

葡萄籽提取物对破骨细胞分化的影响

许妍妮^{1,2}, 赵俐婷¹, 贺芳¹, 张燕¹

作者单位:¹西安交通大学第一附属医院转化医学中心, 陕西 西安 710061; ²陕西地矿医院, 陕西 西安 710014

通信作者: 张燕, 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为骨稳态调控机制, E-mail: zhangyan1114@xjtu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(81670806, 81972133); 中央高校基本科研业务费专项资金(xzy012019094); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JM-365)

摘要: **目的** 检测葡萄籽提取物对破骨细胞分化、形成、功能的影响。**方法** 利用实时定量基因扩增荧光检测系统(qPCR)检测破骨细胞分化标志分子的表达, 利用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色及TRAP活性定量实验检测破骨细胞的形成情况, 利用c-TX定量实验检测破骨细胞的骨吸收活性。**结果** 细胞克隆经诱导分化后, 与对照组相比, GSE组细胞的破骨标志分子Itgb3 mRNA相对表达量由(216.59±34.61)下降至(104.55±9.54) ($n=3, P=0.0355$); Acp5由(103.37±14.77)下降至(78.96±13.15) ($n=3, P=0.0351$); Dcst由(304.85±14.77)下降至(65.03±11.75) ($n=3, P=0.0003$); Ctsk由(290.23±41.65)下降至(132.23±14.06) ($n=3, P=0.0229$)。经葡萄籽提取物处理后, 破骨标志分子Itgb3、Acp5、Dcst、Ctsk mRNA水平均显著降低, TRAP阳性细胞数目减少, TRAP活性由(2.52±0.39)下降至(0.91±0.10) ($n=3, P=0.0165$), TRAP活性显著降低; 与对照组细胞相比, GSE组细胞分泌的c-TX量由(1.01±0.11) nmol/L下降至(0.49±0.06) nmol/L ($n=3, P=0.0028$), c-TX分泌显著减少。**结论** 葡萄籽提取物有效抑制破骨细胞分化、形成及活性, 葡萄籽提取物是潜在的预防治疗骨质疏松的营养补充剂。

关键词: 葡萄籽提取物; 破骨细胞; 组织蛋白酶K; RAW264.7细胞; 抗氧化

Effects of grape seed extract on osteoclast differentiation

XU Yanni^{1,2}, ZHAO Liting¹, HE Fang¹, ZHANG Yan¹

Author Affiliations: ¹Center for Translational Medicine, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; ²Shaanxi Mineral Hospital, Xi'an, Shaanxi 710014, China

Abstract: Objective To detect the effects of grape seed extract (GSE) on differentiation, formation and function of osteoclasts. **Methods** The mRNA levels of osteoclastic markers were examined by realtime qPCR. The formation of osteoclasts was determined by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining and TRAP activity assays. The function of osteoclasts was assessed by quantification of c-TX secreted into the culture medium. **Results** After GSE treatment, in comparison with the control group, the mRNA levels of osteoclastic markers were significantly down-regulated [Itgb3 mRNA from (216.59±34.61) to (104.55±9.54), $n=3, P=0.0355$, Acp5 from (103.37±14.77) to (78.96±13.15) $n=3, P=0.0351$, Dcst from (304.85±14.77) to (65.03±11.75) $n=3, P=0.0003$, Ctsk from (290.23±41.65) to (132.23±14.06) $n=3, P=0.0229$], the TRAP positive cells were decreased, TRAP activity was impaired [from (2.52±0.39) to (0.91±0.10) $n=3, P=0.0165$], and c-TX secretion was inhibited [from (1.01±0.11) nmol/L to (0.49±0.06) nmol/L, $n=3, P=0.0028$] in RAW264.7 cells of GSE group. **Conclusion** Grape seed extract inhibits the differentiation, formation and activity of osteoclasts, which is a potential supplement for the prevention and treatment of osteoporosis.

