

通络生骨胶囊含药血清对破骨细胞及 Toll 样受体 4/核因子 κ B 信号通路的影响

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3134>

2095-4344.3134

投稿日期: 2020-03-02

送审日期: 2020-03-06

采用日期: 2020-05-19

在线日期: 2020-10-21

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)14-02155-06

文献标识码: A

范思奇¹, 曾平¹, 农焦², 刘金富², 钱晓芬²

文章快速阅读:

文章特点一

△通络生骨胶囊可抑制破骨细胞增殖;

△通络生骨胶囊可通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路改善激素性股骨头坏死中炎症环境及骨代谢平衡。

巨噬细胞集落刺激因子和核因子 κ B 受体激活蛋白配体诱导

RAW264.7 细胞株

破骨细胞

分组:

- (1) 正常组
- (2) 生理盐水组
- (3) 通络生骨胶囊低剂量组
- (4) 通络生骨胶囊中剂量组
- (5) 通络生骨胶囊高剂量组

主要观察:

- (1) TLR4、NF- κ Bp65 蛋白表达;
- (2) 肿瘤坏死因子 α 水平

文题释义:

TLR4/NF- κ B 信号通路: MyD88是TLR4信号通路中重要的衔接蛋白, MyD88激活一个死亡域激酶, 引起 IRAK自磷酸化, 磷酸化的IRAK与肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6) 相互作用形成复合物, 促使NIK活化, 进而活化IKK, 降解 I κ B, 释放核因子 κ B(如 核因子 κ B p65), 由胞质转位到核内, 刺激各种细胞因子等的表达。

核因子 κ B(NF- κ B): 是一种与炎症因子产生、细胞增殖、细胞外基质交联和细胞凋亡密切相关的转录因子, 参与多种炎症的信号转导, 在细胞中最常见的作用形式为核因子 κ B p65及核因子 κ B p50。

摘要

背景: 在激素性股骨头坏死发病机制中Toll样受体4(Toll-link receptors 4, TLR4)信号通路异常发挥着重大的作用, 调控TLR4有望成为有效治疗激素性股骨头坏死的突破点。

目的: 研究通络生骨胶囊对破骨细胞分化过程中TLR4信号传导通路的影响, 了解通络生骨胶囊对破骨细胞分化抑制过程的分子生物学机制。

方法: 将28只12周龄的C57BL/6小鼠随机分为通络生骨胶囊高、中、低剂量灌胃组[设置0.91 g/(kg·d)为中剂量, 该浓度剂量的2倍为高剂量, 0.5倍为低剂量]和生理盐水灌胃组, 每日1次, 持续灌胃14 d。末次给药8 h后, 通过腹主动脉取血来制备含药血清和对照血清组。采用核因子 κ B受体激活蛋白配体和巨噬细胞集落刺激因子诱导因子联合诱导RAW264.7 细胞株, 将细胞分为5组: 正常组、生理盐水组、通络生骨胶囊含药血清低、中、高浓度组。经CCK-8法观察含药血清对细胞增殖的影响后, 选择剂量浓度为20%的含药血清在诱导的第4天干预破骨细胞前体, 每组分别在诱导24, 48, 72, 96 h观察破骨细胞前体的生长形态及融合程度, 第8天通过TRAP染色来观察破骨细胞的数量, 通过Western blot检测关键蛋白TLR4、核因子 κ Bp65的表达, ELISA检测细胞上清液肿瘤坏死因子 α 的水平。实验方案经广西中医药大学动物实验伦理委员会批准。

结果与结论: ①通络生骨胶囊低、中、高剂量组培养液中肿瘤坏死因子 α 水平均低于正常组($P < 0.01$), 通络生骨胶囊低剂量组与中剂量组之间差异无显著性意义; ②通络生骨胶囊高、中、低剂量组TLR4蛋白表达均显著低于正常组($P < 0.05$); 通络生骨胶囊组中剂量、高剂量组核因子 κ Bp65蛋白表达显著低于正常组($P < 0.05$); 其中TLR4、核因子 κ Bp65蛋白的表达在通络生骨胶囊中剂量组中抑制效果最为有效; ③结果说明, 通络生骨胶囊治疗激素性股骨头坏死的机制之一可能是通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路, 减少了下游的炎症因子肿瘤坏死因子 α 的释放, 改善了激素性股骨头坏死中的炎症环境; 另一方面又抑制了破骨细胞活性, 使骨吸收减弱, 改善了激素性股骨头坏死中的骨代谢平衡。

关键词: 复方中药; 因子; 骨吸收; 破骨细胞; Toll 样受体 4; 核因子 κ B; RAW264.7细胞

缩略语: 核因子 κ B受体激活蛋白配体: receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL; Toll样受体4: Toll-link receptors 4, TLR4

Effect of Tongluo Shenggu Capsule-containing serum on osteoclasts and Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B signaling pathway

Fan Siqi¹, Zeng Ping¹, Nong Jiao², Liu Jinfu², Qian Xiaofen²

¹ 广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530023; ² 广西中医药大学研究生学院, 广西壮族自治区南宁市 530299

第一作者: 范思奇, 男, 1993年生, 江西省丰城市人, 汉族, 2019年广西中医药大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事中医药防治股骨头坏死研究。

通讯作者: 曾平, 博士, 教授, 主任医师, 广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530023

<https://orcid.org/0000-0003-0229-6055> (范思奇)

基金资助: 国家自然科学基金项目 (81960876), 项目负责人: 曾平; 广西地区自然科学基金项目 (2017GXNSFAA198296), 项目负责人: 曾平

引用本文: 范思奇, 曾平, 农焦, 刘金富, 钱晓芬. 通络生骨胶囊含药血清对破骨细胞及 Toll 样受体 4/核因子 κ B 信号通路的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(14):2155-2160.



