

芒柄花素抑制 RANKL 诱导破骨细胞分化的实验研究

洪一波¹, 姜宏¹, 王建伟², 俞鹏飞¹, 尤武林²

(1.南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 215009; 2.南京中医药大学附属无锡市中医医院, 江苏 无锡 214071)

【摘要】 目的: 建立 RANKL 诱导的破骨细胞体外研究模型, 阐述活血化痰中药鸡血藤有效组分芒柄花素(formononetin, FO)调控小鼠骨髓单核-巨噬细胞(BMMs)向破骨细胞分化和功能的影响, 探讨其抑制破骨细胞分化的分子机制。方法: 取 20 只 4~6 周龄清洁级 C57/BL6 小鼠, 雌雄各 10 只, 体重(20±2) g, 无菌条件下分离出股骨和胫骨内 BMMs, 用 α -MEM 培养基进行体外培养和增殖。BMMs 在加入 M-CSF 和不同浓度的芒柄花素(5~50 μ M)分别培养 4 d 后进行细胞增殖与毒性的 CCK8 检测。将生长状态良好的 BMMs 依次加入 M-CSF 和 RANKL 诱导破骨细胞分化, 对照组无特殊处理, DMSO 对照组加入 DMSO 溶剂, 各观察组分别加入不同浓度芒柄花素(1~20 μ M), 分别进行培养 6 d 后进行抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色, 对破骨细胞的进行计数和统计分析。分别在破骨细胞培养的 1、2 d 收取总蛋白和磷酸化蛋白, Western blot 检测破骨细胞分化中关键转录因子 NFATc1 和 c-Fos 的表达以及磷酸化蛋白 ERK 表达; 在培养的 4 d 提取 RNA, Real-Time PCR 检测破骨细胞相关基因 CTSK、TRAP、MMP9 和 Car2 的活性。结果: CCK8 检测结果提示芒柄花素能够剂量依赖性地抑制 BMMs 的活性, 在 $\leq 20 \mu$ M 的安全浓度范围内对 BMMs 细胞生长无明显毒性效应($P=0.278>0.05$)。TRAP 染色结果发现芒柄花素在(1~20 μ M)浓度范围内能够剂量依赖性的抑制破骨细胞的生成, 尤其是 10 μ M 能够显著抑制破骨细胞的生成($P=0.000<0.05$)。Western blot 检测表明芒柄花素(10 μ M)能显著抑制破骨细胞分化关键蛋白 NFATc1 和 c-Fos 的表达, 而对磷酸化蛋白 ERK 的表达未见明显的作用。在破骨细胞功能上, Real-Time PCR 检测芒柄花素(10 μ M)能显著抑制破骨细胞功能相关基因 CTSK($P=0.000<0.05$)、TRAP($P=0.000<0.05$)、MMP9($P=0.000<0.05$)和 Car2($P=0.000<0.05$)的表达。结论: 鸡血藤有效组分芒柄花素能够抑制原代骨髓单核-巨噬细胞向破骨细胞增殖和分化, 并下调破骨细胞骨吸收功能相关蛋白和基因的表达, 可能是其防治股骨头坏死中骨破坏及塌陷的机制之一。

【关键词】 芒柄花素; 骨髓-单核巨噬细胞; 破骨细胞生成; 抗酒石酸酸性磷酸酶

中图分类号: R-332

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2020.01.012

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Experimental study on the inhibition of Formononetin on the differentiation of osteoclasts induced by RANKL
HONG Yi-bo, JIANG Hong, WANG Jian-wei*, YU Peng-fei, and YOU Wu-lin. *Wuxi Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Wuxi 214071, Jiangsu, China

ABSTRACT Objective: To establish the in vitro study model of osteoclasts induced by RANKL, to elaborate the effect of formononetin (FO), an effective component of *Caulis Spatholobi*, on the differentiation and function of bone marrow mononuclear macrophages (BMMs) into osteoclasts, and to explore the molecular mechanism of its inhibition. **Methods:** The BMMs in femur and tibia were isolated from 20 clean C57/BL6 mice of 4 to 6 weeks old, 10 males and 10 females, each weighing (20±2) g. The BMMs in femur and tibia were cultured and proliferated in vitro with α -MEM medium. BMMs were cultured with M-CSF and different concentrations of anthocyanin (5 to 50 μ M) respectively for 4 days, and CCK8 of cell proliferation and toxicity was detected. BMMs in good growth condition were added to M-CSF and RANKL to induce osteoclast differentiation in turn. There was no special treatment in the control group. DMSO was added to the control group with DMSO solvent. Each observation group was added with different concentrations of awnasin (1 to 20 μ M). After 6 days of culture, the osteoclasts were counted and statistically analyzed. The expression of NFATc1, c-Fos and ERK, the key transcription factors in osteoclast differentia-

基金项目: 江苏省青年医学重点人才项目(编号:QNRC2016253); 无锡市青年医学重点人才项目(编号:QNRC011); 苏州市中医医院博士青年课题(编号:YQN2018003)

Fund program: Young Medical Key Talents Project in Jiangsu Province(No.QNRC2016253)

