

# 断藤益母汤对破骨细胞 RANKL 信号通路及 MMP-9 的影响

蔡叙东<sup>1</sup>, 林昌松<sup>2\*</sup>, 潘东梅<sup>1</sup>, 李楠<sup>1</sup>, 姜玉宝<sup>1</sup>, 丘文宇<sup>1</sup>, 郭添枫<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

**[摘要]** **目的:**探讨断藤益母汤(DTYMD)对破骨细胞(OC)核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)受体活化因子配体(RANKL)信号通路及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的影响及其骨保护的作用机制。**方法:**通过诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立体外破骨细胞培养体系;设空白组,模型组,DTYMD(400,600,800,1 000 mg·L<sup>-1</sup>)组和甲氨蝶呤(2 mg·L<sup>-1</sup>)组,然后通过抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色对破骨细胞进行鉴定;细胞增殖检测(CCK-8)各组细胞生存率;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 RANKL 信号通路关键蛋白表达;酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组细胞 MMP-9 表达水平的变化。**结果:**TRAP 染色显示,与模型组相比,DTYMD 400,600 mg·L<sup>-1</sup>组融合细胞数量有所减少,但差异无统计学差异;DTYMD 800,1 000 mg·L<sup>-1</sup>组融合细胞数目显著减少( $P < 0.01$ )。CCK-8 结果显示,与模型组比较,DTYMD 600,800,1 000 mg·L<sup>-1</sup>组和甲氨蝶呤 2 mg·L<sup>-1</sup>组生存率明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。Western blot 结果显示,与模型组相比,DTYMD 1 000 mg·L<sup>-1</sup>组、甲氨蝶呤 2 mg·L<sup>-1</sup>组中 RANKL 蛋白表达有所下降( $P < 0.05$ )。DTYMD 各组中的 OPG 蛋白表达水平无明显变化。ELISA 结果显示,与模型组相比,DTYMD 各组及甲氨蝶呤组中的 MMP-9 表达水平均有所下降,且 DTYMD 质量浓度越高,下降越明显( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**断藤益母汤可能是通过下调 RANKL 和 MMP-9 的表达以及抑制破骨细胞的分化和增殖而起到骨保护作用。

**[关键词]** 断藤益母汤; 类风湿关节炎; 破骨细胞; 核转录因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体(RANKL); 基质金属蛋白酶-9(MMP-9)

**[中图分类号]** R22;R272;R285.5;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0068-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181023

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1011.003.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-09 13:24

## Effect of Duanteng Yimu Decoction on RANKL Signaling Pathway and MMP-9 in Osteoclasts

CAI Xu-dong<sup>1</sup>, LIN Chang-song<sup>2\*</sup>, PAN Dong-mei<sup>1</sup>, LI Nan<sup>1</sup>, JIANG Yu-bao<sup>1</sup>,  
QIU Wen-yu<sup>1</sup>, GUO Tian-feng<sup>1</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Duanteng Yimu decoction (DTYMD) on the expression of NF- $\kappa$ B receptor activator ligand (RANKL) pathway and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in osteoclasts and the mechanism of bone protection. **Method:** *In vitro* osteoclast culture system was established by inducing RAW264.7 macrophages. Blank group, model group, methotrexate group (2 mg·L<sup>-1</sup>) and DTYMD groups (400, 600, 800, 1 000 mg·L<sup>-1</sup>) were set up. The osteoblasts were identified by anti-tartaric acid phosphatase (TRAP) staining. The survival rate of each group was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method. The protein expression of RANKL signal pathway was detected by Western blot. The expression of MMP-9 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with model group, the number of fusion cells in

**[收稿日期]** 20170927(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81774262,81573930);广东省自然科学基金项目(2014A030313403,2017A030311009)

