

· 基础研究 ·

青娥方含药血清对破骨细胞前体 RAW 264.7 细胞 FAK/Src/p130Cas 通路及上清液炎症因子的影响

郭世明^{1,2} 郑亚明¹ 陈 盛¹ 吴银生² 黄美雅² 林燕萍²

摘要 **目的** 观察青娥方含药血清对破骨细胞前体 RAW 264.7 细胞 FAK/Src/p130Cas 通路相关基因蛋白表达及上清液炎症因子的影响。**方法** 制备青娥方含药血清和生理盐水血清,分别干预体外培养的破骨细胞前体 RAW 264.7 细胞。干预 12 h 和 24 h 后,提取 mRNA 和蛋白,荧光定量 PCR (qPCR) 检测 FAK/Src/p130Cas 及下游信号关键因子 CRK、C3G 和 RAS mRNA 表达的变化,应用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 FAK/Src/p130Cas 及下游信号关键因子 CRK、C3G 和 RAS 蛋白表达的变化;应用 ELISA 法检测细胞上清液 IL-6、TNF- α 、PGE₂ 含量。**结果** 与同期生理盐水血清组比较,青娥方含药血清组 FAK、Src、p130Cas、CRK、C3G 和 RAS 的 RNA 和蛋白表达均明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 以 FAK、Src、p130Cas 下降最为显著,而细胞上清液炎症因子 IL-6、TNF- α 和 PGE₂ 含量明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 青娥方含药血清能够下调 FAK/Src/p130Cas 及其下游信号分子的表达,抑制 RAW 264.7 细胞分泌炎症因子,从而抑制 RANKL + MCSF 诱导的破骨细胞分化。

关键词 青娥方;含药血清;RAW 264.7;FAK/Src/p130Cas 通路;炎症因子

Effect of Qing'e Recipe Containing Serum on Osteoclast Precursor RAW 264.7 Cells via FAK/Src/p130Cas Pathway and Inflammatory Factors GUO Shi-ming^{1,2}, ZHENG Ya-ming¹, CHEN Sheng¹, WU Yin-sheng², HUANG Mei-ya², and LIN Yan-ping² 1 Department of Osteopaedics, Zhangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fujian (363200); 2 Institute of Bone Disease, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Qing'e Recipe (QR) containing serum on osteoclast precursor RAW 264.7 cells via FAK/Src/p130Cas pathway and inflammatory factors. **Methods** QR containing serum and normal saline (NS) serum were prepared, which intervened osteoclast precursor RAW 264.7 cells *in vitro* respectively. After 12 and 24 h intervention, mRNA and protein were extracted. mRNA and protein levels of FAK/Src/p130Cas and the downstream signal key factors (CRK, C3G, RAS) were detected via Real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blot respectively. The levels of IL-6, TNF- α , and PGE₂ on cell supernatant were detected via ELISA. **Results** mRNA and protein expression levels of FAK, Src, p130Cas, CRK, C3G, and RAS obviously decreased in the QR containing serum group, as compared with the NS group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The decrement of FAK, Src, and p130Cas decreased more significantly. The secretion of inflammatory cytokines IL-6, TNF- α , and PGE₂ decreased more significantly in the QR containing serum group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** QR containing serum could down-regulate the expressions of FAK/SRC/p130Cas and their downstream signaling molecules, inhibit inflammatory cytokines secreted by RAW 264.7 cells, therefore, inhibiting RANKL + MCSF induced osteoclast differentiation.

KEYWORDS Qing'e Recipe; drug containing serum; RAW 264.7 cells; FAK/Src/p130Cas pathway; inflammatory factor

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81574003);福建省科技厅引导性项目(No. 2015Y0069);陈可冀中西医结合发展基金资助(No. CKJ2014003, No. CKJ201411)

作者单位:1.福建省漳州市中医院骨伤科(福建 363200);2.福建中医药大学中西医结合研究院骨病研究所(福州 350122)

通讯作者:林燕萍, Tel: 0591-22861090, E-mail: lyp66@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170614.138