通讯作者: 王建伟 E-mail: diaphysis@qq.com

Corresponding author: WANG Jian-wei E-mail: diaphysis@qq.com

tion, were detected by Western blot, RNA was extracted at 4 days, and the activity of ctsk, trap, MMP9 and Car2 were detected by real time PCR. **Results:** CCK8 test results showed that awnstein could inhibit the activity of BMMs in a dose-dependent manner, and had no significant toxic effect on the growth of bmmms within the safe concentration range of $\leq 20 \mu\text{M}$ ($P=0.278 > 0.05$). The results of trap staining showed that awnstein could inhibit osteoclast production in a dose-dependent manner in the concentration range of (1 to 20 μM), especially in 10 μM ($P=0.000 < 0.05$). Western blot showed that 10 μm could significantly inhibit the expression of NFATc1 and c-Fos, but not the expression of ERK. In terms of osteoclast function, the expression of ctsk ($P=0.000 < 0.05$), trap ($P=0.000 < 0.05$), MMP9 ($P=0.000 < 0.05$) and Car2 ($P=0.000 < 0.05$) related to osteoclast function were detected by real time PCR. **Conclusion:** The effective component of Caulis Spatholobi can inhibit the proliferation and differentiation of primary mononuclear macrophages into osteoclasts, and down regulate the expression of osteoclast bone resorption related proteins and genes, which may be one of the mechanisms of its prevention and treatment of bone destruction and collapse in osteonecrosis of femoral head.

KEYWORDS Formononetin; Bone marrow macrophages; Osteoclastogenesis; Tartrate resistant acid phosphatase

股骨头坏死 (osteonecrosis of femoral head, ONFH) 又称股骨头缺血性坏死 (avascular necrosis, AVN), 是临床上骨伤科常见的疾病。股骨头坏死常伴随骨细胞坏死吸收, 随后发生修复再生, 继而造成股骨头结构破坏、塌陷等一系列病理变化^[1-2]。吸收与再生过程通过破骨细胞与成骨细胞的作用来实现, 其病理机制是骨吸收和再生的过程失衡, 骨吸收速率超过骨生成, 最终导致骨量丢失^[3]。随着股骨头坏死发病率的不断上升, 早期明确诊断采取保髋治疗是理想目标^[4]。我国新版临床诊疗规范中强调了中药防治 ONFH 的重要性, 并以活血化瘀为基本防治大法^[5]。近年来中药单体组分的研究已成为热点, 鸡血藤是临床治疗 ONFH 常用的活血化瘀中药, 其重要活性成分芒柄花素 (formononetin, FO) 已被证实能够刺激成骨细胞的生成, 从而增加骨量, 改善骨结构^[6-7], 但目前罕有文献报道其对破骨细胞作用的机制研究。为进一步探索该中药单体对 ONFH 中骨破坏塌陷的相关作用, 本研究拟应用原代骨髓-单核巨噬细胞 (bone marrow macrophages, BMMs) 诱导的破骨细胞培养模型, 检测鸡血藤单体组分芒柄花素对破骨细胞分化的调控, 分别应用 Western Blot 和 RT-PCR 等技术, 研究芒柄花素对破骨细胞分化相关指标表达的影响, 探讨其防治股骨头坏死骨破坏的作用机制, 为临床治疗股骨头坏死提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

20 只清洁级 4~6 周龄 C57/BL6 小鼠雌雄各 10 只, 体重 (20±2) g, 由上海杰斯捷实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(沪)2018-0004。在下列条件饲养: 室内温度 24~26 °C, 相对湿度 55%~60%, 每小时换风 12 次, 光照条件 12:12 h 昼夜自动控制循环。

1.2 药物制备

芒柄花素 (纯度 $\geq 98\%$) 标准品购买于江苏永健医药公司 (苏州, 中国), 批号: 100390。称取 10 mg 芒柄花素, 加入 1.76 ml 二甲基亚砷 (Dimethyl sulfox-

ide, DMSO) 溶剂, 配制母液的浓度 $2.0 \times 10^4 \mu\text{M}$, 然后 0.22 μM 过滤后 -80 °C 保存使用。

1.3 相关试剂和仪器

CCK8 细胞增殖活力试剂盒 (碧云天, 中国); 细胞胎牛血清 (BI, 中国); α -MEM 培养液 (Biosera, 法国); M-CSF 和 RANKL (PEPROTECH, 美国); 抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒 (Sigma, 美国); NFATc1、c-Fos 和 ERK 抗体 (Santa cruz, 美国); PCR 试剂盒 RNAliso Reagent kit、Prime Script™ SYBR Premix Ex Taq™ II (宝生, 中国); 组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK), 酒石酸盐酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP), 金属基质蛋白酶 9 (matrix metal protein, MMP9) 和碳酸酐酶 (carbonic anhydrase II, Car2) 引物 (生工, 中国); 青霉素和链霉素双抗 (Sigma, 美国); BCA 蛋白定量试剂盒 (武汉博士德, 中国)。电热恒温水浴锅 (HWS12 型, 上海睿钰, 中国); 超净工作台 (KSP12 型, Thermo, 美国); 细胞培养箱 (3472 型、8000WJ 型, Thermo, 美国); 高速恒温离心机 (LABOFUGE 400R 型, Thermo, 美国); 微孔板离心机 (LMC-3000 型, Grant-bio, 英国); 电泳仪 (DG-III 型, Bio-rad, 美国); 荧光定量 PCR 仪 (CFX96 型, Bio-rad, 美国); 显微镜 (BX50 型, Olympus, 日本)。

1.4 体外培养小鼠骨髓单核-巨噬细胞 (BMMs)

分批次每次选取 4 只 C57/BL6 小鼠进行后续体外实验。将小鼠麻醉后脱颈处死, 然放入 75% 乙醇浸泡 10 min, 无菌条件下分离出股骨和胫骨, 放入含 1% 双抗的 PBS 溶液中清洗后, 放至生物安全柜中用眼科剪打开股骨、胫骨两端; 用 α -MEM 完全培养液冲洗骨髓腔, 收集上清后 BMMs 铺板到 2 个直径为 10 cm 细胞培养皿中, 在 37 °C 和 5% CO₂ 环境培养 24 h; 收集培养皿中的培养基, 在 4 °C 和 1 500 r/min 离心条件下离心 5 min, 然后弃上清液; 使用含 44 ng/ml 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophages colony stimulatory factors, M-SCF) 的 α -MEM 完全培养液重悬后计数; 细胞计数仪计数后, 用含 M-