**[第一作者]** 蔡叙东,在读硕士,从事风湿病中医药研究,E-mail:1617213793@qq.com

**[通信作者]** \*林昌松,硕士,主任医师,从事风湿病中医药研究,E-mail:1617213793@qq.com

DTYMD 400, 600 mg·L<sup>-1</sup> concentration group decreased, but the difference was not statistically significant; the number of fusion cells was significantly decreased in DTYMD 800, 1 000 mg·L<sup>-1</sup> concentration groups ( $P < 0.01$ ). CCK-8 results showed significant decreases in survival rates of DTYMD (600, 800, 1 000 mg·L<sup>-1</sup>) and methotrexate (2 mg·L<sup>-1</sup>) compared with model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Western blot results showed that the protein expression of RANKL decreased in DTYMD 1 000 mg·L<sup>-1</sup> and methotrexate 2 mg·L<sup>-1</sup> groups ( $P < 0.05$ ) compared with model group. The protein expression of OPG in DTYMD group had no significant change. The results of ELISA showed that the expression of MMP-9 decreased in DTYMD concentration group and methotrexate group compared with the model group; and the higher the DTYMD concentration was, the more significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** DTYMD may protect bone cells by down-regulating the expressions of RANKL and MMP-9 and inhibiting the differentiation and proliferation of osteoclasts.

[**Key words**] Duanteng Yimu decoction; rheumatoid arthritis; osteoclast; NF- $\kappa$ B receptor activator ligand (RANKL); matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种临床最常见的关节炎之一,其病因与自身免疫失调密切相关<sup>[1-2]</sup>,以中老年女性为多见,好发于四肢中小关节,呈对称性分布,病程呈慢性进展性加剧,晚期可导致关节畸形,严重影响患者生活质量。RA 病理表现以关节炎症因子的过度表达、滑膜炎、滑膜细胞迁移浸润、血管翳形成为主,若不积极进行药物干预,可逐渐累及软骨及骨质,引发骨破坏,最终导致关节结构出现破坏而引起畸形、功能障碍<sup>[3]</sup>。RA 骨破坏的进展情况直接影响到患者的病程结局,尽可能地阻止、延缓骨破坏,是 RA 治疗中的重要目标。破骨细胞在维持人体正常骨量平衡方面发挥着关键的作用,参与了某些骨成分如 I 型胶原的形成过程,并可影响人体钙磷的水平以及表达某些与骨矿化有关的蛋白<sup>[4]</sup>。RA 的骨破坏与破骨细胞的过度激活具有直接的关系。人体正常骨平衡由破骨细胞和成骨细胞共同维持,而 RA 患者体内破骨细胞被过度活化,骨平衡被破坏,骨吸收增加,最终导致骨质流失<sup>[5-6]</sup>。破骨细胞的分化、成熟与核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 受体活化因子配体 (RANKL) 信号通路密切相关,RANKL 蛋白通过特异性结合破骨细胞前体细胞表面的受体 RANK,诱导单核的破骨细胞前体细胞分化成为成熟的多核破骨细胞,引发过度的骨吸收,最后导致骨侵蚀<sup>[7-8]</sup>。基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 属于 MMP 家族明胶酶的一种,在破骨细胞中有表达,与炎症及肿瘤的转移侵袭有关<sup>[9-10]</sup>,并且对破骨细胞成熟过程中相关基因通路有一定的影响<sup>[11]</sup>。

