

茛菪酰胺抑制破骨细胞分化的机制研究

黄微星 万玲君 黄幻 王威 雷新环 袁赤亭 章礼炜

【摘要】 目的 探讨茛菪酰胺对破骨细胞分化的影响及机制。方法 通过CCK-8法评估茛菪酰胺对小鼠骨髓来源单核巨噬细胞(BMMs)增殖活性的影响,采用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色评估其对BMMs破骨分化的影响,利用Osteo Assay Surface骨细胞表面培养板研究其对破骨细胞骨吸收能力的影响,并采用qRT-PCR法验证茛菪酰胺处理下BMMs破骨分化过程中核心转录因子活化T-细胞核因子1(NFATc1)和相关破骨特征基因在转录水平的变化。结果 2 μmol/L及以下浓度的茛菪酰胺对BMMs增殖无明显毒性反应,并且茛菪酰胺可浓度依赖性地抑制BMMs破骨分化过程,在1 μmol/L茛菪酰胺干预下几乎无成熟破骨细胞生成。与此同时,茛菪酰胺可显著抑制破骨细胞的骨吸收功能。在机制上,茛菪酰胺可通过抑制NF-κB受体活化因子配体(RANKL)刺激BMMs破骨分化过程中核心转录因子NFATc1的表达,从而下调下游耐酒石酸酸性磷酸酶(ACP5)、破骨细胞相关受体(OSCAR)、组织蛋白酶K(CTSK)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)等破骨特征基因的转录,抑制破骨分化过程。结论 茛菪酰胺可通过下调RANKL刺激BMMs破骨分化过程中NFATc1的表达,抑制BMMs破骨分化过程及破骨细胞的骨吸收能力。

【关键词】 骨质疏松;破骨细胞;茛菪酰胺

Piperlongumine inhibits osteoclast differentiation and its mechanism

HUANG Weixing, WAN Lingjun, HUANG Huan, WANG Wei, LEI Xinhuan, YUAN Chiting, ZHANG Liwei

First-author's address: Department of General Surgery, Taizhou Hospital of Zhejiang University, Taizhou 317000, China

Corresponding author: ZHANG Liwei, E-mail: medzlw@sina.com

【 Abstract 】 **Objective** To investigate the effect of monomer piperlongumine on osteoclast differentiation and its mechanism. **Methods** Mouse bone marrow-derived monocytes/macrophages (BMMs) were treated with piperlongumine at different concentrations. CCK-8 assay was used to determine the cell proliferation; tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining was used to detect the osteoclast differentiation from BMMs; and Osteo Assay Surface plate was used to investigate the bone resorption capacity of osteoclasts; qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) and genes related to osteoclast differentiation. **Results** Piperlongumine showed no obvious toxic effect on the cell proliferation of BMMs under concentration 2 μmol/L, and it inhibited osteoclast differentiation from BMMs in a concentration-dependent manner under concentration of 1 μmol/L. Meanwhile, piperlongumine significantly inhibited the bone resorption function of osteoclasts. Piperlongumine hindered the osteoclastogenesis process by inhibiting the expression of NFATc1, a core transcription factor of osteoclast differentiation, down-regulating the transcription of osteoclast feature genes including ACP5, OSCAR, CTSK, MMP-9. **Conclusion** Piperlongumine inhibits osteoclastic differentiation of BMMs and bone resorption of osteoclast by down-regulating the expression of NFATc1 stimulated by RANKL.

【 Key words 】 Osteoporosis; Osteoclast; Piperlongumine

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2023.45.1.2022-2179

基金项目:浙江省基础公益研究计划项目(LGF20H250004);浙江省医药卫生科技计划(2021KY1197);台州市退变性骨关节疾病防治联合体专项研究基金

作者单位:317000 浙江大学台州医院综合外科(黄微星、万玲君、黄幻),骨科(王威、雷新环、袁赤亭、章礼炜)

通信作者:章礼炜,E-mail:medzlw@sina.com

骨骼作为人体运动系统的重要器官,在体内发挥着保护、代谢、支持、运动、造血等功能。在正常机体的骨代谢中,成骨细胞所介导的骨形成作用与破骨细胞所介导的骨吸收作用至关重要,使骨量维持在动态平衡的状态^[1]。起源于骨髓单核巨噬细胞的破骨细胞,是体内唯一具有骨吸收功能的终末分化细胞。绝经后的女性,由于体内缺乏雌激素,使得破骨细胞数

