

· 药理 ·

青蒿素及其衍生物对破骨细胞分化作用的比较分析

吴宣^{1,2}, 苏晓慧², 孟翔鹤², 王鑫², 孔祥英^{2*}, 林娜^{1,2*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:比较青蒿素及其衍生物双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯对破骨细胞诱导分化能力以及相关通路的调控作用。方法:经核转录因子- κ B(NK- κ B)受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)诱导小鼠骨髓巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMMs)向破骨细胞分化,给予不同浓度的青蒿素、双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯作用后,通过抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色观察 TRAP 阳性多核细胞的形成,实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测 TRAP,基质金属蛋白酶-9(MMP-9),组织蛋白酶-K(cathepsin K, Cts-K) mRNA 表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)及 p65 蛋白表达。结果:RANKL 可成功诱导出 TRAP 阳性的多核细胞,提高破骨细胞主要调控因子 TRAP, MMP-9 和 Cts-K mRNA 以及 TRAF6 和 p65 蛋白表达水平。青蒿素、双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯均可显著降低 RANKL 诱导后异常增加的破骨细胞数、破骨细胞核数和破骨细胞直径($P < 0.05$, $P < 0.01$),青蒿素可明显降低 TRAP mRNA 表达水平($P < 0.01$),双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯可显著下调 TRAP, MMP-9 和 Cts-K mRNA 表达水平(均 $P < 0.01$),以蒿甲醚及青蒿琥酯作用较佳;此外,青蒿素及其衍生物也可以明显抑制 RANKL 诱导后异常增高的 TRAF6 和 p65 蛋白表达,其中青蒿琥酯的作用最显著($P < 0.01$)。结论:青蒿素及其衍生物均具有抑制由 RANKL 诱导的小鼠 BMMs 向破骨细胞分化的作用,且相关作用可能与下调 TRAP, MMP-9 和 Cts-K 基因表达,抑制破骨细胞分化通路主要因子 TRAF6/NF- κ B 的活化有关;相同浓度下蒿甲醚和青蒿琥酯的作用比青蒿素和双氢青蒿素略强。

[关键词] 青蒿素及其衍生物; 破骨细胞; 细胞分化; 核转录因子- κ B 受体活化因子配体 (RANKL)

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R274.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0084-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040084

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1507.022.html>

[网络出版时间] 2017-11-25 15:07

Effect of Artemisinin and Artemisinin Derivatives in Differentiating Osteoclasts

WU Xuan^{1,2}, SU Xiao-hui², MENG Xiang-he², WANG Xin², KONG Xiang-ying^{2*}, LIN Na^{1,2*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of artemisinin, dihydroartemisinin, artesunate and artemether on osteoclasts differentiation, and investigate relevant signaling pathways. **Method:** Osteoclast differentiation was induced by receptor activator of nuclear factor- κ B (NK- κ B) ligand (RANKL) in bone marrow-derived macrophages (BMMs). After different concentrations of artemisinin, dihydroartemisinin, artemether and artesunate were treated, tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) -positive multinucleated cells were observed by TRAP staining. TRAP, MMP-9 and cathepsin-K (Cts-K) mRNA expressions were detected by Real-time PCR, and TRAF6 and p65 protein expressions were detected by Western blot. **Result:** TRAP-positive multinucleated

[收稿日期] 20170914(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703787,81274167)

[第一作者] 吴宣,在读硕士,从事中药药理研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: wuxuan1085@163.com

[通信作者] *林娜,博士,研究员,博士生导师,从事药性理论研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: linna888@163.com;