RA 属于中医“痹病”、“尪痹”范畴,导师林昌松教授在长期临床实践中不断探索,确定以“肝肾亏虚,风湿瘀阻”为 RA 的主要病机,并针对此病机,研

发出断藤益母汤。断藤益母汤由昆明山海棠、续断、益母草三味药组成,其中昆明山海棠祛风除湿,续断补益肝肾,益母草活血利湿消肿,可以在补益肝肾的同时,祛风除湿,攻补兼施,适宜于 RA 慢性病程中长期服用治疗。断藤益母汤在长期的临床应用中对 RA 疗效显著而明确<sup>[12]</sup>,基于以上 RANKL 通路和 MMP-9 与破骨细胞的密切关系及课题组前期实验研究发现断藤益母汤对 RA 患者具有骨质保护作用,并对破骨细胞的分化生成具有影响<sup>[13]</sup>,本实验旨在探讨断藤益母汤对 RANKL 通路及 MMP-9 的影响,以期能从细胞、分子层面揭示该方剂对 RA 患者骨保护的作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株药品与试剂** 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞株 (上海慧颖生物科技有限公司,编号 160231); 小鼠重组可溶性 RANKL, 巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF (美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 F1604, C2346); 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色试剂盒 (美国 Sigma 公司,批号 SLBQ6233V); 总蛋白提取试剂盒 (中国碧云天生物有限公司,批号 201608106); RANKL 抗体, 骨保护素 (OPG) 抗体 (杭州贤至生物科技有限公司,批号分别为 ABP53136, ABP52073); 羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G/HRP 二抗, 羊抗小鼠 IgG/HRP (武汉博士德生物公司,批号分别为 BA1055, BA1051);  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体 (美国 CST 公司,批号 3700); 细胞增殖检测 (CCK-8) 试剂盒 (日本同仁化学研究所,批号 FJ692); MMP-9 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司,批号 CSB-E08007m); 昆明山海棠 (广西玉林草本堂中药饮片有限公司,批号 1604009); 续断 (广东康美药业股份

有限公司,批号 170600489);益母草(广东省药材公司中药饮片厂,批号 189301)。由广州中医药大学第一附属医院药学部主任中药师唐洪梅鉴定,昆明山海棠为卫矛科植物昆明山海棠 *Tripterygium hypoglaucum* 的根,益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* 的干燥地上部分,续断为续断科植物川续断 *Dipsacus asper* 的干燥根。

**1.2 仪器** 3131 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱, Multiskan Mk3 型酶标仪(美国 Thermo 公司);IX70-S8F 型倒置相差显微镜,CX21BIM-SET5 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);Mini-PROTEAN Tetra 型垂直电泳仪及转移系统(美国 Bio-Rad 公司);ChemiDoc-ItTS3 型化学发光成像系统(美国 UVP 公司)。

## 2 方法

**2.1 断藤益母汤(DTYMD)冻干粉的制备** 分别取昆明山海棠-益母草-续断 3:2:1 加 10 倍量去离子水,常规煎煮得煎液,过滤 3 次,用旋转蒸发器浓缩,得断藤益母汤浓缩液。再用真空冷冻干燥机对浓缩液干燥得到断藤益母汤冻干粉。用磷酸盐缓冲液(PBS)配成质量浓度为 4 g·L<sup>-1</sup> 的药液,0.22 μm 无菌滤膜过滤得母液。

**2.2 TRAP 染色实验诱导 OC 细胞分化形成** 取 RAW264.7 巨噬细胞,分为空白组(细胞不做处理),模型组,DTYMD(400,600,800,1 000 mg·L<sup>-1</sup>)组和甲氨蝶呤(2 mg·L<sup>-1</sup>)组,按每组设 3 个平行孔,每孔 6 000 个细胞铺种于 96 孔板中。次日加入相应的刺激因子(50 ng·L<sup>-1</sup> RANKL + 25 ng·L<sup>-1</sup> M-CSF)和药物,按试剂盒说明书操作。

**2.3 CCK-8 法检测细胞生存率** 本次实验分为空白组(细胞不做处理),模型组,DTYMD(600,800,1 000 mg·L<sup>-1</sup>)组和甲氨蝶呤(2 mg·L<sup>-1</sup>)组。将 RAW264.7 巨噬细胞以 6 000 个/孔接种于 96 孔板,次日加入刺激因子和药物,分别干预 24,48,72 h 后,吸净原培养基,加入 CCK-8 工作液,37 ℃ 恒温培养箱孵育 2 h。在 450 nm 处检测吸光度 A,细胞生存率 =  $\Delta A_{\text{实验组}} / \Delta A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

**2.4 蛋白免疫印迹法检测 RANKL 信号通路相关蛋白表达** 实验分组同 2.3 项,加入刺激因子诱导,药物干预 24 h,收集上清液,1 万 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,按说明书配好溶液和凝胶,使用 BCA 法定量检测蛋白浓度;将蛋白样品煮沸变性,加到凝胶孔内电泳;将凝胶电转移至硝酸纤维素膜上。转膜结束后,将膜置于含 5% 脱脂奶粉中,常温孵育 2 h,洗膜,加入稀释后的一抗(1:1 000),孵育 2 h,加入稀