Key words: Grape seed extract; Osteoclasts; Cathepsin K; RAW264.7 cell; Antioxidation

葡萄籽提取物(grape seed extract, GSE)是从葡萄籽中提取分离得到的一类多酚类纯天然物质, 主要由原花青素、儿茶素、表儿茶素、没食子酸等多酚类物质组成^[1]。GSE是一种抗氧化剂, 具有很强的体内活性, 是迄今发现的植物来源最高效的抗氧化剂之一^[2]。GSE是一种天然成分, 具有保护心肌、抗氧化、消炎、清除自由基、抗癌作用, 具有极高的营养价值和药用功能。Özden等^[3]研究发现, GSE可有效减少牙周疾病的炎症反应; Toker等^[4]研究发现, GSE可通过减少MMP-8和HIF-1 α 水平降低大鼠牙

槽骨损失和牙周疾病炎症反应, 同时可提高成骨细胞活性; Park等^[5]研究发现, GSE可有效减少胶原诱导的大鼠关节炎模型的炎症反应和骨吸收。但GSE是否影响破骨细胞形成未见报道。

破骨细胞来源于髓细胞和多功能造血干细胞分化而来的单核巨噬细胞, 在巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)和核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL)的双重刺激下, 单核巨噬细胞不断融合, 最终分化成为具有骨吸收功能的破骨细胞。

胞^[6]。活化T-细胞核因子1(nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1, NFATc1)是破骨细胞分化过程中最为关键的转录因子,在NFATc1的作用下,破骨细胞转录表达抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)和组织蛋白酶K(cathepsin K)等功能分子发挥特定功能^[7]。本研究自2108年1月至2019年1月检测葡萄籽提取物对破骨细胞分化的影响,以期为临床上治疗骨质疏松等疾病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞 RAW264.7细胞系(RAW 264.7小鼠单核巨噬细胞白血病细胞)用含10%FBS的 α -MEM培养基进行培养,培养条件为37℃、5%二氧化碳,每3天传代1次。

1.2 试剂 GSE购自美国GNC公司;巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)购自美国Peprotech公司。

1.3 细胞诱导分化 用破骨细胞诱导液(含有30 ng/mL M-CSF、100 ng/mL RANKL的10%FBS α -MEM完全培养基)进行诱导分化培养,每2天换液一次,5 d后待细胞出现明显的破骨细胞形态特征(多核、巨大),即诱导分化成功。

1.4 实时定量基因扩增荧光检测系统(qPCR)检测破骨细胞标志分子的表达 提取总RNA,提取细胞总RNA,取1 μ g进行反转录,cDNA稀释10倍后使用TaKaRa实时荧光定量试剂盒,进行qPCR,反应体系为:2 $\times$ mix 10 μ L、正/反向引物(10 μ mol/L)0.5 μ L、cDNA模板5 μ L,补H₂O至20 μ L。反应程序为:95℃预变性10 min,95℃变性10 s,60℃退火10 s,72℃延伸20 s,40个循环。使用GAPDH基因为内参,2^{- $\Delta\Delta$ CT}法进行数据分析。检测破骨分化标志分子Itgb3、Acp5、Ctsk的mRNA水平。

1.5 TRAP染色 根据TRAP染色试剂盒(Sigma)说明书进行染色。等量混合亚硝酸钠溶液和坚牢石榴红GBC盐溶液,依次加入萘酚AS-BI磷酸溶液、醋酸盐溶液、酒石酸盐溶液,充分混合,配制成染色液。4%多聚甲醛固定细胞30 min,加入适量染色液,37℃染色40 min。在光学显微镜下观察,将有3个或3个以上核的TRAP阳性细胞认定为破骨细胞,并在每个孔的不同区域随机选择视野进行计数。

1.6 c-TX水平检测 在骨片上诱导破骨细胞,6 d

后收集细胞培养上清,利用酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒检测c-TX水平。具体步骤是:将标准品工作液和细胞培养上清加入到酶标板中,2个复孔,每孔100 μ L。37℃孵育90 min。弃去液体,甩干,立即加入生物素化抗体工作液100 μ L,混匀后37℃孵育1 h。甩尽孔内液体,每孔加洗涤液300 μ L,浸泡2 min后在厚吸水纸上拍干。重复此洗板步骤3次。每孔加酶结合物工作液100 μ L,混匀后37℃孵育30 min。洗板5次。加底物溶液100 μ L,混匀后37℃避光孵育20 min。加终止液50 μ L终止反应,立即用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。