*孔祥英,博士,副研究员,从事中药药理研究, E-mail: kongu0051@163.com

cells were successfully induced by RANKL, and TRAP, MMP-9 and Cts-K mRNA expressions, TRAF6 and p65 protein expression were significantly increased after treatment with RANKL. Importantly, artemisinin, dihydroartemisinin, artemether and artesunate could significantly reduce the number, nuclei and diameter of osteoclasts after induction with RANKL ($P < 0.05$, $P < 0.01$), artemisinin obviously reduced TRAP mRNA expression ($P < 0.01$), dihydroartemisinin, artemether and artesunate significantly down-regulated the mRNA expressions of TRAP, MMP-9 and Cts-K ($P < 0.01$), and artemether and artesunate had a better therapeutic effect. In addition, the abnormal increase of TRAF6 and p65 proteins were obviously suppressed by artemisinin and artemisinin derivatives after induction with RANKL, and the results demonstrated that artesunate was the best one ($P < 0.01$). **Conclusion:** Artemisinin and artemisinin derivatives could inhibit the effect of mouse BMMs in differentiating osteoclasts, which may be related to the down-regulation of TRAP, MMP-9 and Cts-K gene expressions, and the inhibition of TRAF6/NF- κ B activation. The effect of artemether and artesunate is better than that of artemisinin and dihydroartemisinin at the same concentration.

[**Key words**] artemisinin and artemisinin derivative; osteoclast; cell differentiation; receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)

类风湿性关节炎 (RA) 是一种病因未明的以关节破坏为主的慢性、全身性的免疫系统疾病。关节周围的软骨破坏和骨质侵蚀是 RA 的主要病理特征,也是 RA 患者致残的主要原因之一。最近研究表明破骨细胞在骨侵蚀中起着核心作用^[1],在此过程中,肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 的激活与破骨细胞特异性基因 [包括抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP), 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 和组织蛋白酶-K (Cts-K) 等] 的表达是其发挥功能的重要组成部分。因此,调控破骨细胞的形成和活化进而改善骨破坏成为缓解 RA 病情进展的关键。

青蒿为菊科植物黄花蒿的地上部分,其味苦、性寒,入肝、胆经,具有清热除湿之功,可用于湿热痹证治疗^[2]。青蒿的有效成分主要为青蒿素 (ART),青蒿素的还原产物为双氢青蒿素 (DHA),其可以合成 2 种衍生物,即蒿甲醚 (ARM) 和青蒿琥酯 (ARS)。近年研究发现除抗疟作用外,青蒿素及其衍生物还具有抗 RA 作用,尤其具有改善 RA 骨破坏作用,但机制仍不清楚^[3-6]。本研究利用核转录因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 诱导小鼠骨髓巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMMs) 向破骨细胞分化的体系,观察比较青蒿素及其衍生物对破骨细胞分化作用的差异以及对相关通路的调控作用,为 RA 及其他骨破坏相关性疾病的药物研发提供实验支持。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6J 雄性小鼠 20 只,体质量 20 ~

23 g,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,清洁级,合格证号 SCXK(京)2014-0004。本研究获得中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准 [中药科服字 (2013) D12]。

1.2 药物及试剂 青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯 (上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 O13F8K29065, Z30N6L6745, O22D5K1); 双氢青蒿素 (重庆华方武陵山制药有限公司,批号 C00220141201); α -MEM 培养基 (美国通用电气公司,批号 AB212879); 胎牛血清 (德国 PAN Biotech 公司,批号 P15047); 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司,批号 J160002); M-CSF, sRANKL (美国 Peprotech 公司,批号分别为 #0914245, #0112233); 红细胞裂解液 (美国 Solarbio 公司,批号 20170328); trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司,批号 94604); 逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司,批号 00425005); 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色试剂盒 (美国 Sigma 公司,批号 SLBM2502V); 兔抗鼠 TRAF6 抗体,兔抗鼠 p65 抗体 [圣克鲁斯生物技术 (上海) 有限公司,批号分别为 sc-7221, sc-7151]; 兔抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (英国 Abcam 公司,批号 ab-181602); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 08H04A02)。小鼠 TRAP 引物序列 (121 bp): 上游 5'-GCAGTATCTTCAGGACGAGAAC-3', 下游 5'-TCCATAGTGAAACCGCAAGTAG-3'; MMP-9 引物序列 (80 bp): 上游 5'-GCCGACTTTTGTGGTCTTCC-3', 下游 5'-GGTACAAGTATGCCTCTGCCA-3'; Cts-K 引物序列 (85 bp): 上游 5'-CAGCAGAACGGAGCC