释后的二抗(1:2 500),孵育 1 h,洗膜;ECL 发光液孵育 5 min 显影。使用 Image J 软件分析各个条带的灰度值,最后进行统计分析。

**2.5 ELISA 检测 DTYMD 对 MMP-9 表达水平的影响** 实验分组同 2.3 项,加入刺激因子诱导,给药干预 24 h,提取上清液 1 万 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,将离心后的上清液转移至新的离心管中。按照试剂盒说明书操作,在酶联免疫检测仪 450 nm 处检测 A。

**2.6 统计学处理** 所有数据用 SPSS 20.0 统计软件处理,定量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多个样本均数比较采用 One-Way ANOVA 分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 DTYMD 对 OC 分化的影响** 与空白组相比,DTYMD(600,800 mg·L<sup>-1</sup>)组、模型组均可见明显的融合细胞(细胞核  $\geq 3$  个)形成,提示 OC 分化诱导成功,见图 1。从随机所拍视野中,每组随机选出 10 个视野,求得每个视野融合细胞的平均数,与模型组相比,DTYMD(400,600 mg·L<sup>-1</sup>)组融合细胞数量减少,但无统计学差异;DTYMD(800,1 000 mg·L<sup>-1</sup>)组融合细胞数目显著减少( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 DTYMD 对 OC 分化的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

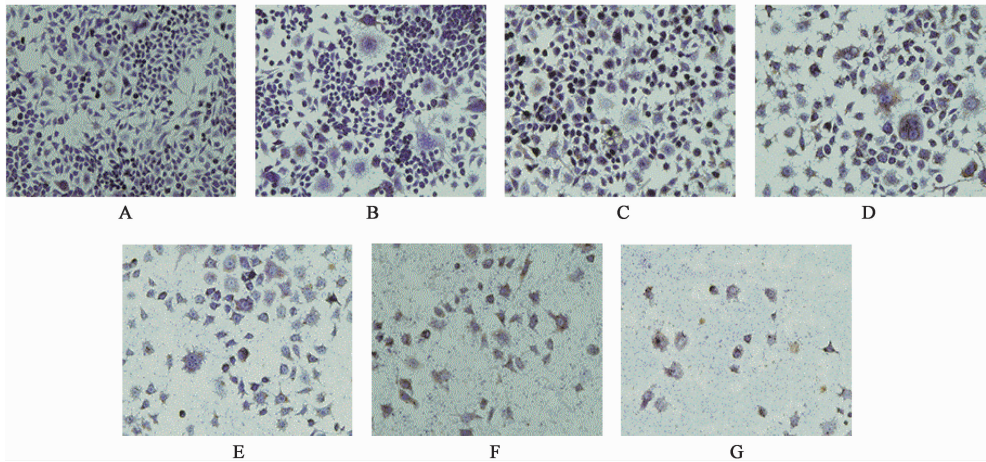
Table 1 Effect of DTYMD on OC differentiation( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	融合细胞/每视野/个
空白	-	-
模型	-	10.1 ± 3.3 <sup>1)</sup>
DTYMD	400	9.9 ± 2.7 <sup>2)</sup>
	600	7.9 ± 1.4 <sup>2)</sup>
	800	4.8 ± 1.4 <sup>1,2)</sup>
	1 000	0.6 ± 1.1 <sup>1,2)</sup>
MTX	2	0.6 ± 0.7 <sup>1,2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 DTYMD 对细胞生存率的影响** 与模型组比较,DTYMD(400 mg·L<sup>-1</sup>)组细胞生存率无明显降低,差异无统计学意义;DTYMD(600,800,1 000 mg·L<sup>-1</sup>)组和甲氨蝶呤(2 mg·L<sup>-1</sup>)组生存率均具有明显下降,且与药物浓度及干预时间相关,药物质量浓度越高,干预时间越久,下降越明显( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

**3.3 DTYMD 对 RANKL 蛋白表达的影响** 给药干预细胞 24 h 后,与模型组相比,DTYMD(1 000 mg·L<sup>-1</sup>)组、甲氨蝶呤(2 mg·L<sup>-1</sup>)组中 RANKL 蛋白表达量明显下降( $P < 0.05$ )。与模型