¹The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530299, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Fan Siqi, Master, Physician, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Zeng Ping, MD, Professor, Chief physician, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Abnormal Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway plays an important role in the pathogenesis of steroid-induced necrosis of femoral head, and regulating TLR4 expression is expected to become a breakthrough point for effective treatment of hormonal femoral head necrosis.

OBJECTIVE: To study the effect of *Tongluo Shenggu* Capsule on the TLR4 signal transduction pathway in the process of osteoclast differentiation, in order to understand the molecular biological mechanism by which *Tongluo Shenggu* Capsule inhibits osteoclast differentiation.

METHODS: Twenty-eight 12-week-old C57BL/6 mice were randomly divided into *Tongluo Shenggu* Capsule high-dose, medium-dose, low-dose gavage group and normal saline gavage group. Medium dose was set to be 0.91 g/(kg·d), the high dose was 2 times up on the medium dose, and the low dose was 0.5 time up on the medium dose. The drug-containing serum was prepared by continuous gavage for 14 days. At 8 hours after the last administration, blood samples were taken from the abdominal aorta to prepare the serum containing the drug and the control serum. RAW264.7 cell line was induced by the combination of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and macrophage colony stimulating factor inducer. The cells were divided into five groups: normal group, normal saline group, high-, medium-, and low-dose drug-containing serum groups. Cell counting kit-8 method was used to observe the effect of drug-containing serum on cell proliferation. Then, the precursor of osteoclast was pretreated with 20% drug-containing serum on the 4th day of induction. Cell growth, morphology, and fusion were observed at 24, 48, 72, and 96 hours after induction. The number of osteoclasts was observed by TRAP staining on the 8th day. The expression of TLR4 and NF-κBp65 in cell supernatant was detected by western blot. The level of tumor necrosis factor α in cell supernatant was detected using ELISA. The study protocol was approved by the Animal Experimental Ethics Committee of Guangxi University of Chinese Medicine.

RESULTS AND CONCLUSION: The level of tumor necrosis factor α in low-, medium- and high-dose drug-containing serum groups was lower than that in the normal group ($P < 0.01$), whereas there was no significant difference between the low-dose and medium-dose drug-containing serum groups. The protein expression of TLR4 in low-, medium- and high-dose drug-containing serum groups was significantly lower than that in the normal group ($P < 0.05$), whereas the protein expression of NF-κBp65 in the medium- and high-dose drug-containing serum groups was significantly lower than that in the normal group ($P < 0.05$). Moreover, inhibiting the protein expression of TLR4 and NF-κBp65 was most obvious in the medium-dose drug-containing serum group. Overall, one of the mechanisms underlying *Tongluo Shenggu* Capsule in the treatment of steroid-induced necrosis of femoral head may be to reduce the release of tumor necrosis factor α and improve the inflammatory environment by inhibiting TLR4/NF-κB signal pathway; on the other hand, it can inhibit the activity of osteoclasts, weaken bone absorption and improve the balance of bone metabolism after steroid-induced necrosis of femoral head.

Key words: compound traditional Chinese medicine; factor; bone resorption; osteoclast; Toll-like receptor 4; nuclear transcription factor-B; RAW264.7 cell

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81960876 (to ZP); the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 2017GXNSFAA198296 (to ZP)

How to cite this article: FAN SQ, ZENG P, NONG J, LIU JF, QIAN XF. Effect of Tongluo Shenggu Capsule-containing serum on osteoclasts and Toll-like receptor 4/ nuclear factor-kappa B signaling pathway. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(14):2155-2160.

0 引言 Introduction

激素性股骨头坏死是由于长期使用糖皮质激素, 损坏了股骨头的血供, 导致骨细胞、骨髓成分坏死, 在持续机械应力作用下导致股骨头的局部区域中出现骨小梁稀疏和骨髓的坏死为特征的代谢性疾病^[1-2]。骨骼结构的稳定及骨组织的新陈代谢依赖于成骨细胞与破骨细胞的平衡^[3]。研究表明长期大剂量应用糖皮质激素可以影响成骨细胞及破骨细胞的活性及存活周期, 导致股骨头中出现骨代谢紊乱现象, 使股骨头内骨组织力学结构改变, 在外界重力的作用下发生微骨折, 诱发激素性股骨头坏死^[4]。因此, 从破骨、成骨细胞活性方面作为突破点, 可以在根本上起到治疗甚至逆转激素性股骨头坏死病程的作用。前期应用 iTRAQ 技术筛选激素性股骨头坏死患者的血清进行蛋白质组学研究, 发现激素性股骨头坏死患者体内 SERPINA4、SAA1、CD14、HP 蛋白存在显著差异; 通路分析表明, 这些差异蛋白显著富集在 Toll 样受体 4(Toll-link receptors 4, TLR4) 信号通路^[5-7]。最近研究证明, 大剂量应用糖皮质激素可导致 TLR4 信号通路过度激活, 加剧炎症因子的释放, 使破骨细胞大量增殖, 骨吸收远远强于骨形成, 导致骨组织的结构力学改变及骨小梁的稀疏, 引起股骨头不堪负重而坏死塌陷^[8-11]。因此, 在激素性股骨头坏死发病机制中 TLR4 信号通路异常发挥着重大的作用, 调控 TLR4 有望成为有效治疗激素性股骨头坏死的突破点。前期动物及细胞实验研究表明通络生骨胶囊可以有效防治激素性股骨头坏死, 但其具体机制还有待进一步研究^[12-14]。此次实验旨在从

