

黄酮类物质预防骨质疏松症的研究进展

龚凌霄, 迟海林, 曹文燕, 王静

(北京工商大学北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 北京 100048)

摘要: 随着我国步入老龄化社会, 骨质疏松症屡见不鲜, 已经成为严峻的公共卫生及社会问题。老年人骨含量降低, 易导致骨脆性、骨折风险度上升, 所以骨质疏松症应该及时诊断。但骨质疏松症治疗的难点在于治疗滞后, 骨质病变前期的临床现象不易被发现, 如何有效预防骨质疏松症成为医学界亟待解决的问题。黄酮类物质广泛存在于蔬菜、水果和药用植物中, 含量丰富, 具有多种生物活性, 毒副作用小。大量研究证明, 黄酮类物质可以促进成骨细胞增殖、促进骨细胞矿化、抑制破骨细胞骨吸收、增加骨峰值、减少骨流失, 可有效预防骨质疏松症, 保护骨健康。本文重在总结黄酮类物质防止骨质疏松症的分子机制、黄酮类物质预防骨质疏松症作用机理等研究进展, 为预防骨质疏松症的保健食品和药品的开发提供理论依据。

关键词: 骨健康; 骨质疏松症; 黄酮; 骨细胞

文章编号: 1673-9078(2017)7-328-335

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.046

Research Progress into the Prevention of Osteoporosis Using Flavonoids

GONG Ling-xiao, CHI Hai-lin, CAO Wen-yan, WANG Jing

(Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Technology & Business University (BTBU), Beijing 100048, China)

Abstract: As China is becoming an increasingly aging society, osteoporosis is very common and has become a serious public health and social problem. Decreased bone content in the elderly leads to bone fragility and increases fracture risk, so osteoporosis should be promptly diagnosed. However, the treatment of osteoporosis lags behind that of other chronic illnesses, the clinical phenomenon of early bone lesions is not easy to identify, and the effective prevention of osteoporosis has become an urgent problem to be solved by the medical field. Flavonoids are found widely in vegetables, fruits, and medicinal plants, and have a variety of bioactivities with few side effects. A large number of studies have shown that flavonoids can prevent osteoporosis and protect bone health by promoting osteoblast proliferation and osteocyte mineralization, inhibiting osteoclastic bone resorption, increasing peak bone mass, and reducing bone loss. This article focuses on reviewing research progress into the cellular and molecular mechanisms of action of flavonoids in preventing osteoporosis. This provides a theoretical basis for the development of functional foods and medicines for the prevention of osteoporosis.

Key words: bone health; osteoporosis; flavonoid; osteocytes

根据国家统计局发布的《2014年国民经济和社会发展统计公报》, 2014年我国60岁及以上的老年人占总人口比例的15.5%, 65岁及以上的老年人占10.1%, 这意味着我们国家的人口已步入老龄化社会。骨质疏松(Osteoporosis, OP)是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征, 导致骨质脆性增加和易于骨折的全身性骨代谢疾病, 在老年人群中发病率较高, 由骨质疏松导致的老人致残、致死风险也在逐步增加。2009年公

收稿日期: 2017-01-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501480); 北京市留学人才科技活动项目优秀类项目

作者简介: 龚凌霄(1981-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物与功能性食品

通讯作者: 王静(1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 功能性食品配料

布的亚洲骨质疏松症流行病学、费用和负担白皮书显示, 中国骨质疏松症的患病人口达6940万, 骨量减少的人口近2亿, 是我国一个严重的公共健康问题。另据流行病学调查显示, 全球50岁以上女性有1/2因骨质疏松而骨折, 在男性中比例则为1/5, 该病在亚洲和拉丁美洲的发病率最高。预计到2050年全球骨质疏松患者将增加到6.3亿。但是, 骨质疏松症被认为“沉默的流行病”, 其病因从儿童时期就已经潜伏, 骨质疏松症治疗的难点在于治疗滞后, 骨质病变前期如骨质流失、骨皮质变薄和骨密度降低等临床现象不易被病人发现, 无法进行及时治疗^[1]。因此, 如何有效地预防骨质疏松症的发生是我国保障“健康中国”计划顺利实施的关键问题之一。

目前治疗骨质疏松症的药物手段层出不穷, 抗骨

吸收药物有双膦酸盐类^[2], 此药物安全性较好, 但有一些不良反应, 比如胃肠道反应和肾功能损害等; 激素替代治疗法 (Hormone replacement therapy, HRT), 主要指雌激素加孕激素复合治疗, 主要适用于骨折风险高的绝经后妇女, 但由于 HRT 会提高肿瘤的风险度, 不作为常用的药物手段^[3]; 降钙素类^[4], 可以抑制骨的重吸收, 缓解骨痛, 还可用于骨肿瘤的镇痛治疗。促进骨形成药物有人工合成的锶盐, 新一代的抗骨质疏松药物, 即可以作用于成骨细胞又可以作用于破骨细胞, 具有抑制骨吸收、促进骨形成的双重作用^[3]; 维生素 K₂ 可提高血中骨钙素含量, 减缓骨密度下降幅度, 维生素 K₂ 为脂溶性维生素, 在小肠内吸收依赖于胆盐, 空腹服用吸收差^[5]。此外新型抗骨质疏松药物有与核因子 κ B 受体活化因子配基 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 结合的骨保护素、组织蛋白酶 K 抑制剂 (Odanacatib) 和抗代谢药 (Sclerostin) 抗体等, 这些药物或被研发中或已应用于市场^[3]。