ATTGA-3', 下游 5'-CCTTTGCCGTGGCG TTATAC-3'; GAPDH 引物序列 (95 bp): 上游 5'-AGGTCC GTGTGAACGGATTTG-3', 下游 5'-GGGGTCGTTGA TGGCAACA-3', 均由 Life Technologies 公司合成。

1.3 仪器 MK3 型全自动酶标仪, ABI7500 型荧光定量 PCR 仪 (Thermo 公司); TD5A-WS 型低速台式离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); XDS-1B 型倒置显微镜 (重庆光电仪器有限公司); 371 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); CKX31 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); MK3 型全自动酶标仪 (美国 Thermo 公司); Powerpac™ Basic 型电泳仪, Mini Trans-Blot® Cell 型转移电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); Fusion FX5 型凝胶成像仪 (法国 Vilber 公司); WD-9405B 型摇床 (上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法

2.1 BMMs 的分离与诱导培养 将小鼠脱颈处死, 75% 乙醇消毒后, 分离股骨和胫骨, 剪开干骺端, 用 5 mL 无菌注射器吸取无血清 α -MEM 培养液冲洗骨髓腔 3~4 次, 至内面发白。加入红细胞裂解液裂解红细胞。经磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤后, 加入质量浓度 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ M-CSF 诱导, 3 d 后分别以 2×10^5 个/mL 密度接种到 24 孔板, 96 孔板或培养皿中用于不同的实验。破骨细胞诱导方法为 BMMs 用含质量浓度 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ M-CSF 及质量浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RANKL 的 α -MEM 完全培养基进行诱导培养, 隔天换液, 正常组不加 RANKL。

2.2 TRAP 染色观察破骨细胞分化及成熟度 取小鼠 BMMs 种于 24 孔板, 每组设 3 复孔。实验分组为空白组, RANKL + M-CSF 诱导组, 以及不同药物处理组, 即在 RANKL + M-CSF 诱导的基础上, 分别给予 3 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青蒿素、双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯。按 2.1 项中诱导破骨细胞方法诱导 6 d 后, 细胞用丙酮/柠檬酸盐固定 7 min, 按照 TRAP 染色试剂盒步骤进行染色后, 于倒置显微镜下观察 TRAP 阳性多核破骨细胞 (核 ≥ 3 个)。统计阳性细胞数、细胞核数目以及平均细胞直径。

2.3 实时荧光定量 PCR 法 (Real-time PCR) 检测破骨细胞相关基因表达 取小鼠 BMMs 种于 35 mm 培养皿中, 按照 2.2 项中的分组以及破骨细胞诱导方法诱导 6 d 后, 用 trizol 抽提细胞总 RNA, 用超微量紫外分光光度法测定总 RNA 的纯度及浓度。按照逆转录试剂盒步骤将总 RNA 逆转录成 cDNA, 并经 PCR 进行扩增。PCR 反应程序条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 10 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 延