TLR4 信号通路影响骨代谢为切入点, 通过从通络生骨胶囊含药血清对体外培养破骨细胞活性及 TLR4 信号通路影响的研究, 在前期临床观察的基础上从分子生物学角度以进一步阐述通络生骨胶囊治疗激素性股骨头坏死的机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 7 月至 2019 年 11 月在广西中医药大学第一附属医院分子实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 取 12 周龄清洁级 C57BL/6 雌性小鼠 28 只, 体质量 18–20 g, 分为通络生骨胶囊高、中、低剂量组、正常组及生理盐水对照组, 每组 7 只。实验动物来源于长沙市天勤生物技术有限公司; 许可证号码: SCXK(湘)2014-0011。合格证编号: 43006700014844。

1.3.2 中药组成及来源 通络生骨胶囊中药组成: 木豆叶; 胶囊剂型购于广西中医药大学第一附属医院中药房。

1.3.3 实验试剂 RAW264.7(上海纪宁实业公司); CCK-8 试剂盒(日本同仁 CK04); 人核因子 κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor κB ligand, RANKL)(R&D Systems 462-TR-010/cf); 人巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)(R&D Systems 216-MC-025/cf); TRAP 染色试剂盒(sigma 387a)、TLR4 Antibody-Internal 试剂盒(affinity AF7017); NF-κB p65 Antibody -C-terminal 试剂盒(affinity AF0874); 小鼠肿瘤坏

死因子 α (TNF- α)ELISA 试剂盒 (武汉华美 CSB-E04741m)。

1.4 实验方法

1.4.1 含药血清的制备 将 28 只雌性清洁级 C57BL/6 小鼠随机分为高、中、低剂量组及生理盐水对照组共 4 组, 每组共 7 只。首先计算小鼠的剂量, 按照标准剂量小鼠是人体剂量的 9.1 倍, 通络生骨胶囊的成人用量为每日 6 g, 为方便计算按成人 60 kg 换算, 则小鼠的正常灌胃为 0.91 g/(kg·d)。研究将此剂量设置为中浓度剂量, 该浓度剂量的 2 倍为高剂量, 0.5 倍为低剂量。各组适养 2 d 后, 进行药物灌胃, 灌胃容积按 20 μ L/g 计算。将通络生骨胶囊拆开其外表溶于温水中, 配置好各组所需浓度, 每天灌服通络生骨胶囊混悬液, 对照组每天灌服生理盐水。各组连续灌胃给药 14 d, 每天 1 次, 末次灌胃后, 空腹 8 h。水合氯醛麻醉小鼠, 采用腹主动脉取血, 1 500 r/min 离心 5 min, 取上清液致 EP 离心管中, 恒温水浴箱水浴灭活后, 放至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.4.2 破骨细胞的诱导分化 将复苏好的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞株, 放至含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液的离心管中离心, 弃去上清液, 再加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 5-10 mL, 吹打混匀后移至培养瓶中, 放置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育 24-48 h, 待培养瓶底细胞密度达到 70%-80% 时, 用 PBS 轻柔地将贴壁的 RAW264.7 细胞吹打下来后, 收集细胞于 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 5 mL, 充分吹打混匀后使细胞成单细胞悬液, 用细胞计数板算出此时的细胞浓度, 然后配制成 1×10^8 L⁻¹ 目的浓度的细胞悬液, 加入配置好的含 30 mg/L 巨噬细胞集落刺激因子、60 μ g/L RANKL 及体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 诱导因子培养液, 将 RAW264.7 前体细胞按 1×10^8 L⁻¹ 浓度接种于 96 孔培养板 (12 行 8 列) 中, 每孔加入细胞悬液 200 μ L, CO₂ 培养箱中培养, 每天换 1 次液。使用倒置相差显微镜密切观察 RAW264.7 细胞的生长及分化情况, 连续培养 3 d。然后改用含 30 mg/L 巨噬细胞集落刺激因子、200 μ g/L RANKL 及体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 诱导因子培养液, 每天用倒置相差显微镜动态观察培养前体细胞生长及分化情况, 连续培养 5 d, 总时长 8 d。

破骨细胞的诱导分化培养及鉴定

细胞来源:	RAW264.7 小鼠巨噬细胞株, 上海纪宁实业公司
培养基及添加材料:	(1)DMEM 培养液: 含体积分数 10% 胎牛血清; (2)DMEM 诱导因子培养液 ①含 30 mg/L 巨噬细胞集落刺激因子、60 μ g/L RANKL 及体积分数 10% 胎牛血清; ②含 30 mg/L 巨噬细胞集落刺激因子、200 μ g/L RANKL 及体积分数 10% 胎牛血清
培养时间:	8 d
细胞传代:	2 d 即可传代, 用第 3 代细胞实验。
细胞鉴定:	TRAP 染色鉴定
伦理学批准:	实验方案经广西中医药大学动物实验伦理委员会批准