A. 空白组; B. 模型组; C ~ F. DTYMD(400, 600, 800, 1 000 mg·L<sup>-1</sup>) 组; G. 甲氨蝶呤 2 mg·L<sup>-1</sup> 组

图 1 DTYMD 对 OC 分化的影响(倒置显微镜, ×100)

Fig. 1 Effect of DTYMD on OC differentiation(inverted microscope, ×100)

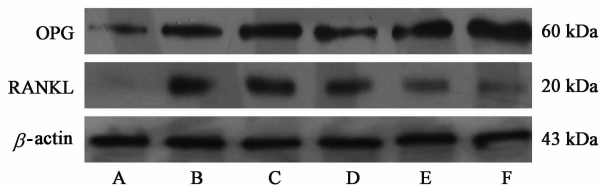
表 2 DTYMD 对细胞生存率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of DTYMD on cell viability rate( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	24 h	48 h	72 h
模型	-	97 ± 0.09	1.09 ± 0.14	101 ± 4.0
DTYMD	400	97.0 ± 6.0	95.0 ± 6.0	95.0 ± 1.0
	600	88.0 ± 6.0	77.0 ± 9.0 <sup>1)</sup>	86.0 ± 3.0 <sup>2)</sup>
	800	76.0 ± 1.6 <sup>1)</sup>	68.0 ± 12.0 <sup>2)</sup>	56.0 ± 4.0 <sup>2)</sup>
	1 000	70.0 ± 1.3 <sup>2)</sup>	44.0 ± 11.0 <sup>2)</sup>	64.0 ± 3.0 <sup>2)</sup>
MTX	2	57.0 ± 8.0 <sup>2)</sup>	41.0 ± 8.4 <sup>2)</sup>	53.0 ± 6.0 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 3 同)。

组相比,DTYMD 各组中的 OPG 蛋白表达水平无明显上升或下降,甲氨蝶呤组中 OPG 蛋白表达显著上升( $P < 0.01$ )。见图 2,表 3。



A. 空白组; B. 模型组; C ~ E. DTYMD(600, 800, 1 000 mg·L<sup>-1</sup>) 组; F. 甲氨蝶呤(2 mg·L<sup>-1</sup>) 组

图 2 RANKL 信号通路相关 OPG, RANKL 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of OPG, RANKL signaling pathway-associated protein expressions

**3.4 DTYMD 对 MMP-9 表达水平的影响** 与空白组比较,模型组 MMP-9 表达水平显著增加( $P < 0.01$ )。与模型组相比,DTYMD 各组及甲氨蝶呤组中的 MMP-9 表达水平均有所下降,且 DTYMD 质量浓度越高,下降越明显( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4。

表 3 DTYMD 对 RANKL 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of DTYMD on RANKL protein expression( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	RANKL/β-actin	OPG/β-actin
模型	-	1.0	1.0
DTYMD	600	0.90 ± 0.08	1.11 ± 0.12
	800	0.75 ± 0.09	0.94 ± 0.05
	1 000	0.54 ± 0.14 <sup>1)</sup>	1.04 ± 0.07
MTX	2	0.45 ± 0.24 <sup>2)</sup>	1.64 ± 0.22 <sup>2)</sup>

表 4 DTYMD 对 MMP-9 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of DTYMD on expression of MMP-9( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	MMP-9 /μg·L <sup>-1</sup>
空白	-	1.22 ± 0.18
模型	-	31.26 ± 4.96 <sup>1)</sup>
DTYMD	600	8.47 ± 2.47 <sup>1,2)</sup>
	800	19.53 ± 2.06 <sup>1,2)</sup>
	1 000	10.67 ± 2.57 <sup>1,3)</sup>
MTX	2	5.90 ± 1.24 <sup>1,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