目增加及功能异常,骨吸收速度提高,出现明显的骨量丢失现象,导致骨质疏松^[2]。此外,破骨细胞分化异常活跃在肿瘤骨转移、类风湿性关节炎、关节置换假体周围骨溶解等疾病的发生过程中发挥着重要作用^[3]。由此可见,抑制破骨细胞分化是防治骨量丢失疾病的重要靶点之一。萆苳酰胺提取自胡椒科胡椒属植物萆苳,是一种天然生物碱,具有抗肿瘤、抗血小板凝集、抗炎、降血脂、保护神经等作用,但是其在骨代谢领域的功能尚未揭示^[4-5]。本研究旨在通过体外实验探讨萆苳酰胺对破骨细胞分化的影响及其潜在机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 6~8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠 10 只, 体质量 16~20 g, 购自上海杰思捷实验动物有限公司 [SCXK(沪)2018-0004], 饲养于浙江大学台州医院公共科研平台 SPF 动物房 [SYXK(浙)2019-0030]。小鼠在室温 20~25 ℃, 湿度 40%~60%, 24 h 自然光暗循环条件下饲养, 不限制饮水及进食, 相关饲养及操作经浙江大学台州医院动物伦理委员会审批 (tzyy-2019033)。

1.2 试剂和仪器 萆苳酰胺粉末(批号:HY-N2329) 购自美国 MedChemExpress 公司, 高速离心后使用二甲亚砜(批号:ST038, 上海碧云天生物技术有限公司) 溶解制成 100 mmol/L 母液, 分装后置于 -80 ℃ 冰箱保存。巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) (批号:315-02) 购自美国 Peprotech 公司; NF-κB 受体活化因子配体 (receptor activator of NF-κB ligand, RANKL) (批号:P00226)、总 RNA 提取试剂(批号:R1100) 均购自北京索莱宝科技有限公司; α-改良型 MEM 培养基(批号:SH30265.01) 购自美国 Hyclone 公司; 澳洲特级 FBS(批号:10099-141) 购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒(批号:K1018) 购自美国 APEX BIO 公司; cDNA 第一链合成试剂盒(批号:R123-01)、SYBR Green 荧光实时定量 PCR 试剂盒(批号:Q121-02) 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。PBS(批号:C0221)、胰酶细胞消化液(批号:C0201)、青霉素-链霉素双抗溶液(批号:C0222) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 24 孔 Osteo Assay Surface 骨细胞表面培养板(批号:3987) 购自美国 Corning 公司; 破骨细胞特征性标志酶抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 染色试剂盒(批号:BZ-OC02) 购自苏州必中生物科技有限公司。Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪购自美国 Thermo

Fisher 公司, ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司, DM IL LED 倒置实验室显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠骨髓来源单核巨噬细胞 (bone marrow-derived monocytes/macrophages, BMMs) 提取与培养 解剖小鼠, 收集小鼠胫腓骨置于无菌 PBS 中, 剔净肌肉、生长板及黏附其上的韧带等结缔组织, 3 次无菌 PBS 漂洗后, 于股骨近端、胫骨远端暴露骨髓腔, 使用 1 ml 针筒抽取 PBS 反复冲洗骨髓腔。将分离的骨髓使用含 10% 血清的 α-改良型 MEM 培养基重悬后 1 500 r/min 离心 4 min, 倒掉上清液后使用含 30 ng/ml M-CSF 的完全培养基重悬, 接种于 10 cm 细胞培养皿中, 过夜。第 2 天去除细胞培养皿中的培养液, 并用无菌 PBS 冲洗 3 次, 加入适量含 30 ng/ml M-CSF 的完全培养基, 将仍贴壁的细胞继续培养 2 d 细胞呈短梭形, 密度 80%~90%。随后去除培养液并使用 PBS 冲洗 3 次, 胰酶消化, 计数后备用, 即为 BMMs。后续 BMMs 培养均使用含 30 ng/ml M-CSF 的完全培养基, 进行破骨分化诱导时采用含 50 ng/ml RANKL、30 ng/ml M-CSF 的完全培养基。

