

# 葛根素对 RAW264.7 细胞破骨分化的影响

刘春丽, 闫雨娟, 莫礼文, 吴志杰, 张黎

https://doi.org/10.12307/2023.829

投稿日期: 2022-10-25

采用日期: 2022-12-28

修回日期: 2023-01-08

在线日期: 2023-01-19

中图分类号:

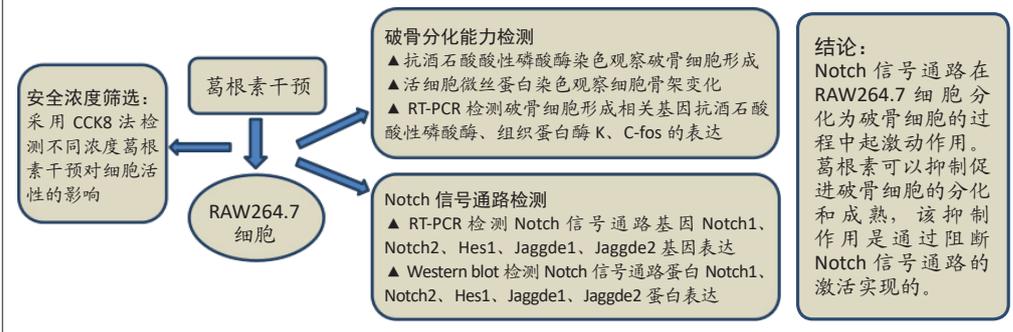
R459.9; R336; R285.5

文章编号:

2095-4344(2023)32-05114-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读: 葛根素影响 RAW264.7 细胞破骨分化的作用机制



### 文题释义:

**破骨细胞分化:** 多核破骨细胞由单核巨噬细胞融合产生, 与成骨细胞相互作用, 维持体内骨骼稳态。采用核因子 $\kappa$ B受体激动剂配体RANKL和巨噬细胞集落刺激因子联合培养巨噬细胞可以于体外诱导破骨细胞的形成。

**葛根素:** 是临床常用中药葛根的主要活性成分, 作为一种异黄酮衍生物, 已被证明具有抗炎、抗氧化、扩张血管、抗肿瘤等作用。近年来, 葛根素在防治骨质疏松、促进骨组织修复方面的作用也逐渐被发现。

### 摘要

**背景:** 葛根素是葛根中含有的一种黄酮类衍生物, 其可以预防骨质疏松、促进新骨生成, 有望成为治疗骨质破坏相关疾病的潜在药物。

**目的:** 观察葛根素对RAW264.7细胞破骨分化能力的影响, 探究Notch信号通路在其中的调控作用。

**方法:** 将RAW264.7细胞分5组干预培养: 对照组加入DMEM高糖培养基; 破骨诱导组加入破骨诱导培养基(含巨噬细胞集落刺激因子与核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体的DMEM高糖培养基); 低、中、高浓度葛根素组分别加入含10, 25, 50  $\mu$ mol/L葛根素的骨诱导培养基。培养7 d后, 采用抗酒石酸性磷酸酶染色及F-actin染色评估破骨细胞形成情况, RT-PCR检测破骨细胞形成相关基因的表达, Western blot及RT-PCR检测Notch信号通路相关指标表达。

**结果与结论:** ①抗酒石酸性磷酸酶染色显示, 与对照组比较, 破骨诱导组破骨细胞形成能力升高( $P < 0.01$ ); 与破骨诱导组比较, 低、中、高剂量葛根素组破骨细胞形成能力降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且呈浓度依赖性; ②F-actin染色显示, 与对照组比较, 破骨诱导组出现边界清晰的F-actin环; 与破骨诱导组比较, 各浓度葛根素组细胞F-actin环变小, 且呈浓度依赖性; ③RT-PCR检测显示, 与对照组比较, 破骨诱导组抗酒石酸性磷酸酶、组织蛋白酶K、C-fos mRNA表达升高( $P < 0.01$ ); 与破骨诱导组比较, 各浓度葛根素组酒石酸性磷酸酶、组织蛋白酶K、C-fos mRNA表达降低( $P < 0.01$ ), 且呈浓度依赖性; ④Western blot及RT-PCR检测显示, 与对照组比较, 破骨诱导组Notch1、Notch2、Hes1、Jagged1、Jagged2的表达升高( $P < 0.01$ ); 与破骨诱导组比较, 各浓度葛根素组Notch1、Notch2、Hes1、Jagged1、Jagged2的表达降低( $P < 0.01$ ), 且呈浓度依赖性; ⑤结果表明, 葛根素通过抑制Notch信号通路来抑制RAW264.7细胞的破骨分化能力。

**关键词:** 葛根素; RAW264.7细胞; 破骨细胞; 诱导分化; 骨稳态; Notch信号通路

**缩略语:** 核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体RANKL: receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL

## Effects of puerarin on osteoclast differentiation of RAW264.7 cells

Liu Chunli, Yan Yujuan, Mo Liwen, Wu Zhijie, Zhang Li

School of Stomatology, Hainan Medical University, Haikou 571101, Hainan province, China

Liu Chunli, Attending physician, School of Stomatology, Hainan Medical University, Haikou 571101, Hainan province, China

**Corresponding author:** Zhang Li, Associate professor, School of Stomatology, Hainan Medical University, Haikou 571101, Hainan province, China

### Abstract

**BACKGROUND:** Puerarin is a flavonoid derivative from *Pueraria lobata*. Studies have found that puerarin can prevent osteoporosis and promote new bone formation, which is expected to become a potential drug for treating diseases related to bone destruction.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of puerarin on osteoclast differentiation of RAW264.7 cells and to explore the regulatory effect of Notch signaling pathway.