骨质疏松症确切发病机制目前还不清楚,但骨代谢失衡的观点已被广泛接受。破骨细胞功能的失调是导致绝经后骨质疏松症发病的重要原因,破骨细胞体外培养是研究破骨细胞生物学特性及骨吸收机制与调控因素的重要方法,因此建立破骨细胞体外培养模型是研究骨质疏松症的重要手段。目前研究已表明,FAK/Src/p130Cas 通路可以通过调节破骨细胞的结构和功能来抑制破骨细胞活性,在早期骨质疏松起重要作用^[1]。本课题组前期研究表明,青娥方可减缓骨质疏松模型大鼠骨密度及雌二醇含量水平的下降^[2]。临床研究也表明,青娥方对原发性骨质疏松症有明显的防治作用^[3]。为进一步阐明青娥方防治绝经后骨质疏松症的作用机制,本研究从骨吸收角度切入,通过青娥方含药血清干预体外培养破骨细胞,检测 FAK/Src/p130Cas 及其下游信号分子 CRK、C3G 和 RAS mRNA 和蛋白表达,以及细胞上清液炎症因子 IL-6、TNF- α 和 PGE₂ 的含量变化,以探讨青娥方防治骨质疏松症的发病机制。

材料与方法

1 实验动物 3 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 30 只,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,实验动物许可证号:SCXK(沪)2012-0001,合格证编号:0001101,体重(231 \pm 11)g,医学实验动物环境设施为福建中医药大学动物实验中心鼠类实验室(合格证号:SYXK 2012-0001)。饲养环境:温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度(55 \pm 5)%。

2 实验药物 青娥方由杜仲(盐炒)15 g、补骨脂(盐炒)10 g、核桃仁(炒)10 g、大蒜 5 g 组成,原药材购于福建中医药大学国医堂,由福建中医药大学医学实验中心中药制剂室制备。8 倍量水浸泡后常规煎煮法煎煮 2 次,合并煎煮液,旋转蒸发器中蒸发浓缩,再水浴锅上浓缩成膏(每克浸膏含生药 5.79 g,4 $^{\circ}$ C 保存备用)。

3 主要试剂与仪器 RAW 264.7 细胞(美国 ATCC 细胞库,生产批号:TIB-71);FAK 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,生产批号:3285);p130Cas 抗体(美国 Santa Cruz 公司,生产批号:sc-365200);c-Src 抗体(美国 Santa Cruz 公司,生产批号:sc-18);C3G 抗体(美国 Santa Cruz 公司,生产批号:sc-32055);Ras 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,生产批号:3965);Crk 抗体(美国 BD Transduction Laboratories 公司,生产批号:610036);一抗稀释液(碧云天生物技术研究

生产批号:P0023A);二抗稀释液(碧云天生物技术研究,生产批号:P0023D); β -actin(北京全氏金生物技术有限公司,生产批号:HC201);鼠二抗(北京全氏金生物技术有限公司,生产批号:HS201);兔二抗(北京全氏金生物技术有限公司,生产批号:HS101);彩色预染蛋白质分子量标准 Marker(碧云天生物技术研究,生产批号:P0068);Beyo plus 超敏化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究,生产批号:P0018);反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司,生产批号:RR047A);PCR 引物(日本 TaKaRa 公司,生产批号:NSO_2033945_001~014);SYBR Premix Ex Taq PCR Kit(日本 TaKaRa 公司,生产批号:RR820A);IL-6 酶联免疫吸附测试试剂盒(南京森贝伽科技有限公司,生产批号:SBJ-M0044);TNF- α 酶联免疫吸附测试试剂盒(南京森贝伽科技有限公司,生产批号:SBJ-M0030);PGE₂ 酶联免疫吸附测试试剂盒(南京森贝伽科技有限公司,生产批号:SBJ-M0055);ELx800 型酶标仪(美国 Bio-TEK 公司);凝胶成像系统 GEL DOC 2000 型(美国 PE 公司);荧光实时定量 PCR 仪 7500 fast 型(美国 ABI 公司)。

4 实验方法

4.1 含药血清的制备 30 只 3 月龄 SPF 级 SD 雌性大鼠,随机分成 2 组:青娥方组和生理盐水组,各 15 只。适应性饲养 7 天后,开始灌胃。青娥方组给予青娥方浸膏 0.62 g/(kg \cdot d),生理盐水组以生理盐水 2 mL/d 灌胃,两组均连续灌胃 7 天,于最后一次灌胃后 1 h 无菌采集腹主动脉血。全血室温下静置 2 h,3 000 r/min,离心 15 min 后取上清,同组血清混匀,56 $^{\circ}$ C 水浴灭活补体 30 min,过滤器(0.22 μ m 孔径)过滤除菌,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