1.3.2 BMMs 增殖活性检测 采用 CCK-8 法。将 BMMs 按 0.4×10^4 细胞/孔的密度接种于 96 孔板内, 设置 1 个对照组和 9 个浓度 (0.25、0.5、1、2、5、10、25、50、100 μmol/L) 萆苳酰胺干预组, 共 10 组, 每组 3 个复孔。待细胞过夜贴壁后, 将孔内液体更换为含对应药物的完全培养基进一步培养, 隔天换液 1 次。分别培养 48、72、96 h 后, 向每孔中加入 10 μl CCK-8 试剂, 于细胞培养箱中继续培养 2 h 后, 使用酶标仪测定各孔 450 nm 波长处吸光度 (OD₄₅₀) 值。

1.3.3 BMMs 破骨分化诱导 将 BMMs 分别按 10×10^4 、 40×10^4 细胞/孔的密度接种于 24、6 孔板内。过夜贴壁后, 使用破骨诱导分化完全培养基 (完全培养基 + 50 ng/ml RANKL + 30 ng/ml M-CSF) 进行破骨分化诱导, 隔天换液。第 4 天显微镜下见 BMMs 开始汇聚、融合, 出现 3 个细胞核以上的细胞, 第 6 天见边界清晰、巨大、煎饼样的成熟破骨细胞。

1.3.4 BMMs 破骨分化能力检测 采用 TRAP 染色。吸去成熟破骨细胞 24 孔板中各个培养孔中的培养基, PBS 冲洗 1 遍后加入 500 μl 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 随后 PBS 冲洗 2 遍, 按照试剂盒说明书进行 TRAP 染色。倒置显微镜下观察并拍照, TRAP 阳性且细胞核数目 ≥ 3 的细胞计为破骨细胞, 并通过 Image

J 软件进行破骨细胞相对大小的计算,破骨细胞相对大小=各组破骨细胞大小/溶剂对照组中破骨细胞大小的平均值。

1.3.5 破骨细胞骨吸收能力检测 采用 24 孔 Osteo Assay Surface 骨细胞表面培养板。将 BMMs 按 10×10^4 细胞/孔的密度接种于 24 孔板中,细胞过夜贴壁后将培养基更换为破骨诱导分化完全培养基,进行破骨诱导,隔天换液。3 d 后倒置显微镜下见 BMMs 开始融合成较小的、不成熟的破骨细胞,随后去除培养液并使用 PBS 冲洗 3 次,胰酶消化并重新进行细胞计数。随后,将消化后的未成熟破骨细胞按 10×10^4 细胞/孔的密度接种于 Osteo Assay Surface 骨细胞表面培养板中,共 9 孔,分为对照组和 0.5、1 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组,加入含对应药物的破骨诱导分化完全培养基继续培养 2 d。最后使用 5% 次氯酸钠清洗孔板,去除黏附的细胞,并用双蒸水清洗 2 次。倒置显微镜下观察骨板的骨吸收情况并拍照,通过 Image J 软件进行骨吸收相对面积的计算,相对骨吸收面积=结晶涂层吸收区域面积/同一视野下的总面积。

1.3.6 BMMs 破骨分化过程中核心转录因子活化 T-细胞核因子 1(nuclear factor of activated T cells c1, NFATc1) 及相关特征基因耐酒石酸酸性磷酸酶(acid phosphatase 5, tartrate resistant, ACP5)、破骨细胞相关受体(osteoclast associated receptor, OSCAR)、组织蛋白酶 K(cathepsin K, CTSK)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9) mRNA 表达水平检测 采用 qRT-PCR 法。将 BMMs 按 40×10^4 细胞/孔的密度接种于 6 孔板中,过夜贴壁后,将培养基更换为含对应药物的破骨诱导分化完全培养基,进行破骨诱导,隔天换液。6 d 后吸去各个培养孔中的培养基,用预冷的 PBS 冲洗 1 次后每孔加入 500 μl 总 RNA 提取试剂,置于冰上按说明书提取细胞总 RNA。RNA 样品使用 RNA/DNA 紫外可见光度法定量测定浓度,然后使用 cDNA 第一链合成试剂盒逆转录合成 cDNA(1 μg RNA,使用 20 μl 逆转录体系,反应结束后使用双蒸水稀释至 100 μl 备用)。后续 qPCR 所用引物序列如下: NFATc1 上游: 5'-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3', 下游: 5'-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3'; ACP5 上游: 5'-TGTGGCCATCTTTATGCT-3', 下游: 5'-GTCATTTCTTTGGGCTT-3'; OSCAR 上游: 5'-CTGCTGGTAACGGATCAGCTCCCAGA-3', 下游: 5'-CCAAGGAGCCAGAACTTCGAAACT-3'; CTSK 上游: 5'-ACGGAGGCATTGACTCTGAAGATG-3', 下游: 5'-GGAAGCACCAACGA-