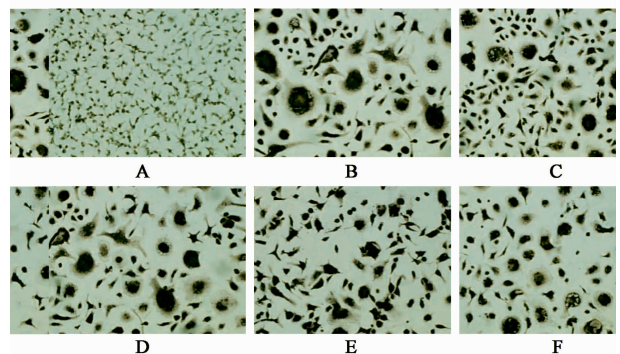
伸 1 min, 共 40 个循环; $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 至反应结束。按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算待测基因的相对表达。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测破骨细胞活化调控因子 TRAF6 及 p65 蛋白表达 取小鼠 BMMs 种于 6 孔板, 分别加入 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青蒿素、双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯孵育 2 h 后, 加入 RANKL ($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 24 h, 收集细胞, 提取蛋白; 同法加入 RANKL ($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 0.5 h, 收集细胞, 上述细胞分别提取蛋白, 湿法电泳转移至 PVDF 膜, 用脱脂奶粉封闭, 分别加入 TRAF6 (1:500), p65 (1:500) 和 GAPDH (1:10 000) 一抗, 后加入相应二抗 (1:3 000), 用多色荧光及活体成像系统显影, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 最终以目的蛋白与 GAPDH 的比值来评价蛋白表达水平的强弱。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 数据软件进行统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 青蒿素及其衍生物对破骨细胞分化以及成熟度的影响 正常小鼠 BMMs 诱导培养 6 d 后进行 TRAP 染色, 可见大小相对均一的单核巨噬细胞, 而经 RANKL 诱导后, 出现大量 TRAP 阳性的多核细胞 (核 ≥ 3 个), 其体积显著增大, 胞浆呈现明显的酒红色, 胞膜边界不整, 周边可见伪足伸展。加入 $3, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的青蒿素、双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯后, 破骨细胞的 TRAP 阳性细胞数显著减少, 细胞核数目以及细胞的平均直径也明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其中蒿甲醚及青蒿琥酯的统计学结果最显著。见图 1, 表 1。



A. 空白组; B. 诱导组; C. 青蒿素组 ($3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); D. 双氢青蒿素组 ($3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); E. 蒿甲醚组 ($3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); F. 青蒿琥酯组 ($3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (图 2 同)

图 1 青蒿素及其衍生物对破骨细胞分化的影响 (TRAP, $\times 400$)
Fig. 1 Effect of artemisinin and artemisinin derivatives on osteoclast differentiation (TRAP, $\times 400$)

表 1 青蒿素及其衍生物对破骨细胞形成和成熟度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of artemisinin and artemisinin derivatives on osteoclast formation and maturation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	每孔 TRAP ⁺ 阳性细胞数/个	破骨细胞核数/个	平均细胞直径/ μm
空白	-	-	-	-
诱导	-	383.67 \pm 29.16 ¹⁾	10.67 \pm 2.65 ¹⁾	78.21 \pm 15.69 ¹⁾
ART	3	289.67 \pm 36.61 ²⁾	8.29 \pm 1.38 ²⁾	63.59 \pm 6.64 ³⁾
	10	259.33 \pm 34.08 ³⁾	8.00 \pm 1.15 ²⁾	61.43 \pm 4.16 ³⁾
DHA	3	206.67 \pm 40.41 ³⁾	6.71 \pm 1.25 ³⁾	47.43 \pm 7.44 ³⁾
	10	193.33 \pm 37.86 ³⁾	6.14 \pm 0.69 ³⁾	45.71 \pm 5.82 ³⁾
ARM	3	108.67 \pm 33.84 ³⁾	3.14 \pm 0.90 ³⁾	23.43 \pm 3.69 ³⁾
	10	80.00 \pm 26.46 ³⁾	2.86 \pm 0.90 ³⁾	21.43 \pm 3.65 ³⁾
ARS	3	98.33 \pm 18.93 ³⁾	2.71 \pm 0.76 ³⁾	16.71 \pm 3.64 ³⁾
	10	94.67 \pm 24.50 ³⁾	2.14 \pm 0.69 ³⁾	16.00 \pm 2.24 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

