

- chemical component of Hawthorn leave [J]. J Liaoning Coll Tradit Chin Med(辽宁中医学院学报), 2001, 3(2): 98-99.
- [3] KUANG R, CHEN N, KANG H, et al. Mechanisms of total flavones of crataegus leaves on experimental atherosclerosis in rabbits [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(4): 372-375.
- [4] OLIVEIRA E J, WATSON D G A, GRANT M H. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and identification of flavonoid glycosides in human plasma [J]. Xenobiotica, 2002, 32(4): 279-287.
- [5] BOMBARDELLI E. Photosome: New cosmetic delivery system [J]. Boll Chim Farm, 1991, 130(11): 431.
- [6] SHI S L, GAO M, TONG L J, et al. Study on preparation of the total flavonoids of hawthorn leaves-phospholipids complex [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2013, 28(1): 243-246.
- [7] WANG X B, GAO M, TONG L J, et al. Study on physicochemical properties of the total flavonoids of hawthorn leaves-phospholipids complex [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技), 2012, 19(3): 240-242.
- [8] REED R, KOLZ C, POTTER B, et al. The mechanistic basis for the disparate effects of angiotensin II on coronary collateral growth [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(1): 61-67.
- [9] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Methodology of Pharmacological Experiment(药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 700-701.
- [10] AMIDON G L, LENNERNAS H, SHAH V P, et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability [J]. Pharm Res, 1995, 12(3): 413-420.
- [11] FAGERHOLM U, JOHANSSON M, LENNERNAS H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. Pharm Res, 1996, 13(9): 1336-1342.
- [12] HU Y Q, ZHENG L Y, QIAN C Q, et al. Absorption of phenol red from rat intestine [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 1996, 27(6): 355-359.

收稿日期: 2013-08-09

淫羊藿苷抑制亮氨酸拉链蛋白表达调节糖皮质激素诱导的 MC3T3-E1 成骨基因的表达失衡

林忠, 孙渊*, 金慧, 洪盾, 朱敏, 杨建苗, 林建群, 丁亭亭(浙江省台州医院临床药学实验中心, 浙江 台州 317000)

摘要: 目的 考察成骨细胞 MC3T3-E1 中亮氨酸拉链蛋白(GILZ)的表达与淫羊藿苷(icraiin, ICR)和糖皮质激素地塞米松(dexamethasone, DEX)之间的关系以及对部分成骨相关基因的表达影响。方法 将诱导成熟分化的 MC3T3-E1 细胞分为 3 组, 分别为 DEX 组、ICR 组以及 ICR+DEX 组, 通过 Real-Time RT-PCR 来检测不同组中 GILZ、骨保护素(OPG)、破骨细胞分化因子(RANKL)、骨钙素(OC)和碱性磷酸酶(ALP)mRNA 表达。结果 DEX 能够提升 GILZ、RANKL 和 ALP 的表达, 降低 OPG、OC 的表达, 提高 RANKL/OPG 表达比率。ICR 能够抑制 GILZ、RANKL 和 ALP 的表达, 提升 OPG、OC 的表达, 降低 RANKL/OPG 表达比率。并且 ICR 能够抑制 DEX 诱导的 GILZ、RANKL 和 ALP 表达升高, 逆转 DEX 诱导的 OPG、OC 的表达抑制。同时显著降低了 RANKL/OPG 表达比率。结论 ICR 通过抑制 GILZ 的 mRNA 表达, 降低 RANKL/OPG 的表达比率, 抑制破骨细胞成熟激活。ICR 通过抑制 ALP 表达和提高 OC 表达提高成骨细胞的增殖能力。**关键词:** 淫羊藿苷; 亮氨酸拉链蛋白; 糖皮质激素; MC3T3-E1

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)08-0926-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.006

Icraiin Regulating Expression Imbalance of Glucocorticoid-induced Osteogenesis Genes by Inhibiting GILZ Expression in MC3T3-E1

LIN Zhong, SUN Yuan*, JIN Hui, HONG Dun, ZHU Min, YANG Jianmiao, LIN Jianqun, DING Tingting (Clinical Pharmacy Experimental Center of Taizhou Hospital in Zhejiang Province, Taizhou 317000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the icraiin regulating expression imbalance of glucocorticoid-induced osteogenesis genes by inhibiting GILZ expression in MC3T3-E1. **METHODS** Mature induced differentiation of MC3T3-E1 were divided into 3 groups, respectively dexamethasone(DEX) group, icraiin(ICR) group and ICR+DEX group. The mRNA expression lever

基金项目: 恩泽科研基金(12EZD34); 台州医院青蓝人才培养工程

作者简介: 林忠, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (0576)85487907 E-mail: lz6323@163.com *通信作者: 孙渊, 男, 主管药师 Tel: (0576)85199449 E-mail: linz6285@enzemed.com

of GILZ, osteoprotegerin(OPG), osteoclast differentiation factor(RANKL), osteocalcin (OC) and alkaline phosphatase (ALP) from different groups were detected by Real-Time RT-PCR. **RESULT** On the one hand, increase of GILZ by DEX improved the expression lever of RANKL, ALP and the ratio of RANKL/OPG in a dose-dependent manner in MC3T3-E1, but inhibited OPG and OC. On the other hand, inhibition of GILZ by ICR increased expression lever of OPG and OC, but inhibited RANKL, ALP and the ratio of RANKL/OPG also in a dose-dependent manner. Further more, enhancing of GILZ, RANKL, ALP and the ratio of RANKL/OPG induced by DEX could be inhibited in the presence of ICR, but the expression lever of OPG and OC were increased. **CONCLUSION** Inhibition of GILZ by ICR reduced the ratio of RANKL/OPG, suggesting a physiological role in inhibiting osteoclast maturation. Inhibition of ALP and increase of OC by ICR may improve proliferation of osteoblasts.