GAGGAGAAAT-3'; MMP-9 上游: 5'-GTCCAGACCAAGGGTACAGC-3', 下游: 5'-ATACAGCGGGTACATGAGCG-3'; 18S 核糖体 RNA(18S ribosomal RNA, Rn18s) 上游: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3', 下游: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'。所使用的 qPCR 反应体系为 20 μl (SYBR Green 10 μl , cDNA 2 μl , 前后链引物 mix 0.5 μl , ddH₂O 7.5 μl), 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性,随后 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 变性,65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 扩增共循环 40 次。分析结果时,以 Rn18s 为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各个基因转录水平的相对表达量。

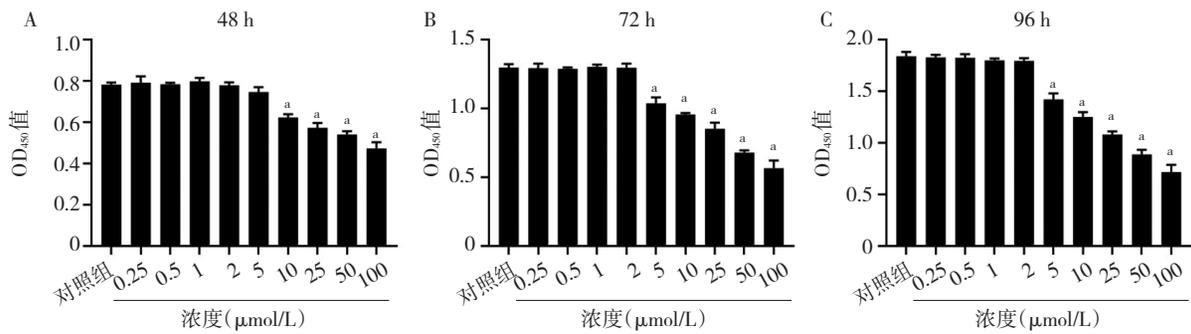
1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 萆萘酰胺对 BMMs 增殖的影响 在萆萘酰胺处理 BMMs 48 h 后,10 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组 OD₄₅₀ 值由对照组的 0.78 ± 0.01 降低至 0.62 ± 0.02 ($P < 0.01$); 72 h 后,5 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组 OD₄₅₀ 值由对照组的 1.30 ± 0.02 降低至 1.04 ± 0.04 ($P < 0.01$); 96 h 后,5 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组 OD₄₅₀ 值由对照组的 1.84 ± 0.04 降低至 1.42 ± 0.06 ($P < 0.01$),见图 1。CCK-8 实验提示,2 $\mu\text{mol/L}$ 及以下浓度的萆萘酰胺对 BMMs 增殖无明显毒性反应。