黄酮类化合物包括异黄酮、黄酮醇、黄烷醇、黄烷酮和黄酮五大类, 广泛存在于食物中, 现代医学药理研究已证明其在防治骨质疏松的作用上具有独特的效果^[6,7]。本文就黄酮类化合物防治骨质疏松症发生的分子机制及骨保护作用机制进行综述, 目的在于为预防骨质疏松症发病的保健食品和药品的开发提供理论依据。

1 骨结构及骨重建

骨的细胞虽只占骨体积的很小部分, 但对维持人体的钙磷平衡却起着重要作用, 包括成骨细胞 (osteoblast)、破骨细胞 (osteoclast) 和骨细胞 (osteocyte) 三种类型。成骨细胞负责骨的形成, 破骨细胞负责骨的吸收, 骨细胞产生新的基质, 使骨组织钙、磷沉积和释放处于稳定状态, 以维持血钙平衡。骨骼是一个有生命力的器官, 不断地生长和重建, 骨重建过程贯穿人的一生。骨重建过程包括破骨细胞贴附在旧骨区域, 分泌酸性物质溶解矿物质, 分泌蛋白酶消化骨基质, 形成骨吸收陷窝; 其后, 成骨细胞移行至被吸收部位, 分泌骨基质, 骨基质矿化而形成新骨。破骨与成骨过程的平衡是维持正常骨量的关键。所以, 促进骨形成和抑制骨吸收对于治疗多种代谢性骨病均有重要意义。

骨质疏松症的临床表现为骨密度 (Bone Mineral Density, BMD) 降低、骨皮质变薄、髓腔增宽、骨小梁变少、易于折断。骨质疏松症可分为原发性和继发性两种。前者指老年性及绝经后骨质疏松症; 后者与

多种因素有关, 如内分泌紊乱、营养缺乏、药物应用、肝肾疾病和酒精中毒等。

2 黄酮类防治骨质疏松症分子学机制

2.1 雌激素受体介导的机制

人体雌激素受体 (ER) 有 2 种亚型: ER α 和 ER β , 存在于软骨细胞、成骨细胞、骨髓基质细胞以及破骨细胞及其前体细胞上。雌激素通过合并激活 ER α 和 ER β 发挥骨保护作用^[8]。

2.2 护骨素 (Osteoprotegerin, OPG)、核受体 B 激活受体 (the receptor activator of NF- κ B, RANK) 及其配体 (the receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 介导的机制

OPG/RANKL/RANK 在破骨细胞的生成、激活和存活中起着重要的作用。成骨细胞在骨的微环境中对破骨细胞的整体功能发挥直接的基本的作用, 包括了对 OPG/RANKL/RANK 系统的调节。RANKL 是一种跨膜糖蛋白, 由成骨细胞产生, 可以通过与 RANK 受体结合增加破骨细胞形成、成熟和存活。而 OPG 作为一种成骨细胞分泌的诱变受体, 可以结合于 RANKL, 防止 RANKL 和 RANK 的相互作用, 从而引起破骨细胞形成、成熟和存活减少^[9]。

2.3 酶抑制作用

通过介导细胞内钙离子信号途径, 抑制蛋白激酶和酪氨酸激酶, 从而引起破骨细胞凋亡, 抑制骨吸收; 还可通过上调碱磷酸酶 (ALP) 参与骨的矿化, ALP 的活性直接影响骨细胞的活跃状态, 从而起到治疗骨质疏松的作用^[10]。酸蛋白激酶抑制剂 α , 下调蛋白酪氨酸酶 7、酪氨酸蛋白磷酸化酶等活性, 协同产生骨保护作用。也可以通过抑制 DNA 拓扑异构酶 II 的活性来减少小鼠破骨细胞形成^[11]。

2.4 过氧化物酶增殖子激活受体介导的机制

过氧化物酶增殖子激活受体 (PPARS) 是植物雌激素的转录靶受体, 有 3 种亚基: α 、 γ 和 δ (或称 β), PPARS 可以通过与配体结合或者被磷酸化而激活, 不同的亚基影响骨组织的活性不同。PPAR δ 刺激骨生成, 而 PPAR γ 则抑制骨生成, 低浓度时, PPAR γ 直接作用骨前体细胞和成骨细胞系, 引起骨生成下调^[12]。

2.5 调节信号转导通路的机制

Notch 信号转导通路是影响细胞命运的决定性的重要通路之一。它具有调控成骨细胞增殖分化的作用。Lin^[13]等发现补肾复方通过激活 Notch 信号转导通路,进而促进骨细胞分化,抑制破骨细胞活性,起到防治骨质疏松的目的。也有研究发现 Runx2 和 Osterix 是调节成骨细胞分化的重要特异性转录因子, Runx2 基

因敲除小鼠成骨细胞发育受阻,骨骼发育不良。miRNA^[14]可以调控 Runx2 信号转导通路即与其结合抑制小鼠成骨细胞的分化;敲除 Osterix(OSX)基因小鼠可因骨矿化异常在出生后迅速死亡, miR-145 通过减少 OSX 的表达,抑制 C2C12 和 MC3T3-E1 成骨细胞的分化。