1.7 统计学方法 使用SPSS 17.0软件进行统计分析。所有数据均为3次生物学重复。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用Dunnett's *t*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 葡萄籽提取物抑制破骨细胞标志分子表达 RAW264.7细胞分为两组,分别为对照组(无葡萄籽提取物)、GSE组(细胞培养液中添加终浓度100 μ g/mL的葡萄籽提取物)。对两组RAW264.7细胞用含30 ng/mL M-CSF、100 ng/mL RANKL的10%FBS α -MEM培养基进行诱导分化,每2天换液一次,5 d后收集细胞,提取总RNA,反转录成cDNA,qPCR检测破骨细胞分化标志分子Itgb3、Acp5、Dest、Ctsk的mRNA水平。结果如图1所示,细胞克隆经诱导分化后,与对照组相比,GSE组细胞的破骨标志分子Itgb3 mRNA相对表达量由(216.59 $\pm$ 34.61)下降至(104.55 $\pm$ 9.54)($n=3$, $P=0.0355$);Acp5由(103.37 $\pm$ 14.77)下降至(78.96 $\pm$ 13.15)($n=3$, $P=0.0351$);Dest由(304.85 $\pm$ 14.77)下降至(65.03 $\pm$ 11.75)($n=3$, $P=0.0003$);Ctsk由(290.23 $\pm$ 41.65)下降至(132.23 $\pm$ 14.06)($n=3$, $P=0.0229$)。以上分化标志分子mRNA水平均显著降低,提示葡萄籽提取物抑制破骨细胞分化。

2.2 葡萄籽提取物抑制破骨细胞形成 对照组、GSE组RAW264.7细胞用含30 ng/mL M-CSF、100 ng/mL RANKL的10%FBS α -MEM培养基进行诱导分化5 d,固定后进行TRAP染色。结果如图2所示,与对照组细胞相比,GSE组细胞形成的TRAP阳性细胞数目显著减少,提示葡萄籽提取物抑制破骨细胞形成。

为了进一步炎症葡萄籽提取物对破骨细胞形

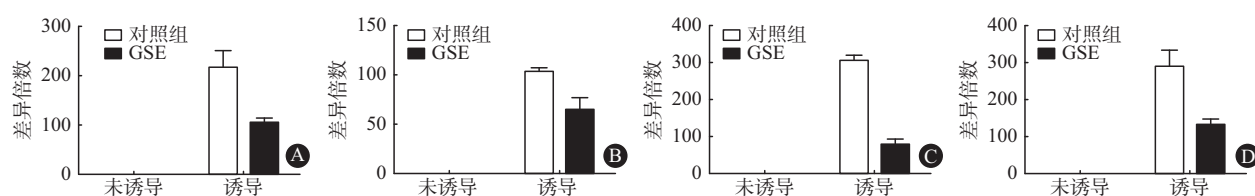


图1 实时定量基因扩增荧光检测破骨细胞标志分子表达:A为Itgb3,B为Acp5,C为Dest,D为Ctsk

成的抑制作用,我们同时收集了细胞培养上清液,进行了TRAP活性检测。结果如图3所示,GSE组细胞培养上清TRAP活性由 (2.52 ± 0.39) 下降至 (0.91 ± 0.10) ($n=3, P=0.0165$),再次证实了葡萄籽提取物对破骨细胞形成的抑制作用。

2.3 葡萄籽提取物抑制破骨细胞功能 对照组、GSE组RAW264.7细胞培养于骨片上,用含30 ng/mL M-CSF、100 ng/mL RANKL的10%FBS α -MEM培养基进行诱导分化6 d,收集细胞培养上清,进行了c-TX检测。结果如图4所示,与对照组细胞相比,GSE组细胞分泌的c-TX量由 (1.01 ± 0.11) nmol/L下降至 (0.49 ± 0.06) nmol/L ($n=3, P=0.0028$),提示葡萄籽提取物抑制破骨细胞活性。

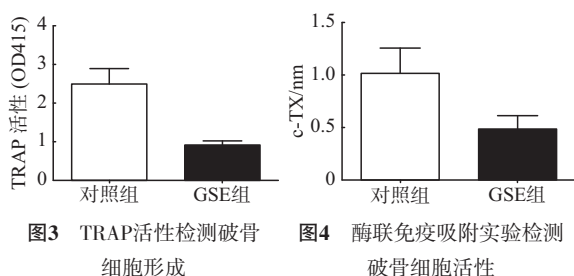


图3 TRAP活性检测破骨细胞形成

图4 酶联免疫吸附实验检测破骨细胞活性

3 讨论

骨质疏松是绝经后妇女常见的一种退行性骨骼疾病,其病理特征为骨量减少、骨折概率增加^[8]。流行病学调查显示,约60%的60岁以上老人患有不同程度的骨质疏松。在骨质疏松导致的骨折中,髌、脊椎骨折最为常见^[8]。髌部骨折后一年内由于各种并发症导致的死亡率高达20%,存活者中约40%因长期卧床导致关节固定僵直、功能丧失,生命质量明显下降^[8]。骨质疏松程度相对较轻的病人往往也要常年忍受四肢及腰背部疼痛、反复骨折等痛苦。目前临床上使用的治疗骨质疏松药物主要从抗破骨方面来发挥作用,如双膦酸盐、降钙素等,但其副作用较大,不能长期使用。因此,开发安全的天然活性物质是目前研究的热点。