**METHODS:** RAW264.7 cells were divided into five groups: control group treated with Dulbecco's modified Eagle medium high sugar medium; osteoclast induction group treated with osteoclast induction medium (Dulbecco's modified Eagle medium high sugar medium containing macrophage colony-stimulating

海南医学院口腔医学院, 海南省海口市 571101

第一作者: 刘春丽, 女, 1989年生, 海南省海口市人, 汉族, 主治医师, 主要从事牙周病学研究。

通讯作者: 张黎, 副教授, 海南医学院口腔医学院, 海南省海口市 571101

https://orcid.org/0000-0003-2174-022X(刘春丽)

基金资助: 海南省财政科技计划资助项目—海南省2020年重点研发计划社会发展专项(ZDYF2020166), 项目负责人: 张黎

引用本文: 刘春丽, 闫雨娟, 莫礼文, 吴志杰, 张黎. 葛根素对 RAW264.7 细胞破骨分化的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(32):5114-5119.



factor and receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand); low-, medium- and high-concentration puerarin groups treated with osteoclast induction medium containing 10, 25 and 50  $\mu$ mol/L puerarin respectively. After 7 days of culture, tartrate-resistant acid phosphatase staining and F-actin staining were used to observe the role of puerarin in osteoclast formation. RT-PCR was used to detect the expression of genes related to osteoclast formation. Western blot and RT-PCR were used to detect the expression of Notch signaling pathway-related indicators.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Tartrate-resistant acid phosphatase staining results indicated that osteoclast formation ability was enhanced in the osteoclast induction group compared with the control group ( $P < 0.01$ ), while compared with the osteoclast induction group, low-, middle-, and high-concentration puerarin intervention inhibited osteoclast formation in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). F-actin staining results revealed that clear ring structure could be observed in the osteoclast induction group; compared with the osteoclast induction group, puerarin intervention could inhibit the formation of F-actin ring in a concentration-dependent manner. RT-PCR results showed that compared with the control group, the expression of tartrate-resistant acid phosphatase, cathepsin K and C-fos mRNA was increased in the osteoclast induction group ( $P < 0.01$ ); compared with the osteoclast induction group, puerarin intervention decrease the expression of tartrate-resistant acid phosphatase, cathepsin K and C-fos mRNA in a concentration-dependent manner ( $P < 0.01$ ). Western blot and RT-PCR results showed that the expression of Notch1, Notch2, Hes1, Jagged1 and Jagged2 was increased in the osteoclast induction group compared with the control group ( $P < 0.01$ ); compared with the osteoclast induction group, puerarin intervention reduced the expression of Notch1, Notch2, Hes1, Jagged1, and Jagged2 in a concentration-dependent manner ( $P < 0.01$ ). To conclude, puerarin inhibits the osteoclast differentiation ability of RAW264.7 cells by inhibiting the Notch signaling pathway.

**Key words:** puerarin; RAW264.7 cell; osteoclast; induced differentiation; bone homeostasis; Notch signaling pathway

**Funding:** Hainan Provincial Finance Fund for Science and Technology Program – 2020 Hainan Province Key R&D Program for Social Development, No. ZDYF2020166 (to ZL)  
**How to cite this article:** LIU CL, YAN YJ, MO LW, WU ZJ, ZHANG L. Effects of puerarin on osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2023;27(32):5114-5119.

## 0 引言 Introduction

破骨细胞是一类具有溶骨能力的细胞，是骨骼重建的重要工具<sup>[1]</sup>。人体骨骼通过骨重建过程完成骨代谢更新，具有骨吸收能力的破骨细胞与具有骨形成能力的成骨细胞的数量和功能稳态，是骨代谢平衡的基础，如果骨稳态被打破会导致骨质异常，进而引发一系列疾病<sup>[2-3]</sup>。研究表明，破骨细胞的过度增殖活化会伴随骨吸收作用的增强，导致或加剧一系列以骨质破坏为表征的疾病，例如骨质疏松症<sup>[4-5]</sup>、骨关节炎<sup>[6-7]</sup>、牙周炎等<sup>[8]</sup>。因此，抑制破骨细胞的形成可以作为改善骨质破坏的一种重要手段。

Notch 信号通路可以调控细胞分化和功能激活<sup>[9]</sup>。Notch 受体是一类单通道 I 型跨膜蛋白，当前已经发现 4 种 Notch 受体和 5 种 Notch 配体<sup>[10]</sup>。当 Notch 受体和配体相互结合时会激活信号通路，从而完成相邻细胞间的信息交换<sup>[11]</sup>。在骨重建过程中，Notch 信号通路激活可以诱导核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL) 表达，从而促进破骨细胞的分化<sup>[12]</sup>，下调 HES1 表达水平可以减弱破骨细胞的分化能力<sup>[13]</sup>。有学者通过构建 Notch1 条件性基因敲除鼠证实，Notch1 基因缺失会减弱骨组织破骨细胞生成，而在成骨细胞谱系中，Notch1 的信号激活抑制成骨细胞分化并增加骨保护素水平，导致破骨细胞生成的显著抑制<sup>[14]</sup>。可见，Notch 信号通路是骨骼稳态调控的一种重要途径。

