

补肾通络方对骨质疏松斑马鱼效应评价及破骨细胞自噬机制

谭登¹, 张玉¹, 张农山¹, 刘军¹, 万仕炜¹, 韩龙¹, 方彭华², 闵文^{1*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2. 南京中医药大学翰林学院, 江苏泰州 225300)

[摘要] **目的:** 评价补肾通络方对斑马鱼骨质疏松模型的干预效应, 并明确其对破骨细胞分化的自噬调控机制。**方法:** 选取新生 3 d 健康斑马鱼幼鱼 260 尾, 25 mmol·L⁻¹ 泼尼松龙 (Pred) 干预 3 d, 通过钙黄绿素染色确认建模成功, 分为空白组, Pred 组 (25 mmol·L⁻¹), 依替磷酸二钠组 (300 mg·L⁻¹), 补肾组 (180 mg·L⁻¹), 通络组 (30 mg·L⁻¹) 和补肾通络组 (210 mg·L⁻¹) 各 40 尾。药物干预 4 d 后采用钙黄绿素染色后拍照, 统计斑马鱼脊椎骨荧光面积; 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测斑马鱼碱性磷酸酶 (ALP), 骨形态发生蛋白-2b (BMP-2b), Runt 相关转录因子 2 (Runx2), 组织蛋白酶 K (CTSK), 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 及活化 T 细胞核因子 (NFATC-1) mRNA 表达。培养 RAW264.7 细胞至 80% ~ 90% 密度后分为空白组, Rankl 诱导组 (10 μg·L⁻¹), 补肾组 (180 mg·L⁻¹), 通络组 (30 mg·L⁻¹) 和补肾通络组 (210 mg·L⁻¹)。经 Rankl 诱导细胞破骨分化及药物干预 4 d 后, 采用 FITC 标记鬼笔环肽染色检测肌动蛋白环表达, Real-time PCR 检测 RAW264.7 细胞 TRAP, CTSK 和自噬相关基因 5 (ATG5), 自噬相关基因 7 (ATG7), 泛素结合蛋白 62 (p62) mRNA 表达。**结果:** 在体内研究中, 与空白组比较, Pred 组斑马鱼椎骨面积及 ALP, BMP-2b, Runx2 表达显著下降 ($P < 0.01$), CTSK, TRAP, NFATC-1 表达显著升高 ($P < 0.01$)。与 Pred 组比较, 通络组椎骨面积明显增加 ($P < 0.05$), 而补肾通络组椎骨面积显著增加 ($P < 0.01$), 补肾组, 通络组及补肾通络组 ALP, BMP-2b, Runx2 表达均显著升高 ($P < 0.01$), 补肾通络组 CTSK, TRAP, NFATC-1 表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。体外研究显示, 与空白组比较, Rankl 诱导组肌动蛋白环数目显著增多 ($P < 0.01$), CTSK, TRAP 和 ATG5 表达显著升高 ($P < 0.01$), ATG7, p62 表达明显升高 ($P < 0.05$)。与 Rankl 诱导组比较, 补肾组、通络组及补肾通络组均明显减少了肌动蛋白环数目及 CTSK, TRAP 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而补肾通络组同时降低了 ATG5, ATG7, p62 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:** 补肾通络方能够显著改善泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松症, 并通过降低自噬相关基因表达抑制破骨细胞分化。

[关键词] 斑马鱼; 骨质疏松; 补肾通络方; 破骨细胞; 自噬

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0079-07

[doi] doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200641

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191206.1641.011.html>

[网络出版时间] 2019-12-07 08:22

Effect of Bushen Tongluo Formula on Osteoporosis of Zebrafish and Study on Autophagy Mechanism of Osteoclast

TAN Deng¹, ZHANG Yu¹, ZHANG Nong-shan¹, LIU Jun¹, WAN Shi-wei¹, HAN Long¹,
FANG Peng-hua², MIN Wen^{1*}

(1. *Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;*
2. *Hanlin College, Nanjing University of Chinese Medicine, Taizhou 225300, China*)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the intervention effect of Bushen Tongluo formula on zebrafish osteoporosis model and to clarify its regulation of autophagy mechanism on osteoclast differentiation. **Method:** The

[收稿日期] 20190921(007)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81774335, 81473390); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX19_1212); 第六批全国老中医药专家学术经验继承项目

