

· 基础研究 ·

基于 RANK/RANKL/OPG 通路探讨尪痹片对
去势后胶原诱导性关节炎大鼠骨吸收的影响张馨妍^{1, 2} 孙龙吉^{1, 2} 郑慧兰^{1, 2} 陶庆文^{2, 3} 周同亮^{3, 4} 李 鸿^{3, 4} 王建国^{2, 3}

摘要 目的 探讨尪痹片(WBT)对肾虚证胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠核转录因子- κ B受体活化因子(RANK)/RANK配体(RANKL)/骨保护素(OPG)信号通路的影响,探索WBT干预破骨细胞(OC)分化、增殖及骨吸收作用的机制。方法 选用雌性SD大鼠,共48只,随机分为空白对照组、CIA组、肾虚证组、肾虚证CIA组、CIA+WBT组、肾虚证+WBT组、肾虚证CIA+WBT组、CIA+甲氨蝶呤(MTX)组,每组6只。采用去势法制备肾虚证模型,牛Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂诱导制备CIA模型。模型制备成功后进行药物灌胃,灌胃周期结束后处死,取血及后肢踝关节。甲苯胺蓝染色检测踝关节骨吸收情况。酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠血清中白细胞介素4(IL-4)、IL-33、OPG、RANKL水平。实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测大鼠踝关节骨组织中RANKL、OPG mRNA表达。蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测大鼠踝关节骨组织中活化T细胞核因子1(NFATc1)、肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)表达。结果 大鼠踝关节软骨甲苯胺蓝染色结果显示,经WBT干预后,关节软骨面结构破坏有所改善,关节软骨面相对完整。与空白对照组比较,CIA组、肾虚证CIA组大鼠血清中IL-4、IL-33浓度降低,RANKL浓度、RANKL/OPG比值及NFATc1、TRAF6蛋白表达升高($P<0.05$, $P<0.01$),肾虚证CIA组OPG浓度、mRNA表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),RANKL mRNA表达升高,RANKL/OPG比值升高($P<0.01$)。与肾虚证CIA组比较,肾虚证CIA+WBT组IL-4浓度升高($P<0.01$),RANKL mRNA表达、RANKL/OPG比值及NFATc1、TRAF6蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与CIA组比较,CIA+WBT组IL-33、OPG浓度升高($P<0.05$, $P<0.01$),RANKL/OPG比值降低($P<0.01$)。结论 尪痹片能够通过调控RANK/RANKL/OPG信号通路,上调抗破骨因子IL-4、IL-33浓度,抑制炎症反应,直接或间接抑制OC分化、增殖及骨吸收功能。

关键词 类风湿关节炎;破骨细胞;RANK/RANKL/OPG信号通路;炎症因子;尪痹片;中成药

Effect of Wangbi Tablet on Bone Resorption in Castration CIA Rats Based on RANK/RANKL/OPG Pathway

ZHANG Xin-yan^{1, 2}, SUN Long-ji^{1, 2}, ZHENG Hui-lan^{1, 2}, TAO Qing-wen^{2, 3}, ZHOU Tong-liang^{3, 4}, LI Hong^{3, 4}, and WANG Jian-ming^{2, 3} 1 Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 2 Traditional Chinese Medicine Department of Rheumatism, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029); 3 Beijing Key Lab of Immune-Mediated Inflammatory Diseases, Beijing (100029); 4 Institute of Clinical Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029)

ABSTRACT Objective To discuss the effect of Wang-bi Tablet (WBT) on receptor activator of NF- κ B (RANK) /RANK ligand (RANKL) / osteoprotegerin (OPG) signaling pathway in collagen-induced arthritis (CIA) rats with Shen deficiency syndrome, and to explore the intervention mechanism of WBT in osteoclast (OC) differentiation, proliferation and bone resorption. **Methods** Totally 48 female SD rats were selected,

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 82074223)

作者单位:1. 北京中医药大学研究生院(北京 100029); 2. 中日友好医院中医风湿病科(北京 100029); 3. 免疫炎症性疾病北京市重点实验室(北京 100029); 4. 中日友好医院临床医学研究所(北京 100029)