KEY WORDS: icraiin; GILZ; glucocorticoid; MC3T3-E1

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)诱导的骨质疏松是长期 GC 治疗病患中最严重的不良反应之一^[1]。克氏综合症是一种内源性 GC 分泌旺盛的疾病,这类疾病也会提高骨折发生的危险。因此,无论是内源性 GC 还是外源性 GC 都会导致骨质疏松的发生^[2]。

关于 GC 诱导的骨质疏松机制研究报告很多。一方面, GC 通过激活 caspase-3 和糖原合成酶 3 β (GSK3 β)诱导成骨细胞和骨细胞的凋亡;另一方面,通过激活 Wnt 通路抑制 dickkopf-1(Dkk-1)的分泌表达,从而抑制成骨细胞的成熟分化。OPG/RANK/RANKL 系统是调节骨质代谢的重要信号通路之一。GC 能够抑制骨保护素(osteoprotegerin, OPG)表达和提高 RANKL 表达诱导成骨细胞介导下的破骨细胞成熟分化。在骨骼中, RANKL 不仅能够激活破骨细胞的成熟分化,也能够抑制破骨细胞的凋亡。OPG 则可以抑制巨噬细胞转化为破骨细胞的能力,也能够与成骨细胞和骨原细胞上表达的 RANKL 结合,从而抑制 RANKL 对于骨原细胞、成骨细胞、破骨细胞和巨噬细胞的作用。因此,成骨细胞所表达的 RANKL 和 OPG 的比率,决定着破骨细胞的吸收作用^[3]。

GC 诱导的亮氨酸拉链蛋白(GILZ)是 GILZ 蛋白家族中的新成员,是 GC 发挥炎症抑制作用的重要转录因子,属于转录因子 TSC-22。GILZ 可结合到编码 PPAR-2(peroxisome-proliferator-activated receptor-2)基因启动子 CCAAT 增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein, C/EBP)的串联重复序列上,抑制其转录,也能够抑制脂蛋白脂肪酶和脂肪细胞蛋白酶的表达。而 PPAR γ -2 能够通过干预 Smad3 来抑制 Runx2,可能参与脂肪细胞与成骨细胞分化间的转换机制。Runx2 的表达是成骨细胞形成所必须的,无论是 Runx2 表达缺失还是 Runx2 过表达都会导致小鼠骨质形成障碍^[4-5]。因此,Runx2 在骨质代谢平衡中与部分细胞因子一

样起着双向调节的作用。

Zhang 等^[6]过表达 GILZ 提高了间充质干细胞的成骨细胞分化,与临床观察到的克氏综合症骨质疏松症患者骨组织中 GILZ 的表达明显提高所违背。实际上对于 GILZ 与骨质疏松之间的关系仅仅报道了 GILZ 与 MSC 之间的关系,而 GILZ 与成骨细胞、巨噬细胞和破骨细胞之间的关系至今鲜有报道。淫羊藿苷(icraiin, ICR)与 GILZ 之间的关系更是无人问津。本研究一方面试着阐述 GILZ 与鼠源成骨细胞 MC3T3-E1 成骨相关基因表达以及对成骨细胞增殖凋亡之间的关系,另一方面考察 GILZ 与传统中药活性成分 ICR 之间的联系,从而初步探讨 ICR 调控引起的 GILZ 在成骨细胞中表达变化所表现出的功能到底存在什么样的关系。

1 材料

1.1 仪器

NIB-100 生物显微镜(ROVEL); 311 二氧化碳恒温培养箱(美国 Thermo); Real-Time 7300 PCR 仪(美国 ABI)、ST16R 离心机(美国 Thermo)。

1.2 试剂和细胞株

改良型 α -MEM 培养液(美国 HYCLONE, 批号: SH30265.01B); 胰酶(USP, 批号: P110505-250g); 胎牛血清(美国 HYCLONE, 批号: SH30401.01); RT-PCR 试剂盒(PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit D6110A, 日本); real time PCR 试剂盒(SYBR PremixEx TagTM, Takala Code:DRR081A, 日本); Trizol Reagent (美国 Invitrogen, 批号: 15596-026,); 8 连管 PCR real time PCR 专用(平盖)(AXYGEN, PCR-0208-F); ICR(灭国 Sigama, 批号: 11286MSDS, 含量 $\geq$ 94%); 地塞米松(dexamethasone, DEX)(美国 Sigama, 批号: D4902-25MG); MC3T3-E1 细胞(浙江省台州医院公共实验平台保存, ATCC)。

1.3 引物

利用 PUBMED Primer-BLAST 网站进行引物

设计,最终设计引物经 Primer-BLAST 数据库特异性比对和预实验验证均为目的基因特异性引物。引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