葛根素是临床常用中药葛根的主要活性成分，作为一种异黄酮衍生物，其已被证明具有抗炎、抗氧化、扩血管、抗肿瘤等作用<sup>[15]</sup>。近年来，随着研究的深入，葛根素在促进成骨细胞生成、抑制破骨细胞分化、维持骨代谢平衡方面的作用也逐渐被发现。有研究报道，溶解在胶原基质中的葛根素可以增加骨缺损位置的新骨生成，而葛根素灌胃可以延缓小鼠去卵巢导致的骨量损失，提示葛根素在破骨吸收和新骨形成过程中发挥了作用<sup>[16-17]</sup>。周师等<sup>[18]</sup>采用葛根素治疗肺动脉高压小鼠时发现，给予葛根素干预可显著降低 Notch 信号通路蛋白的表达水平，提示葛根素在治疗肺动脉高压过程中抑制了 Notch 信号通路的激活。此次实验通过 RANKL+ 巨噬

细胞集落刺激因子诱导法对 RAW264.7 细胞进行破骨诱导，观察葛根素对 RAW264.7 细胞破骨分化能力的影响，探究其潜在的作用机制，为葛根素的临床应用寻找新的理论证明。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 体外细胞干预实验，通过葛根素体外干预 RANKL+ 巨噬细胞集落刺激因子诱导培养的 RAW264.7 细胞，验证葛根素对 RAW264.7 细胞破骨分化能力的影响及 Notch 信号通路在其中发挥的作用。组间比较进行  $t$  检验及单因素方差分析。

**1.2 时间及地点** 实验于 2022 年 1-9 月在海南医学院科学实验中心进行。

**1.3 材料** 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7(Hibio, 中国); 葛根素 (纯度 99.2%, Mce, 美国); DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶 (Gibco, 美国); 破骨细胞诱导培养基、TRAP 染色试剂盒 (CTCC, 中国); SYBP Green PCR 试剂盒 (Thermo, 美国); CCK8 检测试剂盒、F-actin 荧光探针、Hoechst33258 荧光探针 (Beyotime, 中国); Notch1、Notch2、Hes1、Jagged1、Jagged2 蛋白抗体 (abcam, 英国); Lipofectamine™ 3000(invitrogen, 美国); 显微镜 (OLYMPUS, IX71)。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 CCK8 法筛选葛根素的安全干预浓度** 复苏 RAW264.7 细胞，加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基，观察细胞融合度至 90% 以上时收集细胞，调整细胞浓度为  $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ ，将细胞以  $100 \mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔板中，继续培养 24 h。弃去原培养基，按照 0, 1, 10, 50, 100, 200, 500  $\mu\text{mol/L}$  浓度梯度加入含葛根素药液培养基  $100 \mu\text{L}$ ，以 0  $\mu\text{mol/L}$  组为对照，培养 24 h 后进行 CCK8 检测。每孔加入 20  $\mu\text{L}$  CCK8 试剂，避光孵育 3 h 后，使用酶标仪于 450 nm 波长下检测各组细胞吸光度值，筛选出对 RAW264.7 细胞活性不产生影响的最高葛根素浓度。细胞存活率 (%) = 含药干预组 ( $A_{450 \text{ nm}} - A_{650 \text{ nm}}$ ) / 对照组 ( $A_{450 \text{ nm}} - A_{650 \text{ nm}}$ )  $\times 100\%$ ，对照组细胞存活率记为 100%。

**1.4.2 RAW264.7 细胞破骨诱导及葛根素干预** 将 RAW264.7 细胞以  $1 \times 10^5/\text{well}$  的密度接种于 48 孔细胞培养板中，设置对照组、破骨诱导组及低、中、高浓度及葛根素组。对照组

加入 DMEM 高糖培养基 250  $\mu$ L, 破骨诱导组加入破骨诱导培养基 (含巨噬细胞集落刺激因子 20 ng/mL 和 RANKL 50 ng/mL 的 DMEM 高糖培养基) 250  $\mu$ L, 葛根素干预组加入含不同浓度葛根素的破骨诱导培养基 250  $\mu$ L。将细胞置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 连续培养 7 d, 每隔两三天更换对应培养基。

**1.4.3 抗酒石酸酸性磷酸酶染色观察破骨细胞形成** 按 1.4.2 分组培养细胞 7 d, 弃去原培养基, 加入 40 g/L 多聚甲醛于室温下固定 15–20 min, 使用 PBS 漂洗两三次, 加入抗酒石酸酸性磷酸酶染色工作液室温染色, 10 min 后弃去染色液, PBS 漂洗干净, 于显微镜下观察, 随机选取 5 个视野拍照, 统计阳性多核细胞数量。

**1.4.4 F-actin 染色观察破骨细胞骨架形成** 按 1.4.2 分组培养细胞 7 d, 弃去原培养基, 加入 40 g/L 多聚甲醛于室温下固定 15–20 min, 使用 PBS 漂洗两三次, 加入 0.1% TritonX-100 破膜 20 min, PBS 漂洗两三次, 加入 F-actin 探针 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 加入 Hoechst 33258 室温孵育 10 min, PBS 漂洗后观察。

**1.4.5 RT-PCR 检测破骨形成及 Notch 信号通路相关基因表达** 按 1.4.2 分组培养细胞 7 d, 弃取原培养基, 收集细胞于 1.5 mL 离心管中, 提取细胞总 RNA, 采用 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA, 配制 RT-PCR 反应体系, 扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 10 min; 94  $^{\circ}$ C 20 s, 55  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 检测破骨细胞形成相关基因抗酒石酸酸性磷酸酶、组织蛋白酶 K、C-fos 及 Notch 信号通路相关基因 Notch1、Notch2、Hes1、Jaggde1、Jaggde2 的表达。引物序列见表 1。