3.2 青蒿素及其衍生物对破骨细胞分化基因表达的影响 小鼠 BMMs 经 RANKL 诱导培养 6 d 后,破骨细胞分化的特异性基因 TRAP, MMP-9 和 Cts-K mRNA 的表达显著提高,比诱导前分别提高 43.5, 9.5 及 13.8 倍。3 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯均能显著抑制 TRAP, Cts-K

和 MMP-9 mRNA 的表达 ($P < 0.01$); 3 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的青蒿素也明显抑制 TRAP mRNA 的表达,均具有显著性差异 ($P < 0.01$),但对 MMP-9 mRNA 无明显影响,仅 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度能明显降低 Cts-K mRNA 表达,具有显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 青蒿素及其衍生物对破骨细胞 TRAP, MMP-9 和 Cts-K mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of artemisinin and artemisinin derivatives on mRNA expression of TRAP, MMP-9 and Cts-K in osteoclasts ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TRAP	MMP-9	Cts-K
空白	-	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
诱导	-	43.47 \pm 8.52 ¹⁾	9.49 \pm 1.79 ¹⁾	13.84 \pm 3.42 ¹⁾
ART	3	20.80 \pm 4.69 ³⁾	7.85 \pm 0.84	12.57 \pm 1.52
	10	21.49 \pm 3.29 ³⁾	7.40 \pm 0.64	8.02 \pm 2.26 ³⁾
DHA	3	0.52 \pm 0.13 ³⁾	4.69 \pm 1.41 ³⁾	2.66 \pm 0.34 ³⁾
	10	0.41 \pm 0.11 ³⁾	3.55 \pm 0.83 ³⁾	1.71 \pm 0.73 ³⁾
ARM	3	0.67 \pm 0.10 ³⁾	4.03 \pm 0.76 ³⁾	1.83 \pm 0.51 ³⁾
	10	0.59 \pm 0.10 ³⁾	3.91 \pm 1.49 ³⁾	2.07 \pm 0.50 ³⁾
ARS	3	0.65 \pm 0.13 ³⁾	3.54 \pm 0.92 ³⁾	2.45 \pm 0.74 ³⁾
	10	0.45 \pm 0.12 ³⁾	3.46 \pm 0.97 ³⁾	2.16 \pm 0.40 ³⁾

3.3 青蒿素及其衍生物对破骨细胞分化通路主要因子 TRAF6/NF- κ B 的影响 正常小鼠 BMMs 可见 TRAF6 和 p65 蛋白表达,而经过 RANKL 培养 6 d 后,这两个蛋白的表达量显著提高 ($P < 0.01$); 各给药组可不同程度地抑制 RANKL 诱导的小鼠 BMMs 的 TRAF6 和 p65 蛋白表达水平的上调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中双氢青蒿素和青蒿琥酯降低 TRAF6 表达的作用较为明显 ($P < 0.01$),而青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯抑制 p65 表达的作用更为显著

($P < 0.01$)。见表 3,图 2。

4 讨论

青蒿素是中国中医科学院中药研究所诺贝尔医学奖获得者屠呦呦研究员从青蒿中分离得到的具有我国自主知识产权的高效低毒抗疟药,其还原产物双氢青蒿素可以合成 2 种衍生物——蒿甲醚和青蒿琥酯。除了抗疟作用之外,近年来越来越多的研究报道青蒿素及其衍生物具有抗炎免疫作用^[7-8]。最新文献报道青蒿素及其衍生物不仅能明显改善 RA

表 3 青蒿素及其衍生物对破骨细胞 TRAF6, p65 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of artemisinin and artemisinin derivatives on gray scale of TRAF6 and p65 protein in osteoclasts($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TRAF6/GAPDH	p65/GAPDH
空白	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
诱导	-	1.36 ± 0.08 ¹⁾	1.31 ± 0.10 ¹⁾
ART	3	1.14 ± 0.11 ²⁾	0.38 ± 0.07 ³⁾
DHA	3	0.72 ± 0.10 ³⁾	0.96 ± 0.09 ³⁾
ARM	3	0.89 ± 0.09 ³⁾	0.23 ± 0.06 ³⁾
ARS	3	0.33 ± 0.07 ³⁾	0.15 ± 0.07 ³⁾