1.4.3 破骨细胞的鉴定 按说明书进行 TRAP 染色, 甘油明胶封固, 显微镜观察, 以 TRAP(+) 且细胞核 ≥ 3 为破骨细胞。

1.4.4 CCK-8 法检测含药血清毒性实验 实验分 5 组: 正常组、对照组 (生理盐水组)、通络生骨胶囊含药血清低、中、高浓度组, 每组 5 个副孔, 每孔接种密度为 1×10^8 L⁻¹, 置于培养箱中培养 4 h; 这时 RAW264.7 细胞基本已经贴壁, 吸去培养基, 各组加入对应的药物浓度, 每孔 100 μ L, 继续培养。在培养的 24, 48, 72 h 这 3 个时间点, 每孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 置于培养箱中培养 4 h。然后应用酶标仪测定各组在 450 nm 波长处的吸光度。重复 5 次, 得出 A 值。

1.4.5 含药血清干预 按每孔接种密度 1×10^8 L⁻¹ 的标准, 将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中, 用含 30 mg/L 巨噬细胞集落刺激因子 +60 μ g/L RANKL+10% 胎牛血清的 DMEM 进行诱导, 每天换液, 连续培养 3 d 后, 待 RAW264.7 细胞基本都分化为破骨细胞前体。改用含 30 mg/L 巨噬细胞集落刺激因子 +200 mg/L RANKL+10% 胎牛血清的 DMEM 进行诱导, 于第 4 天时各组加入剂量浓度为 20% 的不同含药血清干预, 每天干预 1 次, 共 5 d。

1.4.6 ELISA 检测细胞上清液的肿瘤坏死因子 α 水平 细胞浓度调整为 1×10^8 L⁻¹, 100 μ L/ 孔, 按上述方法干预培养细胞后, 收集各孔培养的上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书要求检测细胞上清液中肿瘤坏死因子 α 的水平。

1.4.7 Western blot 法检测 TLR4、核因子 κ Bp65 蛋白表达 用 RIPA 裂解液裂解细胞收集细胞碎片及裂解液蛋白, 离心后取收集到的上清液样品。等量样品经 SDS-PAGE 凝胶进行蛋白电泳, 蛋白分离后转至 PVDF 膜上。PVDF 膜在室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加各目标分子特异性一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日 TBST 缓冲液洗涤膜, 加入二抗室温孵育 1 h。采用 ECL 法显影, 用 ChemiDocXRS 化学发光成像系统显色、曝光, 使用 ImageJ 软件分析各条带平均灰度值。

1.5 主要观察指标 ① RAW264.7 细胞及破骨细胞的形态学观察; ②破骨细胞的 TRAP 染色鉴定; ③含药血清的毒性实验结果; ④ Western blot 检测 TLR4、核因子 κ Bp65 蛋白表达; ⑤ ELISA 检测细胞上清液肿瘤坏死因子 α 的水平。

1.6 统计学分析 实验数据使用 SPSS 22.0 统计软件进行处理, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 RAW264.7 细胞及破骨细胞的形态学观察 见图 1。对传代细胞进行观察时, 图 1A 可见 RAW264.7 细胞在刚刚接种时, 细胞呈圆形, 贴壁后呈不规则扁平状圆形或椭圆形; 图 1B 可见, 接种第 2 天 RAW264.7 细胞增殖迅速, 呈椭圆形, 成片生长; 图 1C 可见, 诱导第 4 天, RAW264.7 细胞分化为破骨细胞前体, 大部分长出伪足, 且细胞大量增殖正常; 图 1D 可见, 正常组诱导第 8 天, 大量破骨细胞前体融合成破骨细胞, 其体积形态均不同于之前的破骨细胞前体。通过图 1E, F, G, H 看出, 与正常组相比生理盐水中破骨细胞数量相差不大, 低、中、高剂量组数量均少于正常组。

2.2 破骨细胞的 TRAP 染色鉴定 见图 2。TRAP 染色后, 细

胞形态呈现不规则状,类似椭圆形,细胞中细胞核数量较多,呈现出紫色或者紫蓝色,其体积与之前的破骨细胞前体相比明显增大。

2.3 含药血清的毒性实验结果 使用不同浓度的通络生骨胶囊含药血清干预 RAW 264.7 细胞,在 24, 48 及 72 h 这 3 个时间段采用 CCK-8 检测细胞活性,发现各组差异无显著性意义 ($P > 0.05$),见图 3。

2.4 Western blot 检测 TLR4、核因子 κ Bp65 蛋白的表达 见图 4-6。正常组、生理盐水组及高、中、低剂量组 TLR4 蛋白表达量分别为 2.81 ± 0.37 , 2.47 ± 0.33 , 1.50 ± 0.26 , 1.39 ± 0.25 , 1.88 ± 0.44 。与正常组相比,生理盐水组中 TLR4 蛋白表达水平差异无显著性意义;而通络生骨胶囊高、中、低剂量组 TLR4 蛋白水平均显著低于正常组 ($P < 0.05$);但通络生骨胶囊高剂量组与低、中剂量相比,TLR4 蛋白水平反而增高。正常组、生理盐水组及高、中、低剂量组核因子 κ Bp65 蛋白表达量分别为 2.48 ± 0.5 , 1.58 ± 0.3 , 1.72 ± 0.3 , 0.83 ± 0.24 , 0.82 ± 0.27 。生理盐水组及低浓度组中核因子 κ Bp65 蛋白表达水平差异无显著性意义,但通络生骨胶囊中、高剂量核因子 κ Bp65 蛋白表达显著低于正常组 ($P < 0.05$)。