Tab. 1 The gene sequence of purpose primers

引物名称	引物序列
NM_007431.2	正向引物 CCGGCTGGAGATGGACAAAT
Alp	反向引物 TAGTCACAATGCCACGGAC
NM_010286.3	正向引物 GACACCCTTGGAGTCACTTCT
GILZ	反向引物 GGTGGTTCTTCACGAGGTCC
NM_008764.3	正向引物 GCCACGCAAAAGTGTGAAT
OPG	反向引物 TTTGGTCCCAGGCAAACTGT
NM_011613.3	正向引物 CTAAGAGACATGGCCACGG
RANKL	反向引物 GTCCAGGGGTTAGACCCAGA
NM_007541.2	正向引物 ATGGCTTGAAGACCGCTAC
OC	反向引物 AGGGCAGAGAGAGAGGACAG

2 方法

2.1 α -MEM 细胞培养基的配制(培养基 A)

含 10%胎牛血清的 α -MEM 细胞培养基。

2.2 成骨诱导 α -MEM 细胞培养基的配制(培养基 B)

在培养基 A 中加入适量的 β -甘油磷酸钠和维生素 C,使培养基中 β -甘油磷酸钠浓度为 $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,维生素 C 浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 ICR 标准溶液配制

称取 ICR(ICR 含量 $\geq 98\%$)7.2 mg 至 5 mL EP 管中,加入 2 mL DMSO 得 $3.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ICR 溶液,再加入 3.6 mL PBS 缓冲液溶解。

2.4 DEX 标准溶液配制

称取 5 mg DEX 至 5 mL EP 管中,加入 5 mL PBS 缓冲液溶解得 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DEX 标准溶液。

2.5 MC3T3-E1 细胞培养

MC3T3-E1 种子细胞的培养:从液氮灌中取一株冷冻 MC3T3-E1 细胞复苏。于 5 mL 培养瓶中用培养基 A 培养,待长至 80%丰度时传代,待实验所用。3~4 d 换一次培养基。

不同 DEX 浓度刺激 MC3T3-E1 细胞的培养:取上述待用种子细胞 1×10^5 个 $\cdot\text{孔}^{-1}$,均匀接种于 24 孔板中,以培养基 A 培养,待细胞长至 70%丰度时在每孔中加入培养基 B 诱导培养 3 d,分别在每孔中加入适量的 DEX 标准溶液使培养液中的 DEX 浓度分别为 0, 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} , $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,继续培养 4 h 后收集细胞,每个浓度设 2 个复孔。其中阴性对照组对应加入 0.05%的乙

醇。收集细胞后 real time PCR 测定对应 mRNA 表达,每孔重复 3 次。

不同 ICR 浓度刺激 MC3T3-E1 细胞的培养:取上述种子细胞 1×10^5 个 $\cdot\text{孔}^{-1}$,均匀接种于 24 孔板中,以培养基 A 培养,待细胞长至 70%丰度时。加入培养基 B,分别在每孔中加入适量的 ICR 标准溶液使培养液中的 ICR 浓度分别为 0, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,培养 3 d。其中阴性对照组对应加入 0.05%的 DMSO。收集细胞后 real time PCR 测定对应 mRNA 表达,每孔重复 3 次。

不同 ICR 培养基 B 预孵育对 DEX 诱导 MC3T3-E1 成熟分化过程中成骨相关基因表达的影响:取上述种子细胞 1×10^5 个 $\cdot\text{孔}^{-1}$,均匀接种于 24 孔板中,以培养基 A 培养,细胞接种培养至 70%丰度时,加入含有浓度 ICR 为 0, 10^{-7} , $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基 B 干预 MC3T3-E1 细胞成熟分化 3 d,再加入不同浓度 DEX 刺激 4 h。ICR 为 $0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的空白以含 0.05% DMSO 培养基 B 为对照。 $0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEX 为 0.05%的乙醇。收集细胞后 real time PCR 测定对应 mRNA 表达,每孔重复 3 次。

2.6 逆转录和 real time PCR

收集步骤“2.5”中所得细胞并用 Trizol 提取对应组中的 mRNA。取 RNA 5 μL 至 200 μL EP 管于冰浴中,并依次加入 7 μL RNase Free 水、4 μL 反转录酶缓冲液、1 μL NdTP、1 μL 随机引物、1 μL Rnasin 和 1 μL 反转录酶。反转录反应条件为 42°C 50 min, 72°C 15 min。反应结束后将产物冻存于 -20°C 备用。取 2 μL cDNA 模板至 real time PCR 8 连管中,再在每孔加入 1.6 μL MgCl_2 、0.8 μL Primer Forward、0.8 μL Primer Reverse、2 μL SYBR Green I MIX 和适量 Nuclease-Free H_2O 补足 20 μL 反应体系。realtime PCR 程序:酶激活 95°C , 10 min; 扩增反应, 95°C , 15 s, 变性; $50\sim 60^\circ\text{C}$, 5 s, 退火; 72°C , 15 s 延伸; 76°C , 3 s, 荧光检测; 共 40 个循环,溶解曲线, $75\sim 95^\circ\text{C}$ 。