[第一作者] 谭登, 在读硕士, 从事中医药防治骨质疏松症研究, E-mail: tandeng1993@126.com

[通信作者] * 闵文, 博士, 教授, 从事中医药防治骨质疏松症研究, E-mail: wenge1977@126.com

260 young zebrafishes (3 dpf) were selected, the zebrafish osteoporosis model was established with $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ prednisolone (Pred) for 3 days, confirming the successful model by calcein staining. The zebrafishes were divided into control group, Pred group ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), etidronate disodium (ED) group ($300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), Bushen (BS) group ($180 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), Tongluo (TL) group ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), and Bushen Tongluo (BSTL) group ($210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 40 tails per group. After intervened with medicine for 4 days, the calcein staining was adopted to count the vertebral bone fluorescence area of zebrafish, Real-time PCR was adopted to detect the mRNA expression of alkaline phosphatase (ALP), bone morphogenetic protein 2b (BMP-2b), runt-related protein 2 (Runx2) and cathepsin K (CTSK), phosphorus and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic-1 (NFATC-1). Divided RAW264.7 cells into control, Rankl induction ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), BS ($180 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), TL ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), and BSTL group ($210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) after they were cultured to 80% -90% density. The expression of actin ring was detected by phalloidin cytoskeleton staining. The mRNA expression of TRAP, CTSK and autophagy-related genes 5 (ATG5), autophagy-related genes 7 (ATG7), and ubiquitin-binding protein p62 (p62) were detected by Real-time PCR. **Result:** Compared with the control group *in vivo*, the vertebral area and ALP, BMP-2b, and Runx2 expression of zebrafish in the Pred group were significantly decreased ($P < 0.01$), and CTSK, TRAP, and NFATC-1 expression of zebrafish were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the Pred group, the vertebral area of the TL ($P < 0.05$) and BSTL group ($P < 0.01$) increased significantly. The expressions of ALP, BMP-2b, and Runx2 in the BS, TL, and BSTL group were significant increased ($P < 0.01$). The expression of CTSK, TRAP, and NFATC-1 in BSTL group were significant decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the control group *in vitro*, the number of actin rings ($P < 0.01$) and CTSK, TRAP, ATG5 ($P < 0.01$) expression and ATG7, p62 ($P < 0.01$) expression were significantly increased in the Rankl-induced group. Compared with the Rankl induction group, the number of actin rings and CTSK and TRAP expression were significantly decreased in the BS, TL, and BSTL group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the expression of ATG5, ATG7, and p62 were significant decreased in the BSTL group ($P < 0.05$). **Conclusion:** BSTL can significantly improve prednisolone-induced zebrafish osteoporosis and inhibit osteoclast differentiation by reducing autophagy-related gene expression.

[**Key words**] zebrafish; osteoporosis; Bushen Tongluo formula; osteoclasts; autophagy

骨质疏松症(OP)是以骨量降低、骨微结构退变为特征的全身性骨代谢疾病,我国 OP 人群患病率达到 13%^[1-2]。骨吸收与骨形成耦联失衡导致 OP 发生,破骨细胞数量及活性增加是骨吸收亢进的关键因素^[3]。在受损、应激等状态下,自噬水平明显升高,并促进破骨细胞分化成熟和活性增加。研究表明,降低破骨细胞自噬水平是抑制破骨细胞介导骨吸收亢进的有效途径^[4]。

双磷酸盐、雌激素及甲状旁腺激素等是目前临床治疗 OP 的主要药物,但致癌、致畸等毒副作用一定程度限制了其推广使用^[5-6]。补肾通络方是全国第六批老中医药专家学术经验传承指导老师黄桂成教授根据“本痿标痹”病机治疗 OP 的常用方剂,具有补肾填精,强筋壮骨及通络止痛的功效。临床研究显示,补肾通络方对 OP 患者全身骨痛,骨量减少等症状均有明显缓解作用^[7]。实验研究表明,该方通过抑制去势大鼠骨吸收,显著增加骨量并改善其

骨微结构^[8-9]。为进一步探讨补肾通络方对多种骨质疏松模型的干预效应及其对破骨细胞分化的自噬调控机制,本研究拟通过斑马鱼 OP 模型对补肾通络方的抗骨质疏松作用进行再评价,并明确该方对 RAW264.7 细胞破骨分化的自噬调控机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 补肾方由骨碎补 12 g,淫羊藿 12 g,白芍 9 g,茯苓 9 g,续断 12 g,炙甘草 6 g 组成;通络方由全蝎 5 g,蜈蚣 5 g 组成;补肾通络方由骨碎补 12 g,淫羊藿 12 g,续断 12 g,全蝎 5 g,蜈蚣 5 g,白芍 9 g,茯苓 9 g,炙甘草 6 g 组成。药材均购于亳州市胜元堂有限公司并经南京中医药大学药学院刘圣金副教授鉴定。称取 10 倍处方量药材,经粉碎至 40 目,10 倍量水回流提取 2 h,再 8 倍量水回流提取 1.5 h,合并两次提取液,减压回收溶剂浓缩至含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,4 °C 冷藏备用。泼尼松龙(Pred),依替磷酸二钠(ED),钙黄绿素(上海源叶生物有限公