SCF 的 α -MEM 完全培养基稀释浓度,24 孔板按每孔 10 0000/ml 铺板,放置于 37 °C、5%的 CO₂ 的培养箱中进行培养。

1.5 实验药物干预与分组情况

首先检测出芒柄花素对 BMMs 细胞增殖活力的影响,以筛选出安全浓度范围,再根据安全有效的剂量分组进行破骨细胞培养。本实验分为:对照组(control group,Con 组), α -MEM 完全培养液中仅加入 M-CSF 培养。DMSO 对照组(DMSO 组), α -MEM 加入 M-SCF 和溶剂二甲基亚砷 DMSO 培养。各观察组用标准品母液按照分子量计算后,分别制备为最终浓度为 1、2、5、10、15、20、25、40、50 μ M 的芒柄花素(FO),母液中均含有溶剂 DMSO;以 5 μ M 浓度 FO 观察组(5 μ M 组)为例: α -MEM 完全培养液加入 M-SCF 以及 5 μ M 浓度 FO 进行培养,其他各浓度 FO(1、2、10、15、20、25、40、50 μ M)干预的观察组以此类推。

1.6 观察项目与方法

1.6.1 细胞增殖和活性检测 细胞活性毒性检测(cell counting kit 8,CCK8)法,按照实验分组检测对照组、DMSO 组和各浓度芒柄花素组的细胞增殖。将 BMMs 计数后,按照每孔 8×10^3 的密度种植到 96 孔板中,然后加入 2% M-CSF 和不同浓度芒柄花素(5~50 μ M) 分别处理 4 d 后,加入 20 μ l 的 CCK8 工作液,离心均匀然后继续培养 1 h,在酶标仪在 450 nm 波长处测定其吸光值(A450),检测细胞的活性,然后分别做统计分析,筛选出安全有效的剂量。

1.6.2 破骨细胞的培养和鉴定 BMMs 计数后按照每孔 8×10^3 的密度种植到 96 孔板中,然后加入 M-CSF (10 ng/ml)和 RANKL (100 ng/ml)进行破骨细胞培养,根据安全剂量在各观察组加入不同浓度的芒柄花素(1、2、5、10、15、20 μ M)分别培养 4~6 d,然后用 10%甲醛室温固定 10~20 min,然后加入 TRAP 染色试剂盒进行 TRAP 染色。染色结束后在镜下观察破骨细胞(≥ 3 核)并拍照和计数。

1.6.3 破骨细胞分化相关蛋白的表达 BMMs 计数后,分别按照 5.0×10^5 的密度将细胞种植到 60 mm 皿中,加入 M-CSF (10 ng/ml)和 RANKL (100 ng/ml) (对照组)或 DMSO 或芒柄花青素 10 μ M,然后继续培养 24、48 h,分别加入细胞裂解液,分别收取细胞的蛋白。同时准备同样的细胞,在细胞培养的 0、5、10 min 后加入蛋白裂解液收集相关蛋白。用 BCA 法测量稀薄蛋白的浓度,制作标准蛋白后,按照每孔 15 μ g 的蛋白标准浓度上样,运用 Western blot 检测相关蛋白的表达。

1.6.4 破骨细胞分化相关基因的表达 BMMs 计

数后,分别按照 5.0×10^5 的密度将细胞种植到 60 mm 皿中,然后继续培 96 h 后收集 RNA,测量浓度和 OD 数值后,使用 Prime Script TM SYBR Premix Ex TaqTM II PCR 扩增逆转录 RNA 后,进行 PCR 检测。引物的列表(见表 1),本实验独立重复 3 次,每次 5 个副孔分别做 Real-time PCR 检测。

表 1 破骨细胞 PCR 的引物序列
Tab.1 Primer sequence of osteoclast PCR

基因	序列
β -actin	F:5'-CCTGTACGCCAACACAGTGC-3' R:5'-ATACTCCTGCTTCTGCTGATCC-3'
MMP9	F:5'-CTTCTTCTCTGGACGTCAAATG-3' R:5'-CATTTTGGAAACTCACACGCC-3'
Car2	F:5'-AGAGAACTGGCACAAGGACTT-3' R:5'-CCTCCTTTCAGCACTGCATTGT-3'
Ctsk	F:5'-GATGCTTACCCATATGTGGGC-3' R:5'-CATATCCTTTGTTTCCCCAGC-3'
TRAP	F:5'-GCCAAGATGGATTTCATGGGTGG-3' R:5'-CAGAGACATGATGAAGTCAGCG-3'
NFATc1	F:5'-TGFTCTTCTCCCGATGTCT-3' R:5'-CCCCTTGCTTCCAGAAAATA-3'
c-Fos	F:5'-TGFTCTTCTCCCGATGTCT-3' R:5'-GGATTTGACTGGAGGTCTGC-3'

1.7 统计学处理

采用 SPSS 22.0 进行统计分析,定量资料采用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。其中,破骨细胞的标准:TRAP 阳性和多核(≥ 3),认为是破骨细胞,按照单个视野下的数量进行计数和分析。统计分析采用单因素定量资料方差分析,两组间比较采用 Student's *t*-test, 然后进行 Bonferroni 进行校正,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖和活性检测结果