4.2 破骨细胞前体 RAW 264.7 细胞的诱导分化与破骨细胞的鉴定 取 15 代以内的同代细胞,以 1 \times 10⁴/mL 密度接种,加入高糖 DMEM 培养基 + 10% FBS,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养,细胞贴壁 48 h 后,去原培养基,加入诱导分化液(高糖 DMEM 培养基 + RANKL + MCSF,RANKL 及 MCSF 在板孔中的终浓度分别为 50 ng/mL 和 30 ng/mL)。第 6 天镜下观察,并用 TRAP 法染色,出现 3 个核及以上的多核细胞且具有皱折缘即为破骨细胞。

4.3 应用梯度浓度的血清干预 RAW 264.7 细胞以确定最佳干预血清浓度 取第 6 代 RAW 264.7 细胞消化种植于 24 孔板,细胞密度 3 \times 10³/孔,待细胞贴壁 24 h 后更换培养液(高糖 DMEM 培养基 + RANKL + MCSF,RANKL 及 MCSF 在板孔中的终浓

度分别为 50 ng/mL 和 30 ng/mL), 分别加入 5%、10% 和 15% 的青娥方含药血清或生理盐水血清, 每组 3 个复孔。每 2 天换液 1 次, 连续培养 6 天, TRAP 染色, 显微镜下计数每个孔 3 个核及以上的多核破骨细胞数量。取相同浓度青娥方含药血清组与生理盐水血清组分化细胞数量差别较明显的血清浓度作为最佳浓度进行正式实验。

4.4 破骨细胞分组、干预 取同代的 RAW 264.7 细胞消化、接种于 25 cm² 培养瓶, 细胞密度 1 × 10⁶/瓶, 以高糖 DMEM 培养基 + 10% FBS 培养, 待细胞贴壁 24 h 后, 弃原培养液, 分组: 青娥方含药血清组、生理盐水血清组, 加入培养液 (见 4.3), 再分别加入最佳浓度的青娥方含药血清及相应浓度的生理盐水血清。培养 12、24 h 后收集细胞及细胞上清液检测。

4.5 荧光实时定量 PCR 法检测 RNA 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 根据反转录试剂盒提供实验步骤进行逆转录, 合成 FAK、Src、p130Cas、CRK、C3G 和 RAS 扩增引物, 进行 PCR 反应。PCR 引物序列: FAK 引物: 上游: 5'-AGA A C T T G G A C G C T G-T A T T G G A G A-3', 下游: 5'-T G C A A C A G C C A A A G C T G G A-3'; Src 引物: 上游: 5'-G C A A G A T C A C-T A G A C G G G A A T C A-3', 下游: 5'-G C A T T G T C G A A G T C G G A T A C A G A G-3'; p130Cas 引物: 上游 5'-C G A G A C C C A T T G T T G G A T G T G T A-3', 下游 5'-G G G C A C A T C C T T G C T C A C A G-3'; CRK 引物: 上游 5'-T G A G C T A G G G T C A A T C G C T C A T C-3', 下游 5'-C C A T G A A G G T A A A T G G G T T T G A G A A-3'; RAS 引物: 上游 5'-A G A C T C G A G T G G A A T T G G G T G A A-3', 下游 5'-T G A A C A T T T G G C T G C T G T G G A-3'; C3G 引物: 上游 5'-T C T G G A C A A G G T G G A C C A G A A G-3', 下游 5'-T G G C T G T G G A A A T C A T G C A A-3'; β-actin 引物: 上游 5'-A G G C T G T G T T G T C C C T G T A-3', 下游 5'-A T G T C A C G C A C G A T T T C C-3'。引物使用前用 DEPC 水溶解成 10 pmol/μL 浓度的引物溶液。反应体系低速离心机离心, 在低速震荡器震荡混匀。荧光定量 PCR 仪设定如下: 95 °C 5 s 变性, 60 °C 34 s 退火、延伸, 循环 40 次, 得到扩增曲线。95 °C 15 s,

60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 得到溶解曲线。以各组 β-actin 作为内参, 对各组样品进行校正, 应用 2^{-ΔΔCt} 法 (RQ 值) 计算基因相对表达量。