综上所述,防治骨质疏松症有多种机制,主要原则是抑制骨吸收、促进骨形成和促进骨矿化。

表 1 影响骨吸收和骨形成的激素、细胞因子

Table 1 Hormones and cytokines that affect bone resorption and bone formation

促进骨吸收物质	抑制骨吸收物质	促进骨形成物质
甲状旁腺激素 (PTH)	降钙素 (CT)	胰岛素
1,25(OH) ₂ D ₃	磷酸盐	胰岛素样生长因子 (IGF1 和 IGF2)
白介素 1 (IL1)	二磷酸盐	雌激素, 雄激素
前列腺素 (PG)		生长激素 (GH)
甲状腺激素		甲状腺激素
上皮生长因子 (EGF)		PTH, 1,25(OH) ₂ D ₃
肿瘤坏死因子 α (TNF α)		
肿瘤坏死因子 β (TNF β)		

3 黄酮类物质预防骨质疏松症

3.1 异黄酮

异黄酮类包括染料木素 (genistein)、大豆苷元 (daidzein)、大豆黄素 (glycitein) 以及其相应的葡萄糖配糖体,共 12 种单体。异黄酮是一种植物雌激素,与女性雌激素结构相似。临床研究证实提高异黄酮摄入可增加骨密度,预防雌激素缺乏引起的骨质疏松。Lydeking^[15]等给 177 名绝经后妇女每日服用 500 mg 豆奶 (含有异黄酮 76 mg),两年后其腰椎的骨密度和骨矿含量 (bone mineral content, BMC) 各增长 1.1% 和 2.2%,而每日异黄酮摄入量小于 1 mg 对照组的妇女其椎体的 BMD 和 BMC 各下降 4.2% 和 4.3%。Arjmandi^[16]等在一年内每日口服异黄酮 60 mg 的临床试验中发现,血液胰岛素样生长因子-1(IGF-1),护骨素(OPG)和碱性磷酸酶(ALP)浓度升高,BMD 和 BMC 则无变化。

异黄酮能够通过不同的转导途径促进成骨细胞生成,抑制破骨细胞分化,从而在雌激素缺乏时减少骨质丢失,提高骨密度和骨矿含量。染料木素通过旁分泌刺激成骨细胞生成 OPG,激活 ALP,抑制 RANKL 表达。OPG 具有很强的抑制破骨细胞分化的作用,RANKL 则诱导破骨细胞分化和活化^[17]。

异黄酮对骨组织的保护作用还存在争议。部分研究发现,异黄酮可改变体内骨转化标记物浓度,而对

BMD 和 BMC 没有影响。Brink^[18]等给 237 名年龄在 50~53 岁的绝经后妇女每日食用富含异黄酮的食物 (含异黄酮 110 mg),保持生活习惯和饮食习惯不变。1 年后观察腰椎和全身的 BMD、骨生成和骨吸收的生物标记的变化。结果表明,长期服用异黄酮对预防健康的早期绝经妇女的骨质流失没有明显效果。后续研究发现长期食用异黄酮补充剂不能提高 BMD。染料木黄酮可以通过调节骨质代谢途径,诱导抗氧化酶及抑制细胞凋亡,减轻机体过氧化伤害,通过核因子 kappaB(NF- κ B)通路抑制破骨细胞的活性,促进分化和骨密度上升^[19]。

3.2 黄酮醇

黄酮醇类包括槲皮素 (quercetin)、山柰酚 (kaempferol)、高良姜素和杨梅素 (myricetin) 等。Yamaguchi M 等^[20]用 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (高葡萄糖) 培养大鼠皮质骨和小梁骨组织 48 h,发现槲皮素能引起骨干钙含量的显著增加。Wong 等^[21]对 9 只新西兰白兔顶骨中移入分别填有槲皮素和胶原基质 (试验组)、胶原基质 (阳性对照组)、留空 (阴性对照组) 的缺损骨,观察缺损骨在体内新骨的合成情况。在体内 14 d 后,测定新骨的截面积、新骨体积,结果显示,槲皮素组合成的新骨量是对照组的 55.6%,槲皮素能促进新骨合成。目前对槲皮素抑制骨吸收的多种研究中,较为确定的是槲皮素能够通过抑制 RANKL 的活化,抑制破骨细胞的形成,促进骨形成,