2.7 统计学方法

使用 Minitab 16 Statistical Software 对 real time PCR 的结果进行 one-way ANOVA 统计分析。

3 结果

3.1 不同浓度 DEX 对成熟分化过程中 MC3T3-E1 基因表达的影响

不同浓度 DEX 对 MC3T3-E1 成熟分化过程中与成骨相关的 GILZ、OPG、RANKL、ALP 和 OC 的表达差异见图 1。图 1A 中 GILZ 的表达随着 DEX 浓度由 10^{-12} mol·L⁻¹ 至 10^{-6} mol·L⁻¹ 的增加而增加, 与阴性对照组相比, DEX 浓度 10^{-6} mol·L⁻¹ 组 GILZ 的表达最大提高了 2.67 倍左右 ($P=0.0048$); OPG 表达则随着 DEX 浓度的增加而下降, 最大下降程度达到 87% ($P=0.0016$), OC 的表达量在最高 DEX 浓度下则下降了 90% ($P=0.0157$) 且都与 GILZ 的表达呈负相关; RANKL 表达则随着 DEX 浓度的增加而提高, 与阴性对照组相比最大提高了 4.35 倍 ($P=0.0132$), 与 GILZ 的表达呈正相关。ALP 也随着 DEX 浓度的提高而表达增加 ($P=0.0229$)。RANKL 与 OPG 的 mRNA 表达比率与阴性对照组相比提高了 35.0 倍。

3.2 不同浓度 ICR 对成熟分化过程中 MC3T3-E1 基因表达的影响。

不同 ICR 浓度条件下 MC3T3-E1 细胞中相应基因表达差异见图 2。GILZ 的表达随着 ICR 浓度由 10^{-9} mol·L⁻¹ 至 10^{-6} mol·L⁻¹ 呈递减状态, 与阴性对照相比, 最低 GILZ 表达量在 ICR 10^{-6} mol·L⁻¹ 时下降了 65% ($P=0.0105$)。OPG 和 OC 表达量与阴性对照组相比则明显升高了, 且与 ICR 浓度呈剂量依赖性关系, 其中 OPG 最高表达量为 ICR 浓度 10^{-6} mol·L⁻¹ 组, 与阴性对照组相比提高了 2.75 倍 ($P=0.0295$), OC 表达量也提高了近 2.04 倍

($P=0.0108$)。RANKL 和 ALP 表达量与阴性对照组相比显著降低了, 其中 RANKL 最大降低了 77% ($P=0.0107$), ALP 则约降低了 68% ($P=0.0133$)。RANKL 与 OPG 相对表达比率与阴性对照组相比下降了 92%。

3.3 不同浓度 ICR 培养基 B 预孵育对 DEX 诱导 MC3T3-E1 成熟分化过程中成骨相关基因表达的影响

由图 1 和图 2 可知, ICR 和 DEX 在 MC3T3-E1 成熟分化过程中的成骨相关基因表达影响具有相反作用。为了进一步验证他们之间的关系, 本组实验先用含 10^{-6} 和 10^{-7} mol·L⁻¹ 的 ICR 培养基 B 培养 MC3T3-E1, 3 d 后以含 10^{-6} 和 10^{-8} mol·L⁻¹ 的 DEX 培养基 B 培养 4 h。本组实验的基因表达差异见图 3。从阴性对照组、单独使用 ICR 组 2 和 7 以及单独使用 DEX 组 3 和 5 之间对 MC3T3-E1 的相应基因表达与前面两部分实验结果相似, 都存在着显著性差异。其中 DEX 组与 ICR 组对基因的表达差异趋势也呈相反状态。在 ICR 预处理 10^{-6} mol·L⁻¹ 与 10^{-7} mol·L⁻¹ 2 组中, DEX 诱导的 GILZ、RANKL 和 ALP 的表达升高都能够被 ICR 所抑制, 使其朝着阴性对照组表达量方向逆转; 而 OPG 和 OC 的表达量都显著提高了, 虽然与单独使用 ICR 组相比有所下降, 但与单独使用 DEX 组存在显著性差异。RANKL 与 OPG 相对表达比率与阴性对照组相比下降了 55%。结果见图 3。

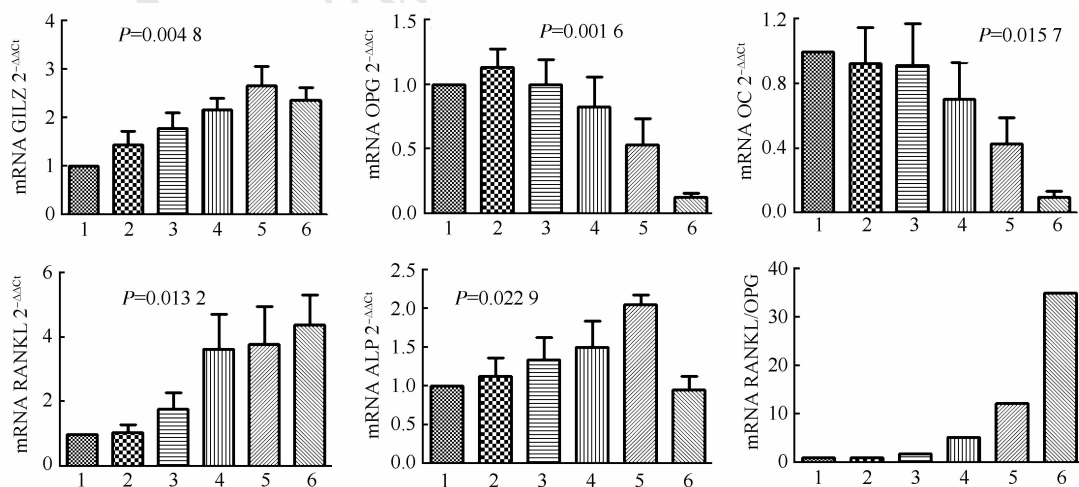


图 1 不同 DEX 浓度对成熟分化过程中 MC3T3-E1 基因表达的影响

1-阴性对照组; 2-6-DEX 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} mol·L⁻¹。

Fig. 1 The effects of gene expression to MC3T3-E1 in the process of differentiated by different concentrations of DEX treatment
1-negative control; 2-6-DEX 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} mol·L⁻¹.