4.6 Western blot 法检测蛋白 细胞裂解液裂解细胞后, 提取总蛋白。BCA 法检测蛋白浓度后变性。计算 30 μg 蛋白样品所需的体积以及 4 μL 彩色蛋白分子量标准 Marker, 分别加入上样孔中, 电泳、转膜、封闭, 一抗孵育, 二抗孵育, 洗膜, 化学发光与曝光。应用 Image Pro-plus program version 5.0 图像分析系统分析 PVDF 膜中的目的条带, 计算机自动读取并记录每条带的光密度值。

4.7 ELISA 法检测 试剂盒及细胞上清液于室温下平衡 30 min, 按照 ELISA 试剂盒操作方法, 根据标准品的浓度及对应的 OD 值, 绘制标准曲线, 再根据样品 OD 值计算出对应的样品浓度, 计算 IL-6、TNF-α、PGE₂ 的含量。

5 统计学方法 实验数据运用 SPSS 18.0 软件包处理分析, 参数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

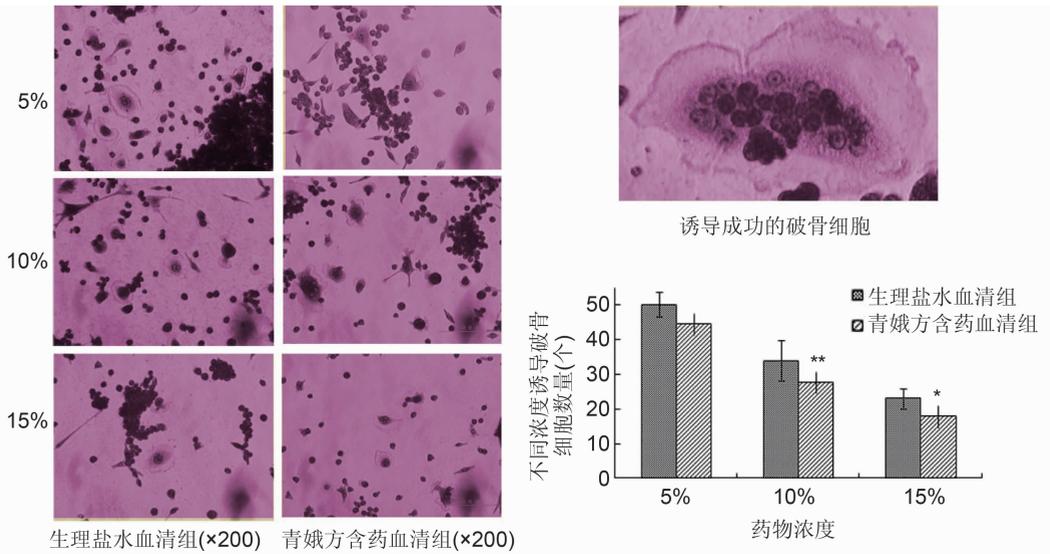
1 两组诱导破骨细胞的鉴定与数量的比较 (图 1) 诱导培养 6 天后发现 RAW 264.7 细胞分化成有数个细胞核的多核巨细胞, 经 TRAP 液染色, 可见细胞边缘的皱折缘。当两组血清浓度均为 5% 时, 生理盐水血清组和青娥方含药血清组的破骨细胞的数量最多, 随着干预的血清浓度的升高, 两组的破骨细胞数逐渐减少。与生理盐水血清组比较, 相同浓度的青娥方含药血清组所诱导的破骨细胞数减少, 但低浓度血清的两组差别不明显。当青娥方含药血清浓度为 10% 时, 青娥方含药血清组与相同浓度的生理盐水血清组破骨细胞数量相差最大 (P < 0.01)。当两组的血清浓度为 15% 时, 两组破骨细胞的数量也逐渐减少, 两组差别亦减小 (P < 0.05)。故选择 10% 血清浓度进行后续实验。

2 两组细胞 FAK、Src、p130Cas、CRK、C3G 和 RAS mRNA 表达比较 (表 1) 青娥方含药血清组

表 1 两组细胞 FAK、Src、p130Cas、CRK、RAS、C3G mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	培养时间	FAK	Src	p130Cas	CRK	RAS	C3G
生理盐水血清	3	12 h	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
		24 h	1.121 ± 0.070	1.141 ± 0.026	1.283 ± 0.067	1.364 ± 0.035	1.462 ± 0.053	1.583 ± 0.095
青娥方含药血清	3	12 h	0.784 ± 0.092 *	0.823 ± 0.036 **	0.811 ± 0.028 **	0.811 ± 0.033	0.888 ± 0.057 *	0.839 ± 0.032 **
		24 h	0.650 ± 0.059 **	0.728 ± 0.038 **	0.733 ± 0.060 **	0.934 ± 0.092 **	0.971 ± 0.164 **	1.013 ± 0.069 **

