

· 基础研究 ·

补肾活骨汤含药血清对小鼠 RAW264.7 细胞
向破骨细胞分化的影响及其作用机制

侯成志, 赵勇, 夏迪, 俞张镜泽, 秦伟凯, 董永丽, 魏光成, 顾金光

(中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

摘要 目的:探究补肾活骨汤含药血清对小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的影响及其作用机制。方法:①补肾活骨汤含药血清和空白血清制备方法。将 24 只 SD 大鼠随机分为补肾活骨汤含药血清制备组和空白血清制备组,每组 12 只,分别给予补肾活骨汤药液和蒸馏水灌胃,连续灌胃 7 d 后,采集腹主动脉血,制备补肾活骨汤含药血清和空白血清。②补肾活骨汤含药血清干预浓度的筛选方法。取第 3 代小鼠 RAW264.7 细胞,分为空白对照组及 10%、15%、20%、25% 补肾活骨汤含药血清组。空白对照组加入 10% 的空白血清,10%、15%、20%、25% 补肾活骨汤含药血清组分别加入 10%、15%、20%、25% 的补肾活骨汤含药血清。培养 24 h 后,采用 MTT 法检测各组小鼠 RAW264.7 细胞的活力,确定干预浓度。③补肾活骨汤含药血清对小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化影响的分析方法。取第 3 代小鼠 RAW264.7 细胞,分为空白对照组、诱导分化组及 10%、15%、20% 补肾活骨汤含药血清组。除空白对照组外,其余各组均加入终浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)和 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的核因子 κB 受体激活蛋白配体(receptor activator of nuclear factor- κB ligand, RANKL);同时,空白对照组和诱导分化组加入 10% 的空白血清,10%、15%、20% 补肾活骨汤含药血清组分别加入 10%、15%、20% 的补肾活骨汤含药血清。培养 5 d 后,进行抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色,并统计各组小鼠 RAW264.7 细胞分化的破骨细胞数量。④补肾活骨汤含药血清影响小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化作用机制的分析方法。取第 3 代小鼠 RAW264.7 细胞,分为空白对照组、诱导分化组、20% 补肾活骨汤含药血清组。除空白对照组外,其余各组均加入终浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 M-CSF 和 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 RANKL;空白对照组和诱导分化组加入 10% 的空白血清,20% 补肾活骨汤含药血清组加入 20% 的补肾活骨汤含药血清。培养 5 d 后,采用实时定量 PCR 检测 TRAP 和活化 T 细胞核因子 c1(nuclear factor of activated T cells c1, NFATc1)的 mRNA 表达水平,采用 Western Blot 法检测 NFATc1、组织蛋白酶 K、多囊蛋白 1、PDZ 结合基序转录共激活因子(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ)的蛋白表达水平。**结果:**①补肾活骨汤含药血清干预浓度的筛选结果。空白对照组及 10%、15%、20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞活力组间两两比较,差异均无统计学意义($P=0.745$, $P=0.922$, $P=0.981$, $P=0.958$, $P=0.999$, $P=0.993$),25% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞活力低于空白对照组及 10%、15%、20% 补肾活骨汤含药血清组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$)。确定补肾活骨汤含药血清干预浓度为 10%、15%、20%。②补肾活骨汤含药血清对小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化影响的分析结果。空白对照组无破骨细胞。10% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞分化的破骨细胞数量与诱导分化组的差异无统计学意义($P=0.209$),15%、20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞分化的破骨细胞数量均少于诱导分化组和 10% 补肾活骨汤含药血清组($P=0.000$, $P=0.001$; $P=0.016$, $P=0.002$);20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞分化的破骨细胞数量少于 15% 补肾活骨汤含药血清组($P=0.046$)。③补肾活骨汤含药血清影响小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化作用机制的分析结果。诱导分化组、20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞 TRAP、NFATc1 的 mRNA 相对表达量和 NFATc1、组织蛋白酶 K、多囊蛋白 1、TAZ 的蛋白相对表达量均高于空白对照组($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.002$, $P=0.011$; $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.001$, $P=0.002$; $P=0.000$, $P=0.001$),20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞 TRAP、NFATc1 的 mRNA 相对表达量和 NFATc1、组织蛋白酶 K、多囊蛋白 1、TAZ 的蛋白相对表达量均低于诱导分化组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.008$, $P=0.005$, $P=0.006$, $P=0.022$)。结论:补肾活骨汤含药血清能够抑制小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化,其作用机制可能通过下调多囊蛋白 1、TAZ 的表达进而抑制 NFATc1、组织蛋白酶 K 等破骨细胞分化相关基因的表达。

关键词 骨关节炎;补肾活骨汤;破骨细胞;分化;RAW264.7 细胞

基金项目:国家自然科学基金项目(82505627);中国中医科学院望京医院高水平中医医院建设项目(WJZJ-202316);中国中医科学院望京医院自主选题项目(WJYY-ZZXT-2022-03)

通信作者:赵勇 E-mail:zhaoyong423@163.com

Effects and mechanism of Bushen Huogu Tang (补肾活骨汤) medicated serum on the differentiation of mouse RAW264.7 cells into osteoclasts