从而达到预防骨质疏松症的效果^[22-24]，而槲皮素对雌激素受体的作用仍存在争议。Wattel 等^[21]将小鼠骨髓细胞在甲状旁腺激素 (PTH; 10-7M) (一种骨吸收因子) 的存在下在体外培养 7 d 后发现, PTH 培养会引起破骨细胞的显著增加, 但是槲皮素存在时这种增加被显著抑制, 槲皮素通过 NF- κ B 和 AP-1 所调控的 RANKL 信号通路来抑制破骨细胞形成。Tsuiji 等^[23]在去卵巢后导致的雌性小鼠骨质疏松症模型中发现, 槲皮素可以显著增加 OVX 组小鼠的骨密度和恢复股骨远端松质骨体积, 但对破骨细胞的面积和数量以及与雌激素分泌密切相关的小鼠的子宫性能上没有任何影响。另外, 研究者进一步通过 RAW264.7 细胞研究证实, 槲皮素可以显著抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化和相关通路的基因表达, 但对破骨细胞形成以及雌激素受体相关的通路并无显著作用。在雌激素受体作用方面, 最近 Masuhara 等^[24]新发现雌激素受体-G 蛋白偶联受体 GPR30 可能与槲皮素抑制破骨细胞分化的作用有关。Pang 等^[25]证明山柰酚能抑制小鼠颅盖骨成骨细胞中 TNF- α 诱导分泌 IL-6, 同时抑制破骨细胞中促进破骨细胞分化的 RANKL、RANK 及骨钙素受体等因子的表达, 且存在剂量依赖性。Yao Y 等^[26]将 12 只雌性 SD 大鼠随机分为假手术组、去卵巢组(OVX)和杨梅素注射组(OVX+Myricetin), 8 周后, micro CT 扫描股骨远心端, HE 染色观察骨小梁, 荧光标记法检测 BMMSCs 活性氧水平, 结果显示 HE 切片 OVX+Myricetin 组的骨小梁多于 OVX 组, OVX+Myricetin 组 BMMSCs 的 ROS 水平低于 OVX 组, SOD 表达升高, ALP 活性和成骨基因表达升高。实验表明杨梅素通过降低 ROS 水平恢复内源性 BMMSCs 的成骨能力, 减少去卵巢大鼠骨量丢失。Huh 等^[27]考察高良姜对破骨细胞骨破坏的影响和高良姜影响骨髓来源的巨噬细胞的破骨细胞发生的分子机制。在用高良姜素治疗的关节炎小鼠中, 软骨和骨侵蚀性变化以及滑膜炎, 滑膜增生都被显著抑制。此外, 高良姜治疗的关节炎小鼠的 IL-1 β , TNF- α 和 IL-17 的浓度显著降低, 说明高良姜抑制骨髓来源的巨噬细胞和成骨细胞共培养细胞中的破骨细胞生成因子和破骨细胞形成, 并增加成骨细胞中的 OPG 水平。卞伟^[28]等人研究发现对大鼠注射槲皮素, 发现大鼠的血清中骨源性碱性磷酸酶 (BALP) 均出现明显增高 ($p < 0.05$); 用药 12 周后, 血清中 BALP 也明显高于去卵巢实验组 ($p < 0.05$)。BALP 是成骨细胞的一种胞外酶, 它的含量可直接反映成骨细胞的活性, BALP 的增高说明槲皮素可以在早期影响成骨细胞活性, 随着时间延长, 促进成骨作用也增强。丁淑琴等^[29]人发现山柰酚对去卵

巢大鼠骨密度有显著提高, 明显抑制大鼠尿液中骨钙和磷的流失, 能够显著抑制去卵巢大鼠血清中酒石酸性磷酸酶和组织蛋白酶 K 的活性, 显微 CT 结果显示山柰酚能明显改善骨质疏松大鼠骨小梁形态。

3.3 黄烷醇

黄烷醇类包括茶多酚、花青素、儿茶素、没食子儿茶素和茶黄素等。大量体外研究证实, 茶多酚通过增强抗氧化能力、减轻氧化应激损伤, 对雌激素缺乏和雌激素正常的成年鼠骨密度产生保护作用, 且此作用对雌激素正常大鼠更为显著, 这可能与茶多酚中 EGCG 和 ECG 等与卵巢雌激素受体存在低亲和力有关^[30]; 而临床方面则证明茶多酚能显著增加绝经后妇女腰椎、股骨颈等部位骨密度, 且存在剂量依赖性, 同时, 尿钙与骨吸收标志物水平下降^[31]。

茶多酚对骨量的保护作用机制为: 上调成骨基因 mRNA 的表达、增加 ALP 的活性和骨的矿化刺激成骨反应; 并通过 RANKL 途径, 抑制 NF- κ B 作用, 致破骨细胞的凋亡; 抑制基质金属蛋白酶-9 的表达, 进一步抑制破骨细胞的生成; 增强前列腺素 F₂ 的作用-上调 SAPK/JNK 的表达诱导血管内皮生长因子生成, 激活成骨样细胞 MC3T3-E1; 抑制内皮缩血管肽-1 作用-抑制细胞分裂素对蛋白激酶 P44/P42 的活性, 降低成骨细胞白介素-6 的合成^[32,33]

Ishikawa 等^[34]证明葡萄籽花青素能抑制骨吸收。在低剂量钙 (1.44 mg/g) 膳食中分别添加 0.03 mg/g 葡萄籽花青素提取物, 喂养发育中的大鼠。六周后, 同空白对照组大鼠相比, 低剂量钙协同葡萄籽花青素组大鼠下颌骨的皮质骨密度、骨矿含量和骨截面积都不同程度增加, 表明葡萄籽花青素提取物能促进骨形成。