司,批号分别为 T20J7H9291, K22A8M34493, S19167);三卡因(美国 Sigma-aldrich 公司,批号 MKBV1603V);trizol 裂解液,逆转录试剂盒,扩增试剂盒,无酶水(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为 R401-01, R223-01-AB, Q111-02-AA, R223-01-AA);DMEM 培养基(美国 Thermo 公司,批号 10099141);Ran1(中国 Novoprotein 公司,批号 CR06);噻唑蓝(MTT,德国 Biofroxx 公司,批号 EZ2811D347);FITC 标记鬼笔环肽(上海翊圣生物科技有限公司,批号 40735ES75);DAPI(上海碧云天生物技术有限公司,批号 C1002);碱性磷酸酶(ALP),骨形态发生蛋白 2b(BMP-2b),Runt 相关转录因子 2(Runx2),组织蛋白酶 K(CTSK),抗酒石酸性磷酸酶(TRAP),活化 T 细胞核因子(NFATC-1),肿瘤坏死因子受体相关蛋白(TRAP),组织蛋白酶 K(CTSK),自噬相关基因 5(ATG5),自噬相关基因 7(ATG7),泛素结合蛋白 62(p62),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),PCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司设计并合成,引物序列见表 1。

1.2 动物及细胞 受精后 1 d(1 dpf)的 AB 品系斑马鱼,购于南京一树梨花生物科技有限公司(批号 20190516);小鼠前破骨细胞系 RAW264.7 细胞购于中国科学院上海细胞库。

1.3 仪器 M205FA 型体式荧光显微镜(德国 Leica 公司),SPX-150 型生化培养箱(上海跃进医疗器械有限公司),Tissuelyser-48 型高通量多样品组织研磨仪(南京乔贝琳生物科技有限公司),Synergy2 型酶标仪(美国 Biotek 公司),7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司),5417R 型定量病理成像分析系(美国 PerkinElmer 公司)。

2 方法

2.1 斑马鱼死亡率统计检测药物毒性 随机选取 3 dpf 正常斑马鱼 200 尾,分为空白组及给药组,空白组正常培养,给药组按低、中、高剂量每组设置 3 个质量浓度组,具体为补肾组(90, 180, 360 mg·L⁻¹),通络组(15, 30, 60 mg·L⁻¹),补肾通络组(105, 210, 420 mg·L⁻¹),每组 20 尾,持续给药 4 d^[10]。28 ℃生化培养箱昼夜孵育,记录每日斑马鱼死亡数量,统计每组总体死亡尾数,确定补肾方、通络方及补肾通络方对斑马鱼无毒副作用的最适药物浓度。

2.2 斑马鱼骨质疏松模型构建 选取健康的 3 dpf 的斑马鱼 310 尾随机分为空白组及模型组(Pred 25 mmol·L⁻¹),空白组 50 尾,模型组 260 尾。从

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
ALP	上游 GGCCTTACATGAAGCTGTGG	3 712
	下游 GTTTCCTCGTGGTGTGTAGC	
BMP-2b	上游 CCGTCAACTCCAACATTCCC	2 001
	下游 ATTGTTCTCATCGGCAACCG	
Runx2	上游 GTGGAGATCATAGCGGACCA	1 750
	下游 CTCCCAGAGCCACAACCTTA	
CTSK	上游 CGTCACTTCGGTGAAGAACC	1 595
	下游 ACAGTCCA-CCAGTCTCTGAG	
TRAP	上游 GCGGAAGTC-CAAAGCTGATT	1 690
	下游 CGGATATGGACCACACTGGA	
NFATC-1	上游 CCAAGGTGGTGTGTTGTGGAG	2 991
	下游 CTGGCTTCTCTCCGCTTTC	
GAPDH	上游 TGGTGTGCTATTGCTCTCA	1 329
	下游 ATGGGAGAATGGTCGCGTAT	
CTSK	上游 CAGTAGCCACGCTTCCTATCC	1 583
	下游 ACTGGGTGCCAGCATTTCC	
TRAP	上游 CTGAACACCACGAGAGTCCT	1 683
	下游 TCAGTTGGTGTGGCATACT	
ATG5	上游 GGAACCACCTTGAGTCAGGA	2 317
	下游 AGTG-GTCTGTGTCTCAG	
ATG7	上游 TCCGTTGAAGTCTCTGCTT	3 925
	下游 CCACTGAGTTACCATCCT	
p62	上游 CCTGCCTCCGCTCTCTGTA	1 916
	下游 TGGTCCAGGTTTCTTACTCC	
GAPDH	上游 GGGTGT-CTCCTGCCACTTCA	1 296
	下游 TGGTCCAGGTTTCTTACTCC	