表 1 | RT-PCR 引物序列  
Table 1 | RT-PCR primer sequences

基因名称	引物序列 (5'-3')
抗酒石酸酸性磷酸酶	F: TCC CCA GCC CTT ACT ACC GTT T R: CTC CCA GGT CTC GAG GCA TTT T
组织蛋白酶 K	F: TTG TGA CCG TGA TAA TGT GA R: GCA GGC GTT GTT CTT ATT C
C-fos	F: TGA AGA CCG TGT CAG GAG R: CGC TTG GAG TGT ATC TGT C
Notch1	F: GGA CCT CAT CAA CTC ACA T R: AAC AGC AGC ATC CAC ATT
Notch2	F: CAG CAG GAG GAA GAA GTG R: GTG GCA TCG GAG ACA TAC
Hes1	F: ATG GAG AAG AGG CGA AGG R: GAG GTG CTT CAC AGT CAT T
Jaggde1	F: ATG ATG TCT CCA GGT CTT AC R: GAA GGC TCA CAG GCT ATG
Jaggde2	F: GCT ATA ACG GAG GCA TCT G R: AGG ACT GGC ACT CAT CAA

**1.4.6 Western blot 检测 Notch 信号通路相关蛋白表达** 按 1.4.2 分组培养细胞 7 d, 弃去原培养基, 收集细胞, 加入预冷的已加 PMSF 的 RIPA 裂解液, 裂解 30 min 后 12 000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清进行 BCA 蛋白定量, 调整蛋白浓度制备上样用蛋白样本; 加样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (参数: 浓缩胶恒定电压 80 V, 30 min; 分离胶恒定电压 120 V, 60 min), 采用湿法转膜, 封闭 2 h; 加入一抗 Notch1(稀释比例 1 : 1 000)、Notch2(稀释比例 1 : 1 000)、Hes1(稀释比例 1 : 500)、Jaggde1(稀释比例 1 : 1 000)、Jaggde2(稀释比例 1 : 500) 过夜,

一抗孵育完成后, TBST 缓冲液缓慢洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min; 将 PVDF 膜放入以 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记的兔二抗或者鼠二抗溶液中, 37  $^{\circ}$ C 缓慢振荡孵育 1 h; TBST 缓冲液缓慢洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min; 在膜上加入适量的 ECL 发光液, 利用一体式化学发光仪拍摄照片, 内参选择 GAPDH。

**1.5 主要观察指标** ① CCK8 法检测葛根素干预 RAW264.7 细胞的安全浓度范围; ② 抗酒石酸酸性磷酸酶染色观察葛根素对破骨细胞形成能力的影响; ③ F-actin 染色观察葛根素对破骨细胞骨架形成能力的影响; ④ RT-PCR 检测破骨分化基因抗酒石酸酸性磷酸酶、组织蛋白酶 K、C-fos 及 Notch 信号通路相关基因 Notch1、Notch2、Hes1、Jaggde1、Jaggde2 的表达; ⑤ Western blot 检测 Notch 信号通路相关蛋白 Notch1、Notch2、Hes1、Jaggde1、Jaggde2 的表达。

**1.6 统计学分析** 所有实验数据均采用 SPSS 20.0 软件进行 *t* 检验及单因素方差分析, 若  $P < 0.05$  则认为差异有显著性意义, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。该文统计学方法已经海南医学院统计学教研室专家审核。

## 2 结果 Results

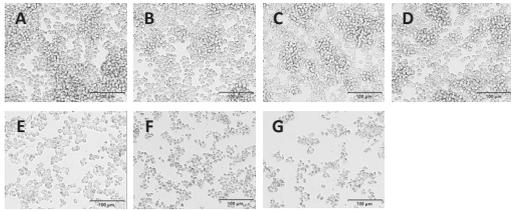
**2.1 葛根素安全浓度筛选** 显微镜下观察葛根素对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响, 活性较好的 RAW264.7 细胞呈现圆形或椭圆形, 形态饱满, 细胞融合度高, 细胞活性变差后, 形态变为梭形, 继而出现细胞皱缩和碎片化, 采用不同浓度葛根素干预后, RAW264.7 细胞形态如图 1 所示。

CCK8 检测结果显示, 1, 10, 50  $\mu$ mol/L 葛根素干预对 RAW264.7 细胞的活性无显著影响, 而采用 100, 200, 500  $\mu$ mol/L 葛根素干预后, 细胞活性降低为 (91.67 $\pm$ 0.28)%, (62.58 $\pm$ 0.39)%, (33.85 $\pm$ 0.35)%, 与对照组细胞活性比较差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。可见, 50  $\mu$ mol/L 及以下浓度葛根素干预对细胞活性无影响, 后续实验剂量组设置 50  $\mu$ mol/L 为最高给药浓度。

**2.2 葛根素抑制破骨细胞形成** 抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果可见, 相比于对照组, 破骨诱导组破骨生成能力升高 ( $P < 0.01$ ); 相比于破骨诱导组, 10, 25, 50  $\mu$ mol/L 浓度的葛根素均显著抑制破骨生成 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且呈浓度依赖性, 见图 3, 4。

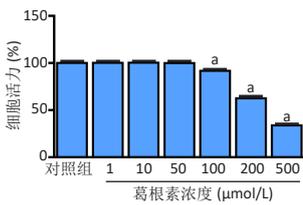
**2.3 葛根素抑制破骨细胞骨架形成** F-actin 环反映破骨细胞的骨架。F-actin 染色实验结果显示, 相比于对照组, 破骨诱导组出现边界清晰的 F-actin 环; 相比于破骨诱导组, 各浓度葛根素处理后细胞 F-actin 环变小, 且呈浓度依赖性, 见图 5。