CCK8 吸光度提示芒柄花素能够剂量依赖性抑制破骨细胞前体细胞 BMMs 的活性。CCK8 吸光度值:对照组 0.627 ± 0.050 ,DMSO 组 0.625 ± 0.021 ,5 μ M 芒柄花素组 0.618 ± 0.013 ,10 μ M 芒柄花素组: 0.607 ± 0.260 ,20 μ M 芒柄花素组 0.607 ± 0.014 ,25 μ M 芒柄花素组 0.486 ± 0.011 ,40 μ M 芒柄花素组 0.468 ± 0.031 ,50 μ M 芒柄花素组 0.436 ± 0.061 。在 25、40、50 μ M 浓度观察组,与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),在浓度 $\leq 20 \mu$ M 时各观察组对 BMMs 细胞生长无明显毒性效应 ($P > 0.05$),见图 1。其中在 20 μ M 及以下浓度的芒柄花素对 BMMs 的活性未造

成显著的影响。因此,通过本实验明确芒柄花素作用于 BMMs 的安全剂量范围为 20 μM 及以下浓度。

2.2 破骨细胞测定结果

根据 CCK8 实验结果,在筛选出的安全有效剂量范围内($<20 \mu\text{M}$)各分组进行破骨细胞培养并观察。BMMs 在破骨细胞生成的 4~6 d 内进行 TRAP 染色。结果显示芒柄花素能够剂量依赖性地抑制 RANKL 诱导的破骨细胞的生成,尤其在 10 μM 能完全抑制破骨细胞的分化,见图 2。根据测定结果,各

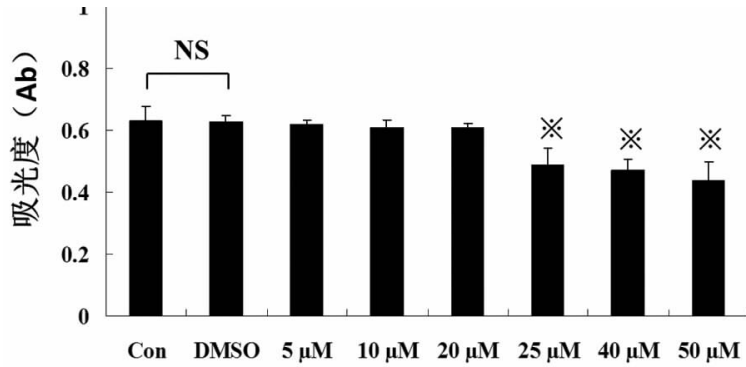


图 1 不同浓度芒柄花素(5~50 μM)对骨髓-单核巨噬细胞(BMMs)活性的影响(A450)。与对照组比较,DMSO 组, $t=0.162, P=0.876$;芒柄花素 5 μM 组, $t=0.493, P=0.637$;芒柄花素 10 μM 组, $t=1.129, P=0.296$;芒柄花素 20 μM 组, $t=1.176, P=0.278$;芒柄花素 25 μM 组, $t=3.602, P=0.009<0.05$;芒柄花素 40 μM 组, $t=6.490, P=3.37\text{-}E4<0.05$;芒柄花素 50 μM 组, $t=6.189, P=4.50\text{-}E4<0.05$

Fig.1 Effects of different concentrations of Formononetin (5 to 50 μm) on the activity of bone marrow mononuclear macrophages (BMMs) (A450). Compared with the control group, DMSO group, $t=0.162, P=0.876$; In 5 μm group, $t=0.493, P=0.637$; In 10 μm group, $t=1.129, P=0.296$; In 20 μm group, $t=1.176, P=0.278$; In 25 μm group, $t=3.602, P=0.009<0.05$; In 40 μm group, $t=6.490, P=3.37\text{-}E4<0.05$; In 50 μm group, $t=6.189, P=4.50\text{-}E4<0.05$

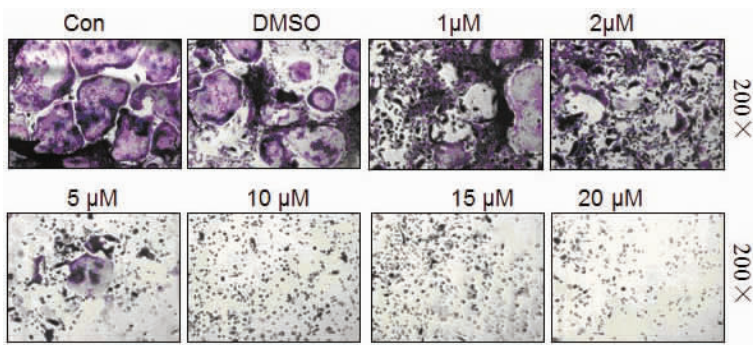


图 2 芒柄花素浓度依赖性抑制破骨细胞生成(TRAP 染色 $\times 200$) TRAP 染色液检测抗酒石酸盐酸性磷酸酶活性,各观察组破骨细胞数量均小于对照组及 DMSO 组,芒柄花素在安全的剂量范围($<20 \mu\text{M}$)内抑制破骨细胞的分化,而对破骨细胞的活性并无明显的影响

Fig.2 Inhibition of osteoclastogenesis in a concentration - dependent manner of Formononetin (TRAP staining $\times 200$) The activity of tartrate-resistant acid phosphatase was detected by TRAP staining. The number of osteoclasts in each observation group was less than that in the control group and DMSO group. Formononetin inhibited the differentiation of osteoclasts in a safe dose range ($<20 \mu\text{M}$), but had no significant effect on the activity of osteoclasts.