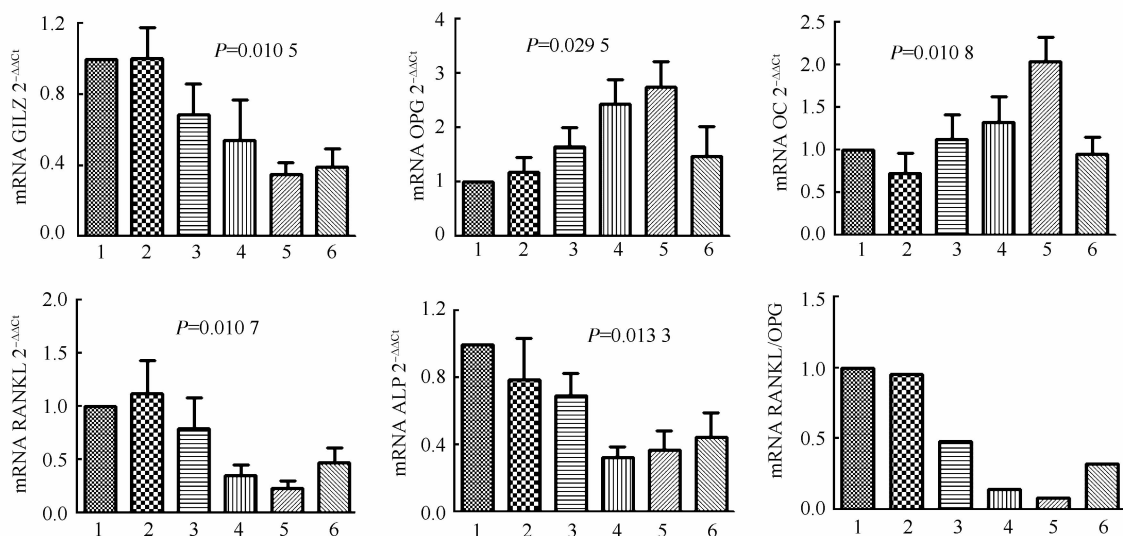


图2 不同ICR浓度对MC3T3-E1成熟分化过程中基因表达的影响

1-阴性对照组; 2-6-ICR 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol·L $^{-1}$ 。

Fig. 2 The effects of gene expression to MC3T3-E1 in the process of differentiated by different concentrations of ICR treatment

1-阴性对照组; 2-6-ICR 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol·L $^{-1}$ 。

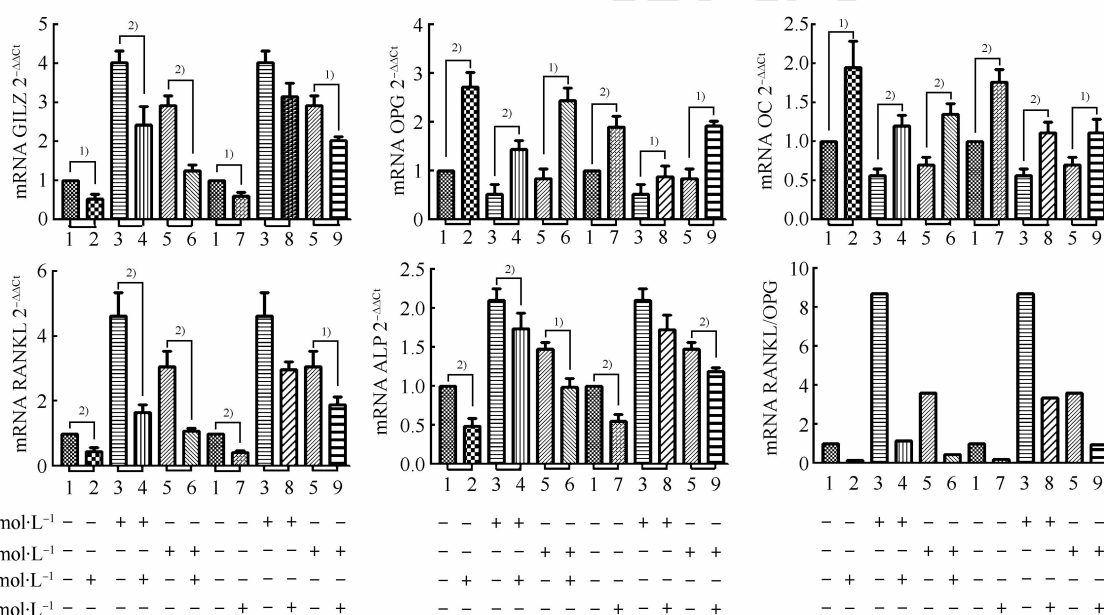


图3 不同ICR培养基B预孵育对DEX诱导MC3T3-E1成熟分化过程中成骨相关基因表达的影响

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

Fig. 3 The effects of gene expression to MC3T3-E1 in the process of DEX-induced differentiated by different concentrations of ICR treatment

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

4 讨论

淫羊藿为中国传统治疗骨质疏松的中药之一, 经过临床验证证实具有强筋健骨的疗效。目前已从淫羊藿中分离得到 260 多种化合物, 其中异戊二烯基类黄酮类是其主要的组成成分, 现代药理学证明其能够使人精力充沛、调节人体激素分泌, 具有抗骨质疏松作用, ICR 是异戊二烯基类