GSE是从葡萄籽里提取到的多酚类天然产物,富含黄酮类化合物,主要包括黄烷-3-醇结构的儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯,以及由黄烷-3-醇通过碳-碳键结合聚合而成的原花青素^[1]。葡萄籽提取物具有超强的抗氧化能力,能够有效清除氧自由基,具备抗炎、抗肿瘤、调节免疫、调节血压等重要功能^[2,9-11],能够预防和治疗70余种疾病,临床应用广泛。葡萄籽提取物具有较高的食用安全性,无急性毒性和慢性长期毒性作用,日益被各国广泛用作营养补充剂来使用。目前关于葡萄籽的生物活性作用报道较多,但对破骨细胞影响的研究未见报道,本研究拟探讨其对破骨细胞分化、形成、功能的影响。

在本研究中,我们用100 μ g/mL的葡萄籽提取物处理RAW264.7细胞,并对其用含30 ng/mL M-CSF、100 ng/mL RANKL的10%FBS α -MEM培养基进行诱导分化,收集细胞及培养上清,利用qPCR检测破骨细胞分化标志分子的表达,利用TRAP染色及TRAP活性定量实验检测破骨细胞的形成情况,利用c-TX定量实验检测破骨细胞的骨吸收活性。研究结果显示,经葡萄籽提取物处理后,破骨标志分子Itgb3、Acp5、Dcst、Ctsk mRNA水平均显著降低,TRAP阳性细胞数目减少,TRAP活性显著降低,c-TX分泌显著减少,表明葡萄籽提取物有效抑制破骨细胞分化形成及活性。我们下一步工作将验证葡萄籽提取物在体内的作用。若内外研究结果在体内得到了验证,将会有力地证明GSE可以作为有效的营养补充剂用于骨质疏松的预防和治疗,将丰富目前对于GSE功能的认识。

(本文图2见插图8-1)

参考文献

- [1] WESELER AR, BAST A. Masquelier's grape seed extract: from basic flavonoid research to a well-characterized food supplement with health benefits [J]. *Nutr J*, 2017, 16(1): 5.
- [2] BAGCHI D, SWAROOP A, PREUSS HG, et al. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview [J]. *Mutat Res*, 2014, 768: 69-73.
- [3] ÖZDEN FO, SAKALLIOĞLU EE, SAKALLIOĞLU U, et al. Effects of grape seed extract on periodontal disease: an experimental study in rats [J]. *J Appl Oral Sci*, 2017, 25(2): 121-129.
- [4] TOKER H, BALCI YH, LEKTEMUR AA, et al. Morphometric and histopathological evaluation of the effect of grape seed proanthocyanidin on alveolar bone loss in experimental diabetes and periodontitis [J]. *J Periodontol Res*, 2018, 53(3): 478-486.
- [5] PARK JS, PARK MK, OH HJ, et al. Grape-seed proanthocyanidin extract as suppressors of bone destruction in inflammatory autoimmune arthritis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51377. DOI: 10.1371/journal.pone.0051377.
- [6] IKEDA K, TAKESHITA S. The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis [J]. *J Biochem*, 2016, 159(1): 1-8.
- [7] KIM JH, KIM N. Regulation of NFATc1 in osteoclast differentiation [J]. *J Bone Metab*, 2014, 21(4): 233-241.
- [8] LIU J, CURTIS EM, Cooper C, et al. State of the art in osteoporosis risk assessment and treatment [J]. *J Endocrinol Invest*, 2019, 42(10): 1149-1164.
- [9] LUAN YY, LIU ZM, Zhong JY, et al. Effect of grape seed proanthocyanidins on tumor vasculogenic mimicry in human triple-negative breast cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(2): 531-535.
- [10] CHAO CL, CHANG NC, Weng CS, et al. Grape seed extract ameliorates tumor necrosis factor- α -induced inflammatory status of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Eur J Nutr*, 2011, 50(6): 401-409.
- [11] KADRI S, EL AYED M, COSETTE P, et al. Neuroprotective effect of grape seed extract on brain ischemia: a proteomic approach [J]. *Metab Brain Dis*, 2019, 34(3): 889-907.

(收稿日期: 2019-05-07, 修回日期: 2019-07-09)