2.5 ELISA 检测各组破骨细胞上清液肿瘤坏死因子 α 的水平 见图 7。培养液中肿瘤坏死因子 α 水平通络生骨胶囊低剂量组为 $(1.20 \pm 0.20) \mu\text{g/L}$,中剂量组为 $(1.10 \pm 0.18) \mu\text{g/L}$,高剂量组为 $(0.75 \pm 0.15) \mu\text{g/L}$,均显著低于正常组 [$(1.80 \pm 0.30) \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$];而生理盐水组 $(1.72 \pm 0.24) \mu\text{g/L}$ 与正常组相比差异无显著性意义;通络生骨胶囊组低、中剂量两组之间表达值接近,差异无显著性意义。

3 讨论 Discussion

骨骼系统的稳定依赖于骨形成和骨吸收共同作用的动态平衡,其中成骨细胞和破骨细胞各自发挥着重要作用,维持钙磷代谢和骨骼完整。但由于大剂量糖皮质激素的使用将导致破骨细胞大量增殖,使骨吸收破坏作用占据主导地位,不断的加重骨组织损伤,形成一种恶性循环,长期积累下将导致软骨下骨小梁发生不可逆的进行性破坏,最终致关节面塌陷,诱发激素性股骨头坏死^[15-16]。骨组织损伤与修复几乎是同时进行的,在激素性股骨头坏死的早期,机体发挥自主的修复功能时破骨细胞的活性便开始增强,主要是促进坏死骨的吸收,但在这基础上新生的骨往往比较脆弱,其硬度较低与周边正常骨质存在较大的压力差,骨小梁极易发生微骨折,进一步加重激素性股骨头坏死的病情进展。如若不加干预,随着破骨细胞的活性的一步步升高,其发展成为晚期激素性股骨头坏死将极为迅速^[17-18]。因此,破骨细胞在激素性股骨头坏死的修复重建中扮演着重要的角色,其活性越高塌陷的程度越深。

TLR4 是 Toll 样受体家族 (Toll like receptor, TLR) 成员之一,TLR4 主要表达于单核 / 巨噬细胞和树突状细胞,识别病原的分子模式,在免疫识别和免疫应答中起作用。已有研究表明在

骨细胞上也有 TLR4 的表达,并且它的活化参与到 TLR 介导的破骨细胞形成,影响破骨细胞的分化^[19-20]。它是免疫反应与骨代谢紊乱之间联系的桥梁。免疫系统中的多个因子都在骨髓中产生,骨组织也可以通过释放多种细胞因子来合理调节免疫反应^[21]。因此,骨坏死的发病机制与 TLR4 有一定的关联,两者之间起到了一种相互关联的双向调节作用。TLR4 信号通路有两条不同的传导模式:一条是 MyD88 依赖通路传导;另一条是 MyD88 非依赖性通路传导。MyD88 依赖性途径可以激活促炎细胞因子,而 MyD88 非依赖性通路可以激活干扰素诱导基因^[22],其中 TLR4 参与 MyD88 依赖型模式较多。TLR4 的下游因子核因子 κ B 被认为是炎症级联反应的重要始动因素,其活化可产生肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素 6 等炎症因子。有文献报道破骨细胞的活性与分化依赖于 RANKL 和核因子 κ B 受体激活剂的结合^[23],且核因子 κ B 下游的炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素 6 可以通过对破骨细胞活性的影响,上调核因子 κ B 受体活化因子配体的表达,促进破骨细胞分化^[24-26]。国内外的一些研究采用了 TAK242(TLR4 受体拮抗剂)来验证 TLR4/NF- κ B 信号通路与破骨细胞的关系^[27]。ADAPALA 等^[28]发现了股骨头坏死骨髓来源的巨噬细胞,增加了 ERK1/2 和 I κ B α 的磷酸化,增加了炎症细胞因子的表达,但可被 TLR4 抑制剂 TAK242 阻断,证明了坏死骨刺激巨噬细胞炎症反应是通过 TLR4 信号通路激活的。田雷等^[8]发现甲基强的松龙可通过 TLR4 信号通路过度激活破骨细胞,使正常的骨代谢失衡,造成骨小梁的结构力学改变,诱导大鼠激素性股骨头坏死。这些发现表明 TLR4/NF- κ B 信号通路可以影响破骨细胞分化使骨代谢紊乱,其在激素性股骨头坏死的发生发展中起着重要作用。

从激素性股骨头坏死的发病机制上来讲,由于血供的缺乏,局部势必出现低氧微环境,进而造成无菌性的炎症。XIE 等^[29]在骨坏死的动物模型中观察到,在大剂量糖皮质激素诱导的骨坏死早期,血浆纤维蛋白原含量明显增加,提示糖皮质激素诱导的骨坏死有一个前炎症期阶段。多数研究均发现激素性股骨头坏死患者体内的炎症因子水平明显增高。因此,激素性股骨头坏死的致病机制与过度的炎症反应密切相关。有文献报道 TLR4/NF- κ B 通路是糖皮质激素导致股骨头坏死的重要途径^[30-34],因为其可以影响骨形成、骨吸收、血管的生成及炎症因子的释放,其过量激活将增加下游炎症因子肿瘤坏死因子 α 的释放,促进破骨细胞增殖分化。因此,此次研究认为激素性股骨头坏死的发病机制与 TLR4 信号通路介导的炎症及其对破骨细胞活性的影响相关。