HOU Chengzhi, ZHAO Yong, XIA Di, YU Zhangjingze, QIN Weikai, DONG Yongli, WEI Guangcheng, GU Jinguang
Wangjing Hospital of CACMS, Beijing 100102, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of Bushen Huogu Tang (补肾活骨汤, BSHGT) medicated serum on the differentiation of mouse RAW264.7 cells into osteoclasts, and explore its underlying mechanisms. **Methods:** ①Preparation of BSHGT medicated serum and blank serum. Twenty-four SD rats were randomized into a BSHGT medicated serum preparation group and a blank serum preparation group, with 12 ones in each group. The rats in the 2 groups were intervened by intragastric administration with BSHGT solution and distilled water, respectively, for consecutive 7 days. One hour after the end of the last intervention, the blood was drawn from the abdominal aorta of rats in each group for making BSHGT medicated serum and blank serum. ②Screening method for the intervention concentration of BSHGT medicated serum. The third generation of mouse RAW264.7 cells were collected and divided into blank control group, and 10%, 15%, 20%, and 25% BSHGT medicated serum groups. The mouse RAW264.7 cells in blank control group were intervened by 10% blank serum, while the ones in treatment groups by 10%, 15%, 20%, and 25% BSHGT medicated serum, respectively, for 24 hours. After the end of the intervention, the viability of the mouse RAW264.7 cells in each group was assessed by MTT assay to determine the intervention concentration. ③Analysis method for the effect of BSHGT medicated serum on the differentiation of mouse RAW264.7 cells into osteoclasts. The third generation of mouse RAW264.7 cells were fetched and divided into a blank control group, an induced differentiation group, and 10%, 15%, and 20% BSHGT medicated serum groups. All groups but the blank control group were intervened by macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) at a final concentration of 100 ng/mL and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) at a final concentration of 50 ng/mL. Meanwhile, the blank control group and the induced differentiation group were intervened by 10% blank serum, and the 10%, 15%, and 20% BSHGT medicated serum groups by 10%, 15%, and 20% BSHGT medicated serum, respectively. After 5-day culture, the number of osteoclasts differentiated from mouse RAW264.7 cells in each group was counted by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. ④Analysis method for the mechanism of BSHGT medicated serum affecting the differentiation of mouse RAW264.7 cells into osteoclasts. The third generation of mouse RAW264.7 cells were selected and divided into a blank control group, an induced differentiation group, and a 20% BSHGT medicated serum group. All groups but the blank control group were intervened by M-CSF at a final concentration of 100 ng/mL and RANKL at a final concentration of 50 ng/mL. Meanwhile, the blank control group and the induced differentiation group were intervened by 10% blank serum, while the 20% BSHGT medicated serum group by 20% BSHGT medicated serum. After 5-day culture, the mRNA expression levels of TRAP and nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) were detected by real-time quantitative PCR, and the protein expression levels of NFATc1, cathepsin K, polycystin-1, and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) were detected by Western Blot. **Results:** ①Screening results of intervention concentrations of BSHGT medicated serum. Pairwise comparisons of the viability of mouse RAW264.7 cells among the blank control group, and 10%, 15%, and 20% BSHGT medicated serum groups showed no statistically significant differences ($P = 0.745, P = 0.922, P = 0.981, P = 0.958, P = 0.999, P = 0.993$). However, the 25% BSHGT medicated serum group showed lower cell viability compared to the blank control group and the 10%, 15%, and 20% BSHGT medicated serum groups ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$). Therefore, the intervention concentrations of BSHGT medicated serum were determined to be 10%, 15%, and 20% for subsequent experiments. ②Analysis results of the effect of BSHGT medicated serum on the differentiation of mouse RAW264.7 cells into osteoclasts. No osteoclasts were observed in the blank control group. There was no statistically significant difference in the number of osteoclasts differentiated from mouse RAW264.7 cells between the 10% BSHGT medicated serum group and the induced differentiation group ($P = 0.209$). However, the number of osteoclasts differentiated from mouse RAW264.7 cells was less in both 15% and 20% BSHGT medicated serum groups compared to the induced differentiation group and the 10% BSHGT medicated serum group ($P = 0.000, P = 0.001; P = 0.016, P = 0.002$), and was less in the 20% BSHGT medicated serum group compared to the 15% BSHGT medicated serum group ($P = 0.046$). ③Analysis results of the mechanism of BSHGT medicated serum affecting the differentiation of mouse RAW264.7 cells into osteoclasts. The relative mRNA expression levels of TRAP and NFATc1, as well as the relative protein expression levels of NFATc1, cathepsin K, polycystin-1, and TAZ in mouse RAW264.7 cells were all higher in the induced differentiation group and the 20% BSHGT medicated serum group compared to the blank control group ($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.002, P = 0.011; P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000; P = 0.001, P = 0.002; P = 0.000, P = 0.001$). However, they were all lower in the 20% BSHGT medicated serum group compared to the induced differentiation group ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.008, P = 0.005, P =$

0.006, $P=0.022$). **Conclusion:** BSHGT medicated serum can inhibit the differentiation of mouse RAW264.7 cells into osteoclasts. It may work by inhibiting the expression of osteoclast differentiation-related genes such as NFATc1 and cathepsin K through downregulating the expression of polycystin-1 and TAZ.