破骨细胞是骨代谢过程中的关键细胞。在 RA 发病过程中它被过度激活而导致骨吸收增多,骨平衡被破坏<sup>[5]</sup>。很多促炎细胞因子如白细胞介素(IL)-1, IL-6, IL-17, 肿瘤坏死因子-α 以及 RANKL 等都可以通过激活破骨细胞而加剧 RA 骨侵蚀<sup>[6]</sup>。因此抑制破骨细胞的分化及活性可以有效减缓骨破坏进程。本次实验结果显示,DTYMD(800,

1 000 mg·L<sup>-1</sup>)组 TRAP 染色阳性细胞数目显著减少,提示当 DTYMD 浓度达到一定水平后,可以有效抑制 OC 的分化。DTYMD(600,800,1 000 mg·L<sup>-1</sup>)组和甲氨蝶呤(2 mg·L<sup>-1</sup>)组生存率均具有明显的降低,提示一定浓度的 DTYMD 可以明显抑制 OC 的增殖。

RANKL 在 RA 骨破坏过程中发挥着关键的作用,其主要由滑膜成纤维细胞和 T 细胞分泌,而引起 RA 骨破坏的主要是滑膜成纤维细胞分泌的 RANKL。相关研究发现,抑制滑膜成纤维细胞 RANKL 的表达后,可以观察到小鼠关节内 TRAP 染色阳性的破骨细胞明显减少<sup>[14]</sup>。敲除 RANKL 基因的 RA 模型小鼠或经过 RANKL 抑制剂处理后的 RA 模型小鼠,其骨质可免于骨侵蚀的损害<sup>[15]</sup>。由此可见,RANKL 与 RA 骨侵蚀及破骨细胞均具有十分密切的关系。RANKL 是诱导破骨细胞生成的关键细胞因子<sup>[16]</sup>,它通过特异性地结合破骨细胞前体细胞表面的 RANK 受体,诱导破骨细胞前体单核细胞分化成为成熟的多核破骨细胞,增加骨吸收,从而引发骨破坏<sup>[7]</sup>。与 RANKL 作为 RA 骨破坏关键因子相反的是骨保护素(OPG),可以与 RANKL 结合,竞争性地抑制 RANKL 与 RANK 的结合,从而起到骨保护作用<sup>[17]</sup>。在人体正常骨代谢过程中,体内的 RANKL 和 OPG 水平处于比例平衡状态,所以能保持骨质的正常代谢。如果此平衡被打破,如 RANKL 表达占优势或 OPG 水平异常降低,都会导致骨代谢系统失衡,破骨细胞被过度激活,发生骨破坏<sup>[8,18]</sup>。因此,RANKL/OPG 系统的稳定是维持人体骨平衡的重要保障。RA 发病过程中很多炎症因子都是通过直接或间接地影响 RANKL/OPG 系统而造成骨破坏<sup>[19]</sup>。RANKL 通路的发现为 RA 的治疗提供了新的靶点,目前已有药物如狄诺塞麦用于治疗绝经后妇女骨质疏松症,并取得相当的疗效<sup>[20-22]</sup>,这从临床上验证了以 RANKL 通路作为药物靶点用于治疗 RA 导致的骨破坏的理论推导是可行的。蛋白免疫印迹结果显示,与模型组相比,DTYMD(1 000 mg·L<sup>-1</sup>)组、甲氨蝶呤(2 mg·L<sup>-1</sup>)组中 RANKL 蛋白表达量有所下降,提示一定质量浓度的 DTYMD 可以有效降低 RANKL 表达水平。DTYMD 各组中的 OPG 蛋白表达水平无明显上升或下降,提示断藤益母汤对 OPG 蛋白的表达无明显影响。

此外,据相关研究报道,MMP-9 与炎症因子关系密切,当 MMP-9 表达被抑制之后,炎症因子 IL-1 $\beta$ ,IL-6,IL-8 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  的表达均有所

下降,并且滑膜成纤维细胞介导的软骨破坏也被抑制<sup>[23]</sup>。同时有研究表明,血清 MMP-9 水平也与绝经后妇女骨质疏松症相关,绝经后女性骨密度越低,其血清 MMP-9 水平则越高<sup>[24]</sup>。因此,降低 MMP-9 的表达水平也可能是药物减缓 RA 骨破坏的机制之一。ELISA 结果显示,与模型组相比,DTYMD(600,800,1 000 mg·L<sup>-1</sup>)组及甲氨蝶呤组中的 MMP-9 表达水平均有所下降,且 DTYMD 浓度越高,下降越明显,提示 DTYMD 能显著降低 MMP-9 的表达水平。