通讯作者:王建国, Tel: 010-84205067, E-mail: doctorwangjm@sina.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230925.089

which were randomly divided into blank control group, CIA group, Shen deficiency syndrome group, CIA with Shen deficiency syndrome group, CIA+WBT group, Shen deficiency syndrome + WBT group, CIA with Shen deficiency syndrome + WBT group and CIA + methotrexate (MTX) group, and 6 rats in each group. The rat model of Shen deficiency syndrome was established by castration, and CIA model was induced by bovine type II collagen and incomplete Freund's adjuvant. Intragastric administration was performed after successful model replication. After administration, the rats in each group were sacrificed and materials including blood and ankle joints of hind limbs were taken. Toluidine blue staining was used to detect the bone absorption in ankle joints. The levels of serum interleukin-4 (IL-4), interleukin-33 (IL-33), OPG and RANKL of rats were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of RANKL and OPG in the ankle bone tissue of rats were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Western Blot was used to determine the expression of nuclear factor of activated T cells 1 (NFATc1) and TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) in the ankle bone tissue of rats. **Results** The results of toluidine blue staining on the ankle cartilage of rats showed that the damage of the articular cartilage surface was improved and the articular cartilage surface was relatively intact after WBT treatment. Compared with the blank control group, the levels of serum IL-4 and IL-33 of rats in CIA group and CIA with Shen deficiency syndrome group decreased, while the level of RANKL, the ratio of RANKL/OPG and the expression of NFATc1 and TRAF6 increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The level of OPG and OPG mRNA expression in CIA with kidney deficiency syndrome group decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and RANKL mRNA expression increased, RANKL/OPG ratio increased ($P<0.01$). Compared with CIA with Shen deficiency syndrome group, the level of serum IL-4 in CIA with Shen deficiency syndrome + WBT group increased ($P<0.01$), while RANKL mRNA expression, RANKL/OPG ratio, NFATc1 and TRAF6 expression decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with CIA group, the level of serum IL-33 and OPG in CIA+WBT group increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the ratio of RANKL/OPG decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Through regulating the RANK/RANKL/OPG signaling pathway, WBT could up-regulate the levels of anti-osteoclast factors including IL-4 and IL-33, and inhibit the inflammatory response, directly or indirectly inhibit the OC differentiation, proliferation and bone resorption.

KEYWORDS rheumatoid arthritis; osteoclast; RANK/RANKL/OPG signaling pathway; inflammatory cytokines; Wang-bi Tablet; Chinese patent medicine

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 以关节滑膜炎和血管炎为主要病理特点, 是一种发病率、致残率较高的慢性自身免疫病^[1]。RA 关节下骨破坏是其致残的主要原因^[1]。破骨细胞 (osteoclast, OC) 作为体内唯一的骨吸收细胞, 是 RA 骨破坏的关键参与者。OC 介导的骨吸收过度导致骨代谢失衡是 RA 骨破坏形成的重要原因, 而调控骨吸收的关键通路是核转录因子- κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK) / RANK 配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) / 骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 通路, 调节 RANKL/OPG 平衡以抑制骨吸收, 一直是医学研究的热点^[2]。

RA 属中医学“尪痹”范畴, 肾虚、髓亏、骨损是其主要病机, 补肾壮骨法是治疗 RA 骨破坏的根本大法。而尪痹片 (Wang-Bi Tablet, WBT) 则是由焦树德教授以补肾壮骨为法创立的补肾祛寒治尪汤为主加减而制成, 是治疗 RA 骨破坏的经典中成药。临

床研究表明, WBT 联合甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 能够显著下调 RA 患者循环血 Dickkopf 相关蛋白-1 (Dickkopf-related protein 1, DKK-1) 表达, 延缓骨侵蚀, 且疗效优于单用 MTX^[3]。本课题组前期实验研究亦发现, WBT 可调控胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 小鼠滑膜组织中 Th1/Th2 细胞平衡, 抑制炎症反应^[4]。因此, 本研究建立肾虚证 CIA 大鼠病证结合复合模型并开展相关实验, 以 RANK/RANKL/OPG 信号通路为切入点, WBT 作为实验药物, 从动物-分子体系解析 WBT 抑制骨吸收的机制。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 大鼠, 48 只, 雌性, 6 周龄, 体重 (200 ± 20) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2019-0008。大鼠饲养于北京中医药大学良乡校区临床研究

所实验动物中心屏障系统,为 SPF 级别环境条件,温度范围 21~25 ℃,湿度范围 60%~70%,每日光照时间 12 h、黑夜时间 12 h 循环交替。大鼠分笼饲养,每笼 3~4 只,动物饲养期间可自由进食、饮水,所用大鼠饲料、水、垫料等均已提前高压灭菌处理,垫料每 4 日更换 1 次。实验开始前大鼠适应性饲养 1 周。本实验已经过中日友好医院实验动物福利伦理委员会审查并批准 (No. zryhy21-21-03-03)。