**2.4 葛根素抑制破骨分化相关基因表达** 破骨细胞形成相关基因的表达代表了 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的能力, 采用 RT-PCR 检测抗酒石酸酸性磷酸酶、组织蛋白酶 K 及 C-fos 等基因的表达情况, 结果显示: 相比于对照组, 破骨诱导组抗酒石酸酸性磷酸酶、组织蛋白酶 K、C-fos mRNA 表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 相比于破骨诱导组, 各浓度葛根素组抗酒石酸酸性磷酸酶、组织蛋白酶 K、C-fos mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且呈浓度依赖性, 见图 6。

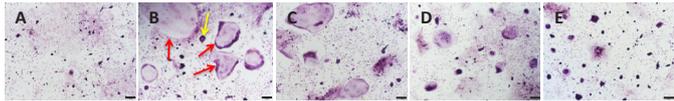


图注: A 为对照组, B-G 分别为 1, 10, 50, 100, 200, 500 μmol/L 葛根素干预组。对照组细胞呈现圆形或椭圆形, 形态饱满, 细胞融合度高; 经 1-50 μmol/L 葛根素干预后, 细胞形态无明显变化, 融合度较高, 当葛根素浓度达到 100-500 μmol/L 干预后, 细胞形态转变为梭形, 继而出现细胞皱缩和碎片化。标尺 =100 μm

图 1 | 镜下观察不同浓度葛根素对 RAW264.7 细胞活性的影响  
Figure 1 | Effect of different concentrations of puerarin on RAW264.7 cell viability under microscope



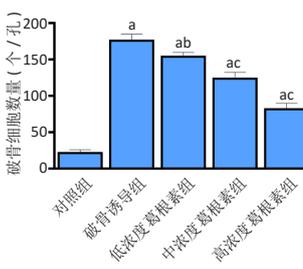
图注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.01  
图 2 | 不同浓度葛根素对 RAW264.7 细胞活性的影响  
Figure 2 | Effect of different concentrations of puerarin on the activity of RAW264.7 cells



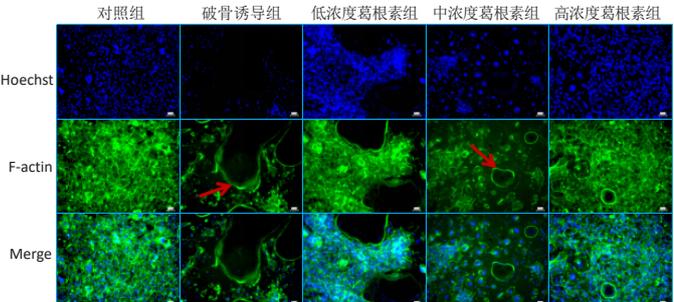
图注: A 为对照组, B 为破骨诱导组, C-E 分别为低、中、高浓度葛根素组。黄色箭头指示为未成熟破骨细胞, 红色箭头指示为成熟破骨细胞。标尺 = 100 μm

图 3 | 不同浓度葛根素对 RAW264.7 细胞破骨形成能力的影响 (抗酒石酸性磷酸酶染色)

Figure 3 | Effect of different concentrations of puerarin on the osteoclast differentiation ability of RAW264.7 cells (tartrate-resistant acid phosphatase staining)



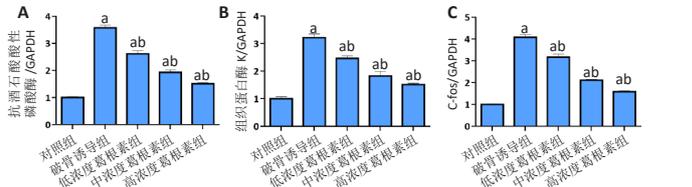
图注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.01; 与破骨诱导组比较, <sup>b</sup>P < 0.05, <sup>c</sup>P < 0.01  
图 4 | 各组 RAW264.7 细胞破骨诱导后抗酒石酸性磷酸酶染色阳性细胞数统计  
Figure 4 | The number of RAW264.7 cells positive for tartrate-resistant acid phosphatase after osteoclast induction



图注: 相比于对照组, 破骨诱导组出现边界清晰的 F-actin 环; 相比于破骨诱导组, 各浓度葛根素处理后细胞 F-actin 环变小, 且呈浓度依赖性; 红色箭头指示为 F-actin 环。标尺 =50 μm

图 5 | 不同浓度葛根素对 RAW264.7 细胞破骨分化骨架的影响 (F-actin 染色)

Figure 5 | Effect of different concentrations of puerarin on the osteoclast skeleton differentiated from RAW264.7 cells (F-actin staining)

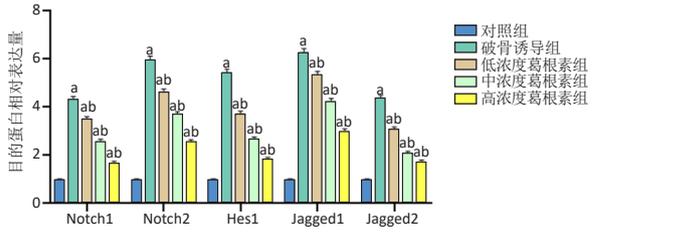


图注: A 为抗酒石酸性磷酸酶 mRNA 表达, B 为组织蛋白酶 K mRNA 表达, C 为 C-fos mRNA 表达。与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.01; 与破骨诱导组比较, <sup>b</sup>P < 0.01

图 6 | 不同浓度葛根素对 RAW264.7 细胞破骨分化相关基因表达的影响  
Figure 6 | Effect of different concentrations of puerarin on osteoclast differentiation-related gene expression