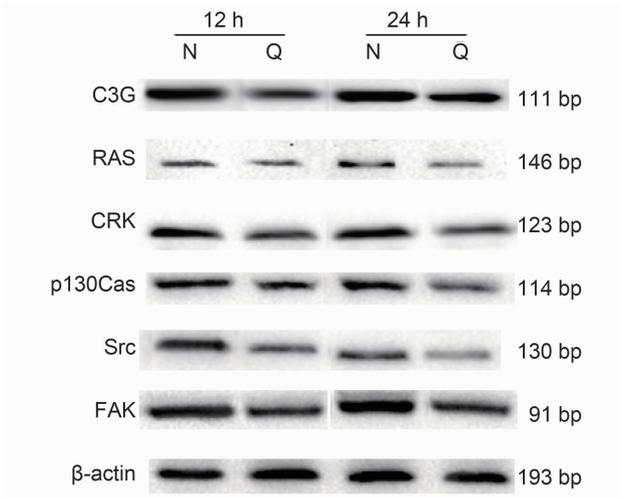
注: 与生理盐水血清组同期比较, *P < 0.05, **P < 0.01



注:与生理盐水血清组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
 图 1 梯度浓度青娥方含药血清干预小鼠 RAW 264.7 细胞分化成破骨细胞 (TRAP 染色)

与生理盐水血清组比较,各时间段上述各指标均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),以 FAK、Src、p130Cas 下降最为显著。

3 两组细胞 FAK、Src、p130Cas、CRK、C3G、RAS 蛋白表达比较(图 2,表 2) 青娥方含药血清组与生理盐水血清组比较,各时间段上述各指标均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),以 FAK、Src、p130Cas 下降最为显著。



注:N 为生理盐水血清组;Q 为青娥方含药血清组
 图 2 FAK/Src/p130Cas 信号通路信号蛋白的 Western blot 检测结果

4 两组细胞上清液 IL-6、TNF- α 、PGE₂ 含量比较(表 3) 生理盐水血清组 RAW 264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 和 PGE₂ 持续升高。培养 12 h,青娥方含

药血清组 IL-6 有所下降,与生理盐水血清组无明显差异($P > 0.05$),但 TNF- α 、PGE₂ 明显低于生理盐水血清组($P < 0.05$)。至 24 h,青娥方含药血清组 IL-6、PGE₂ 进一步下降,与生理盐水血清组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),TNF- α 两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

绝经后骨质疏松症主要表现为高转换型,即骨的高吸收与高形成,绝经后骨质疏松(PMOP)的早期预防应着重于抑制骨吸收。破骨细胞体外培养是研究破骨细胞生物学特性及骨吸收机制与调控因素的重要方法,因此建立破骨细胞体外培养模型是研究骨质疏松症的重要手段。RAW 264.7 细胞为小鼠单核白血病细胞,来源于小鼠肿瘤,生物学特性较稳定,是目前运用较广泛的一种破骨细胞前体细胞。国内外研究表明,RANKL 和 MCSF 联合诱导外周血单核细胞即可成功获得破骨细胞,可用来建立理想的破骨细胞体外模型^[4,5]。本研究应用 RAW 264.7 细胞,在 RANKL + MCSF 的诱导下培养 6 天,即可分化成有数个细胞核的多核巨细胞,经 TRAP 液染色,可见细胞边缘的皱折缘,故破骨细胞的体外培养模型成功建立。

本研究结果发现,血清浓度为 5% 时,破骨细胞的数量最多,随着血清浓度的升高,破骨细胞数却逐渐减少,两组之间差异有统计学意义。可见高浓度的青娥方含药血清对破骨细胞的分化有抑制作用,其机制可能为青娥方通过抑制肌动蛋白环的形成使破骨细胞分