2 实验药物 WBT (主要成分:桂枝、骨碎补、续断、淫羊藿、熟地、生地、黑顺片、白芍、防风、伸筋草、狗脊、威灵仙、知母、独活、羊骨、皂角刺、红花),0.5 g/片,辽宁好护士药业(集团)有限公司生产,批号:210615;MTX,2.5 mg/片,上海信谊药厂生产,批号:036200303。

3 主要试剂与仪器 牛Ⅱ型胶原(货号:20022)、弗氏不完全佐剂(货号:7002),购自 Chondrex 公司;二甲苯(货号:10023418)、中性树胶(货号:10004160),购自国药集团化学试剂有限公司;冰醋酸(货号:G10000218)购自 Servicebio 公司;甲苯胺蓝染色液(货号:G1481)购自 Solarbio 公司;蛋白提取液(货号:MDL91201)、蛋白酶抑制剂(货号:MD912893)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:MD913053)、SDS-PAGE 预制胶套装(货号:MD911919)、DEPC(货号:MD911875)、白细胞介素 4 (interleukin 4, IL-4) 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒(货号:MD123461)、IL-33 ELISA 试剂盒(货号:MD13897)、OPG ELISA 试剂盒(货号:MD123455)、RANKL ELISA 试剂盒(货号:MD120008),购自 MDL 公司;中等蛋白分子量 marker(货号:26617)购自 Thermo 公司; β -actin(货号:ab8226)购自 Abcam 公司;活化 T 细胞核因子 1 (nuclear factor of activated T cells 1, NFATc1)(货号:A1539)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF Receptor-Associated Factor 6, TRAF6)(货号:A16991),购自 ABclonal 公司;TRIZOL(货号:10296028)购自 Invitrogen 公司;无水乙醇(货号:10009218)、异丙醇(货号:40064360),购自国药公司;UltraPure Agarose(货号:16500100)、SuperScript III RT 逆转录试剂盒(货号:11752050)、Sybr qPCR Mix 试剂盒(货号:4472920),购自 ABI-Invitrogen 公司。

石蜡切片机(RM2235型)、加热石蜡包埋系统(G1150 H型)、显微镜(DM3000型),Leica;脱色

摇床(TS-100型),海门其林贝尔仪器制造公司;电泳仪(BG-subMIDI型),北京百晶生物技术有限公司;低温离心机(3-30 K型),Sigma,德国;SDS-PAGE 电泳系统(Mini-PROTEAN Tetra Cell with Mini Trans-Blot Module And PowerPac Universal Power Supply型)、酶标仪(550型),BIO-Rad,美国;凝胶成像系统(GelDoc-It310型),UVP,美国;化学发光成像系统(ChemiScope6100型),CLINX 勤翔,中国;台式高速冷冻离心机(LEGEND MICRO 21 R型)、分光光度计(Nanodrop lite型),THERMO,美国;电泳仪(EPS 300型)、凝胶成像仪(2500型),Biorad,美国;荧光定量 PCR 仪(StepOne Software型),Applied biosystems (USA)。

4 动物分组及干预方法

4.1 分组方法 大鼠适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法对其进行分组,每组 6 只。分为空白对照组、CIA 组、肾虚证组、肾虚证 CIA 组、CIA+WBT 组、肾虚证 +WBT 组、肾虚证 CIA+WBT 组、CIA+MTX 组,共 8 组。

4.2 造模方法 先采用去势法(摘除双侧卵巢)制备肾虚证模型,4 周后采用牛Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂诱导制备 CIA 模型^[5]。

4.2.1 肾虚证模型 根据文献报道^[5]方法,做去势手术,即摘除双侧卵巢进行肾虚证造模。手术前大鼠均禁食水 12 h,戊巴比妥钠(42 mg/kg)注射液腹腔注射麻醉大鼠,常规备皮消毒后,大鼠仰卧位固定,无菌条件下进行去势手术。大鼠麻醉后于大鼠腹部正中行 3.5 cm 纵切口,找到卵巢,结扎下端输卵管后摘除卵巢,缝合伤口。术后连续 3 日腹腔注射青霉素预防感染,8 万 U/只,每日 1 次。以大鼠弓背蜷缩、扎堆、畏寒喜暖、精神萎靡、反应迟钝、自主活动少、体重减轻、体毛枯疏、毛/爪/尾少光泽/无光泽、食量/饮水量减少等特征表现为造模成功^[5,6]。去势手术顺利,造模成功,过程中无大鼠死亡。