Hardcastle 等^[35]对 3000 多名妇女进行食物频率调查问卷, 研究膳食黄酮类的摄入是否与绝经期的苏格兰妇女的 BMD 和骨吸收有关。通过双能 X 射线吸收测定法 (DXA) 在股骨颈 (FN) 和腰椎 (LS) 测量 BMD。通过高效液相色谱 (HPLC) 在第二次清晨禁食尿样品中测量游离吡啶啉 (PYD) 和脱氧吡啶啉 (DPD)。结果表明黄酮类摄入量与 FN 和 LS 的 BMD 相关 (FN $r=0.054$, LS $r=0.036$, $p \leq 0.05$) 且与黄酮类中原花青素和儿茶素的摄入量相关 ($p \leq 0.05$)。研究表明姜黄素可以促进成骨细胞中 P21WAF1/CIP1 mRNA 的表达, 抑制组蛋白 H1 磷酸化, 从而抑制染色质凝缩, 诱导 G1 期细胞周期停滞, 从而抑制成骨细胞增生^[36]。姜黄素可显著降低因糖尿病所致的破骨细胞前体数量增加, 结果说明姜黄素可以通过抑制 AP-1 信

号抑制糖尿病大鼠体内破骨细胞形成。姜黄素在低浓度时不仅能够抑制破骨细胞的分化成熟和骨吸收功能,也能同时抑制成骨细胞增生和功能^[37]。

3.4 黄烷酮

黄烷酮类包括橙皮素、柑桔素、圣草素和老鹤草素等。韦敏^[38]等将柚皮苷制备成磷脂复合物后,采用体外培养法从乳鼠中分离出成骨细胞,然后用不同浓度的柚皮苷、柚皮苷磷脂复合物作用于成骨细胞,促进柚皮苷在肠段的吸收,提高其成骨细胞活性,具有较好的抗骨质疏松活性。丁佩惠等^[39]证明,柚皮苷能促进小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 的增殖、分化的作用,但无促进矿化作用。柚皮苷(naringin)通过增加骨细胞中 BMP-2 的含量,促进前成骨细胞向成骨细胞转化。BMP-2 能调控成骨细胞系的 ALP、胶原和胰岛素样生长因子等的合成。此外,Pang 等^[40]认为柚皮苷与雌激素受体(ER)结合调节去卵巢小鼠的成骨细胞和破骨细胞。Li 等^[41]发现柚皮苷对细胞凋亡通路中的 BCL-2 和 BAX, capase-3 和细胞色素 C 等因子的表达有调控作用,可以通过促进破骨细胞凋亡来改善去卵巢诱导大鼠骨质疏松症的发展。柚皮苷还可通过增加骨膜蛋白的表达从而抑制下游的硬骨素表达并激活 Wnt/ β -链蛋白通路以减少骨流失^[42]。Chiba 等^[43]证明橙皮苷(hesperidin)能减少股骨远端骨的破骨细胞数量。Shehata 等^[44]研究表明橙皮苷可改变 I 型糖尿病骨质疏松症大鼠血清中与骨转化相关因子的含量,包括增加血清中骨桥蛋白、骨钙素,减少 ALP 等。

骨碎补总黄酮(TDF)是以柚皮苷为主的二氢黄酮类化合物,Song 等^[45]使用卵巢切除的大鼠模型和成骨细胞株 MC3T3-E1 细胞,研究骨碎补总黄酮类黄酮(DRTF)对雌激素缺乏诱导的骨丢失的治疗效果。结果表明 DRTF 对卵巢切除的大鼠具有骨保护作用,可以降低的骨转换标记物水平,增强股骨强度和预防小梁骨微结构退化。体外实验揭示了 DRTF 依靠雌激素受体(ER)介导途径对成骨细胞活性起调节作用。同时也证明了 DRTF 通过上调 OPG 以及下调受体激活剂抑制破骨细胞发生的 RANKL 表达。吴鹰等^[46]用维甲酸建立大鼠骨质疏松模型,观察老鹤草素(Ge) 20 mg/kg 灌胃给药 1 周后对骨质疏松相关指标的影响,结果发现与模型组比较,Ge 组的卵巢指数高,骨钙增高,骨小梁较密集,骨小梁间隙面积小,骨小梁表面积大。表明老鹤草素对维甲酸致大鼠骨质疏松症有对抗作用。