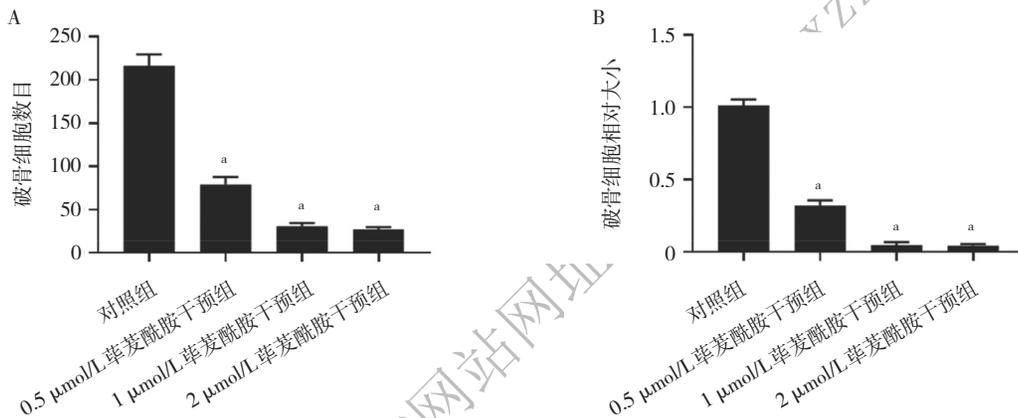
2.2 萆萘酰胺对破骨细胞分化的影响 对照组、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组、1 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组、2 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组经过 6 d 培养后,各组孔内细胞经固定、TRAP 染色,倒置显微镜下观察可见对照组中出现大量多核、肥大、煎饼样的成熟破骨细胞,而在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺处理下,成熟破骨细胞数目显著下降。与此同时,1 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组、2 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组中几乎只有极少量破骨细胞生成,见图 2(插页)。进一步统计分析显示,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组中 TRAP 阳性且细胞核数目 ≥ 3 个的破骨细胞数目由对照组的 (216.30 ± 13.20) 个降低至 (79.00 ± 8.72) 个 ($P < 0.01$),而 1 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组与 2 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组比较差异无统计学意义 [(30.67 ± 3.79) 个比 (27.00 ± 2.65) 个, $P > 0.05$]。与此同时,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组中破骨细胞相对大小由对照组的 1.00 ± 0.04 降低至 0.32 ± 0.04 ($P < 0.01$),见图 3。

2.3 萆萘酰胺对破骨细胞骨吸收能力的影响 对照组、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干预组、1 $\mu\text{mol/L}$ 萆萘酰胺干



注: BMMs 为骨髓来源单核巨噬细胞; OD₄₅₀ 为 450 nm 波长处吸光度; 与对照组比较, $^a P < 0.01$

图 1 萘苄酰胺对 BMMs 增殖的影响(A: 不同浓度萘苄酰胺处理 48 h 后对 BMMs 增殖的影响; B: 不同浓度萘苄酰胺处理 72 h 后对 BMMs 增殖的影响; C: 不同浓度萘苄酰胺处理 96 h 后对 BMMs 增殖的影响)



注: BMMs 为骨髓来源单核巨噬细胞; 与对照组比较, $^a P < 0.01$

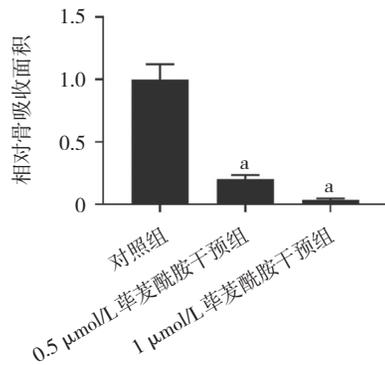
图 3 萘苄酰胺对 BMMs 破骨分化过程中细胞数目及相对大小的影响(A: 萘苄酰胺对成熟破骨细胞数目的影响; B: 萘苄酰胺对破骨细胞相对大小的影响)

预组分别在 Osteo Assay Surface 骨细胞表面培养板上进行骨吸收实验后, 对照组中可见大量破骨细胞进行骨吸收后形成透亮的骨吸收陷窝, 而在 0.5 μmol/L 萘苄酰胺处理下骨吸收数目明显减少, 而在 1 μmol/L 萘苄酰胺干预组中几乎仅有少量的骨吸收陷窝生成, 见图 4(插页)。进一步统计分析显示, 与对照组的 1.00 ± 0.12 比较, 0.5 μmol/L 萘苄酰胺干预组中相对骨吸收面积降低至 0.20 ± 0.03 ($P < 0.01$), 而在 1 μmol/L 萘苄酰胺干预组中仅为 0.04 ± 0.01 ($P < 0.01$), 见图 5。