通络生骨胶囊是为了针对治疗股骨头坏死而研发出来的,能够有效改善髋部疼痛、跛行、下肢肌肉的萎缩、行走乏力及髓关节的活动受限等症状^[14]。其主要成分是天然药物木豆叶,有药理学研究表明木豆素及木豆叶提取物都具有抗炎、刺激成骨细胞骨形成、促进细胞间质矿化及抑制破骨细胞形成的活性^[35],降低骨吸收减少骨量的丢失,但其与

TLR4 信号通路的分子机制尚未见文献报道。此次实验中,加入不同浓度的通络生骨胶囊含药血清对破骨细胞进行干预,Western blot 检测结果表明核因子 κB 蛋白表达水平在一定范围内均低于正常组,通过 ELISA 检测各组破骨细胞上清液中肿瘤坏死因子 α 的水平,发现通络生骨胶囊低、中、高剂量组培养液中肿瘤坏死因子 α 水平均低于正常组。这也证实了通络生骨胶囊可以抑制核因子 κB 蛋白的表达及肿瘤坏死因子 α 炎症因子的释放,进而抑制破骨细胞的增殖,但 TLR4 的表达并没有随着通络生骨胶囊含药血清的浓度增高而下降,在低、中剂量组下调以中剂量最为明显,在高剂量组中反而增高。这可能与核因子 κB 是多条信号通路的连接点相关,TLR4 并不是唯一能激活核因子 κB 的信号通路,其作用的具体机制还有待进一步研究。

综上所述,此次研究认为通络生骨胶囊治疗激素性股骨头坏死的作用机制之一在于其改善了激素性股骨头坏死中的炎症环境,机制可能是通过抑制 TLR4/NF- κB 信号通路,减少了下游的炎症因子肿瘤坏死因子 α 的释放从而降低其介导的炎性损害,另一方面又抑制了破骨细胞活性,使骨吸收减弱,改善了激素性股骨头坏死中的骨代谢平衡,缓解激素性股骨头坏死的进展。因此,研制出抑制体内 TLR4/NF- κB 信号通路的生物制剂,以降低破骨细胞的活性,可能在将来会有效地降低因临床上长期大剂量应用糖皮质激素药物而并发激素性股骨头坏死的风险。

致谢: 感谢曾平导师的指导和意见。

作者贡献: 文章设计为曾平、范思奇,实施为范思奇、农焦、刘金富、钱晓芬,评估者为农焦,范思奇成文并对文章负责。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目 (81960876)”“广西地区自然科学基金项目 (2017GXNSFAA198296)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经广西中医药大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] TSE SM, MOK CC. Time trend and risk factors of avascular bone necrosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2017;26(7):715-722.

[2] CUI L, ZHUANG Q, LIN J, et al. Multicentric epidemiologic study on six thousand three hundred and ninety five cases of femoral head osteonecrosis in China. *Int Orthop*. 2016;40(2):267-276.

[3] 张玲莉,陈炳霖,邹军.运动影响骨转换:促进或抑制骨细胞/破骨细胞的发育和活性[J].中国组织工程研究,2014,18(42):6838-6843.

[4] 邓爽,彭昊.激素性股骨头坏死发生机制的新认识[J].中国医药导报,2017,14(14):32.

[5] 刘雄,曾平,秦刚,等.系统性红斑狼疮合并激素性股骨头坏死中医证型的血清差异蛋白质组学研究[J].中华中医药学刊,2018,36(11):2662-2666.

[6] 范思奇,曾平,周怡,等.ITRAQ 技术筛选系统性红斑狼疮合并股骨头坏死的血清差异蛋白质组学变化[J].中国组织工程研究,2019,23(3):476-481.

[7] 赖崇荣,曾平,刘雄,等.SLE 合并 SONFH 患者血清差异表达蛋白筛查[J].山东医药,2018,58(5):9-12.

[8] 田雷,周东生,孙水,等.Toll 样受体 4 信号通路过度激活在大鼠激素性股骨头坏死中的作用[J].西安交通大学学报(医学版),2014,35(5):622-629.

[9] CUI L, ZHUANG Q, LIN J, et al. Multicentric epidemiologic study on six thousand three hundred and ninety five cases of femoral head osteonecrosis in China. *Int Orthop*. 2016;40(2):267-276.

[10] WANG F, WANG Y, HU N, et al. Risk-Factors, Pathogenesis, And Pharmaceutical Approaches for Treatment of Steroid-Induced Bone Infarction of Femoral Head. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2016;73(3):557-563.

[11] 齐进,周寒冰,王晋申,等.糖皮质激素性骨量减少患者股骨头骨小梁微结构改变[J].国际骨科学杂志,2013,34(3):208-210.

[12] 杨俊兴,方斌,徐传毅,等.通络生骨胶囊对激素性股骨头坏死大鼠骨钙素、降钙素与骨密度的影响[J].广州中医药大学学报,2007,24(1):41-43.