Keywords osteoarthritis; Bushen Huogu Tang; osteoclasts; differentiation; RAW 264.7 cells

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是临床常见的关节退行性疾病, 属中医“骨痹”范畴。中医认为, 该病属本虚标实之证, 以肝肾亏虚为本, 以风寒湿邪侵袭、瘀血阻络为标^[1-2]。赵勇教授基于补肾活血法创制了补肾活骨汤。前期临床研究结果显示, 补肾活骨汤可有效缓解 OA 患者关节疼痛, 改善关节活动功能; 动物实验结果显示, 该方能够延缓 OA 大鼠软骨退变, 减少软骨下骨质破坏^[3]。但该方的具体作用机制尚不清楚。软骨下骨异常重塑是 OA 的主要病理特征之一^[4-6]。破骨细胞介导的骨吸收与成骨细胞介导的骨形成是维持软骨下骨正常重塑的关键因素, 破骨细胞过度分化会导致软骨下骨重塑异常^[7-8]; 而调控破骨细胞分化能够改善软骨下骨重塑, 进而延缓 OA 进展^[9-10]。有研究发现, 多囊蛋白 1 能够通过影响 PDZ 结合基序转录共激活因子 (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ) 的核转位间接调控活化 T 细胞核因子 c1 (nuclear factor of activated T cells c1, NFATc1)、组织蛋白酶 K 等破骨细胞分化关键基因的表达, 影响破骨细胞分化^[11]。为了探究补肾活骨汤含药血清对破骨细胞分化的影响及其作用机制, 我们进行了相关细胞实验, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量 (200 ± 20) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 [实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2024-0001]。大鼠饲养于北京迈德康纳生物技术有限公司实验动物中心 [实验动物使用许可证号: SYXK (京) 2023-0062]。动物实验方案经北京迈德康纳生物技术有限公司实验动物福利伦理委员会审查通过, 伦理批件号: MDKN-2024-099。小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 (货号: CL-0190) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 实验药物

补肾活骨汤, 药物组成包括熟地黄 12 g、当归 12 g、红花 10 g、续断 12 g、骨碎补 9 g、丹参 15 g。中药饮片购自中国中医科学院望京医院中药房。将中

药饮片煎煮浓缩为生药含量为 1.26 g · mL⁻¹ 的药液, 备用。

1.3 实验试剂

DMEM (货号: SH30022.01) 购自 Hyclone 公司, 胎牛血清 (货号: 10099141) 购自 GIBCO 公司, MTT 试剂 (货号: BS186)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (货号: BL508A) 均购自 Biosharp 公司, 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) (货号: 315-02) 购自 PeproTech 公司, 核因子 κ B 受体激活蛋白配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) (货号: CM045-20MP) 购自乔默生物技术 (上海) 有限公司, 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 染色试剂盒 (货号: G1492) 购自 Solarbio 公司, Trizol 裂解液 (货号: ET101-1-V2) 购自北京全式金生物技术股份有限公司, 总 RNA 提取试剂盒 (货号: M5102) 购自新赛美生物科技有限公司, HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (货号: R223)、SYBR qPCR Master Mix (货号: Q331-03) 均购自 Vazyme 公司, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: P0010)、山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin, IgG) 二抗 (货号: A0208) 均购自上海碧云天生物技术有限公司, 抗 NFATc1 抗体 (货号: 5861) 购自 CST 公司, 抗组织蛋白酶 K 抗体 (货号: 11239-1-AP) 购自 Proteintech 公司, 抗多囊蛋白 1 抗体 (货号: DF13419) 购自 Affinity 公司, 抗 TAZ 抗体 (货号: ab307148) 购自 Abcam 公司。

1.4 实验仪器

SW-CJ-1FD 型超净工作台 (苏州净化设备有限公司), XD-101 型 CO₂ 培养箱 (SANYO 公司), 80-2 型台式低速离心机 (上海医疗器械股份有限公司医疗设备厂), MULTISKAN FC 型酶标仪 (Thermo 公司), IX73 型生物倒置显微镜 (OLYMPUS 公司), WH-2 型振荡器 (上海沪西分析仪器厂), C1000 型 PCR 仪 (BIO-RAD 公司), ABI 7500 型实时定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司), VE-586 型转移电泳槽、EPS-200 型电泳仪、5260Multi 型全自动化学发光分析仪 (上海天能生命科学有限公司)。