3.5 黄酮

天然存在较多的黄酮为木犀草素(luteolin)、芹菜素(apigenin)和黄芩素等。黄酮在抗骨质疏松应用中的研究报道较少,Bandyopadhyay 等^[47]研究了芹菜素对骨细胞的作用及机制。芹菜素对小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 中肿瘤坏死因子(TNF- α)、调节因子(IFN- γ)诱导的促进破骨细胞形成有抑制作用,且呈剂量依赖性。芹菜素减少 RAW 264.7 细胞中抗酒石酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase)、RANK 和降钙素受体(calcitonin receptor)的 mRNA 的表达来抑制多核破骨细胞的形成。同样地,芹菜素通过下调破骨细胞分化的标记物 TRAP、RANK、集落刺激因子受体(colony stimulating factor receptor-1, c-Fms)等因子的表达来抑制破骨细胞的形成。Chen 等^[48]研究发现淫羊藿苷以剂量依赖性方式刺激 rMSC 的增殖并增加碱性磷酸酶染色阳性的 CFUF 数目。淫羊藿苷还在成骨诱导期间剂量依赖性地增加碱性磷酸酶活性,骨钙素分泌和 rMSCs 的钙沉积水平。结果表明,淫羊藿苷应是骨强化活性的有效成分,其机制之一是刺激增殖和增强骨髓间充质干细胞的成骨分化。Zhang 等^[49]进行 24 个月的随机双盲安慰剂对照临床试验,结果显示淫羊藿总黄酮类成分(YH-C)能够在绝经后妇女中发挥有益作用以防止骨丢失,而不会导致对子宫内膜的可检测的增生作用。同时 YH-C 能有效控制骨量丢失,防止骨显微结构的改变,抑制骨吸收亢进,进而对抗去卵巢后的高转换型骨质疏松症。淫羊藿苷可以通过激活骨髓基质细胞(rBMSCs)中的 ER α -Wnt/ β -catenin 信号通路,具体包括:增强 ALP 活性,上调 Runx2,骨桥蛋白,DLX5,骨钙素,胶原蛋白 I 型以及 ER α 等与骨生成相关的因子表达,同时上调 Wnt 通路中 β -catenin、Lef1、TCF7、c-jun、c-myc 和 cyclin D 等因子的表达,从而促进骨形成^[50]。裴凌鹏等^[51]运用动物实验,将 50 只大鼠随机分成正常对照组、泼尼松模型组和刺老苞根皮黄酮类化合物高、中、低剂量组,分别灌胃相应药物,取血清检测生化指标,对骨进行组织切片检查,发现刺老苞根皮黄酮类化合物组能有效提高骨的重量和骨质的含量($p < 0.01$)。兰波^[52]等采用 MC3T3-E1 Subclone14 成骨细胞,将不同浓度黄芩素加入到细胞中培养,用 MTT 法检测细胞增殖情况,发现与空白组相比,黄芩素可明显促进 MC3T3-E1 Subclone14 成骨细胞的增殖($p < 0.05$);明显上调 OPG 和 Osterix 的表达($p < 0.05$),同时能降低 RANKL 的表达($p < 0.05$)。杜仲总黄酮成分也能直接促进体外成骨细胞中骨钙素 mRNA 的表达,从而促进大鼠成骨细胞的增殖。朱振标^[53]等人发现补骨脂二氢黄酮可以减少股骨 γ -氨基丁酸, γ -氨基丁酸 B 型受体含量,增加

骨密度,减少尿钙排泄,从而达到防治骨质疏松的目的。Al-Ghudani^[54]等人探讨了沙漠玫瑰总黄酮提取物对骨质疏松的防治作用,发现沙漠玫瑰总黄酮提取物通过提高大鼠胫骨抗弯力,增加股骨、腰椎的骨密度,改善其生物力学性能,提高血清 ALP 含量等因素防治骨质疏松。研究发现体外长期培养的成骨细胞在包含钙化条件下可形成钙化骨基质,分化细胞可分泌 ALP,水解有机磷酸盐增加局部磷酸盐的浓度,从而导致局部形成羟基磷灰石结晶,由此发生矿化^[55]。许周媚^[56]等人发现芹菜素可以增加钙结节数量且呈浓度依赖性增加,说明芹菜素对 MC3T3-E1 细胞的矿化有显著促进作用。桂林源^[57]等人从黄芩中提取小分子化合物,对雌性 SD 大鼠腹腔注射, Micro CT 结果显示,预防组和治疗组动物的骨体积和骨小梁数目相比对照组均有所增加,而 MTT 生长曲线显示药物可以促进培养的骨髓间充质干细胞的增殖,对骨髓间充质干细胞的成骨分化有促进作用。

4 结论

综上所述,在细胞、动物和少量人群研究中,黄酮类物质能够通过不同的转导途径促进成骨细胞生成,抑制破骨细胞分化,在骨质丢失时,提高骨密度和骨矿含量,其对骨健康的有益作用毋庸置疑。但大部分黄酮类物质防治骨质疏松的评价还在体外或动物试验阶段,其对人体的效果还有待更为深入的研究,尤其是有效剂量、膳食推荐摄入量以及最高可耐受摄入量等指标的确定。黄酮类物质作为自然界广泛存在的天然产物,具有毒副作用小、价格低廉及作用机制广泛等特点,如果能够挖掘其在骨健康方面的应用潜力并开发成为保健食品,对于骨质疏松症的防治具有重要意义。