综上,DTYMD 能通过抑制破骨细胞的分化和增殖并下调 RANKL 和 MMP-9 的表达水平而起到骨保护作用。

#### [参考文献]

- [1] Jose P L, Juan C D. Immunopathology of rheumatoid arthritis [J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13 (6): 705-711.
- [2] Catrina A I, Joshua V, Klareskog L, et al. Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2016, 269 (1): 162-174.
- [3] Boissier M C, Semerano L, Challal S, et al. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction [J]. *J Autoimmun*, 2012, 39 (3): 222-228.
- [4] Corrado A, Maruotti N, Cantatore F P. Osteoblast role in rheumatic diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (6): 1272-1284.
- [5] Walsh N C, Gravalles E M. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233 (1): 301-312.
- [6] Baum R, Gravalles E M. Bone as a target organ in rheumatic disease: impact on osteoclasts and osteoblasts [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016, 51 (1): 1-15.
- [7] Tanaka S, Nakamura K, Takahashi N, et al. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system [J]. *Immunol Rev*, 2005, 208 (6): 30-49.
- [8] Ruyssen-Witrand A, Degboe Y, Cantagrel A, et al. Association between RANK, RANKL and OPG polymorphisms with ACPA and erosions in rheumatoid arthritis: results from a Meta-analysis involving three French cohorts [J]. *Rmd Open*, 2016, 2 (2): 226-230.
- [9] 闫训友,薛冲,刘志敏,等. 基质金属蛋白酶及其组织抑制剂研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2004, 15 (3): 302-305.
- [10] 刘加强,杨富生. 关于基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的最新进展 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2005 (3): 168-171.

- [11] Kim K, Punj V, Kim J M, et al. MMP-9 facilitates selective proteolysis of the histone H3 tail at genes necessary for proficient osteoclastogenesis [J]. *Genes Dev*, 2016, 30(2):208-219.
- [12] 林昌松, 梁江, 刘风震, 等. 断藤益母汤治疗类风湿关节炎的临床疗效观察 [J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29(6):632-637.
- [13] 林昌松, 陈秀敏, 林云斌, 等. 昆母汤对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖及 RANKL/骨保护素系统的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(18):2955-2957.
- [14] Danks L, Komatsu N, Guerrini M M, et al. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(6):1187-1195.
- [15] Pettit A R, Ji H, von Stechow D, et al. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(5):1689-1699.
- [16] Lorenzo J. The many ways of osteoclast activation [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(7):2530-2532.
- [17] Silva I, Branco J C. Rank/Rankl/opg; literature review [J]. *Acta Reumatol Port*, 2011, 36(3):209-218.
- [18] Shimamura M, Nakagami H, Osako M K, et al. OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(22):8191-8196.
- [19] Walsh N C, Crotti T N, Goldring S R, et al. Rheumatic diseases; the effects of inflammation on bone [J]. *Immunol Rev*, 2005, 208(4):228-251.
- [20] Anandarajah A P, Schwarz E M. Anti-RANKL therapy for inflammatory bone disorders; mechanisms and potential clinical applications [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(2):226-232.
- [21] Lacey D L, Boyle W J, Simonet W S, et al. Bench to bedside; elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(5):401-419.
- [22] 张程程, 季青, 杨越, 等. 肺岩宁方调控 TGF- $\beta$  介导的骨转移相关 PTHrP/RANKL 信号通路抗肺癌侵袭转移 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(3):132-136.
- [23] XUE M, McKelvey K, SHEN K, et al. Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation [J]. *Rheumatology: Oxford*, 2014, 53(12):2270-2279.
- [24] 秦健, 杨乃龙. 绝经后妇女血清基质金属蛋白酶-9 和基质金属蛋白酶抑制因子-1 与骨密度的关系 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14(4):245-248.

[责任编辑 张丰丰]