2 方 法

2.1 补肾活骨汤含药血清和空白血清制备方法

将 24 只 8 周龄雄性 SD 大鼠应用随机数字表随机分为补肾活骨汤含药血清制备组和空白血清制备组, 每组 12 只。根据“人和动物间体表面积折算的等效剂量比值表”计算大鼠补肾活骨汤的灌胃剂量^[12], 补肾活骨汤组大鼠每次灌胃 2 mL 浓缩药液, 每天灌胃 2 次, 连续给药 7 d。空白对照组大鼠给予等体积蒸馏水灌胃。末次灌胃 1 h 后, 按照 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠。采集腹主动脉血, 以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min (离心半径 10 cm), 取上层血清于离心管中, 常温下静置 30 min 后, 将同组大鼠的血清合并, 获得补肾活骨汤含药血清和空白血清。将血清置于 $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴中 30 min, 过滤除菌, 于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 细胞培养和传代方法

将小鼠 RAW264.7 细胞培养于含 12% 胎牛血清、 $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 中, 于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内培养; 待细胞贴壁后, 每隔 2 d 更换 1 次培养液; 待细胞汇合度达 80% 时, 用 PBS 漂洗 2 次, 加入胰酶消化, 按 1:3 的比例进行传代。

2.3 补肾活骨汤含药血清干预浓度的筛选方法

取第 3 代小鼠 RAW264.7 细胞, 用培养液稀释细胞密度为 3×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 按照每孔 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 接种于 96 孔板, 分为空白对照组及 10%、15%、20%、25% 补肾活骨汤含药血清组, 每组设 3 个复孔。于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内过夜培养后, 空白对照组加入 10% 的空白血清, 10%、15%、20%、25% 补肾活骨汤含药血清组分别加入 10%、15%、20%、25% 的补肾活骨汤含药血清。培养 24 h 后, 每组取 3 个复孔, 采用 MTT 法检测各组小鼠 RAW264.7 细胞的活力。比较各组间小鼠 RAW264.7 细胞的活力, 确定干预浓度。

2.4 补肾活骨汤含药血清对小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化影响的分析方法

取第 3 代小鼠 RAW264.7 细胞, 用培养液稀释细胞密度为 3×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 按照每孔 $300 \text{ } \mu\text{L}$ 接种于 24 孔板, 分为空白对照组、诱导分化组及 10%、15%、20% 补肾活骨汤含药血清组, 每组设 3 个复孔。除空白对照组外, 其余各组均加入终浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 M-CSF 和 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 RANKL; 同时, 空白对照组和诱导分化组均加入 10% 的空白血清, 10%、15%、20% 补肾活骨汤含药血清组分别加入 10%、15%、20% 的补肾活骨汤含药血清。每隔 2 d 更换 1 次培养液, 培养 5 d 后, 进行 TRAP 染色, 并统计各组小鼠 RAW264.7 细胞分化的破骨细胞数量。TRAP 阳性且细胞核数量 >3 为破骨细胞。

2.5 补肾活骨汤含药血清影响小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化作用机制的分析方法

2.5.1 分组与干预 取第 3 代小鼠 RAW264.7 细胞, 用培养液稀释细胞密度为 3×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 按照每孔 $300 \text{ } \mu\text{L}$ 接种于 24 孔板, 分为空白对照组、诱导分化组、20% 补肾活骨汤含药血清组。除空白对照组外, 其余各组均加入终浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 M-CSF 和 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 RANKL; 空白对照组和诱导分化组均加入 10% 的空白血清, 20% 补肾活骨汤含药血清组加入 20% 的补肾活骨汤含药血清。每隔 2 d 更换 1 次培养液, 培养 5 d 后, 采用下述方法进行各项指标检测。

2.5.2 破骨细胞分化相关基因 mRNA 表达水平检测 取各组细胞, 加入 Trizol 裂解液裂解细胞, 采用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 采用 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录合成 cDNA, 采用实时定量 PCR 检测 TRAP 和 NFATc1 的 mRNA 表达水平。以 β 肌动蛋白为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算 mRNA 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')
抗酒石酸酸性磷酸酶	上游引物 CAGCGACAAGAGGTTCCAG
	下游引物 GTACGTGGAATTTTGAAGCG
活化 T 细胞核因子 c1	上游引物 AGTACAGTCTCAATGGCCGG
	下游引物 AGGTCCAGAGTGCTATCGGT
β 肌动蛋白	上游引物 GTCCCTCACCCCTCCAAAAG
	下游引物 GCTGCCTCAACACCTCAACCC

2.5.3 破骨细胞分化相关基因蛋白表达水平检测

取各组细胞,加入放射免疫沉淀法裂解液,于 4 ℃ 以 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min (离心半径 10 cm),取上清液,采用 BCA 法测定上清液蛋白浓度。取等量蛋白样品处理后,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳结束后,将凝胶上的蛋白湿转至硝酸纤维素膜。用 1 × PBST 配制的 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h。分别加入抗 NFATc1 抗体(1:1 000)、抗组织蛋白酶 K 抗体(1:500)、抗多囊蛋白 1 抗体(1:500)、抗 TAZ 抗体(1:100),于 4 ℃ 孵育过夜;洗膜后加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000),室温孵育 60 min;洗膜后,采用超敏增强化学发光试剂显影。采用 5260Multi 型全自动化学发光分析仪拍照后,用 ImageJ 软件分析条带灰度值。以 β 肌动蛋白为内参,计算 NFATc1、组织蛋白酶 K、多囊蛋白 1、TAZ 的蛋白相对表达量。