2.4 萘苄酰胺对 BMMs 破骨分化过程中核心转录因子及特征基因 mRNA 表达水平的影响 在萘苄酰胺处理后, 与对照组比较, 0.5 μmol/L 萘苄酰胺干预组和 1 μmol/L 萘苄酰胺干预组破骨分化核心转录因子 NFATc1 和特征基因 ACP5、OSCAR、CTSK、MMP-9 mRNA 表达水平均下调(均 $P < 0.01$), 见图 6。

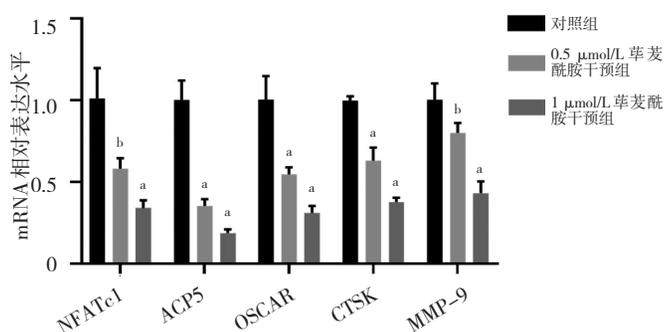
3 讨论

目前骨质疏松症的预防主要为调整生活方式、补充钙剂和维生素 D, 其治疗主要集中在抑制破骨细胞介导的骨吸收和(或)促进成骨细胞介导的骨形成。双膦酸盐、降钙素、雌激素受体调节剂(雷洛昔芬)、雌激素治疗、甲状旁腺素类似物(特立帕肽)及 RANKL 单抗(狄诺塞麦)等抗骨质疏松药物均有不同的适应证、用法、用量、不良反应, 且部分药物价格较高而难以被广泛应用^[6-7]。破骨细胞主要来自于血系单核/巨噬细胞系统, 其作为体内唯一具有骨吸收作用的终末分化细胞, 在骨发育、骨塑性、骨折修复、骨稳态中均发挥着至关重要的作用。破骨前体细胞在 M-CSF、RANKL 刺激下, MAPKs (p38、Erk1/2、JNK)、NF-κB、Akt/Src、PLCγ/Ca²⁺ 等大量信号通路激活, 共同促进下



注:与对照组比较, $^*P < 0.01$

图5 苜蓿酰胺对破骨细胞骨相对骨吸收面积的影响



注: BMMs 为骨髓来源单核巨噬细胞; NFATc1 为活化 T-细胞核因子 1; ACP5 为耐酒石酸酸性磷酸酶; OSCAR 为破骨细胞相关受体; CTSK 为组织蛋白酶 K; MMP-9 为基质金属蛋白酶-9; 与对照组比较, $^*P < 0.05$, $^bP < 0.01$

图6 苜蓿酰胺对 BMMs 破骨分化过程中核心转录因子及特征基因 mRNA 表达水平的影响

游转录因子 NFATc1 的活化,这一过程在破骨细胞分化、成熟中发挥着重要作用^[8]。破骨细胞的过度激活及伴随骨吸收功能的过度活化是骨质疏松、假体周围骨溶解、肿瘤骨破坏、废用性骨丢失等疾病发生、发展过程中的核心致病机制^[9]。临床上目前广泛应用的抗骨质疏松药物中,以狄诺塞麦为代表的 RANKL 单抗可直接靶向抑制 RANKL 与破骨前体细胞膜上 NF- κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK) 结合,双磷酸盐 (如阿仑膦酸、唑来膦酸等) 可通过骨表面的羟基磷灰石结合进而被破骨细胞吸收,发挥抑制其骨吸收活性并促进破骨细胞凋亡的作用^[10]。除此以外,大量小分子化合物可直接作用于 RANKL/RANK 下游信号通路的活化,发挥抑制破骨细胞分化、减少其骨吸收功能,进而缓解骨量丢失^[11]。

本研究所聚焦的药物单体苜蓿酰胺具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化和降血脂等药理作用^[4]。其中,苜蓿酰胺