2.5 葛根素通过抑制 Notch 信号通路抑制破骨细胞形成 Notch 信号通路的过度活跃可以促进 RANKL 入核, 进而促进 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化。实验分别采用 Western blot 和 RT-PCR 法检测葛根素干预后 RAW264.7 细胞破骨诱导分化后 Notch 信号通路蛋白及基因的表达情况。

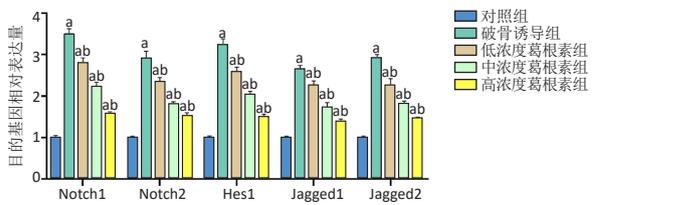
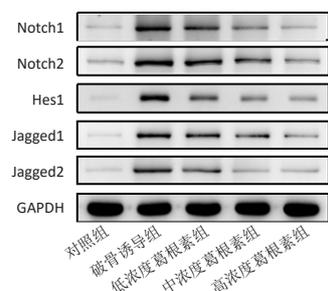
Western blot 检测结果显示, 破骨诱导可以激活 Notch 信号通路, 与对照组相比, 破骨诱导组 Notch1、Notch2、Hes1、Jagged1、Jagged2 蛋白表达量均显著上调 (P < 0.01); 与破骨诱导组相比, 各浓度葛根素组 Notch1、Notch2、Hes1、Jagged1、Jagged2 蛋白表达量显著降低 (P < 0.01), 且呈浓度依赖性, 见图 7。RT-PCR 检测结果趋势与 Western blot 检测结果一致, 均显示破骨诱导可以上调 Notch 信号通路相关蛋白表达, 葛根素可以抑制 Notch 信号通路, 见图 8。



图注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.01; 与破骨诱导组比较, <sup>b</sup>P < 0.01

图 7 | 不同浓度葛根素对 RAW264.7 细胞破骨分化 Notch 信号通路相关蛋白表达的影响

Figure 7 | Effect of different concentrations of puerarin on expression of Notch signaling pathway-related proteins



图注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.01; 与破骨诱导组比较, <sup>b</sup>P < 0.01

图 8 | 不同浓度葛根素对 RAW264.7 细胞破骨分化 Notch 信号通路相关基因表达的影响  
Figure 8 | Effect of different concentrations of puerarin on expression of Notch signaling pathway-related genes

### 3 讨论 Discussion

破骨细胞作为体内具有骨吸收功能的细胞，与成骨细胞共同作用维持骨重建过程中的骨代谢稳态，破骨细胞的数量和活性异常与众多以骨量损失和骨质结果破坏为特征疾病相关<sup>[19-20]</sup>。在牙周炎、骨质疏松症及骨关节炎等疾病中均发现了破骨细胞的异常活跃<sup>[21-22]</sup>，而抑制破骨细胞的过度活化是治疗骨代谢异常相关疾病的重要手段。葛根素是临床常用中药葛根的主要活性成分，在抗炎、抗肿瘤、治疗心血管疾病等方面都有广泛使用。近期有研究报道，葛根素在治疗大鼠骨质疏松、预防牙周炎、减轻骨关节炎等方面具有一定作用，但其具体的作用机制尚不清楚<sup>[23-24]</sup>。前期研究已经发现，Notch 信号通路的激活会促进破骨细胞的分化形成<sup>[25]</sup>，此次实验旨在评估葛根素对破骨细胞分化能力的影响，探究 Notch 信号通路在其中发挥的重要作用，结果表明葛根素干预过程中 Notch 信号通路被抑制，破骨细胞分化能力减弱。

RAW264.7 细胞是目前公认的破骨细胞前体细胞，具有与破骨细胞相似的基因组<sup>[26-27]</sup>。巨噬细胞集落刺激因子和 RANKL 是破骨细胞分化和存活不可或缺的细胞因子<sup>[13, 28]</sup>。巨噬细胞集落刺激因子和 RANKL 由成骨细胞和骨细胞分泌，在培养基中加入 RANKL 可以诱导巨噬细胞破骨分化，而巨噬细胞集落刺激因子是破骨细胞存活的必要因子。此次实验通过 RANKL+ 巨噬细胞集落刺激因子诱导体系体外诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞，可见明显的多核破骨细胞形成。

目前关于葛根素的干预巨噬细胞的浓度报道存在较大差异<sup>[28-30]</sup>，为了证实葛根素在破骨诱导中的发挥的作用，实验首先采用 CCK8 法筛选出葛根素干预 RAW264.7 细胞的安全浓度范围为 0-50  $\mu\text{mol/L}$ ，在安全浓度范围内选择 10, 25, 50  $\mu\text{mol/L}$  浓度葛根素干预破骨诱导中的 RAW264.7 细胞。抗酒石酸酸性磷酸酶是破骨细胞的特异性标志物<sup>[31]</sup>，是鉴定破骨细胞形成的经典方法。抗酒石酸酸性磷酸酶染色结果显示，葛根素干预后，抗酒石酸酸性磷酸酶阳性细胞的数量显著减少，随着干预浓度的升高，出现了众多分化受到抑制的破骨细胞，该类细胞的体积小，胞内结构紧密，多伪足。肌动蛋白是细胞骨架的主要成分，随着破骨细胞的分化形成，其胞体变得巨大，同时也会产生相应的肌动蛋白环状结构<sup>[32]</sup>。F-actin 染色结果显示，葛根素处理后的破骨细胞环状结构变小、数量变少，证明会葛根素抑制破骨细胞的骨架形成。以上结果提示，葛根素有减弱 RAW264.7 分化为破骨细胞的能力，这对临床治疗骨质破坏及骨量损失相关疾病有重要意义。