参考文献

- [1] Yeap S S, Hew F L, Damodaran P, et al. An update of the Malaysian clinical guidance on the management of glucocorticoid-induced osteoporosis, 2015 [J]. *Osteoporosis & Sarcopenia*, 2017
- [2] Mendonça L T, Pinheiro M M, Szejnfeld V L, et al. Bone mass outcomes in patients with osteoporosis treated with risedronate after alendronate failure: a 12-month follow-up study [J]. *Journal of Clinical Densitometry*, 2016
- [3] 冯颖瑜,修玲玲,苏磊.骨质疏松症的药物治疗[J].医学综述,2014,20(1):105-109
FENG Ying-yu, XIU Ling-ling, SU Lei. Drug treatment for osteoporosis [J]. *Medical Recapitulate*, 2014, 20(1): 105-109
- [4] Henriksen K, Byrjalsen I, Andersen J R, et al. A randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of oral salmon calcitonin in the treatment of osteoporosis in postmenopausal women taking calcium and Vitamin D [J]. *Bone*, 2016, 91: 122-129
- [5] Bellan M, Pirisi M, Sainaghi P P. Osteoporosis in rheumatoid arthritis: role of the Vitamin D/parathyroid hormone system [J]. *Revista Brasileira De Reumatologia*, 2014, 55(3): 256-263
- [6] Cheung E, Ching-Lung C, Sahni S, et al. Lignan and flavonoid intakes are associated with bone mineral density (BMD) in southern chinese adult men [J]. *Osteoporosis and Sarcopenia*, 2015, 1(2): 145
- [7] Prasain J K, Carlson S H, Wyss J M. Flavonoids and age-related disease: risk, benefits and critical windows [J]. *Maturitas*, 2010, 66: 163-171
- [8] Zhou S, Turgeman G, Harris S E, et al. Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells [J]. *Mol. Endocrinol.*, 2003, 17: 56-66
- [9] Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system [J]. *Endocrinology*, 2013, 142: 5050-5055
- [10] Pie J E, Park J H, Park Y H, et al. Effect of genistein on the expression of bone metabolism genes in ovariectomized mice using a cDNA microarray [J]. *J. Nutr. Biochem.*, 2006, 17(3): 157-164
- [11] 李芳芳,李恩,宋士军,等.补肾方剂及不同分离组份对成骨细胞增殖分化的影响[J].中国骨质疏松杂志,1998,3:71-73
LI Fang-fang, LI En, SONG Shi-jun, et al. Effects of bushen recipe and different separated components on osteoblast proliferation and differentiation [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 1998, 3: 71-73
- [12] Dang Z C, Audinot V, Papapoulos S E, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein [J]. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(2): 962-967
- [13] Lin G L, Hankenson K D. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2011, 112(12): 3491-501
- [14] Vimalraj S, Selvamangan N. MicrRNAs: Synthesis, generegulation and osteoblast differentiation [J]. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2012, 15: 7-18
- [15] Lydeking-Olsen E, Beck-Jensen J E, Setchell K D R, et al. Soymilk or progesterone for prevention of bone loss a 2 year randomized, placebo-controlled trial [J]. *Euro. J. Nutr.*, 2004,

- 43(4): 246-257
- [16] Arjmandi B H, Lucas E A, Khalil D A, et al. One year soy protein supplementation has positive effects on bone formation markers but not bone density in postmenopausal women [J]. *Nutr. J.*, 2005, 4(1): 176-188
- [17] Zhang Y, Chen W F, Lai W P, et al. Soy isoflavones and their bone protectice effects [J]. *Inflammopharmacology*, 2008, 16(5): 213-215
- [18] Brink E, Coxam V, Robins S, et al. Long-term consumption of isoflavonne-enriched foods does not affect bone mineral density, bone metabolism, or hormonal status in early postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo controlled study [J]. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, 87(3): 761-770
- [19] Choi E Y, Bae S H, Min H H, et al. Genistein suppresses *Prevotella* intermedia, lipopolysaccharide-induced inflammatory response in macrophages and attenuates alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis [J]. *Archives of Oral Biology*, 2016, 62: 70
- [20] Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, et al. Effects of flavonoid on calcium content in femoral tissue culture and parathyroid hormone-stimulated osteoclastogenesis in bone marrow culture *in vitro* [J]. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 2007, 303(1-2): 83-8
- [21] Wattel A, Kamel S, Mentaverri R, et al. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on *in vitro*, osteoclastic bone resorption [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 65(1): 35-42
- [22] Wong Ricky W K, Rabie A Bakr M. Effect of quercetin on bone formation [J]. *Jour. Orthop. Res.*, 2008, 26(8): 1061-1066
- [23] Tsuji M, Yamamoto H, Sato T, et al. Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice [J]. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2009, 27(6): 673-681
- [24] Masuhara M, Tsukahara T, Tomita K, et al. A relation between osteoclasogenesis inhibition and membrane-type estrogen receptor GPR30 [J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2016, 8: 389-394
- [25] Pang J L, Ricupero D A, Huang S, et al. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumou necrosis factor receptor family signaling in bone cells [J]. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, 71(6): 818-826
- [26] Yao Y, Lin G, Xie Y, et al. Preformulation studies of myr-icetin: a natural antioxidant flavonoid [J]. *Pharmazie*, 2014, 69(1):19-26
- [27] Huh J E, Jung I T, Choi J, et al. The natural flavonoid galangin inhibits osteoclastic bone destruction and osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B in collagen-induced arthritis and bone marrow-derived macrophages [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2012, 698(1-3): 57-66
- [28] 卞伟,孙宏,刘凯,等.槲皮素对骨质疏松大鼠骨生物力学性能及骨代谢的影响[J].*吉林中医药*,2016,36(8):814-817
BIAN Wei, SUN Hong, LIU Kai, et al. Effects of quercetin on bone biomechanical properties and bone metabolism in osteoporosis rats [J]. *Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 36(8): 814-817
- [29] 丁淑琴,杨风琴,张玮,等.山奈酚治疗去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究[J].*中国新药杂志*,2014,24:2925-2929
DING Shu-qin, YANG Feng-qin, ZHANG Wei, et al. Experimental study on the effect of kaempferol on osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2014, 24: 2925-2929
- [30] Shin D W, Kim S N, Lee S, et al. (S)-Catechin promotes adipocyte differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells through PPAR- γ transactivation [J]. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 77: 125-133
- [31] Haque A M, Hashimoto M, Katakura M, et al. Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by Abeta 1-40 in rats [J]. *Nutr. Biochem.*, 2008, 19(9): 619-626
- [32] Chwan L S, James K, Barbara J, et al. Green tea polyphenols mitigate deterioration of bone microarchitecture in middle-aged female rats [J]. *Bone*, 2009, 44(4): 684-690
- [33] Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, et al. (-)-Epigallocatechin gallate synergistically potentiates prostaglandin E₂-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts [J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2017, 128-129: 27-33
- [34] Ishikawa M, Maki K, Tofani I, et al. Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular condyle [J]. *Eur. J. Oral. Sci.*, 2005, 113(1): 47-52
- [35] Hardcastle A C, Aucott L, Reid D M, et al. Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a scottish population [J]. *Journal of Bone & Mineral Research the Official Journal of the American Society for Bone & Mineral Research*, 2011, 26(5): 941-947
- [36] 陈之光,薛今琦,付勤.姜黄素对骨骼系统的影响[J].*中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*,2016,9(3):323-329
CHEN Zhi-guang, XUE Jin-qin, FU Qin. Effect of curcumin on skeletal system [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis and*