观察组结果破骨细胞数量均小于对照组及 DMSO 组。视野内破骨细胞数量:对照组 21.20 \pm 3.20, DMSO 组 21.30 \pm 3.30, 1 μM 芒柄花素组 19.20 \pm 2.90, 2 μM 芒柄花素组 17.30 \pm 0.26, 5 μM 芒柄花素组 9.20 \pm 1.90, 10 μM 芒柄花素组 1.00 \pm 0.90, 15 μM 芒柄花素组 0.20 \pm 0.40, 20 μM 芒柄花素组 0.20 \pm 0.40。与对照组相比, DMSO 组、1 μM 、2 μM 浓度组差异无统计学意义($P>0.05$),在 5、10、15、20 μM 浓度组,差异有显著统计学意义($P<0.05$),也明确显示 5~20 μM 浓度能显著抑制破骨细胞的数量 ($P=0.000<0.05$),见图 3。因此,本研究发现芒柄花素在安全的剂量范围($<20 \mu\text{M}$)内抑制破骨细胞的分化,而对破骨细胞的活性并无明显的影响。

2.3 破骨细胞分化相关蛋白测定结果

根据 TRAP 染色结果及破骨细胞计数分析,芒柄花素浓度在 10 μM 能完全抑制破骨细胞的分化,故本实验分别在 BMMs 诱导破骨细胞的 24、48 h 后检测破骨细胞分化的关键蛋白 NFATc1 和 c-Fos 表达,结果显示芒柄花素 10 μM 时能够显著抑制破骨细胞分化过程中关键转录因子 NFATc1 和 c-Fos 表达,见图 4。分别在蛋白刺激后的 0、5、10 min 检测破骨细胞分化中磷酸化蛋白的表达,结果发现芒柄花素 10 μM 时在 0、5、10 min 内并未对磷酸化蛋白的表达发挥明显的调控作用,见图 5。芒柄花素能够显著抑制破骨细胞分化中 NFATc1 和 c-Fos 的表达,而对磷酸化蛋白 ERK 的表达未见明显的抑制作用。

2.4 破骨细胞骨吸收功能相关基因测定结果

DMSO 组与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),可排除溶剂对实验结果的影响;破骨细胞分化相关的转录因子 NFATc1 和 c-Fos 表达芒柄花素组与对照组比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$);骨吸收相关基因 TRAP、MMP9、CTSK 和 Car 2 表达芒柄花素组与对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 6、表 2。结果显示,芒柄花素能够显著抑制破骨细胞骨吸收功能基因 CTSK、TRAP、MMP9 和 Car2 的表达;破骨细胞进行骨吸收之后能够激活一系列功能基因,从而激活骨吸收。根据 TRAP 染色结

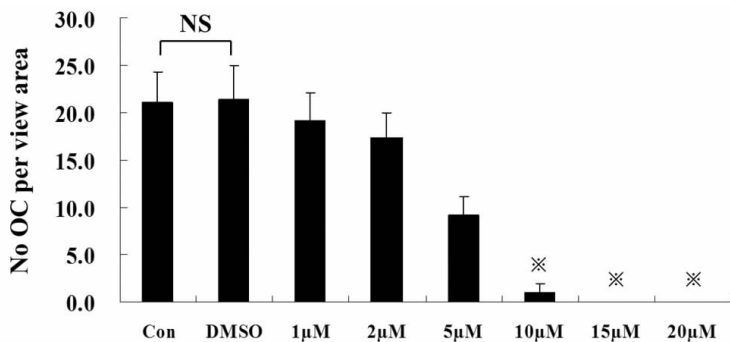


图 3 不同浓度芒柄花素(1-20 μM)对破骨细胞数量的影响(个数/视野)。与对照组比较,DMSO 组, $t=-0.079, P=0.940$; 芒柄花素 1 μM 组, $t=1.044, P=0.344$; 芒柄花素 2 μM 组, $t=2.531, P=0.052$; 芒柄花素 5 μM 组, $t=18.974, P=7.494E-06<0.05$; 芒柄花素 10 μM 组, $t=14.652, P=2.675E-05<0.05$; 芒柄花素 15 μM 组, $t=16.959, P=1.304E-05<0.05$; 芒柄花素 20 μM 组, $t=14.849, P=2.506E-05<0.05$

Fig.3 The numbers of osteoclast in different concentration (1-20 μM) of Formononetin (Number/Visual field). Compared with the control group, DMSO group, $t=-0.079, P=0.940$; In the 1 μM group, $t=1.044, P=0.344$; In the 2 μM group, $t=2.531, P=0.052$; In the 5 μM group, $t=18.974, P=7.494E-06<0.05$; In 10 μM group, $t=14.652, P=2.675E-05<0.05$; In 15 μM group, $t=16.959, P=1.304E-05<0.05$; In the 20 μM group, $t=14.849, P=2.506E-05<0.05$

果及破骨细胞计数分析,芒柄花素浓度 10 μM 能完全抑制破骨细胞分化,故本研究继续在破骨细胞分化 48 h 检测骨吸收相关基因 CTSK、TRAP、MMP9 和 Car2 的表达。研究发现芒柄花素 10 μM 能够显著抑制破骨细胞分化相关的转录因子 NFATc1 和 c-Fos 的表达,进一步研究发现,芒柄花素 10 μM 能够显著抑制破骨细胞骨吸收相关基因 TRAP、MMP9、CTSK 和 Car 2 的表达。

3 讨论

本实验的主旨是研究股骨头坏死中破骨细胞导致的骨破坏塌陷问题。股骨头坏死是由于不同因素引起的微循环障碍,从而导致成骨细胞分化能力和

活性降低,骨再生能力下降,但破骨细胞的骨吸收作用并没有相应减少,相反由于激素等原因引起的股骨头坏死中的破骨细胞分化功能还会被过度激活^[8]。髋关节是人的主要承重部位,股骨头表面承受了很大的应力,一旦发生骨吸收和再生功能失衡,从而导致骨量下降和结构破坏,最终在较小的应力范围内就会发生关节面的塌陷。