可通过上调过氧化物酶 4 (peroxiredoxin 4, PRDX4) 的表达促进胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的累积,引起胶质瘤细胞凋亡^[12]。苜蓿酰胺也可通过增加肿瘤细胞内 ROS 水平,激活下游抑癌基因 p53 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cysteine aspartic protease, Caspase) 依赖性途径,抑制人胃癌 MKN45 细胞增殖并促进其细胞凋亡^[13]。在苜蓿酰胺处理下,三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 迁移和侵袭能力降低,与上皮-间充质细胞转化密切相关的 MMP-2 和 MMP-9 表达降低,并且可抑制转化生长因子 β 诱导的转录因子 ZEB1 和 SNAI2 表达^[14]。本研究显示 $2 \mu\text{mol/L}$ 及以下浓度的苜蓿酰胺对 BMMs 增殖无明显抑制作用,并且 TRAP 染色提示在 $1 \mu\text{mol/L}$ 苜蓿酰胺干预下几乎无成熟破骨细胞分化,骨吸收能力检测表明在 $1 \mu\text{mol/L}$ 苜蓿酰胺干预下破骨细胞骨吸收能力显著减弱。在机制探索层面上,本研究揭示了苜蓿酰胺可浓度依赖性地抑制 RANKL 刺激下 BMMs 破骨分化过程中核心转录因子 NFATc1 在 mRNA 水平的表达,从而降低下游破骨相关特征基因 ACP5、OSCAR、CTSK、MMP-9 的转录,达到抑制破骨分化的作用。BMMs 作为破骨细胞的前体细胞,可在体外 50 ng/ml RANKL、 30 ng/ml M-CSF 等诱导因子的作用下分化成为成熟破骨细胞。其中 RANKL 作为破骨细胞功能维持的重要细胞因子,发挥着促进破骨细胞分化成熟、抑制其凋亡、增加其骨吸收活性等功能。目前研究已揭示在 RANKL 刺激下, BMMs 细胞内 MAPKs、NF- κ B、PI3K/Akt 等信号通路出现明显激活,可导致共同的下游核心转录因子 NFATc1 的扩增,并入核促进相关破骨细胞特征蛋白的转录表达,最终促进破骨细胞分化成熟^[15]。近年研究表明,破骨细胞对骨基质的吸收过程主要由无机成分的溶解和骨基质有机成分的消化所组成。首先,黏附于骨表面的破骨细胞将氢离子泵入亚破骨细胞室从而创造一个酸性微环境,增加骨矿物质的溶解度,导致骨矿物质释放并重新进入破骨细胞的细胞质。在去除矿物质后,胶原酶和明胶酶被分泌到亚破骨细胞隔室中,进一步消化和降解脱钙骨基质的胶原蛋白和其他有机成分,降解产物最终也被破骨细胞所吞噬^[16]。

综上所述,抑制破骨细胞的分化成熟及骨吸收功能对机体病理过程中骨量丢失的防治意义重大,本研究揭示了苜蓿酰胺对该过程的抑制作用。苜蓿酰胺的应用,可起到防治破骨细胞分化过度或功能活跃所导致的骨质疏松、假体周围骨溶解、肿瘤骨破坏等骨量丢失疾病,但尚需更进一步的机制研究及动物体