成熟的破骨细胞膜上存在具有泌酸能力的空泡质子泵，可以分泌酸性磷酸酶、组织蛋白酶 (组织蛋白酶 K) 等活性成分，进而通过一系列酶的作用发挥溶骨能力<sup>[33-34]</sup>。抗酒石酸酸性磷酸酶染色显示，高浓度葛根素干预 RAW264.7 细胞后产生了大量未成熟的破骨细胞，由此猜想葛根素对破骨细胞的成熟过程产生了影响。此次实验通过 RT-PCR 检测了破骨细胞标志活性酶抗酒石酸酸性磷酸酶和组织蛋白酶 K 的基因表达水平，结果显示，RAW264.7 细胞经过 RANKL 诱导后，

抗酒石酸酸性磷酸酶和组织蛋白酶 K 的 mRNA 表达水平较对照组显著升高，而经过葛根素干预后的同步诱导 RAW264.7 细胞的抗酒石酸酸性磷酸酶和组织蛋白酶 K 基因表达水平较破骨诱导组降低，在安全浓度范围内存在剂量依赖效应。该实验结果说明，葛根素对破骨细胞的成熟和活性产生了影响。实验进一步研究了与破骨细胞分化成熟相关的原癌基因 (C-fos) 的表达水平，RANKL 在诱导破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞的过程中会与 RANK 结合，导致转录因子 C-fos 表达激活，进而促进破骨细胞的分化和成熟<sup>[35]</sup>。PCR 检测结果显示，葛根素可以抑制 C-fos 的表达，进而抑制破骨细胞的分化成熟。

Notch 信号通路是细胞增殖、分化及凋亡调节的重要通路<sup>[36]</sup>。在破骨诱导过程中，RANKL 等诱导因子可以上调 Notch1 蛋白表达，通过激活 Notch 信号通路促进破骨细胞的形成<sup>[37-38]</sup>。有学者通过体外激活 Notch 信号通路发现，Notch1 蛋白参与了破骨细胞的分化过程<sup>[39]</sup>；同样有研究表明，阻断 Notch 信号通路后，骨髓细胞破骨分化相关因子巨噬细胞集落刺激因子的表达会受到影响<sup>[40]</sup>，说明 Notch 信号通路参与破骨细胞形成。此次实验分别采用 RT-PCR 法和 Wsetern blot 法检测了 Notch 信号通路相关基因和蛋白的表达水平，结果发现，RAW264.7 细胞采用 RANKL 诱导分化为破骨细胞的过程中，Notch1、Notch2、Hes1、Jaggde1、Jaggde2 的表达水平较对照组大幅升高，而经过葛根素干预后，同步诱导 RAW264.7 细胞的 Notch1、Notch2、Hes1、Jaggde1、Jaggde2 基因和蛋白表达水平较破骨诱导组降低，在安全浓度范围内存在剂量依赖效应。该研究结果提示，葛根素干预会抑制 Notch 信号通路，且随着葛根素干预浓度的提高，Notch 信号通路抑制效果越发明，成功证明了 Notch 信号通路在葛根素调控破骨细胞分化中具有重要意义。

综上所述，Notch 信号通路在 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的过程中起激动作用，葛根素可以抑制破骨细胞的分化和成熟，该抑制作用是通过阻断 Notch 信号通路的激活实现的。抑制破骨细胞的形成是治疗以牙周炎、骨质疏松和骨关节炎为代表的一系列骨质破坏相关疾病的重要手段，葛根素作为一种毒副作用小的中药有望在相关疾病的治疗中发挥作用。

**作者贡献：**张黎进行实验设计，实验实施为刘春丽，实验评估为闫雨娟，资料收集为闫雨娟、莫礼文、吴志杰，刘春丽成文，张黎审核。

**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。

**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。

**版权转让：**文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范：**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。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表宗旨。