破骨细胞在股骨头坏死的这些病理变化中发挥着最主要的作用。破骨细胞是人体中的重要细胞,参与了骨的生长发育、修复和重建等过程,同时骨吸收也是造成人体骨量丢失的基本原因。破骨细胞来源于 BMMs,在 M-CSF 和核因子 κB 受体激活剂配体(receptor activator for nuclear factor-κB Ligand, RANKL)等细胞因子的刺激下生成破骨细胞^[9]。

RANKL 在其中发挥重要的作用,分别促进细胞转录因子 NFATc1、c-Fos^[10]和 ERK^[11]等信号的表达和功能基因的活性,如 MMP9、Car2、TRAP 和 CTSK^[12]的表达,从而激活骨吸收。RANKL 有一个竞争性受体骨保护素 OPG,该受体能够竞争性的结合 RANKL 从而组织其余 RANK 的结合,导致破骨细胞的分化受阻。正常情况下 RANKL/RANK/OPG 形成动态平衡的信号轴^[13],保证破骨细胞的分化和功能处在平衡状态,维护正常的生理功能。而股骨头坏死患者由于激素等各种致病因素,以及炎症反应等病理变化,诱导促进破骨细胞的分化和功能,并直接刺激骨吸收,破坏了这种平衡。

目前,中医药治疗股骨头坏死多从活血、化痰、

表 2 芒柄花素干预破骨细胞分化和功能相关各指标的表达($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Expression of relevant indicators of Formononetin inhibitory on the osteoclast differentiation and function($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	NFATc1	c-Fos	TRAP	CTSK	MMP9	Car2
对照组	15	8.428±0.340	7.586±0.251	4.958±0.078	2.979±0.135	2.921±0.123	4.049±0.171
DMSO 组	15	8.278±0.314	7.426±0.407	4.921±0.169	2.934±0.191	2.893±0.052	4.077±0.301
芒柄花素 10 μM 组	15	1.714±0.210	2.914±0.104	1.495±0.173	0.778±0.118	1.025±0.082	1.714±0.210

注:与对照组比较,DMSO 组破骨细胞分化相关的转录因子 NFATc1: $t=1.187, P=0.255$; c-Fos: $t=1.324, P=0.207$; 骨吸收相关基因 TRAP: $t=0.979, P=0.344$; CTSK: $t=0.877, P=0.560$; MMP9: $t=0.752, P=0.434$; Car 2: $t=-0.302, P=0.759$ 。芒柄花素 10 μM 浓度组与对照组比较,破骨细胞分化相关的转录因子 NFATc1: $t=54.324, P=1.098E-17<0.05$; c-Fos: $t=63.988, P=1.119E-18<0.05$; 骨吸收相关基因 TRAP: $t=73.499, P=1.617E-19<0.05$; CTSK: $t=43.199, P=2.668E-16<0.05$; MMP9: $t=47.071, P=8.0818E-17<0.05$; Car 2: $t=32.470, P=1.3989E-14<0.05$

Note: Compared with the control group, DMSO group, the expression of transcription factors NFATc1: $t=1.187, P=0.255$; c-Fos: $t=1.324, P=0.207$; The expression of TRAP: $t=0.979, P=0.344$; CTSK: $t=0.877, P=0.560$; MMP9: $t=0.752, P=0.434$; Car 2: $t=-0.302, P=0.759$. Compared with the control group, 10 μM Formononetin group, the expression of transcription factors NFATc1: $t=54.324, P=1.098E-17<0.05$; c-Fos: $t=63.988, P=1.119E-18<0.05$; The expression of TRAP: $t=73.499, P=1.617E-19<0.05$; CTSK: $t=43.199, P=2.668E-16<0.05$; MMP9: $t=47.071, P=8.0818E-17<0.05$; Car 2: $t=32.470, P=1.3989E-14<0.05$

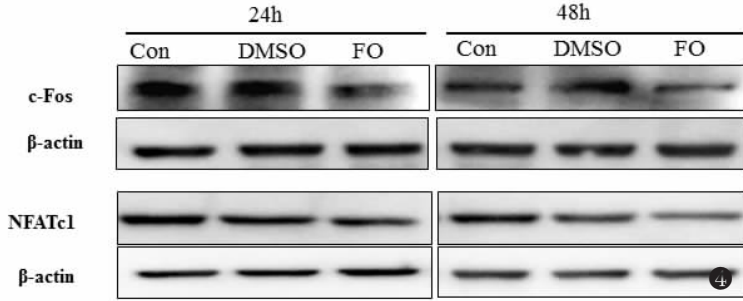


图 4 芒柄花素对破骨细胞分化中 NFATc1 和 c-Fos 蛋白表达的影响 芒柄花素 10 μM 时能显著抑制 BMMs 诱导破骨细胞 24、48 h 后破骨细胞分化过程中关键转录因子 NFATc1 和 c-Fos 表达

Fig.4 Formononetin inhibits the expression of NFATc1 和 c-Fos in osteoclastogenesis The expression of key transcription factors NFATc1 and c-Fos in osteoclasts differentiation induced by BMMs was significantly inhibited at 10 μM Formononetin