表 2 两组细胞 FAK、Src、p130Cas、CRK、RAS、C3G 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	培养时间	FAK	Src	p130Cas	CRK	RAS	C3G
生理盐水血清	3	12 h	0.813 ± 0.058	0.833 ± 0.021	0.262 ± 0.011	0.769 ± 0.027	0.714 ± 0.015	0.772 ± 0.073
		24 h	0.934 ± 0.058	0.951 ± 0.021	0.329 ± 0.021	1.050 ± 0.027	1.044 ± 0.038	1.218 ± 0.073
青娥方血清	3	12 h	0.654 ± 0.077 *	0.686 ± 0.030 **	0.208 ± 0.022 **	0.624 ± 0.025 **	0.634 ± 0.041 *	0.645 ± 0.044 **
		24 h	0.542 ± 0.049 **	0.606 ± 0.032 **	0.188 ± 0.036 **	0.718 ± 0.071 **	0.694 ± 0.117 **	0.779 ± 0.053 **

注:与生理盐水血清组同期比较, *P < 0.05, **P < 0.01

表 3 两组细胞上清液 IL-6、TNF-α、PGE₂ 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	培养时间	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (ng/L)	PGE ₂ (pg/mL)
生理盐水血清	3	12 h	103.808 ± 8.230	128.636 ± 3.292	136.477 ± 3.404
		24 h	106.159 ± 5.856	150.678 ± 6.768	151.715 ± 5.328
青娥方血清	3	12 h	95.292 ± 12.459	115.127 ± 5.634 *	124.968 ± 2.881 *
		24 h	89.004 ± 6.899 *	141.176 ± 9.417	102.180 ± 5.875 **

注:与生理盐水血清组同期比较, *P < 0.05, **P < 0.01

化下降,但生理盐水血清组破骨细胞数量也进一步减少,其机制有待于进一步探讨。

现代研究发现, TNF-α 可直接促进破骨细胞前体细胞的增殖及破骨祖细胞的分化^[6],对成熟破骨细胞的骨吸收功能也有促进作用^[7]。PGE₂ 是一种重要的骨吸收刺激因子,能促进破骨细胞的形成,可增强破骨细胞前体的融合,从而使破骨细胞数量增加,并抑制钙化,促进骨的吸收。IL-6 主要由单核/巨噬细胞合成并分泌,直接作用于破骨细胞促进其增值、分化,刺激骨吸收;同时也可以刺激其他细胞分泌,增加其他因子的作用,如 IL-6 可与 PGE₂ 协同来调节破骨细胞分化^[8]。TNF-α、IL-6 及 PGE₂ 是骨质疏松发病过程中 3 种重要的炎症因子,可代表破骨细胞的增殖、破骨细胞的分化以及破骨功能的骨吸收功能。本研究结果发现予青娥方含药血清干预 12 h, TNF-α 及 PGE₂ 明显降低(P < 0.05), IL-6 虽有降低但与生理盐水血清组比较差异无统计学意义。干预 24 h, IL-6 显著降低(P < 0.05), PGE₂ 下降更明显(P < 0.01), 而 TNF-α 表达水平与生理盐水血清组比较无明显差异。提示 PGE₂ 作为最早期的炎症因子,在刺激因子作用下即出现高表达,再经过 IL-6 协同作用及刺激时间的延长,升高更明显。青娥方含药血清在早期可明显抑制 TNF-α 和 PGE₂, 后期明显抑制 IL-6 表达,推测青娥方含药血清优先抑制破骨细胞前体细胞的增殖以及破骨细胞前体的融合,使之无法形成完整的破骨细胞结构。

破骨细胞的吞噬功能表现在骨吸收过程中吸收骨基质以及暴露出骨陷窝的骨细胞。这种功能依赖于破骨细胞的运动及黏附,而破骨细胞的运动及黏附依赖于破骨细胞肌动蛋白环。FAK 属于非受体蛋白酪氨酸激酶,参与了肌动蛋白环的形成,可以促进破骨细胞的分化、重塑和骨再生^[9]。FAK 活化后构象改变,促

进 FAK 与 c-Src 的 SH2 域结合。FAK/SRC 复合体通过磷酸化 p130Cas 后再通过 CRK 连接到 C3G 进入 RAS 途径,继而激活 MAPK 信号转导通路,启动骨吸收。激活的 CRK 与下游具有富含脯氨酸区域的蛋白质 C3G 通过 CRK 的 SH3 结构域相互结合,其结合点也定位于粘着斑复合物^[10]。研究表明,FAK 可调节破骨细胞的结构和功能,FAK 敲除后骨吸收减少 30%^[11],其作用正是通过调节破骨细胞的结构和功能来抑制破骨细胞活性。Src 基因敲除的小鼠,无法形成肌动蛋白环^[12],破骨细胞活性抑制,出现骨硬化症^[13]。因此在骨质疏松症的发病机制中 FAK/Src/p130Cas 及其下游信号分子在早期骨质疏松起重要作用。