2.6 数据统计方法

采用 GraphPad Prism9.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。各组小鼠 RAW264.7 细胞活力、破骨细胞数量、TRAP 和 NFATc1 的 mRNA 相对表达量及 NFATc1、组织蛋白酶 K、多囊蛋白 1、TAZ 的蛋白相对表达量的组间总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 SNK-*q* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 补肾活骨汤含药血清干预浓度的筛选结果

空白对照组及 10%、15%、20%、25% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞活力比较,组间差异有统计学意义 (1.000 ± 0.001 , 0.999 ± 0.002 , 0.998 ± 0.001 , 0.997 ± 0.001 , 0.979 ± 0.007 , $F = 19.680$, $P = 0.000$)。空白对照组及 10%、15%、20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞活力组间两两比较,差异均无统计学意义 ($P = 0.745$, $P = 0.922$, $P = 0.981$, $P = 0.958$, $P = 0.999$, $P = 0.993$), 25% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞活力低于空白对照组及 10%、15%、20% 补肾活骨汤含药血清组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$)。确定补肾活骨汤含药血清干预浓度为 10%、15%、20%。

3.2 补肾活骨汤含药血清对小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化影响的分析结果

空白对照组无破骨细胞。诱导分化组及 10%、15%、20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细

胞分化的破骨细胞数量比较,组间差异均有统计学意义 [(34.000 ± 4.000) 个, (27.670 ± 1.528) 个, (17.330 ± 1.528) 个, (10.670 ± 2.082) 个, $F = 52.100$, $P = 0.000$]。10% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞分化的破骨细胞数量与诱导分化组的差异无统计学意义 ($P = 0.209$), 15%、20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞分化的破骨细胞数量均少于诱导分化组和 10% 补肾活骨汤含药血清组 ($P = 0.000$, $P = 0.001$; $P = 0.016$, $P = 0.002$); 20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞分化的破骨细胞数量少于 15% 补肾活骨汤含药血清组 ($P = 0.046$)。各组小鼠 RAW264.7 细胞分化破骨细胞 TRAP 染色结果见图 1。确定采用 20% 补肾活骨汤含药血清用于补肾活骨汤含药血清影响小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化作用机制分析。

3.3 补肾活骨汤含药血清影响小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化作用机制的分析结果

3.3.1 破骨细胞分化相关基因 mRNA 表达水平检测结果 空白对照组、诱导分化组、20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞 TRAP 和 NFATc1 的 mRNA 相对表达量比较,组间差异均有统计学意义。诱导分化组、20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞 TRAP 和 NFATc1 的 mRNA 相对表达量均高于空白对照组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.002$, $P = 0.011$), 20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞 TRAP 和 NFATc1 的 mRNA 相对表达量均低于诱导分化组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$)。见表 2。

3.3.2 破骨细胞分化相关基因蛋白表达水平检测结果 空白对照组、诱导分化组、20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞 NFATc1、组织蛋白酶 K、多囊蛋白 1、TAZ 的蛋白相对表达量比较,组间差异均有统计学意义。诱导分化组、20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞 NFATc1、组织蛋白酶 K、多囊蛋白 1、TAZ 的蛋白相对表达量均高于空白对照组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.001$, $P = 0.002$; $P = 0.000$, $P = 0.001$), 20% 补肾活骨汤含药血清组小鼠 RAW264.7 细胞 NFATc1、组织蛋白酶 K、多囊蛋白 1、TAZ 的蛋白相对表达量均低于诱导分化组 ($P = 0.008$, $P = 0.005$, $P = 0.006$, $P = 0.022$)。见表 3、图 2。