黄酮类的其中一种^[7]。

本研究讨论了ICR通过抑制GILZ基因的表达调节小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 成熟分化过程中的部分重要成骨相关基因 OPG、RANKL、OC 和 ALP 表达。特别是通过抑制 GILZ 基因的表达逆转了 DEX 诱导的 MC3T3-E1 成熟分化过程中成骨相关基因表达的显著性改变, 使其表达量向着无 DEX

诱导下的培养基 B 所培养的 MC3T3-E1 所表达的成骨相关基因的相对表达量方向改变。

临床报告长期使用 GC 会导致骨质疏松的发生。在体外实验研究中, GC 通过调节成骨相关的细胞因子抑制成骨发生和成骨细胞的生成、促使破骨细胞和骨细胞的凋亡诱导骨质代谢失衡^[8]。而 GILZ 就是被 GC 所调控的重要细胞因子。从图 1A 中可知, DEX 明显提高了 MC3T3-E1 中所表达的 GILZ 基因, 且呈剂量依赖性关系。这与之前文献关于 GC 能够诱导免疫细胞上调 GILZ 表达发挥其抗炎作用以及临床克氏综合症继发骨质疏松的患者骨组织标本中检测到的 GILZ 的明显上调结果相一致^[9-12]。克氏综合症患者主要表现在 GC 分泌过剩, 在此基础上所继发的疾病也很多, 骨质疏松就是其中较为严重的继发疾病之一。临床研究证明, 该类患者的骨质标本中与成骨相关的基因表达发生了明显的改变, 像 OC, CTX, COL1A2, TRAP, RANKL 和 OPG 等基因都发生了明显的改变, 其中上调最明显的基因是 GILZ^[13]。关于 ICR 对成骨细胞 MC3T3-E1 的 GILZ 表达影响从图 2A 中可知, 与阴性对照组相比, 不同剂量 ICR 组中的 GILZ 的表达均被抑制, 且与图 1A 中 DEX 作用下的 GILZ 表达呈相反的趋势。图 3A 中也反映出了 ICR 逆转了 DEX 诱导刺激下的 GILZ 的表达升高。说明 ICR 能够明显的抑制 MC3T3-E1 中 GILZ 的表达, 而作为转录因子的 GILZ 的改变也可能会导致成骨相关基因表达的改变。

Lekva 等^[14]证明了 GILZ 在 DEX 诱导的骨质疏松中起着非常重要的作用, 对应的成骨相关基因 OPG、RANKL、ALP、OC 的表达都随着 GILZ 表达抑制或者提升产生了显著性差异。本研究中发现, 在 DEX 刺激组中, OPG 的表达明显被抑制了, RANKL 的表达则明显提高了, RANKL/OPG 的表达比率也明显提高了, 且都与 GILZ 的表达量有关系。这与之前文献中报道关于 DEX 作用下的小鼠成骨组织中 OPG 的表达降低了, 而 RANKL 的表达明显提高, RANKL 与 OPG 的比率提高了 40 倍的结果相一致^[15-17]。在 ICR 组中, OPG 与 RANKL 的表达量趋势被逆转了, 因此 RANKL/OPG 的表达比率明显降低了, ICR 预处理组中的 RANKL/OPG 的表达比率与单独使用 DEX 组相比也明显下降了。RANKL 是破骨细胞成熟分化的所必需的细胞因子, 而 OPG 是 RANKL 的天

然抑制剂^[18-19]。DEX 诱导所引起的 MC3T3-E1 细胞中 RANKL 与 OPG 的比率升高势必会激活骨组织中的破骨细胞的活性, 导致骨吸收功能的增强。而在 ICR 的保护下 RANKL 与 OPG 的比率则逆转降低, 抑制了破骨细胞的成熟激活。

人体内的 OC 由成骨细胞所分泌, OC 在骨质形成中表达明显升高, 但是 OC 在骨代谢中的真正作用仍需继续研究确定。有研究证明, 在 OC 敲除的转基因小鼠与野生型的小鼠相比, 骨质重量明显提高^[20-21], 说明 OC 表达的抑制有助于骨量的增加。因此 OC 在成骨过程中发挥着负反馈调节的作用。即在 OC 较少的情况下, 成骨形成的量不断的提高, 而随着成骨量形成的提高, OC 的表达量也提高了, 又反馈抑制成骨的形成。在图 1 中, MC3T3-E1 在浓度为 $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DEX 作用下除提高了 GILZ 的表达之外, OC 的表达量最大降低了 90%, 与文献中所报道降低了 90% 相一致^[22-23]。在图 2C 中, OC 的表达随着 GILZ 表达的抑制明显升高了。图 3 中, ICR 预处理组也由于 DEX 诱导的 GILZ 表达被抑制, OC 的表达明显提高了。说明 OC 的表达确实与 GILZ 的表达存在关系。而关于 DEX 或者 ICR 通过对 OC 的调节最终影响骨量多少并非两者对骨质生长调节的主要因素, 否则两者在临床中的表现会出现相反的作用。这一结论可以解释 ICR 提高了 OC 表达但却可以治疗骨质疏松与前面文献中提及的 OC 敲除转基因小鼠骨量合成增加之间的矛盾^[20]。ICR 提高了 OC 的表达, 说明 ICR 延缓了成骨形成的过程。而实际上虽然成骨形成过程延长了, 但是最终 ICR 促进了成骨细胞的增殖, 成骨细胞数量明显增多, 最终至成熟分化的成骨细胞以及 Ca^{2+} 沉淀明显增加^[24]。有趣的是, 近来研究发现 OC 的血清浓度降低与高血糖症相关, 说明 OC 的表达水平不仅会影响骨质重塑的功能, 也会影响生命体最基本的能量代谢途径。也许 OC 的表达水平成了骨质代谢与能量代谢平衡的信号传递使者之一。这也说明了糖尿病与骨质疏松之间的密切关系。而图 1E 中 DEX 所致的 OC 降低, 能够促使 MC3T3-E1 的成骨诱导, 抑制胰岛素的分泌, 导致高血糖症^[25-27]。这也可能是 DEX 导致机体血糖升高的机制之一。而 ICR 在治疗高血糖症方面是否也会表现出一定的效果呢。已经有关于这方面的报道, 但是较少, 值得深入探讨和研究。