[13] 海阔,李可大.通络生骨胶囊(复方生脉成骨胶囊)治疗股骨头坏死 142 例临床研究[J].实用中医内科杂志,2014,28(10):28-30.

[14] 农焦,曾平.通络生骨胶囊治疗早期股骨头坏死临床疗效的 meta 分析[J].大众科技,2018,20(11):62-65+86.

[15] 朱道宇,杨前昊,高悠水,等.TLR4 通路和激素性股骨头坏死关系的研究进展[J].中国骨与关节杂志,2019,8(1):80-84.

[16] 卢非凡,张启栋,王卫国,等.激素性股骨头坏死信号通路的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2018,26(11):1017-1021.

[17] 俞索静,童培建,吴承亮,等.破骨细胞形成过程中的融合与分裂[J].中华骨科杂志,2013,33(1):82-88.

[18] 于世凤.骨吸收与骨形成[J].现代康复,2001,5(9):10-13.

[19] 邱远,丁艳,徐文岳.TLR2 和 TLR4 的 TLR/IL-1 receptor 结构与功能[J].免疫学杂志,2014,30(2):166-169.

[20] 朱云霞,王兴兵,汪健,等.TLR2 和 TLR4 活化的骨髓间充质干细胞对人脐血 CD34⁺ 细胞迁移能力的影响[J].中国实验血液学杂志,2015,23(2):512-516.

[21] 孙黎飞,孙志宏,吴强强,等.IL-17 等炎症因子在风湿免疫相关性血细胞减少骨髓细胞中的分泌状态及其临床意义[J].中国免疫学杂志,2013,29(1):52-56.

[22] 王娜,张雪梅,陈立杰.TLR4 信号通路和炎症相关性疾病[J].中国实验诊断学,2015,19(5):857-860.

[23] 周立华,李军,邹娜妹,等.TLR2 和 TLR4 相关疾病与药物的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2014,30(7):767-770.

[24] DE BENEDETTI F. The impact of chronic inflammation on the growing skeleton: lessons from interleukin-6 transgenic mice. *Horm Res*. 2009;72(Suppl 1):S26-29.

[25] MILLER RR, CAPPOLA AR, SHARDELL MD, et al. Persistent changes in interleukin-6 and lower extremity function following hip fracture. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006;61(10):1053-1058.

[26] SONOMOTO K, YAMAOKA K, OSHITA K, et al. Interleukin-1 β induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt-5a/Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway. *Arthritis Rheum*. 2012;64(10):3355-3363.

[27] WANG D, TAO K, XIONG J, et al. TAK-242 Attenuates Acute Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation in Mouse via the TLR4/NF- κB signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;472(3):508-515.

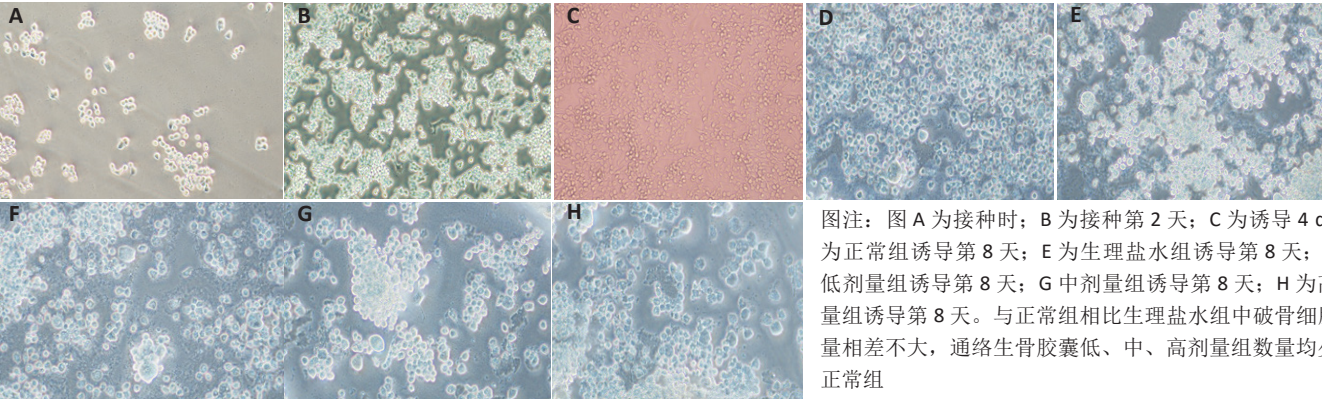
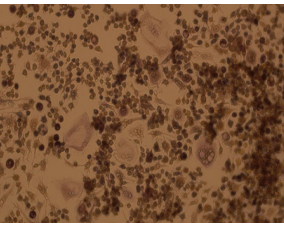
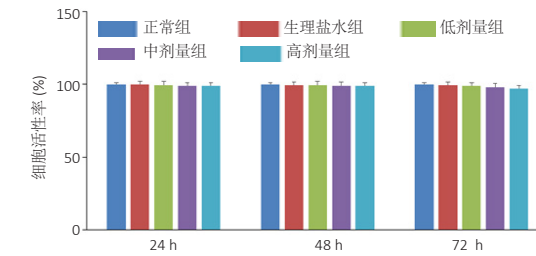


图 1 | RAW264.7 细胞及破骨细胞的形态学观察 (x40)