- Bone Mineral Research, 2016, 9(3): 323-329
- [37] Mau L P, Cheng W C, Chen J K, et al. Curcumin ameliorates alveolar bone destruction of experimental periodontitis by modulating osteoclast differentiation, activation and function [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 22: 243-256
- [38] 韦敏,杨中林,李萍.柚皮苷及其磷脂复合物促进成骨细胞活性和小肠段吸收比较[J].中国天然药物,2007,5(5):366-369
- WEI Min, YANG Zhong-lin, LI Ping. Comparison of naringin and its phospholipid complexes on osteoblast activity and small intestine absorption [J]. China Journal of Chinese Materia Medic, 2007, 5(5): 366-369
- [39] 丁佩惠,唐琪,陈莉丽.柚皮苷对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化和矿化的影响[J].中国中药杂志,2009,34(13): 1712-1716
- DING Pei-hui, TANG Qi, CHEN Li-li. Effects of naringin on the proliferation, differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells [J]. China Journal of Chinese Materia. Medic., 2009, 34(13): 1712-1716
- [40] Pang W Y, Wang X L, Mok S K, et al. Naringin improves bone properties in ovariectomized mice and exerts oestrogen-like activities in rat osteoblast-like (UMR-106) cells [J]. Brit. J. Pharmacol., 2010, 159(8): 1693-1703
- [41] Li F, Sun X, Ma J, et al. Naringin prevents ovariectomy-induced osteoporosis and promotes osteoclasts apoptosis through the mitochondria-mediated apoptosis pathway [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2016, 452(3): 629-635
- [42] Lv J, Sun X, Ma J, et al. Involvement of periostin-sclerostin-Wnt/ β -catenin signaling pathway in the prevention of neurectomy-induced bone loss by naringin [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 468(4): 587-593
- [43] Chiba H, Uehara M, Wu J, et al. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice [J]. J. Nutr., 2003, 133(6): 1892-1897
- [44] Shehata A S, Amer M G, Abd El-Haleem M R, et al. The ability of hesperidin compared to that of insulin for preventing osteoporosis induce by Type I diabetes in young male albino rats: A histological and biochemical study [J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2016
- [45] Song S H, Zhai Y K, Li C Q, et al. Effects of total flavonoids from *drynariae rhizoma* prevent bone loss *in vivo* and *in vitro* [J]. Bone Reports, 2016, 5: 262-273
- [46] 吴鹰,何波,刘淑娟,等.老鹳草素对实验性骨质疏松症及破骨细胞生成的影响[J].昆明医科大学学报,2006,27(6):9-15
- WU Ying, HE Bo, LIU Shu-juan, et al. Effects of gerberin on experimental osteoporosis and osteoclastogenesis [J]. Journal of Kunming Medical University, 2006, 27(6): 9-15
- [47] Bandyopadhyay S, Lion J M, Mentaverri R, et al. Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenin [J]. Biochem. Pharmacol., 2006, 72(2): 184-197
- [48] Chen K M, Ge B F, Ma H P, et al. Icariin, a flavonoid from the herb *Epimedium* enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells [J]. Pharmazie, 2005, 60(12): 939-942
- [49] Zhang G, Qin L, Shi Y. *Epimedium*-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: A 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial [J]. Journal of Bone & Mineral Research the Official Journal of the American Society for Bone & Mineral Research, 2007, 22(7): 1072-1079
- [50] Wei Q, Zhang J, Hong G, et al. Icariin promotes osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by activating the ER α -Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 84: 931-939
- [51] 裴凌鹏,郑玲玲,尹霞,等.刺老苞根皮黄酮类化合物对抗大鼠泼尼松性骨质疏松的作用研究[J].时珍国医国药,2011, 22(7):1559-1561
- PEI Ling-peng, ZHENG Ling-ling, YIN Xia, et al. Study on the effect of flavonoids from the root-bark of old *ctenopharyngodon idellus bge* on antagonism of prednisone-induced osteoporosis in rats [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(7): 1559-1561
- [52] 兰波,刘亭,谢玉敏,等.两种杜仲黄酮类化合物对成骨细胞 OPG/RANKL 及成骨相关转录因子的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(22):180-184
- LAN Bo, LIU Ting, XIE Yu-min, et al. Effects of flavonoids from *Eucommia ulmoides* oliver on OPG/RANKL and osteogenesis-related transcription factors in osteoblasts [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formula, 2014, 20(22): 180-184

(下转第 341 页)