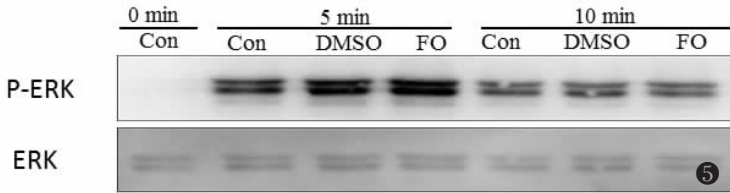


图 5 芒柄花素 10 μM 时在关键蛋白刺激 0、5、10 min 时并未对破骨细胞分化中磷酸化蛋白 ERK 表达发挥明显调控作用

Fig.5 The expression of phosphorylated protein ERK in osteoclast differentiation was not significantly regulated by 10 μM Formononetin when stimulated by key proteins for 0,5 and 10 minutes

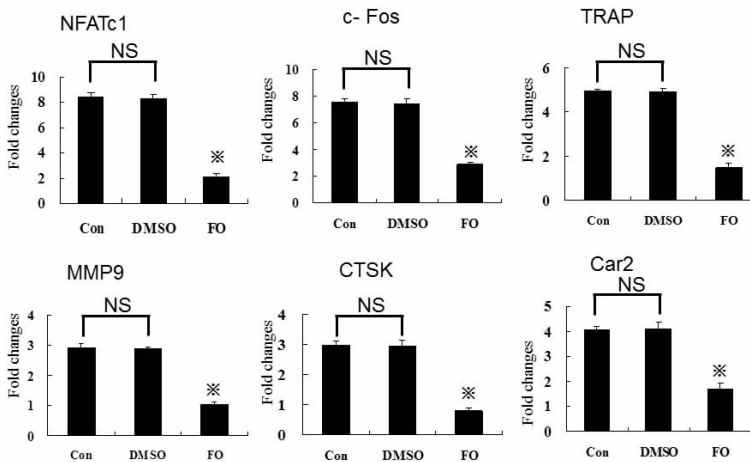


图 6 芒柄花素能够显著抑制破骨细胞功能基因 CTSK、TRAP、MMP9 和 Car2 表达 Fig.6 Formononetin significantly inhibit the expression of osteoclast functional genes CTSK, TRAP, MMP9 and Car2

补肾等角度进行辨证论治，由于股骨头坏死又被称为缺血性坏死，其本质是缺血，故以活血化瘀为基本治法。鸡血藤作为一种临床治疗股骨头坏死中药复方中常用的活血化瘀类中药^[14-16]，对其治疗股骨头坏死的机制，尤其是从破骨细胞的角度目前还缺乏系统的研究。本研究选取的芒柄花素是鸡血藤首先被发现的异黄酮类单体^[17]，也是中国药典规定作为

鉴别药材真伪的指标成分^[18]，具有一定的研究价值。芒柄花素能促进成骨细胞的再生，从而增加骨量已被前期的研究证明^[19]，其具有刺激骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向的分化，促进骨再生的能力^[20-21]，这可能是其治疗股骨头坏死骨破坏塌陷一方面的作用机制。

本研究通过采用 RANKL 诱导的破骨细胞分化模型，系统阐述了鸡血藤有效组分芒柄花素抑制破骨细胞的分化和功能的分子生物学机制。由于破骨细胞是人体内唯一负责骨吸收的细胞，人体骨结构的破坏均有其参与，因此有效抑制破骨细胞的骨吸收活性能够有效防治股骨头坏死的骨破坏塌陷。本研究结果显示：在加入不同浓度的芒柄花素各组能够剂量依赖性抑制 RANKL 诱导的破骨细胞增殖，分化关键蛋白 NFATc1 和 c-Fos 表达在实验组较对照组均显著降低，在功能和基因水平，芒柄花素能够显著抑制破骨细胞骨吸收相关的功能基因 CTSK、TRAP、MMP9 和 Car 2 表达。结合前期研究，认为芒柄花素能够同时发挥调控成骨细胞和破骨细胞活性，从而治疗股骨头坏死导致骨结构破坏和骨塌陷，这也是中药治疗的优势之一。

总之，股骨头坏死的发病原因和病理变化机制目前仍尚未完全明确，本研究仅从研究破骨细胞的角度阐述了中药防治股骨头坏死骨破坏和塌陷的作用，从验证结果中比较全面解释了芒柄花素的作用机制。该研究对中药治疗股骨头坏死有一定的理论价值，也可促进相关单体的进一步研究，拓展中医药治疗该疾病的应用范围。

参考文献

[1] 谢健,童培建,肖鲁伟. Wnt/β-catenin 信号通路调节软骨代谢作用于骨坏死疾病的研究进展 [J]. 中国骨伤,2013,26(7):613-616.
XIE J, TONG PJ, XIAO LW. Progress on Wnt/β-catenin signal pathway regulating the cartilage metabolism in osteonecrosis [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(7):613-616. Chinese with abstract in English.
[2] 赵德伟,谢辉. 成人股骨头坏死保髋手术治疗的策略及探讨 [J]. 中国修复重建外科杂志,2018,32(7):792-797.
ZHAO DW, XIE H. Strategy and discussion of hip joint preserving surgery treatments for adult osteonecrosis of the femoral head [J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2018, 32(7):792-