ALP 是成骨细胞早期成熟分化的标志之一^[28]。

从图 1 中可知, ALP 的表达量与 DEX 的浓度呈剂量依赖关系, 且与 GILZ 升高呈相同趋势。最大升高了 2.05 倍, 与之前报导的较多文献结果相类似^[29-30]。说明在较高浓度的 DEX 10^{-5} mol·L⁻¹ 浓度下, MC3T3-E1 的成熟分化的程度明显提高了, 但却抑制了成骨细胞的增殖分裂和促使了成熟成骨细胞的凋亡^[31]。DEX 刺激对 ALP 表达的影响与 ICR 处理 MC3T3-E1 中的 ALP 表达抑制影响相反(图 2E, 图 3E), 且与 GILZ 的表达呈相同趋势变化(图 1E, 图 2E)。图 3E 同样反映了 ICR 通过对 GILZ 表达的抑制逆转了 DEX 刺激上调的 ALP 表达。证明了 ICR 能够延缓成骨诱导过程, 但却提高了成骨细胞的增殖能力^[24]。

GILZ 是人体内重要的转录调节因子, 是凋亡信号通路 ERK 和 AKT 主要调控者^[32]。其表达和细胞的凋亡增殖具有直接的关系。而雌二醇(E2)与雌性激素受体(ER)结合后可靶向调控 GILZ 的表达^[33]。说明 E2 在 GILZ 介导下发挥其对细胞增殖凋亡的调控。ICR 属于植物雌性激素, 与 E2 有类似的功效^[34]。因此, 根据本论文中基因表达变化趋势可以合理的推断 ICR 是通过 GILZ 对凋亡信号通路的调节而抑制成骨细胞凋亡的发生。从实验结果看, 本研究反映了 ICR 对成骨细胞调节的上游调控元件 GILZ 表达的影响以及下游成骨相关基因表达的影响, 至于其间的信号传递通路还有待于进一步研究验证。GILZ 除了在成骨细胞中调节基因转录之外, 在机体各组织器官中同样也发挥着重要的作用, 机体各组织器官本身就对药物的吸收具有选择性, 机体本身就可以将自身分泌的细胞活性因子合理的分布于各组织器官。这也是药物学家在研究药物时应该考虑的一个重要的问题, 让药物在机体内所发挥的不仅仅是化学反应, 而更应该是一个智能的, 有机的生命反应。

REFERENCES

- [1] SAMBROOK P N. Anabolic therapy in glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(20): 2084-2086.
- [2] KRISTO C, JEMTLAND R, UELAND T, et al. Restoration of the coupling process and normalization of bone mass following successful treatment of endogenous Cushing's syndrome: a prospective, long-term study [J]. *Eur J Endocrinol*, 2006, 154(4): 109-118.
- [3] MAZZIOTTIA G, ANGELIB A, BILEZIKIANC J P, et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update [J]. *Trends Endocrin Met*, 2006, 17(4): 144-149.
- [4] KOMORI T, YAGI H, NOMURA S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [J]. *Cell*, 1997, 89(5): 755-764.
- [5] GEOFFROY V, KNEISSEL M, FOURNIER B, et al. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(17): 6222-6233.
- [6] ZHANG W X, YANG N L, SHI X M. Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(8): 4723-4729.
- [7] MA H, HE X, YANG Y, et al. The genus epimedium: an ethnopharmacological and phytochemical review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(3): 519-541.
- [8] KIM H J, ZHAO H, KITAURA H, et al. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(8): 2152-2160.
- [9] CANNARILE L, CUZZOCREA S, SANTUCCI L, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(2): 530-541.
- [10] FIRESTEIN G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. *Nature*, 2003(423): 356-361.
- [11] FITZPATRICK F A. Cyclooxygenase enzymes: regulation and function [J]. *Cur Pharm Des*, 2004(10): 577-588.
- [12] YANG N L, ZHANG W X, SHI X M. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mediates glucocorticoid action and inhibits inflammatory cytokine-induced COX-2 expression [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(6): 1760-1771.
- [13] GODANG K, UELAND T, BOLLERSLEV J. Decreased bone area, bone mineral content, formative markers, and increased bone resorptive markers in endogenous Cushing's syndrome [J]. *Eur J Endocrinol*, 1999, 141(2): 126-131.
- [14] LEKVA T, BOLLERSLEV J, KRISTO C, et al. The glucocorticoid-induced leucine zipper gene (GILZ) expression decreases after successful treatment of patients with endogenous Cushing's syndrome and may play a role in glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(1): 246-255.
- [15] THIELE S, ZIEGLER N, TSOURDI E, et al. Selective glucocorticoid receptor modulation maintains bone mineral density in mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(11): 2242-2250.
- [16] LORENZ C, HOFBAUER, UTE Z, et al. Evention of glucocorticoid-induced bone loss in mice by inhibition of RANKL [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(5): 1427-1437.
- [17] KONDO T, KITAZAWA R, YAMAGUCHI A, et al. Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(1): 335-345.
- [18] LACEY D L, TIMMS E, TAN H L, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation [J]. *Cell*, 1998, 93(2): 165-176.
- [19] SIMONET W S, LACEY D L, DUNSTAN C R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [J]. *Cell*, 1997, 89(2): 309-319.
- [20] IWANIEC U T, DUBE M G, BOGHOSSIAN S, et al. Body mass influences cortical bone mass independent of leptin signaling [J]. *Bone*, 2009, 44(3): 404-412.