## 4 参考文献 References

- [1] NAKASHIMA T, HAYASHI M, TAKAYANAGI H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrin Met.* 2012;23(11):582-590.
- [2] KIM H, LEE K, KIM JM, et al. Selenoprotein W ensures physiological bone remodeling by preventing hyperactivity of osteoclasts. *Nat Commun.* 2021;12:2258.
- [3] 任明诗, 丁羽, 李子涵, 等. 成骨细胞与破骨细胞相互调节作用的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2022,38(6):822-827
- [4] DA W, TAO L, ZHU Y. The Role of Osteoclast Energy Metabolism in the Occurrence and Development of Osteoporosis. *Front Endocrinol.* 2021; 12:675385.
- [5] LEWIECKI, MICHAEL E. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(11): 631-638.
- [6] KAZUHIRO Y, KOJIRO S, TAKASHI M, et al. Characterization and Function of Tumor Necrosis Factor alpha and Interleukin-6-Induced Osteoclasts in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2021;73(7):1145-1154.
- [7] CHEN X, WANG ZQ, DUAN NA, et al. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res.* 2018;59(2):99-107.
- [8] RACZ GZ, KADAR K, FOLDES A, et al. Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in periodontitis. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65(3):327-339.
- [9] SIEBEL C, LENDAHL U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol.* 2017;97(4):1235-1294.
- [10] RAPHAEL K, MA XL. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell.* 2009;137:216-233.
- [11] YU J, CANALIS E. Notch and the Regulation of Osteoclast Differentiation and Function. *Bone.* 2020;138:115474.
- [12] ZHAO B, GRIMES SN, LI S, et al. TNF-induced osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption are inhibited by transcription factor RBP-J. *J Exp Med.* 2012;209(2):319-34.
- [13] FUJIWARA T, ZHOU J, YE S, et al. RNA-binding protein Musashi2 induced by RANKL is critical for osteoclast survival. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2300.
- [14] 张峻玮, 李琰, 薛海鹏, 等. 骨碎补经骨髓间充质干细胞调节 OPG/RANKL/RANK 通路抑制破骨细胞的实验研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019,25(5):617-624.
- [15] 王东红, 王春爱, 薛建军. 葛根素的研究进展 [J]. *西部中医药*, 2017, 30(1):139-142.
- [16] 杨一秋, 李兰, 解继胜, 等. 葛根素介导 PTEN-PI3K-AKT 信号通路抑制绝经后骨质疏松症的机制研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022,28(3): 347-351.
- [17] WONG R, RABIE B. Effect of puerarin on bone formation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(8):894-899.
- [18] 周帅, 芦山, 郭森. 基于 Notch 信号通路探究葛根素对肺动脉高压小鼠治疗作用机制研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2022,49(7):197-200.
- [19] PARK J, ZHANG X, LEE S K, et al. CCL28-induced RAR $\beta$  expression inhibits oral squamous cell carcinoma bone invasion. *J Clin Invest.* 2019;129(12):5381-5399.
- [20] ONO T, NAKASHIMA T. Recent Advances in Osteoclast Biology. *Histochem Cell Biol.* 2018;149:325-341.
- [21] LARROUTURE QC, CRIBBS AP, RAO S R, et al. Loss of mutual protection between human osteoclasts and chondrocytes in damaged joints initiates osteoclast-mediated cartilage degradation by MMPs. *Sci Rep.* 2021;11:22708.
- [22] AMIN N, BOCCARDI V, TAGHIZADEH M, et al. Probiotics and bone disorders: the role of RANKL/RANK/OPG pathway. *Aging Clin Exp Res.* 2020;32(3):363-371.
- [23] 詹乐, 马瑞培, 万妮, 等. 葛根素对牙周炎大鼠 Th17/Treg 细胞免疫平衡及相关转录因子表达的影响 [J]. *昆明医科大学学报*, 2022, 43(11):36-43.
- [24] 高陆, 刘欧胜, 徐丽. 司马西特通过 Notch/RANKL 诱导破骨细胞形成的初步研究 [J]. *口腔生物医学*, 2021,12(3):160-165.
- [25] 季开心, 陈思言, 张敏杰, 等. 坏死性凋亡在大鼠牙移动过程中对牙周组织改建的影响 [J]. *口腔医学*, 2021,41(12):1068-1087.
- [26] MIZUKAMI J, TAKAESU G, AKATSUKA H, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol.* 2002;22(4):992-1000.
- [27] YAMAMOTO A, MIYAZAKI T, KADONO Y, et al. Possible Involvement of I $\kappa$ B Kinase 2 and MKK7 in Osteoclastogenesis Induced by Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand. *J Bone Miner Res.* 2002;17(4): 612-621.
- [28] 闫波. 葛根素抑制 PMMA 颗粒诱导破骨细胞形成及骨溶解的机制研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
- [29] 于冬冬, 赵丹阳, 姚啸生, 等. 葛根素通过 NF- $\kappa$ B 信号通路调节破骨细胞的分化 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019,25(9):837-841.
- [30] 袁斯远, 何芳, 孔蓓蓓, 等. 葛根素对破骨细胞形成以及成骨细胞 OPG/RANKL mRNA 表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2015,30(11): 3889-3892.
- [31] FILIPOVIC M, FLEGAR D, SUCUR A, et al. Inhibition of Notch Signaling Stimulates Osteoclastogenesis From the Common Trilineage Progenitor Under Inflammatory Conditions. *Front Immunol.* 2022;13:902947.
- [32] 刘官娟, 宋娜, 霍花, 等. 唑来膦酸调控 NLRP3 信号通路抑制脂多糖诱导的破骨细胞分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2023,27(29): 4677-4683.
- [33] 冯燕陵. FoxO1 介导白藜芦醇、葛根素抑制破骨细胞生成和活性的机制研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
- [34] 康鑫. 葛根素促进成骨细胞增殖及信号调控机制的实验研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2015.
- [35] ARMSTRONG AP, TOMETSKO ME, GLACCUM M, et al. A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem.* 2002; 277(46):44347-44356.
- [36] ZHOU B, LIN W, LONG Y, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):95.
- [37] ZENG XZ, HE LG, WANG S, et al. Aconine inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells by suppressing NF- $\kappa$ B and NFATc1 activation and DC-STAMP expression. *Acta Pharmacol Sin.* 2016; 37(2):255-263.
- [38] WANG ZW, LI YW, SARKAR FH. Notch Signaling Proteins: Legitimate Targets for Cancer Therapy. *Curr Protein Pept Sci.* 2010;11(6):398-408.
- [39] 平依林, 姜锋, 杨肖, 等. Notch1 蛋白高表达抑制破骨细胞增殖和分化 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2016,34(2):121-124.
- [40] 王汝杰, 刘复州, 沈伟伟, 等. Jagged1 活化 Notch 通路促进 RAW 264.7 向破骨细胞分化但抑制增殖 [J]. *中国免疫学杂志*, 2014,30(7): 865-869.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)