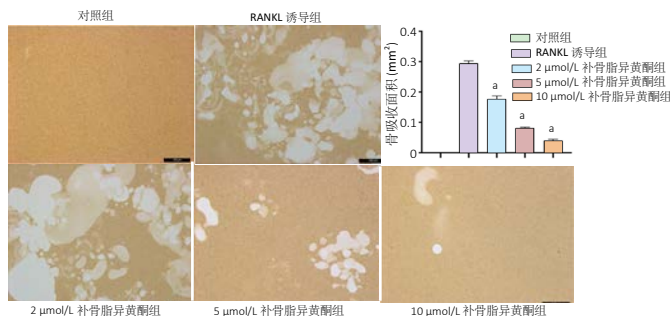
**Figure 2 | TRAP staining for osteoclasts (scale bar=200 μm)**



**图注:** 与对照组相比, RANKL 诱导后有大量 F-actin 形成; 加入补骨脂异黄酮后, F-actin 形成受到明显抑制, 这种抑制作用呈浓度依赖性。与 RANKL 诱导组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.001

**图3 | 破骨细胞 F-actin 染色 (标尺为 100 μm)**

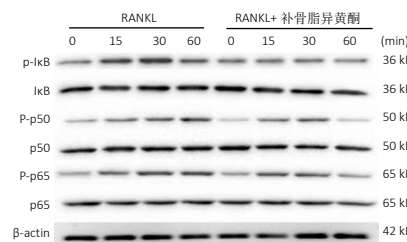
**Figure 3 | F-actin staining for osteoclasts (scale bar=100 μm)**



**图注:** 补骨脂异黄酮干预可显著抑制破骨细胞的骨吸收功能, 骨板吸收面积随用药浓度上升而降低。与 RANKL 诱导组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.001

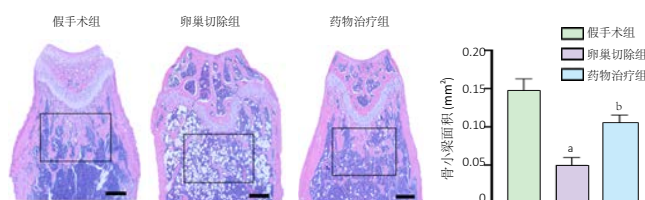
**图4 | 破骨细胞骨吸收实验 (标尺为 100 μm)**

**Figure 4 | Bone resorption assay for osteoclasts (scale bar=100 μm)**



**图5 | Western blot 检测补骨脂异黄酮干预不同时间点 NF-κB 通路相关蛋白的表达**

**Figure 5 | Western blot assay for the activation of nuclear factor-κB pathway at different time of corylin intervention**



**图注:** 卵巢切除组小鼠骨量丢失明显, 骨小梁面积明显下降, 但是补骨脂异黄酮治疗可显著缓解小鼠的骨量丢失, 对小鼠绝经后骨质疏松具有治疗作用。与假手术组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.001, 与卵巢切除组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.001

**图6 | 苏木精-伊红染色分析小鼠股骨形态 (标尺为 500 μm) 及骺板下骨小梁面积 (框选部分) 统计**

**Figure 6 | Hematoxylin-eosin staining for the morphology of mouse femurs (scale bar=500 μm) and the area of trabecular bone (framed part)**

[14] LEE NK, CHOI YG, BAIK JY, et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*. 2005;106(3):852-859.

[15] 林瑞民, 王大为, 熊志立, 等. 补骨脂中两个黄酮类成分的高效液相色谱测定 [J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(9): 669-671.

[16] KLOTZ LH, MCNEILL IY, KEBABDJIAN M, et al. A phase 3, double-blind, randomised, parallel-group, placebo-controlled study of oral weekly alendronate for the prevention of androgen deprivation bone loss in nonmetastatic prostate cancer: the Cancer and Osteoporosis Research with Alendronate and Leuprolide (CORAL) study. *Eur Urol*. 2013;63(5):927-935.

[17] YU AX, XU ML, YAO P, et al. Corylin, a flavonoid derived from *Psoralea Fructus*, induces osteoblastic differentiation via estrogen and Wnt/β-catenin signaling pathways. *FASEB J*. 2020;34(3):4311-4328.

[18] XIN Z, JIN C, CHAO L, et al. A Matrine Derivative M54 Suppresses Osteoclastogenesis and Prevents Ovariectomy-Induced Bone Loss by Targeting Ribosomal Protein S5. *Front Pharmacol*. 2018;9:22.

[19] CHEN X, ZHI X, WANG J, et al. RANKL signaling in bone marrow mesenchymal stem cells negatively regulates osteoblastic bone formation. *Bone Res*. 2018;6:34.

[20] CHELLAIAH MA, MOORER MC, MAJUMDAR S, et al. L-Plastin deficiency produces increased trabecular bone due to attenuation of sealing ring formation and osteoclast dysfunction. *Bone Res*. 2020;8:3.

[21] COLEMAN R, BODY JJ, AAPRO M, et al. Bone health in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii124-37.

[22] CAPOZZI A, LELLO S, PONTECORVI A. The inhibition of RANKL in the management of postmenopausal osteoporosis and related fractures: the role of denosumab. *Gynecol Endocrinol*. 2014;30(6):403-408.

[23] XU R, YALLOWITZ A, QIN A, et al. Targeting skeletal endothelium to ameliorate bone loss. *Nat Med*. 2018;24(6):823-833.

[24] LEUTNER M, MATZHOLD C, BELLACH L, et al. Diagnosis of osteoporosis in statin-treated patients is dose-dependent. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(12):1706-1711.

[25] RODAN GA, MARTIN TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*. 2000;289(5484):1508-1514.

[26] 孙燕. 中医中药在肿瘤综合治疗中的应用 [J]. *中国中西医结合杂志*. 1997, 17(6):323-324.

[27] HUANG MY, TU CE, WANG SC, et al. Corylin inhibits LPS-induced inflammatory response and attenuates the activation of NLRP3 inflammasome in microglia. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):221.

[28] CHEN CY, CHEN CC, SHIEH TM, et al. Corylin Suppresses Hepatocellular Carcinoma Progression via the Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition, Mediated by Long Noncoding RNA GASS. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2): E380.

[29] CHEN CC, CHEN CY, UENG SH, et al. Corylin increases the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to chemotherapy through long noncoding RNA RAD51-AS1-mediated inhibition of DNA repair. *Cell Death Dis*. 2018;9(5):543.

[30] CHELLAIAH MA, MA T, MAJUMDAR S. L-plastin phosphorylation regulates the early phase of sealing ring formation by actin bundling process in mouse osteoclasts. *Exp Cell Res*. 2018;372(1):73-82.

[31] TANG Y, WU X, LEI W, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*. 2009;15(7):757-765.

[32] CHENG C, WENTWORTH K, SHOBACK DM. *New Frontiers in Osteoporosis Therapy*. *Annu Rev Med*. 2020;71:277-288.

[33] SANCAR F. Caution With New Osteoporosis Drug. *JAMA*. 2019;321(19):1862.

[34] HODSMAN AB, BAUER DC, DEMPSTER DW, et al. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev*. 2005;26(5):688-703.

[35] MCCLUNG MR. Clinical utility of anti-sclerostin antibodies. *Bone*. 2017;96:3-7.

[36] CLINE-SMITH A, AXELBAUM A, SHASHKOVA E, et al. Ovariectomy Activates Chronic Low-Grade Inflammation Mediated by Memory T Cells, Which Promotes Osteoporosis in Mice. *J Bone Miner Res*. 2020 Jan 29. doi: 10.1002/jbmr.3966. [Epub ahead of print]