- [21] SEEMAN E. Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength [J]. *Rheumatology*, 2008, 47(Suppl 4): 2-8.
- [22] LECLERC N, NOH T, KHOKHAR A, et al. Glucocorticoids inhibit osteocalcin transcription in osteoblasts by suppressing Egr2/Krox20-binding enhancer [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(3): 929-939.
- [23] IVASKA K K, HENTUNEN T A, VÄÄRÄNIEMI J, et al. Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption *in vitro* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18361-18369.
- [24] LI Y, ZHANG X, PENG H, et al. Effects of anhydrocaritin and 2"-hydroxy-3"-en-anhydrocaritin on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(11): 1461-1464.
- [25] LEE N K, KARSENTY G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, 19(5): 161-166.
- [26] FERRON M, HINOI E, KARSENTY G, et al. Osteocalcin differentially regulates β cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice [J]. *PNAS*, 2008, 105(13): 5266-5270.
- [27] CHAUHAN A, SHARMA P K, SRIVASTAVA P, et al. Plants having potential antidiabetic activity: a review [J]. *Der Pharmacia Lettre*, 2010, 2(3): 369-387.
- [28] WEINSTEIN R S, JILKA R L, PARFITT A M, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(2): 274-282.
- [29] ELSHAL M F, ALMALKI A L, HUSSEIN H K, et al. Synergistic antiosteoporotic effect of *Lepidium Sativum* and alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis in wistar rats [J]. *AJOL*, 2013, 10(5): 267-273.
- [30] CHUN Y, PETER D, MARINER, et al. Cell-mediated delivery of glucocorticoids from thiolene hydrogels [J]. *J Control Release*, 2012, 162(3): 612-618.
- [31] O'BRIEN C A, JIA D, PLOTKIN L I, et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(4): 1835-1841.
- [32] LIN L, HRON J D, PENG S L, et al. Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a [J]. *Immunity*, 2004, 21(2): 203-213.
- [33] WANG J C, DERYNCK M K, NONAKA D F, et al. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(44): 15603-15608.
- [34] MING L G, CHEN K M, XIAN C J. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(3): 513-521.

收稿日期: 2013-12-09

尼美舒利解热镇痛抗炎作用比较研究

岑彦艳, 覃容欣, 李小丽, 彭伟, 潘夕春, 蒋为薇, 张海港, 陈晓红* (第三军医大学药理学教研室, 重庆 400038)

摘要: 目的 研究尼美舒利的解热、镇痛、抗炎作用的量效关系, 比较尼美舒利 3 种药理作用的 ED_{50} , 为临床合理使用尼美舒利提供依据。方法 分别采用热灭活大肠埃希菌制备家兔发热模型、冰醋酸制备小鼠疼痛模型、角叉菜胶诱发大鼠足跖肿胀模型, 观察尼美舒利的解热、镇痛、抗炎作用, 并计算 ED_{50} 。结果 尼美舒利能显著降低家兔体温, 减少小鼠扭体次数, 明显减轻大鼠足关节肿胀程度, 其解热、镇痛、抗炎作用的 ED_{50} 分别为 0.85~1.95, 24.56, 3.15~4.05 $mg \cdot kg^{-1}$, 根据体表面积比例换算成人 ED_{50} 分别为 0.50~0.60, 2.72, 0.26~0.59 $mg \cdot kg^{-1}$ 。结论 尼美舒利发挥解热、镇痛和抗炎作用的 ED_{50} 存在差异, 其中解热最低。

关键词: 尼美舒利; 解热; 镇痛; 抗炎; 半数有效量

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)08-0933-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.007

Comparison of Antipyretic, Anti-analgesic and Anti-inflammatory Effects of Nimesulide in Animal Models

CEN Yanyan, QIN Rongxin, LI Xiaoli, PENG Wei, PAN Xichun, JIANG Weiwei, ZHANG Haigang, CHEN Xiaohong* (Pharmacy Department, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the antipyretic, analgesic and anti-inflammatory effects of nimesulide in laboratory animals, and compare the ED_{50} of three pharmacological activities. **METHODS** The antipyretic activity was evidenced by heat

作者简介: 岑彦艳, 女, 博士, 讲师 Tel: (023)68752367

E-mail: cenyanyan@163.com

*通信作者: 陈晓红, 女, 博士, 教授 Tel:

(023)68752364 E-mail: pharsunr@126.com