3 dpf开始,空白组加入含 0.1% DMSO 的培养基,模型组加入含 25 mmol·L⁻¹ Pred 培养基(含 0.1% DMSO),造模 2 d 后每组随机取 6 尾斑马鱼幼鱼,钙黄绿素染色观察并统计斑马鱼椎骨荧光面积,当模型组较空白组椎骨荧光面积显著下降后,证明造模成功^[11]。

2.3 免疫荧光检测斑马鱼椎骨荧光面积 造模成功后将模型组斑马鱼随机分为 Pred 组,ED 组,补肾组,通络组和补肾通络组,每组 50 尾。空白组及 Pred 组给药条件不变,ED 组给予含 25 mmol·L⁻¹ Pred 和 300 mg·L⁻¹ ED 的培养基,补肾组给予含 25 mmol·L⁻¹ Pred 和 180 mg·L⁻¹ 补肾方的培养基,通络组给予含 25 mmol·L⁻¹ Pred 和 30 mg·L⁻¹ 通络方的培养基,补肾通络组给予含 25 mmol·L⁻¹ Pred 和 210 mg·L⁻¹ 补肾通络方的培养基,所有组别均含

0.1% DMSO。持续给药 4 d 后,于第 9 dpf 各组分别取 20 尾形态正常斑马鱼进行钙黄绿素染色、拍照并统计各组斑马鱼椎骨荧光面积。

2.4 MTT 比色法检测 RAW264.7 细胞活力 取生长良好的 RAW264.7 细胞于种板后 24 h 按药物比例分组并给药:空白组,补肾组(3,30,60,180,360,720 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 通路组(0.5, 6, 10, 30, 60, 120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)及补肾通路组(3.5,35,70,210,420,840 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),每组重复 6 个复孔,于给药后 48 h 采用 MTT 比色法检测细胞活力。

2.5 FITC 标记鬼笔环肽染色法检测破骨细胞活性 取状态良好的 RAW264.7 细胞于种板后 24 h 分为空白组, Rankl ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导组, 补肾方($180 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + Rankl 组, 通路方($30 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + Rankl 组及补肾通路方($210 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + Rankl 组。每组重复 3 个复孔,连续造模并给药干预 4 d,进行 FITC 标记鬼笔环肽染色^[12],检测各组纤维肌动蛋白环的表达。

2.6 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测斑马鱼及 RAW264.7 细胞各 mRNA 表达 取空白组及造模成功组中斑马鱼幼鱼,分组同前,每组 20 尾,造模并给药干预至第 9 dpf 后用 trizol 裂解液提取各组 RNA,RAW264.7 细胞造模及给药方式同前,干预 4 d 后提取各组 RNA,并测定 RNA 浓度。逆转录反应体系:RNA + RNase-Free Water = 12 μL , DNA 4 μL /管,每组逆转录 cDNA 20 μL 。扩增反应体系为 20 μL ,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环。反应结束收集数据并绘制融解曲线,计算各 mRNA 相对表达水平并用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

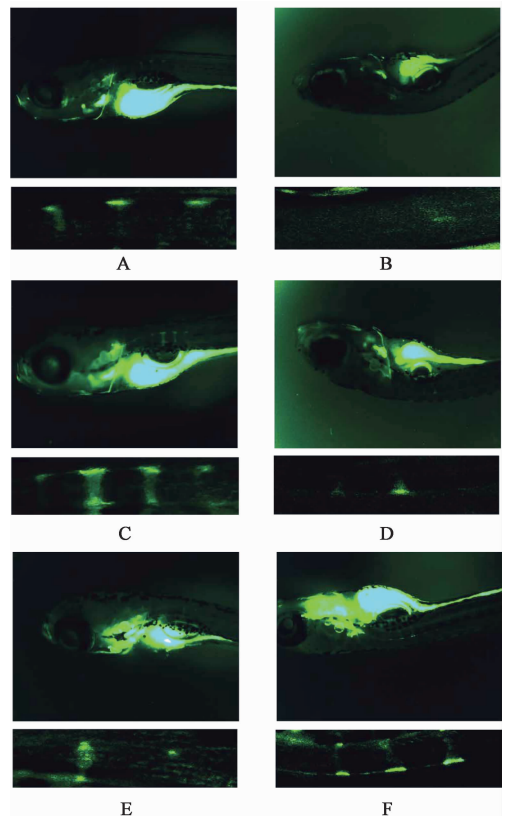
2.7 统计学分析 采用 SPSS 20.0 进行数据处理分析,所有数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用 *t* 检验,组间比较使用单因素方差分析进行统计,秩和检验用于方差不齐, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对斑马鱼生长发育的影响 为筛选斑马鱼幼鱼生长的最适药物浓度,3 种药物分别设置低、中、高剂量组。结果显示,与空白组比较,补肾组在 $360 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下斑马鱼死亡尾数较多,而 $90 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $180 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下死亡尾数较少;通路组在 $60 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下死亡尾数较多,在 $15 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $30 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下死亡尾数较少;补肾通路方在 $420 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下死亡尾数较多,在 $105 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $210 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下死亡