797. Chinese.
- [3] 万甜,吴敏瑞,齐振熙. 羟基红花黄色素 A 对激素诱导骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中国骨伤,2014,27(3):224-228. WAN T,WU MR,QI ZX. Effect of Hydroxy Safflower Yellow A on Glucocorticoid induced bone marrow mesenchymal stem cells osteogenic differentiation[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2014,27(3):224-228. Chinese with abstract in English.
- [4] 毛子木,尹崑,王宇泽,等. 钽棒置入治疗股骨头坏死的疗效分析及预后模型建立[J]. 中国组织工程研究,2016,20(47):7043-7050. MAO ZM, YIN K, WANG YZ, et al. Therapeutic effect of porous tantalum implantation for osteonecrosis of the femoral head and construction of a prognostic model[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu, 2016, 20(47):7043-7050. Chinese.
- [5] 李子荣. 股骨头坏死临床诊疗规范[J]. 中华骨与关节外科杂志,2015,8(1):1-6. LI ZR. Clinical Diagnosis and treatment of osteonecrosis of femoral head[J]. Zhonghua Gu Yu Guan Jie Wai Ke Za Zhi, 2015, 8(1):1-6. Chinese.
- [6] 韩桂秋,王鸣刚,陈克明,等. 芒柄花素对体外培养成骨细胞缺氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2011,27(5):671-677. HAN GQ, WANG MG, CHEN KM, et al. Protective effect of formononetin on hypoxic injuries of osteoblasts in vitro[J]. Zhongguo Yao Li Xue Tong Bao, 2011, 27(5):671-677. Chinese.
- [7] 方瑶瑶,薛志远,杨秀艳,等. 红芪中 5 种黄酮类成分对大鼠骨髓间充质干细胞和成骨细胞成骨分化的影响[J]. 中草药,2019,50(3):632-638. FANG YY, XUE ZY, YANG XY, et al. Effects of promoting osteogenic differentiation of rBMSCs and ROBs using five kinds of flavonoids from Hedysari Radix[J]. Zhong Cao Yao, 2019, 50(3):632-638. Chinese.
- [8] 付志斌,李盛华,周明旺,等. 非创伤性股骨头坏死相关信号通路研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2017,23(4):555-560. FU ZB, LI SH, ZHOU MW, et al. Research progress on the signal pathway of non-traumatic osteonecrosis of femoral head[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2017, 23(4):555-560. Chinese.
- [9] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation[J]. Nature, 2003, 423(6937):337-342.
- [10] Jeong BC, Kim JH, Kim K, et al. ATF3 modulates calcium signaling in osteoclast differentiation and activity by associating with c-Fos and NFATc1 proteins[J]. Bone, 2017, 95:33-40.
- [11] Meng J, Hong J, Zhao C, et al. Low-intensity pulsed ultrasound inhibits RANKL-induced osteoclast formation via modulating ERK-c-Fos-NFATc1 signaling cascades[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(9):2901-2910.
- [12] Choi J, Choi SY, Lee SY, et al. Caffeine enhances osteoclast differentiation and maturation through p38 MAP kinase/Mitf and DC-STAMP/CtsK and TRAP pathway[J]. Cell Signal, 2013, 25(5):1222-1227.
- [13] 宋才渊,彭冰,沈佳怡,等. 破骨细胞分化调节机制的研究进展[J]. 中国骨伤,2015,28(6):580-584. SONG CY, PENG B, SHEN JY, et al. Research on regulation mechanism of osteoclast differentiation[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(6):580-584. Chinese with abstract in English.
- [14] 刘明远,晁振宇,吴亚东. 中药配合手术治疗早期股骨头坏死的临床研究[J]. 中国矫形外科杂志,2017,25(3):274-277. LIU MY, CHAO ZY, WU YD. Clinical research on treatment of early osteonecrosis of the femoral head used traditional Chinese medicine with surgery[J]. Zhongguo Jiao Xing Wai Ke Za Zhi, 2017, 25(3):274-277. Chinese.
- [15] 谭迪仪,高菲菲,高书图,等. 多孔钽棒配合股骨头坏死愈胶囊治疗激素性股骨头坏死临床观察[J]. 中国中西医结合杂志,2016,36(1):40-43. TAN XY, GAO FF, GAO ST, et al. Treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by porous tantalum rod and Gugutou Huaisiyu capsule[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2016, 36(1):40-43. Chinese.
- [16] 王世鑫,韩杰,王大伟,等. 中药内服法治疗股骨头缺血性坏死现状[J]. 广西中医药,2016,39(2):7-9. WANG SX, HAN J, WANG DW, et al. Current treatment situation of avascular necrosis of femoral head by oral administration of traditional Chinese medicine[J]. Guang Xi Zhong Yi Yao, 2016, 39(2):7-9. Chinese.
- [17] 刘静,王晓静,戴忠,等. 鸡血藤研究进展[J]. 中国药事,2019,33(2):188-194. LIU J, WANG XJ, DAI Z, et al. Research progress of Spatholobi Caulis[J]. Zhongguo Yao Shi, 2019, 33(2):188-194. Chinese.
- [18] 梁永枢,安冉,刘军民,等. 不同产地鸡血藤药材中染料木素及芒柄花素的含量测定[J]. 时珍国医国药,2013,24(7):1655-1657. LIANG YS, AN R, LIU JM, et al. Determination of Genistein and Formononetin in Caulis Caulis from different habitats[J]. Shi Zhen Guo Yi Guo Yao, 2013, 24(7):1655-1657. Chinese.
- [19] Gautam J, Khedgikar V, Kushwaha P, et al. Formononetin, an isoflavone, activates AMP-activated protein kinase/ β -catenin signalling to inhibit adipogenesis and rescues C57BL/6 mice from high-fat diet-induced obesity and bone loss[J]. Br J Nutr, 2017, 117(5):645-661.
- [20] Mansoori MN, Tyagi AM, Shukla P, et al. Methoxyisoflavones formononetin and isoformononetin inhibit the differentiation of Th17 cells and B-cell lymphopoiesis to promote osteogenesis in estrogen-deficient bone loss conditions[J]. Menopause, 2016, 23(5):565-576.
- [21] Kong X, Wang F, Niu Y, et al. A comparative study on the effect of promoting the osteogenic function of osteoblasts using isoflavones from Radix Astragalus[J]. Phytother Res, 2018, 32(1):115-124.

(收稿日期:2019-04-08 本文编辑:王玉蔓)