Figure 1 | Morphological observation of RAW264.7 cells and osteoclasts (x40)



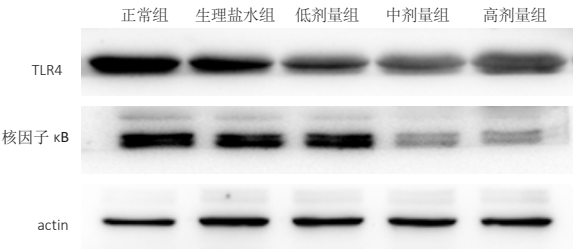
图注：细胞形态呈现不规则状，类似椭圆形，细胞中细胞核数量较多，呈现出紫色或者紫蓝色，其体积与之前的破骨细胞前体相比明显增大
图 2 | 破骨细胞的 TRAP 染色鉴定 (x40)
Figure 2 | TRAP staining identification of osteoclasts (x40)



图注：3 个时间段各组细胞活性差异无显著性意义

图 3 | 通络生骨胶囊含药血清对于 RAW264.7 细胞的毒性作用观测

Figure 3 | Toxic effect of Tongluo Shenggu Capsule on RAW264.7 cells

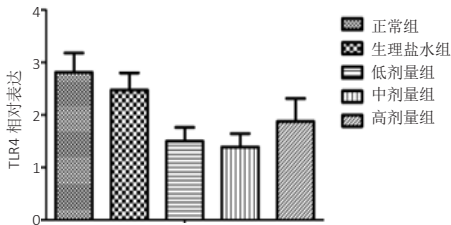


图注：通络生骨胶囊高、中、低剂量组 TLR4 蛋白表达均显著低于正常组；通络生骨胶囊中、高剂量组核因子 κ Bp65 蛋白表达显著低于正常组。
TLR4: Toll 样受体 4

图 4 | Western blot 检测各组关键蛋白表达结果

Figure 4 | Western blot detection of key protein expression in each group

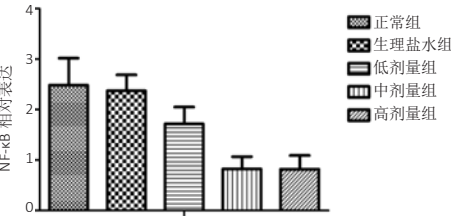
[28] ADAPALA NS, YAMAGUCHI R, PHIPPS M, et al. Necrotic Bone Stimulates Proinflammatory Responses in Macrophages through the Activation of Toll-Like Receptor 4. *Am J Pathol.* 2016;186(11):2987-2999.
[29] XIE XH, WANG XL, YANG HL, et al. Steroid-associated osteonecrosis: Epidemiology, pathophysiology, animal model, prevention, and potential treatments (an overview). *J Orthop Translat.* 2015;3(2):58-70.
[30] 马敏, 刘万林. TNF- α 的表达与激素性股骨头缺血性坏死关系的研究进展 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2011,43(5):588-591.
[31] 普卫, 刘德玉, 贺西京, 等. 激素性股骨头缺血性坏死血清中 TNF- α 变化的实验研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2004,12(6):53-54.



图注：通络生骨胶囊高、中、低剂量组 TLR4 蛋白表达均显著低于正常组。
TLR4: Toll 样受体 4

图 5 | 不同浓度通络生骨胶囊含药血清对 TLR4 蛋白表达的影响

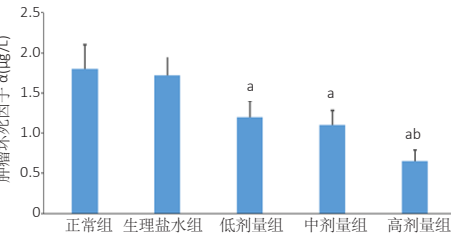
Figure 5 | The effect of serum containing different concentrations of Tongluo Shenggu Capsule on the expression of Toll-like receptor 4 protein



图注：通络生骨胶囊中、高剂量组核因子 κ Bp65 蛋白表达显著低于正常组

图 6 | 不同浓度通络生骨胶囊含药血清对核因子 κ B(NF- κ B) 蛋白表达的影响

Figure 6 | The effect of serum containing different concentrations of Tongluo Shenggu Capsule on the expression of nuclear factor- κ B protein



图注：与正常组和生理盐水组比较, ^a $P < 0.05$; 与通络生骨胶囊低、中剂量组比较, ^b $P < 0.05$

图 7 | 各组破骨细胞上清液中肿瘤坏死因子 α 水平

Figure 7 | The level of tumor necrosis factor α in the supernatant of osteoclasts in each group

[32] 张佳音. TNF- α 与激素性股骨头坏死的关系研究进展 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2018,50(3):283-286.
[33] 农焦, 曾平. TLR4/NF- κ B 信号转导通路在激素性股骨头坏死防治研究中的应用 [J]. *中华中医药学刊*, 2019,37(7):1689-1693.
[34] 朱道宇, 杨前昊, 高悠水, 等. TLR4 通路在激素性股骨头坏死关系的研究进展 [J]. *中国骨与关节杂志*, 2019,8(1):75-79.
[35] 郑元元, 杨京, 陈迪华, 等. 木豆叶提取物对人的类成骨细胞 TE85 成骨功能和体外破骨细胞分化的影响 [J]. *药学报*, 2007,42(4):386-391.