尾数较少。根据补肾通路方药物构成比例(补肾-通路-补肾通路 6:1:7),故选择补肾组 $180 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 通路组 $30 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及补肾通路组 $210 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度为斑马鱼正常生长发育的最适浓度。

3.2 对斑马鱼骨量及骨相关 mRNA 表达影响 与空白组比较, Pred 组斑马鱼椎骨荧光面积显著减少 ($P < 0.01$),骨形成标志基因 ALP, BMP-2b 及 Runx2 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$),骨吸收标志基因 CTSK, TRAP 及 NFATC-1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。与 Pred 组比较,通路组椎骨荧光面积明显增加 ($P < 0.05$), ED 组及补肾通路组椎骨荧光面积显著增加 ($P < 0.01$), ED 组、补肾组、通路组及补肾通路组 ALP, BMP-2b 及 Runx2 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$), ED 组及补肾通路组 CTSK 表达明显降低 ($P < 0.05$), 补肾通路组 TRAP 表达明显降低 ($P < 0.05$), ED 组、补肾组、通路组及补肾通路组 NFATC-1 表达显著降低 ($P < 0.01$)。见图 1,表 2。



A. 空白组; B. Pred 组; C. ED 组; D. 补肾组; E. 通路组; F. 补肾通路组
图 1 补肾方、通路方及补肾通路方对斑马鱼椎骨面积的影响(免疫荧光, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of Bushen (BS), Tongluo (TL), and Bushentongluo (BSTL) on vertebrae area of zebrafish (IF, $\times 100$)

3.3 对 RAW264.7 细胞增殖的影响 与空白组比较, RAW264.7 细胞在补肾组 $360 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及更高

表 2 补肾方、通络方及补肾通络方对斑马鱼椎骨荧光面积 ALP, BMP-2b, Runx2, CTSK, TRAP, NFATC-1 mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2 Effect of BS, TL, and BSTL on fluorescence area of vertebrae and expression of ALP, BMP-2b, Runx2, CTSK, TRAP, NFATC-1 mRNA in zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度	椎骨荧光面积	ALP	BMP-2b	Runx2	CTSK	TRAP	NFATC-1
空白	-	0.10 ± 0.02	1.01 ± 0.17	1.02 ± 0.20	1.00 ± 0.08	1.02 ± 0.21	1.03 ± 0.27	1.03 ± 0.22
Pred	25 mmol·L ⁻¹	0.05 ± 0.01 ¹⁾	0.19 ± 0.01 ¹⁾	0.25 ± 0.01 ¹⁾	0.31 ± 0.01 ¹⁾	2.33 ± 0.27 ¹⁾	3.46 ± 0.51 ¹⁾	2.88 ± 0.12 ¹⁾
ED	300 mg·L ⁻¹	0.12 ± 0.04 ³⁾	0.82 ± 0.02 ³⁾	0.68 ± 0.05 ³⁾	1.03 ± 0.05 ³⁾	1.63 ± 0.03 ²⁾	2.79 ± 0.13	2.22 ± 0.16 ³⁾
补肾	180 mg·L ⁻¹	0.08 ± 0.03	0.51 ± 0.04 ³⁾	0.45 ± 0.03 ³⁾	0.75 ± 0.01 ³⁾	2.70 ± 0.19	3.12 ± 0.13	2.35 ± 0.03 ³⁾
通络	30 mg·L ⁻¹	0.10 ± 0.15 ²⁾	0.51 ± 0.08 ³⁾	0.60 ± 0.09 ³⁾	0.82 ± 0.04 ³⁾	2.18 ± 0.36	2.92 ± 0.48	2.40 ± 0.11 ³⁾
补肾通络	210 mg·L ⁻¹	0.14 ± 0.03 ³⁾	0.67 ± 0.13 ³⁾	0.94 ± 0.15 ³⁾	0.95 ± 0.08 ³⁾	1.64 ± 0.24 ²⁾	2.31 ± 0.20 ²⁾	2.39 ± 0.26 ³⁾