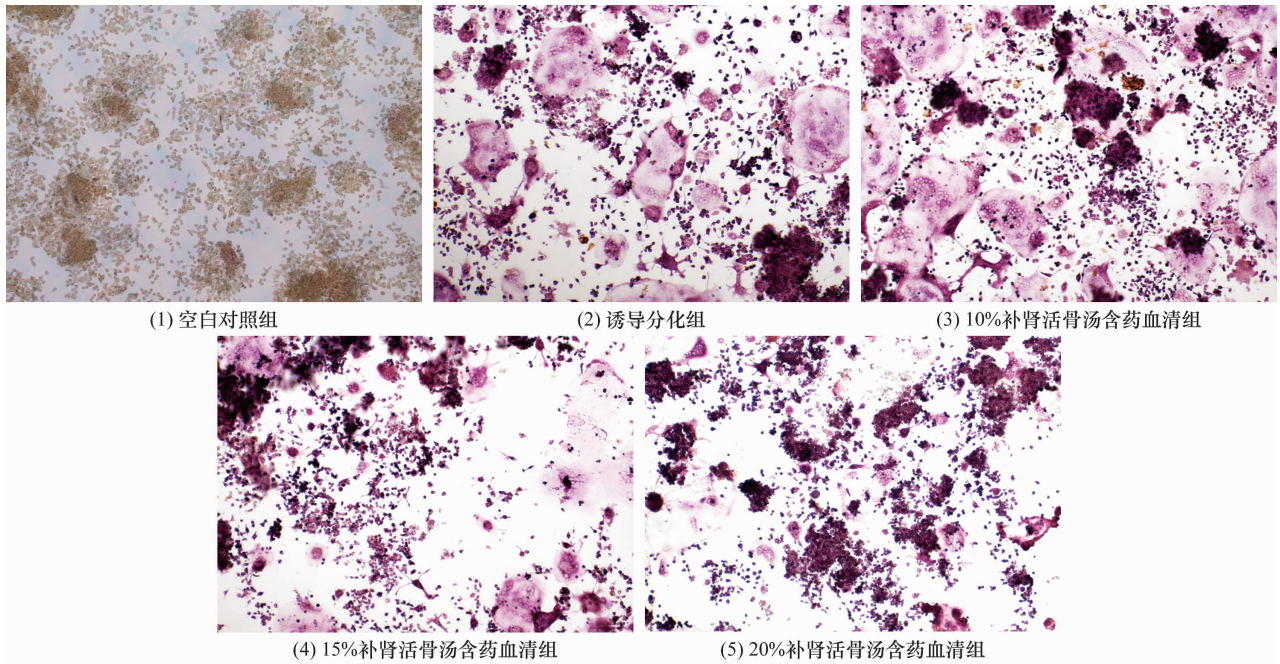


图 1 各组小鼠 RAW264.7 细胞分化破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果 (× 100)

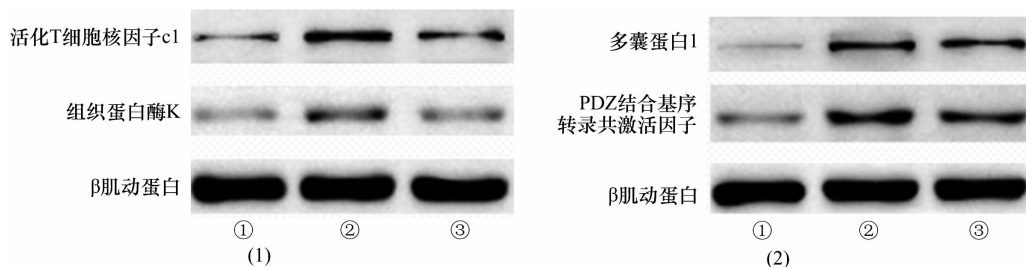
表 2 各组小鼠 RAW264.7 细胞破骨细胞分化相关基因 mRNA 相对表达量

组别	样本量/孔	抗酒石酸酸性磷酸酶 ($\bar{x} \pm s$)	活化 T 细胞核因子 c1 ($\bar{x} \pm s$)
空白对照组	3	1.003 ± 0.081	1.003 ± 0.090
诱导分化组	3	6.047 ± 0.499	6.540 ± 0.655
20% 补肾活骨汤含药血清组	3	2.797 ± 0.370	2.623 ± 0.422
<i>F</i> 值		149.800	118.700
<i>P</i> 值		0.000	0.000

表 3 各组小鼠 RAW264.7 细胞破骨细胞分化相关基因蛋白相对表达量

组别	样本量/孔	NFATc1 ¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)	组织蛋白酶 K ($\bar{x} \pm s$)	多囊蛋白 1 ($\bar{x} \pm s$)	TAZ ²⁾ ($\bar{x} \pm s$)
空白对照组	3	0.420 ± 0.066	0.290 ± 0.062	0.263 ± 0.045	0.423 ± 0.055
诱导分化组	3	0.897 ± 0.049	0.820 ± 0.053	0.760 ± 0.046	0.850 ± 0.044
20% 补肾活骨汤含药血清组	3	0.697 ± 0.035	0.577 ± 0.059	0.593 ± 0.032	0.697 ± 0.050
<i>F</i> 值		64.720	62.510	111.300	56.300
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)活化 T 细胞核因子 c1;2)PDZ 结合基序转录共激活因子。