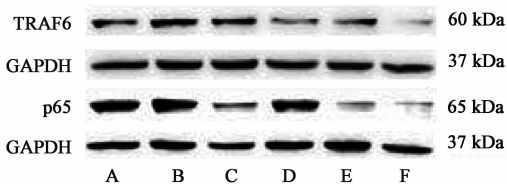


图 2 青蒿素及其衍生物对破骨细胞 TRAF6, p65 蛋白表达电泳
Fig. 2 Effect of artemisinin and artemisinin derivatives on expression of TRAF6 and p65 protein in osteoclasts

大鼠关节红肿症状外,还能改善关节影像学改变^[9-10],提示了这几种药物可能均存在延缓骨破坏的生物活性,但究竟作用强度如何,通过什么途径调节至今尚不清楚。

破骨细胞是一种来源于单核巨噬细胞系的多核细胞,也是体内唯一具有骨吸收功能的细胞^[10]。因破骨细胞为终末细胞,在体外培养时失去增殖能力,且分离培养相对困难,难以满足研究需要,故实验时常通过诱导巨噬细胞来获得破骨细胞。小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 易得且培养方便,之前国内外学者多采用诱导 RAW264.7 向破骨细胞分化的方法。但由于细胞系与体内细胞生物过程相差较大,而作为破骨细胞重要前体细胞—原代分离的骨髓单核细胞^[10],其所诱导获得的破骨细胞相对于巨噬细胞系 RAW264.7 能更好模拟体内的真实过程,故目前已成为体外筛选和评价药物对破骨细胞调控作用的良好媒介。本研究通过分离培养小鼠的 BMMs,采用 RANKL 和 M-CSF 共同诱导的方法,观察到细胞体积显著变大,细胞核数目明显增多并出现伪足,胞浆呈 TRAP 阳性,表明本实验条件下能较好诱导出破骨细胞。借助这个实验平台,本研究发现青蒿素及其衍生物不仅能够显著抑制破骨细胞的生成,表现为 TRAP 阳性细胞数减少,还可以抑制破骨细胞的成熟,即减少细胞核数目以及破骨细胞的平均直径。

而且,在本实验所采用的统一药物剂量的条件下($3, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,前期证明该剂量没有细胞毒性作用),本研究发现蒿甲醚和青蒿琥酯抑制破骨细胞分化和成熟的作用比青蒿素和双氢青蒿素更显著,这与近年学者所报道的蒿甲醚和青蒿琥酯具有较强的免疫调控作用的实验结果相符^[3,11-12]。

已知 RANKL 是肿瘤坏死因子超家族的成员,与破骨细胞前体细胞膜上的受体 RANK 结合,先发动了 TRAF6 的募集,进一步激活 NF- κ B 和 NFATc1,促进 TRAP, MMP-9 和 Cts-K 等破骨细胞特异性基因的表达,最终诱导破骨细胞分化及骨吸收^[13-14]。新近研究表明 TRAP, MMP-9 和 Cts-K 能在破骨细胞内高度表达,是发挥骨吸收的重要酶类,国内外学者也将其作为破骨细胞的标志基因。TRAF6 是胞浆内的重要接头分子,其与 RANK 的结合是维持破骨细胞骨架以及骨吸收作用的关键^[15],而 NF- κ B 信号通路又是破骨细胞生成和活化的重要信号通路之一^[16]。因此,在破骨细胞的形成以及骨吸收功能的维持方面,TRAF6/NF- κ B 发挥着极为重要的调控作用。本研究发现青蒿素及其衍生物均可显著抑制 TRAF6 和 p65 的蛋白表达,提示青蒿素及其衍生物可抑制小鼠 BMMs 的 TRAF6/NF- κ B 信号通路的异常活化,导致其调控的下游基因 TRAP, MMP-9 和 Cts-K 基因的表达有不同程度地降低。