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

浓度下细胞活力显著降低 ($P < 0.01$), 在通络组 120 mg·L⁻¹ 及更高浓度下细胞活力明显升高 ($P < 0.01$), 在补肾通络组 840 mg·L⁻¹ 及更高浓度下细胞活力显著升高 ($P < 0.01$)。根据药物配比(补肾-通络-补肾通络 6:1:7), 选择补肾方 180 mg·L⁻¹, 通络方 30 mg·L⁻¹ 及补肾通络方 210 mg·L⁻¹ 为对 RAW264.7 细胞活力无明显影响的适宜浓度。见表 3。

3.4 对 RAW264.7 破骨分化影响 与空白组比较, Rankl 组肌动蛋白环数量显著增加, 破骨分化标志基因 CTSK 和 TRAP 表达显著升高 ($P < 0.01$)。与 Rankl 组比较, 补肾组、通络组及补肾通络组肌动蛋白环数量显著降低 ($P < 0.01$), 补肾组 CTSK 表达明显降低 ($P < 0.05$), TRAP 表达显著下降 ($P < 0.01$), 通络组 CTSK 表达显著降低 ($P < 0.01$), TRAP 表达明显下降 ($P < 0.05$), 补肾通络组 CTSK 及 TRAP 表达均显著降低 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

3.5 对自噬相关 mRNA 表达影响 与空白组比较, Rankl 组 ATG7 及 p62 表达明显升高 ($P < 0.05$), ATG5 表达显著升高 ($P < 0.01$)。与 Rankl 组比较, 补肾组明显抑制了 ATG5 表达 ($P < 0.05$), 通络组明显抑制了 p62 表达 ($P < 0.05$), 显著抑制了 ATG5 表达 ($P < 0.01$), 而补肾通络组明显抑制了 ATG7 及 p62 表达 ($P < 0.05$), 显著抑制了 ATG5 表达 ($P < 0.01$)。表明在 RAW264.7 破骨分化过程中, 自噬显著增强, 而补肾通络方可明显抑制自噬基因表达, 从而减少破骨细胞分化, 抑制骨吸收。见表 5。

4 讨论

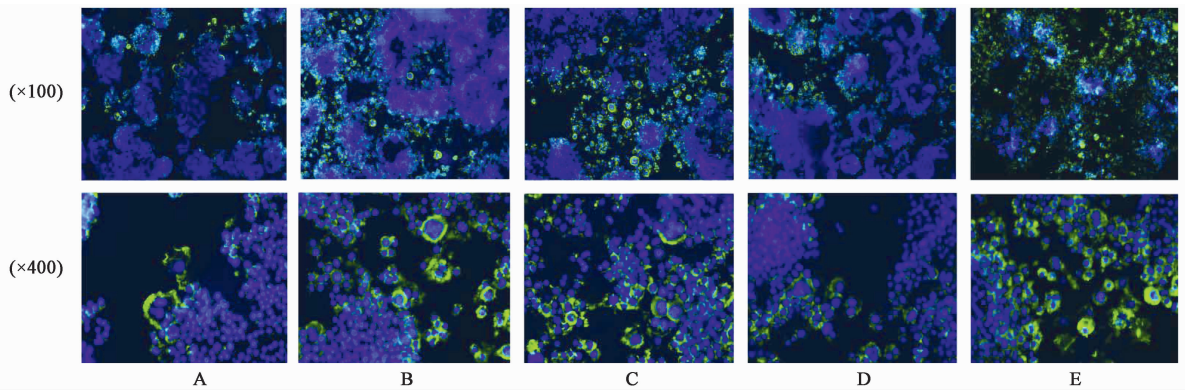
斑马鱼的骨骼发育与哺乳动物高度相似, 具有体积小、发育迅速特点, 逐渐成为实验研究的新型模式生物^[13]。斑马鱼在第 8~9 dpf 头骨已基本发育完全, 与哺乳动物模型相比, 骨骼生长发育同样需要大量相关基因参与和调节, 但具有实验周期短、操作