本研究结果表明,RAW 264.7 细胞用 RANKL + MCSF 刺激 12、24 h 后,FAK、Src、p130Cas、CRK、C3G 和 RAS mRNA 和蛋白表达均增加,其中后三者的增加尤为明显。经予青娥方含药血清干预后,FAK、Src、p130Cas、CRK、C3G 和 RAS 的 RNA 和蛋白表达均明显减少,以前三者下降最为显著。可见青娥方通过抑制 FAK/Src/p130Cas 的表达,从而抑制破骨细胞的肌动蛋白环的形成使破骨细胞分化下降。RANKL + MCSF 刺激 RAW 264.7 细胞后 CRK、C3G 和 RAS 表达明显增加,增加幅度明显高于 FAK、Src、p130Cas,提示 FAK 激活后与 Src、p130Cas 结合形成 FAK/Src/p130Cas 复合体^[14],故游离 FAK、Src、p130Cas 因子增加不明显。另一方面,青娥方含药血清干预后细胞 FAK、Src、p130Cas 的表达下降最明显,推测 FAK/Src/p130Cas 可能是形成肌动蛋白环的始发点,在破骨细胞形成中起“开关”样的作用。由此可见,青娥方含药血清可通过下调 FAK/Src/p130Cas 及其下游信号分

子的表达,从而抑制 RAW 264.7 细胞向破骨细胞分化。对 FAK/Src/p130Cas 及其下游信号分子的调节作用可能是青娥方抑制破骨细胞分化和骨吸收,从而防治骨质疏松的作用机制之一。

参 考 文 献

[1] Thompson WR, Rubin CT, Rubin J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone [J]. *Gene*, 2012, 503(2): 179-193.

[2] 王金蕴, 林煜, 吴银生, 等. 青娥方对骨质疏松模型大鼠骨组织 MMP-9 及血清 TRACP 的影响[J]. *福建中医药大学学报*, 2014, 24(3): 11-14.

[3] 赵光, 沈霖, 杨艳萍. 青娥丸对绝经后骨质疏松症患者骨密度、血清 MMP-2 水平及骨代谢指标的影响[J]. *中西医结合临床*, 2012, 4(3): 113-117.

[4] Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation [J]. *Annals New York Academy Sci*, 2007, 11(16): 227-237.

[5] Takayanagi H, Kim S, Koga T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts [J]. *Develop Cell*, 2002, 3(6): 889-901.

[6] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(2): 275-286.

[7] Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts [J]. *J Cell Biol*, 1999, 145(3): 527-538.

[8] Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, et al. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2012, 122(4): 143-159.

[9] Kim JB, Leucht P, Luppen CA, et al. Reconciling the roles of FAK in osteoblast differentiation, osteoclast remodeling, and bone regeneration [J]. *Bone*, 2007, 41(1): 39-51.

[10] Buday L. Membrane-targeting of signaling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1422(2): 187-204.

[11] Ray BJ, Thomas K, Huang CS, et al. Regulation of osteoclast structure and function by FAK family kinases [J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 92(5): 1021-1028.

[12] Ruest PJ, Roy S, Shi E, et al. Phosphospecific antibodies reveal focal adhesion kinase activation loop phosphorylation in nascent and mature focal adhesions and requirement for the autophosphorylation site [J]. *Cell Growth Differ*, 2000, 11(1): 41-48.

[13] Soriano P, Montgomery C, Geske R, et al. Targeted disruption of the c-Src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice [J]. *Cell*, 1991, 64(4): 693-702.

[14] Burnham MR, Bruce-Staskal PJ, Harte MT, et al. Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(16): 5865-5878.

(收稿:2016-01-21 修回:2017-04-05)

责任编辑:李焕荣

英文责编:张晶晶

《中国中西医结合杂志》荣获中国科协精品科技期刊项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目实施方案(2015—2017)》,通过项目申报,资格审查及专家评审,分别评选出精品科技期刊 TOP50 项目 50 项,学术质量提升项目 120 项,数字出版建设项目 11 项,集群(联盟)建设项目 11 项,出版人才培养项目 2 项,精品科普期刊项目 5 项,共 199 项。《中国中西医结合杂志》进入 TOP50 项目。