综上,本实验结果表明青蒿素以及衍生物均具有抑制由 RANKL 诱导的小鼠 BMMs 向破骨细胞分化的作用,且相关作用可能与下调 TRAP, MMP-9 和 Cts-K 基因表达,抑制破骨细胞分化通路主要因子 TRAF6/NF- κ B 的活化有关;相同浓度下蒿甲醚和青蒿琥酯的作用比青蒿素和双氢青蒿素略强。这为青蒿素及其衍生物用于延缓骨破坏治疗 RA 及相关疾病的临床应用提供实验支持,也为青蒿素类衍生物的进一步研发提供有益的线索。

[参考文献]

[1] Binder N, Miller C, Yoshida M, et al. Def6 restrains osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption[J]. J Immunol, 2017, 198(9): 3436-3447.

[2] 侯安存. 中药免疫抑制剂研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(3): 251-255.

[3] LIU J, HONG X Z, LIN D, et al. Artesunate influences Th17/Treg lymphocyte balance by modulating Treg apoptosis and Th17 proliferation in a murine model of rheumatoid arthritis[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5): 2267-2273.

- [4] 崔向军,王燕燕,侯晓强,等. 青蒿琥酯治疗类风湿关节炎临床观察[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(5):645-646.
- [5] 许赤多,刘纯,吴南辉,等. 二氢青蒿素通过 Akt 信号途径诱导类风湿关节炎滑膜细胞凋亡[J]. 广东医学,2009,30(7):1043-1045.
- [6] 杨敏,呼永河,郭明阳,等. 青蒿素对类风湿关节炎的治疗作用[J]. 风湿病与关节炎,2013,2(8):66-69.
- [7] LI T T, ZHANG X H, JING J F, et al. Artemisinin analogue SM934 ameliorates the proteinuria and renal fibrosis in rat experimental membranous nephropathy [J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36(2): 188-199.
- [8] LI T, CHEN H, YANG Z, et al. Evaluation of the immunosuppressive activity of artesunate *in vitro* and *in vivo*[J]. Int Immunopharmacol,2013,16(2):306-312.
- [9] 林东,刘佳,朱梦雅,等. 青蒿琥酯对大鼠胶原诱导性关节炎骨质疏松的保护作用[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,20(10):1163-1169.
- [10] Kim H J, Yoon K A, Lee M K, et al. A novel small molecule, NecroX-7, inhibits osteoclast differentiation by suppressing NF-kappaB activity and c-Fos expression [J]. Life Sci, 2012, 91(19/20): 928-934.
- [11] LI Y M, WANG S G, WANG Y, et al. Inhibitory effect of the antimalarial agent artesunate on collagen-induced arthritis in rats through nuclear factor kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. Transl Res, 2013, 161(2): 89-98.
- [12] HE Y, FAN J J, LIN H B, et al. The anti-malaria agent artesunate inhibits expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte [J]. Rheumatol Int, 2011, 31(1): 53-60.
- [13] Choi J, Choi S Y, Lee S Y, 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.
- [14] Fumimoto R, Sakai E, Yamaguchi Y, et al. The coffee diterpenekahweol prevents osteoclastogenesis *via* impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation[J]. J Pharmacol Sci, 2012, 118(4): 479-486.
- [15] Kwak H B, Lee B K, Oh J, et al. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by rotenone, through down-regulation of RANKL-induced c-Fos and NFATc1 expression[J]. Bone, 2010,46(3): 724-731.
- [16] Choi B Y, Park C H, Na Y H, et al. Inhibition of RANKL-induced osteoclast differentiation through the downregulation of c-Fos and NFATc1 by *Eremochloa ophiuroides* (centipede grass) extract[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(5): 4014-4022.

[责任编辑 邹晓翠]