表 3 不同质量浓度补肾方、通络方及补肾通络方对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of different concentrations of BS, TL, and BSTL on activity of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞活力	
空白	-	0.59 ± 0.03	
补肾	0.6	0.56 ± 0.04	
	3	0.58 ± 0.02	
	30	0.59 ± 0.02	
	60	0.55 ± 0.01	
	180	0.55 ± 0.03	
	360	0.47 ± 0.02 ¹⁾	
	720	0.41 ± 0.02 ¹⁾	
	1 480	0.35 ± 0.01 ¹⁾	
	空白	-	1.20 ± 0.05
	通络	0.1	1.25 ± 0.05
0.5		1.22 ± 0.04	
1		1.18 ± 0.05	
10		1.17 ± 0.05	
30		1.25 ± 0.03	
60		1.26 ± 0.09	
120		1.31 ± 0.04 ¹⁾	
240		1.44 ± 0.05 ¹⁾	
空白		-	0.61 ± 0.02
补肾通络		0.7	0.61 ± 0.03
	3.5	0.62 ± 0.02	
	35	0.62 ± 0.03	
	70	0.58 ± 0.02	
	210	0.62 ± 0.02	
	420	0.62 ± 0.02	
840	0.67 ± 0.02 ¹⁾		
1 680	0.69 ± 0.01 ¹⁾		

注:与本组空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。



A. 空白组; B. Rankl 组; C. 补肾组; D. 通络组; E. 补肾通络组

图 2 补肾方、通络方及补肾通络方对破骨细胞活性影响(免疫荧光)

Fig. 2 Effect of BS, TL, and BSTL on osteoclast activity (IF)

表 4 补肾方、通络方及补肾通络方对破骨细胞 CTSK, TRAP 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of BS, TL, and BSTL on expression of CTSK and TRAP in osteoclast ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	肌动蛋白环数目	CTSK	TRAP
空白	-	7.00 ± 2.55	1.00 ± 0.02	1.09 ± 0.42
Rankl	25 mmol·L ⁻¹	19.25 ± 3.56 ¹⁾	16.56 ± 0.67 ¹⁾	7.47 ± 2.23 ¹⁾
补肾	180 mg·L ⁻¹	10.25 ± 2.28 ³⁾	10.39 ± 0.37 ²⁾	1.29 ± 0.12 ³⁾
通络	30 mg·L ⁻¹	8.50 ± 1.12 ³⁾	10.23 ± 0.31 ³⁾	3.86 ± 0.24 ²⁾
补肾通络	210 mg·L ⁻¹	6.50 ± 2.18 ³⁾	7.96 ± 0.49 ³⁾	1.50 ± 0.17 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 Rankl 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

表 5 补肾方、通络方及补肾通络方对破骨细胞自噬基因 ATG5, ATG7, p62 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of BS, TL, and BSTL on expression of autophagy genes ATG5, ATG7, and p62 in osteoclast ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	ATG5	ATG7	p62
空白	-	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.09
Rankl	25 mmol·L ⁻¹	1.93 ± 0.13 ²⁾	1.52 ± 0.26 ¹⁾	1.61 ± 0.31 ¹⁾
补肾	180 mg·L ⁻¹	2.34 ± 0.14 ³⁾	1.56 ± 0.04	1.32 ± 0.04
通络	30 mg·L ⁻¹	1.15 ± 0.15 ⁴⁾	1.20 ± 0.23	1.08 ± 0.19 ³⁾
补肾通络	210 mg·L ⁻¹	0.83 ± 0.08 ⁴⁾	0.90 ± 0.07 ³⁾	0.98 ± 0.04 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 Rankl 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

简便的明显优势。本研究证实,泼尼松龙成功诱导了斑马鱼 OP 模型,通络方可明显改善骨质疏松,而补肾通络方逆转骨量流失的作用则更为显著。ALP, Runx2, Bmp-2b 等基因表达可准确反映骨形成水平, TRAP, NFATC1, CTSK 则是骨吸收的标志性基因^[14], 补肾通络方对上述骨重建标志物均明确干预作用。以斑马鱼、大鼠为 OP 模型的研究结果共同佐证了补肾通络方的抗骨质疏松效应。

自噬是对损伤细胞器及残余蛋白进行重组并再利用的过程,参与了 OP 的病理机制^[15]。在机体受到应激、创伤或发生慢性疾病时,自噬水平会相应升高。作为整个自噬过程中的关键步骤,自噬小体形成与 ATG 基因表达密切相关^[16]。研究发现, ATG5

和 ATG7 可调节肌动蛋白环来增强破骨细胞活性,促进骨吸收^[17]。而敲除去卵巢小鼠模型的 Atg5 和 Atg7 基因,可使破骨细胞褶皱形成受阻,破骨细胞骨吸收能力也因此降低^[18]。自噬选择底物 p62 的大量聚积,严重影响自噬缺陷细胞中 DNA 损伤修复过程^[19]。本研究发现,补肾方、通络方及补肾通络方均可降低肌动蛋白环数量及破骨分化标志基因表达;破骨细胞在分化过程中自噬水平明显升高,而补肾通络方显著抑制自噬相关基因表达,这提示补肾通络方可通过降低自噬水平抑制破骨细胞分化成熟。