4.2.2 CIA 模型 根据文献报道^[5]方法,采用牛Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂诱导造模。牛Ⅱ型胶原与弗氏不完全佐剂等体积混合,在冰上用匀浆器将混合液充分乳化,制成Ⅱ型胶原乳剂(终浓度 1 mg/mL),以滴加入水中乳滴不扩散作为匀浆成功标准。在无菌条件下,将配制完成的Ⅱ型胶原乳剂,皮下注射于大鼠尾根部位,0.2 mL/只(即 200 μ g/只)。以初次免疫当天作为第 0 天,第 7 天亦按上述方法配制Ⅱ型胶原乳剂,0.1 mL/只(即 100 μ g/只)尾根部皮下注射,加强免疫 1 次。于第二次免疫后

7 天开始对大鼠双后肢的红肿程度进行关节炎评分：无红肿为 0 分；小趾关节轻微红肿为 1 分；小趾关节和足趾关节红肿为 2 分；踝关节以下的部位全部红肿为 3 分；踝关节及踝关节以下部位足爪全部肿胀为 4 分。将大鼠双后肢的关节评分相加（最高 8 分），以关节炎评分 ≥ 4 分作为造模成功的标准^[5, 7]。CIA 造模成功，过程中无大鼠死亡。

4.3 给药方法 WBT 的临床常用剂量 6 g/d，根据“人和动物体表面积折算等效剂量比率表”计算^[8]，若人体重为 60 kg，则大鼠剂量为 0.63 g/kg，每日 1 次，连续 8 周，用生理盐水溶解，制成浓度为 0.25 g/mL 的溶液，即用即溶。MTX 的临床常用剂量为 10 mg 每周 1 次，计算所得大鼠剂量为 1.05 mg/kg，每周 1 次，连续 8 周，用生理盐水溶解，制成浓度为 0.25 mg/mL 的溶液，即用即溶。于模型复制成功后进行药物灌胃。其中，CIA+WBT 组、肾虚证 +WBT 组、肾虚证 CIA+WBT 组分别每天予 0.63 g/kg WBT；CIA+MTX 组除每周一次 1.05 mg/kg 的 MTX 外，其余时间均每天予生理盐水灌胃；空白对照组、CIA 组、肾虚证组、肾虚证 CIA 组分别每天予等量的生理盐水。

4.4 取材方法 各组灌胃周期结束后处死取材。腹主动脉取血收集全血，3 000 r/min 离心 15 min（离心半径 10 cm）得到上清液血清，-80 ℃ 保存，以备后续 ELISA 检测。处死大鼠后迅速暴露后肢踝关节，剪下双侧后肢足踝关节，除去关节周围多余的皮毛及软组织。左侧后肢放于 4% 多聚甲醛中固定 48 h 后，用流水冲掉关节上残留液，将关节置于 EDTA 脱钙液中，定期更换脱钙液，直至以 1 mL 注射器针头能轻松刺入关节骨内作为判定脱钙完全的标准，脱钙时间大约为 2 个月，以备石蜡切片使用。将右侧后肢置于做好标记的标本袋后立即置于 -80 ℃ 冰箱中冻存，用于实时荧光定量聚合酶链式反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR）检测及蛋白免疫印迹法（Western Blot）检测。

5 检测指标及方法

5.1 甲苯胺蓝染色检测踝关节骨吸收情况 石蜡切片（厚度为 5 μ m）脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯 I 20 min、二甲苯 II 20 min、无水乙醇 I 5 min、无水乙醇 II 5 min、75% 酒精 5 min，自来水洗。组织切片入染液 2~5 min，水洗，0.1% 的冰醋酸稍分化，自来水洗终止反应，显微镜下控制分化程度，自来水洗后，将切片置于烤箱烤干。透明封片：切片入干净

的二甲苯透明 10 min，中性树胶封片。显微镜镜检，图像采集分析。

5.2 ELISA 检测大鼠血清中 IL-4、IL-33、OPG、RANKL 水平 根据 ELISA 试剂盒说明书操作方法检测血清中 IL-4、IL-33、OPG、RANKL 浓度，450 nm 波长测量吸光度（OD 值），根据浓度和 OD 值算出标准曲线的回归方程，拟合模型选用 Logistic 曲线（四参数）。