内实验结果论证。

4 参考文献

- [1] Reid IR, Billington EO. Drug therapy for osteoporosis in older adults[J]. *Lancet*, 2022, 399(10329):1080–1092. DOI:10.1016/S0140-6736(21)02646-5.
- [2] Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, et al. Postmenopausal osteoporosis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2:16069. DOI:10.1038/nrdp.2016.69.
- [3] 赵常红, 李世昌, 李沛鸿, 等. 调节破骨细胞功能的相关信号分子的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(9):1361–1365. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2021.09.022.
- [4] 谭丽娟, 刘雅倩, 闫洁, 等. 萆薢酰胺的合成、抗肿瘤机制及结构修饰的研究进展[J]. *中国药房*, 2021, 32(4):508–512. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2021.04.20.
- [5] 花京剩, 王石健, 刘恒芳. 萆薢酰胺通过激活 p38/Caspase-3/GS-DME 通路诱导胃癌细胞凋亡[J]. *江苏医药*, 2022, 48(3):217–221. DOI:10.19460/j.cnki.0253-3685.2022.03.001.
- [6] Langdahl BL. Overview of treatment approaches to osteoporosis[J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(9):1891–1906. DOI:10.1111/bph.15024.
- [7] Tański W, Kosiorowska J, Szymańska-Chabowska A. Osteoporosis – risk factors, pharmaceutical and non-pharmaceutical treatment[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(9):3557–3566. DOI:10.26355/eurev_202105_25838.
- [8] Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in osteoclast differentiation[J]. *J Bone Metab*, 2014, 21(4):233–241. DOI:10.11005/jbm.2014.21.4.233.
- [9] Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology[J]. *Histochem Cell Biol*, 2018, 149(4):325–341. DOI:10.1007/s00418-018-1636-2.
- [10] Chandra A, Rajawat J. Skeletal aging and osteoporosis: mechanisms and therapeutics[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7):3553. DOI:10.3390/ijms22073553.
- [11] 雷新环, 李芷嫣, 黄微星, 等. 冬凌草甲素抑制破骨细胞分化的机制研究[J]. *浙江医学*, 2018, 40(12):1299–1302, 后插 1. DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2018.40.12.2018-403.
- [12] 文远超, 余云湖, 付晓红, 等. 萆薢酰胺对胶质瘤细胞增殖影响[J]. *中国公共卫生*, 2017, 3:468–470. DOI:10.11847/zgggws2017-33-03-33.
- [13] 段超勤, 邓超, 邹晓平. 萆薢酰胺对人胃癌细胞株 MKN45 增殖、凋亡的影响及其机制研究[J]. *胃肠病学*, 2016, 21(2):69–74. DOI:10.3969/j.issn.1008-7125.2016.02.002.
- [14] Delaney LM, Farias N, Ghassemi Rad J, et al. The natural alkaloid piperlongumine inhibits metastatic activity and epithelial-to-mesenchymal transition of triple-negative mammary carcinoma cells[J]. *Nutr Cancer*, 2021, 73(11–12):2397–2410. DOI:10.1080/01635581.2020.1825755.
- [15] Udagawa N, Koide M, Nakamura M, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways[J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1):19–26. DOI:10.1007/s00774-020-01162-6.
- [16] Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle[J]. *Ann Clin Biochem*, 2018, 55(3):308–327. DOI:10.1177/0004563218759371.
- (收稿日期:2022-08-05)
(本文编辑:陈丽)
-
- (上接第 7 页)
- [73] Atalay YO, Aydin R, Ertugrul O, et al. Does bedside sonography effectively identify nasogastric tube placements in pediatric critical care patients?[J]. *Nutr Clin Pract*, 2016, 31(6):805–809. DOI:10.1177/0884533616639401.
- [74] Conlon TW, Kantor DB, Su ER, et al. Diagnostic bedside ultrasound program development in pediatric critical care medicine: results of a national survey[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2018, 19(11):e561–e568. DOI:10.1097/PCC.0000000000001692.
- [75] van Rijn RR, Stafrace S, Arthurs OJ, et al. Non-radiologist-performed point-of-care ultrasonography in paediatrics – European Society of Paediatric Radiology position paper[J]. *Pediatr Radiol*, 2021, 51(1):161–167. DOI:10.1007/s00247-020-04843-6.
- [76] Conlon TW, Yousef N, Mayordomo-Colunga J, et al. Establishing a risk assessment framework for point-of-care ultrasound[J]. *Eur J Pediatr*, 2022, 181(4):1449–1457. DOI:10.1007/s00431-021-04324-4.
- [77] Wong A, Robba C, Mayo P. Critical care ultrasound[J]. *Intensive Care Med*, 2022, 48(8):1069–1071. DOI:10.1007/s00134-022-06735-9.
- [78] Nti B, Lehmann AS, Haddad A, et al. Artificial intelligence-augmented pediatric lung POCUS: a pilot study of novice learners[J]. *J Ultrasound Med*, 2022, 41(12):2965–2972. DOI:10.1002/jum.15992.
- [79] Kornblith AE, Addo N, Dong R, et al. Development and validation of a deep learning strategy for automated view classification of pediatric focused assessment with sonography for trauma[J]. *J Ultrasound Med*, 2022, 41(8):1915–1924. DOI:10.1002/jum.15868.
- (本文由浙江省医学会推荐)
(收稿日期:2022-11-07)
(本文编辑:陈丽)