OP 在临床上具有“本痿标痹”的病机特征。《黄帝内经》指出“肾者主骨生髓”,“补肾”治法及

左归丸、右归丸等补肾药物广泛应用于 OP 治疗,并取得了确切疗效^[20-21]。黄桂成教授在多年临床工作中认识到,OP 还具有病程久、症状痛的“络病”表现,故在补肾治法的基础上以虫类药“搜剔络中混处之邪”,拟定的补肾通络方也取得了显著疗效。前期对 OP 大鼠模型的研究发现,补肾通络方通过抑制慢性炎症、促进血管生成等机制,逆转骨代谢重建失衡,提升骨量并重构骨微形态,骨强度也因此有效改善^[22]。本研究通过斑马鱼 OP 模型进一步证实补肾通络方的抗骨质疏松活性,并明确其通过降低自噬基因表达抑制破骨细胞分化的作用机制。

[参考文献]

[1] COMPSTON J E, MCCLUNG M R, LESLIE W D. Osteoporosis[J]. Lancet, 2019, 26(6):364-376.

[2] 李冲,李伟华,王亭亭,等. 1088 李医务人员骨质疏松流行病学研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(10):1217-1220.

[3] FARR J, ROWSEY J, ECKHARDT B. Independent roles of estrogen deficiency and cellular senescence in the pathogenesis of osteoporosis: evidence in young adult mice and older humans[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(8):1407-1418.

[4] LAHA D, DEB M, DAS H, et al. KLF2 (kruppel like factor 2 [lung]) regulates osteoclastogenesis by modulating autophagy[J]. Autophagy, 2019, 15:96491:1-13.

[5] KISHIMOTO H, NOGUCHI K, TAKAOKA K. Novel insight into the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ)[J]. Swed Dent J, 2019, 55(1):95-102.

[6] COELINGH B H J, VERHOEVEN C, DUTMAN A E, et al. The use of high-dose estrogens for the treatment of breast cancer[J]. Maturitas, 2017, 95:11-23.

[7] 闵文,黄桂成,马勇,等. 补肾通络对原发性骨质疏松症中医证候影响的临床研究[J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(5):344-346.

[8] 韩龙,闵文,吴铭杰,等. 补肾通络方促进骨质疏松症大鼠骨形成机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(1):97-102.

[9] 闵文,韩龙,韩诗雨,等. 补肾通络方对骨质疏松大鼠骨吸收的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(19):

4743-4746.

[10] 杨国柱,段涛,卢丽,等. 桃红四物汤对泼尼松诱导斑马鱼骨质疏松的治疗作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(8):1007-1010,1021.

[11] 林紫薇,杨菲,黄天一,等. 芍药苷干预成骨细胞凋亡抗骨质疏松作用研究[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(4):426-431.

[12] 吴佼,李勇,南刚,等. 荧光显微成像在医学细胞生物学实验教学中的应用探索[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(12):2364-2367.

[13] 葛静,凌洁,宁青,等. 基于斑马鱼 M-Act/Tox 联合评价箭叶淫羊藿的代谢-效/毒作用[J]. 中草药, 2019, 50(7):1614-1620.

[14] KIM I, KIM J H, KIM K, et al. The IRF2BP2-KLF2 axis regulates osteoclast and osteoblast differentiation[J]. BMB Rep, 2019, 52(7):469-474.

[15] OWEN H C, VANHEES I, GUNST J, et al. Critical illness-induced bone loss is related to deficient autophagy and histone hypomethylation[J]. Intensive Care Med Exp, 2015, 3(1):52.

[16] JIA G, SOWERS J R. Autophagy: a housekeeper in cardiorenal metabolic health and disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(2):219-224.

[17] DESELM C J, MILLER B C, ZOU W, et al. Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption[J]. Dev Cell, 2011, 21(5):966-974.

[18] KIM K H, LEE M S. Autophagy-a key player in cellular and body metabolism[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(6):322-337.

[19] WANG Y, ZHANG N, ZHANG L, et al. Autophagy regulates chromatin ubiquitination in DNA damage response through elimination of SQSTM1/p62[J]. Mol Cell, 2016, 63(1):34-48.

[20] 刘飞祥,林子璇,徐道明,等. 左归丸防治骨质疏松症的动物模型和评价方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18):16-23.

[21] 谭峰,樊巧玲,卞玉群,等. 左、右归丸对去卵巢骨质疏松症大鼠模型骨密度及骨代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(9):137-140.

[22] 袁翰. 补肾通络方激活 HIF/VEGF 信号通路促进骨质疏松大鼠模型的血管生成与抑制骨量流失[D]. 南京:南京中医药大学, 2017.

[责任编辑 孙丛丛]