①为空白对照组;②为诱导分化组;③为 20% 补肾活骨汤含药血清组。

图 2 各组小鼠 RAW264.7 细胞破骨细胞分化相关基因蛋白表达水平 Western Blot 法检测结果

4 讨论

补肾活骨汤以熟地黄、当归共为君药,续断、骨碎补、丹参、红花共为臣药。熟地黄补血滋阴,益精填

髓,归肝、肾经;当归补血活血,归肝、心、脾经。二者共为君药,当归于补血而外,复有活血之能;熟地黄于填精之中,自寓补血之意。熟地黄辅以续断、骨碎补,

补肾强筋以壮骨;当归得丹参、红花之助,祛瘀舒筋以活骨。诸药合用,共奏补肾活血,强筋壮骨之功。

软骨下骨重塑是钙稳态系统的一个重要组成部分,正常情况下,破骨细胞介导的骨吸收与成骨细胞介导的骨形成协同作用,维持软骨下骨重塑稳定^[13]。然而,在早期 OA 软骨下骨微环境中,由于破骨细胞分化变快,破骨细胞数量异常增多,进而导致骨吸收加快,引起软骨下骨重塑异常^[14-15]。破骨细胞是一种特殊的多核巨细胞,是骨吸收的主要执行者;其分化过程受 NFATc1、组织蛋白酶 K 等分子的调控。NFATc1 是调节破骨细胞终末分化的主要转录因子,NFATc1 活化后从细胞质转运进入细胞核,能够促进 TRAP、组织蛋白酶 K、基质金属蛋白酶-9 等基因的转录^[8]。组织蛋白酶 K 属于溶酶体半胱氨酸蛋白酶中的番木瓜蛋白酶超家族成员,其在成熟破骨细胞中高表达,而沉默组织蛋白酶 K 的表达能够抑制软骨下骨吸收^[16]。

相关研究发现,抑制破骨细胞 NFATc1、组织蛋白酶 K 分子的过表达能够抑制破骨细胞的分化和活性,改善软骨下骨重塑,延缓 OA 进展^[17-18]。本研究结果显示,补肾活骨汤含药血清能够抑制小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化,且在一定范围内其抑制作用呈现剂量依赖性。进一步机制研究结果显示,补肾活骨汤含药血清能够逆转诱导破骨细胞分化引起的 TRAP、NFATc1 的 mRNA 表达水平升高和 NFATc1、组织蛋白酶 K 的蛋白表达水平升高。该结果提示,补肾活骨汤含药血清能够通过下调 NFATc1、组织蛋白酶 K 的表达,抑制破骨细胞分化。

近些年,骨细胞中多囊蛋白 1 和 TAZ 之间的关系已被深入研究。有研究发现,TAZ 是多囊蛋白 1 调节骨细胞生理功能的关键蛋白^[19-21]。多囊蛋白 1 是由多囊肾病基因-1 编码的一种大型机械感应蛋白,与骨骼的生成和重塑关系密切^[22]。TAZ 是 Hippo 信号通路的下游效应器;多项研究表明,TAZ 参与破骨细胞生成及骨重塑,能够调控下游 NFATc1、组织蛋白酶 K 等分子的表达^[23-24]。Huang 等^[11]研究发现,在破骨细胞中多囊蛋白 1 可通过形成多囊蛋白 1-TAZ 复合物影响 TAZ 的核转位,进而调节破骨细胞生成,影响骨吸收;且在破骨细胞谱系中,多囊蛋白 1 或 TAZ 的条件性缺失能够导致组织蛋白酶 K、NFATc1 等破骨细胞分化相关基因的表达下调。本研究结果显示,诱

导破骨细胞分化会引起多囊蛋白 1 与 TAZ 蛋白表达水平上调,而补肾活骨汤含药血清能够逆转其表达水平上调。因此,我们认为,多囊蛋白 1 与 TAZ 可能是补肾活骨汤调控破骨细胞分化的关键靶点。这也为补肾活骨汤治疗 OA 的作用机制研究提供了新的方向。

本研究结果表明,补肾活骨汤含药血清能够抑制小鼠 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化,其作用机制可能通过下调多囊蛋白 1、TAZ 的表达进而抑制 NFATc1、组织蛋白酶 K 等破骨细胞分化相关基因的表达。

参考文献

- [1] 中华中医药学会风湿病分会. 骨关节炎辨证结合诊疗指南[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 929-933.
- [2] 中华中医药学会. 膝骨关节炎中西医结合诊疗指南(2023 年版)[J]. 中医正骨, 2023, 35(6): 1-10.
- [3] 卓泽川, 侯成志, 赵勇, 等. 补肾活骨汤治疗肾虚血瘀型膝骨关节炎临床研究及药效学验证[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(9): 16-22.
- [4] TANG S, ZHANG C, OO W M, et al. Osteoarthritis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2025, 11(1): 10.
- [5] KLOPPENBURG M, NAMANE M, CICUTTINI F. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2025, 405(10472): 71-85.
- [6] TANG X, WANG S F, ZHAN S Y, et al. The prevalence of symptomatic knee osteoarthritis in China: results from the China Health and Retirement Longitudinal Study[J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(3): 648-653.
- [7] HU W H, CHEN Y Q, DOU C, et al. Microenvironment in subchondral bone: predominant regulator for the treatment of osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2021, 80(4): 413-422.
- [8] ZHU X, CHAN Y T, YUNG P S H, et al. Subchondral bone remodeling: a therapeutic target for osteoarthritis[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 8: 607764.
- [9] FANG C, GUO J W, WANG Y J, et al. Diterbutyl phthalate attenuates osteoarthritis in ACLT mice via suppressing ERK/c-fos/NFATc1 pathway, and subsequently inhibiting subchondral osteoclast fusion[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(5): 1299-1310.
- [10] LIANG J H, HU J W, HONG X, et al. Amentoflavone maintaining extracellular matrix homeostasis and inhibiting subchondral bone loss in osteoarthritis by inhibiting ERK, JNK and NF-κB signaling pathways[J]. J Orthop Surg Res, 2024, 19(1): 662.

(下转第 29 页)

- [15] ZHU W, XIE K, ZHANG X, et al. Development and validation of a predictive nomogram for postoperative osteonecrosis of the femoral head with cannulated screws fixation[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(4):281.
- [16] 冀家琛, 陈豪杰, 杨博, 等. 股骨颈动力交叉钉系统内固定治疗股骨颈骨折术后早期股骨头坏死的危险因素分析[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2023, 37(2):162-167.
- [17] 张迪, 顾挺, 牛瑶, 等. 股骨颈骨折内固定术后股骨头坏死的因素[J]. *中国矫形外科杂志*, 2025, 33(6):561-565.
- [18] 郑美亮, 李克鹏, 帖小佳, 等. 股骨颈骨折患者空心螺钉内固定术后股骨头坏死的危险因素及其预测模型构建[J]. *创伤外科杂志*, 2023, 25(5):354-360.
- [19] 张武, 唐雄, 袁尚锋, 等. 股骨颈骨折内固定术患者 89 例术后随访分析[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2023, 31(11):51-55.
- [20] 张雅文, 侯国进, 周方, 等. Pauwels III 型股骨颈骨折闭合复位内固定术后缺血性股骨头坏死的多因素分析[J]. *中国微创外科杂志*, 2020, 20(12):1057-1062.
- [21] 周照莲, 卞文玉, 汪晓洁, 等. 成人股骨颈骨折术后股骨头坏死的多因素分析[J]. *局解手术学杂志*, 2024, 33(4):342-345.
- [22] 马博闻, 孙家豪, 夏天卫, 等. 侧卧位直前入路内固定取出并行全髋关节置换[J]. *中国矫形外科杂志*, 2025, 33(16):1512-1515.
- [23] REITMAN C A. Can a nomogram predict survival after treatment for an ankylosing spondylitis cervical fracture in a patient with neurologic impairment? A national, multicenter study[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2023, 481(7):1412-1414.
- [24] WENZEL M, WÜRN SCHIMMEL C, CHIERIGO F, et al. Nomogram predicting downgrading in national comprehensive cancer network high-risk prostate cancer patients treated with radical prostatectomy[J]. *Eur Urol Focus*, 2022, 8(5):1133-1140.

(收稿日期:2025-07-15 本文编辑:李晓乐)

(上接第 7 页)

- [11] HUANG M, ZHOU J X, LI X X, et al. Mechanical protein polycystin-1 directly regulates osteoclastogenesis and bone resorption[J]. *Sci Bull (Beijing)*, 2024, 69(12):1964-1979.
- [12] 徐叔云, 卞如瀛, 陈修. *药理实验方法学* [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:920.
- [13] WANG H, YUAN T, WANG Y, et al. Osteoclasts and osteoarthritis: novel intervention targets and therapeutic potentials during aging[J]. *Aging Cell*, 2024, 23(4):e14092.
- [14] ZHU S, ZHU J, ZHEN G, et al. Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(3):1076-1093.
- [15] HU Y, CHEN X, WANG S C, et al. Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain[J]. *Bone Res*, 2021, 9(1):20.
- [16] XU Q, CAO Z, XU J, et al. Effects and mechanisms of natural plant active compounds for the treatment of osteoclast-mediated bone destructive diseases[J]. *J Drug Target*, 2022, 30(4):394-412.
- [17] BRIZUELA L, BUCHET R, BOUGAULT C, et al. Cathepsin K inhibitors as potential drugs for the treatment of osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(7):2896.
- [18] BAN Y F, WANG Y, QIAO L M, et al. Total lignans from *Vitex negundo* seeds attenuate osteoarthritis and their main component vitexin A alleviates osteoclast differentiation by suppressing ERK/NFATc1 signaling[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(4):1422-1434.
- [19] DING D, YAN J B, FENG G N, et al. Dihydroartemisinin attenuates osteoclast formation and bone resorption via inhibiting the NF- κ B, MAPK and NFATc1 signaling pathways and alleviates osteoarthritis[J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(1):4.
- [20] MERRICK D, MISTRY K, WU J S, et al. Polycystin-1 regulates bone development through an interaction with the transcriptional coactivator TAZ[J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(1):16-30.
- [21] XIAO Z S, BAUDRY J, CAO L, et al. Polycystin-1 interacts with TAZ to stimulate osteoblastogenesis and inhibit adipogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(1):157-174.
- [22] XIAO Z S, CAO L, SMITH M D, et al. Genetic interactions between polycystin-1 and *Wwtr1* in osteoblasts define a novel mechanosensing mechanism regulating bone formation in mice[J]. *Bone Res*, 2023, 11(1):57.
- [23] QIN L, LIU W, CAO H L, et al. Molecular mechanosensors in osteocytes[J]. *Bone Res*, 2020, 8:23.
- [24] FENG Z H, TAO S Y, HUANG Z B, et al. The deubiquitinase UCHL1 negatively controls osteoclastogenesis by regulating TAZ/NFATC1 signalling[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(8):2319-2332.

(收稿日期:2025-09-02 本文编辑:吕宁)