5.3 RT-qPCR 检测大鼠踝关节骨组织中 RANKL、OPG mRNA 表达 Trizol 法从样本中提取总 RNA，使用核酸浓度测定仪测定 RNA 浓度和纯度，使用 invitrogen 的逆转录试剂盒 superscript III 逆转录合成 cDNA，建立 RT-qPCR 反应体系，于荧光定量 PCR 仪上反应。以 β -actin 作为内参。通过 $\Delta\Delta$ CT 法计算基因的相对表达量。本实验引物设计如表 1 所示。

表 1 实验相关引物序列及长度

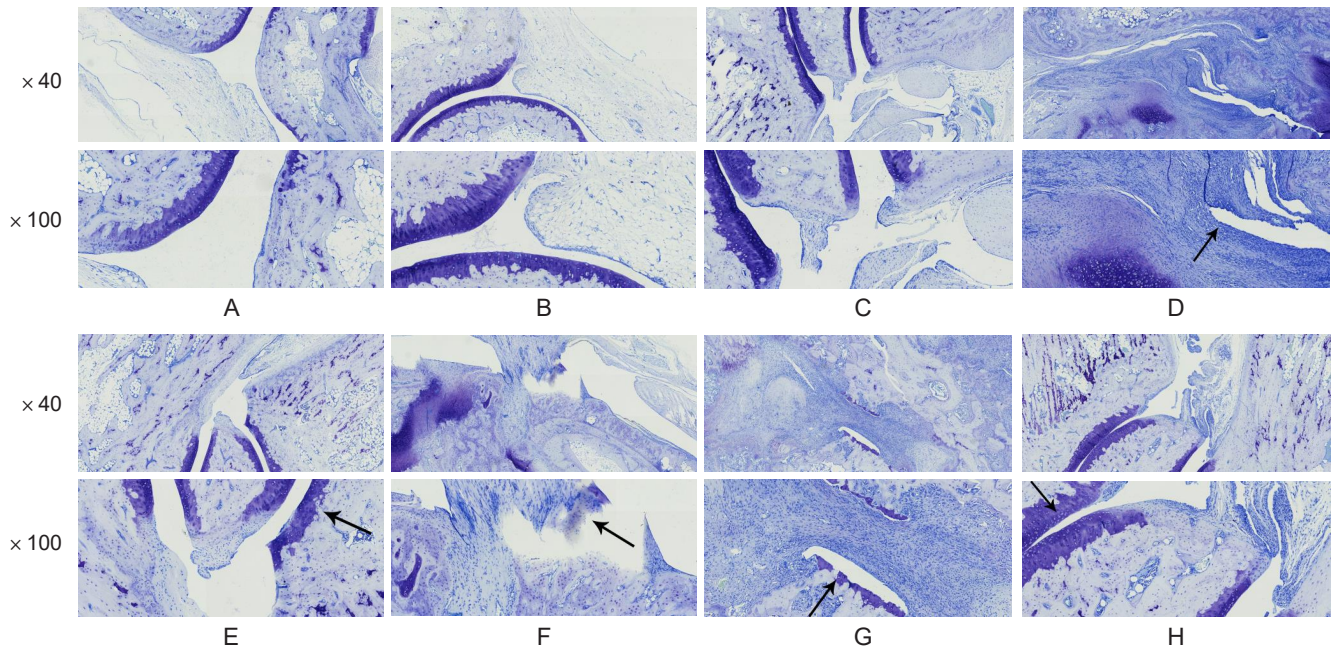
名称	序列（3'-5'）	引物大小（bp）
β -actin	F CTGAACGTGAAATTGTCCGAGA	22
	R TTGCCAATGGTGATGACCTG	20
OPG	F ACATCATTGAATGGACAACCCAG	23
	R TGCCAGGAGCACATTTGTCA	20
RANKL	F CACACGAGGGTCCGCTGCATC	21
	R TGCAGACCACCTGACCCAGTCC	22

5.4 Western Blot 检测大鼠踝关节骨组织中 NFATc1、TRAF6 表达 取大鼠踝关节组织加液氮进行匀浆，加入裂解液于冰浴中充分裂解，4 ℃，12 000 r/min 离心 15 min，收集上清，BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。经 SDS-PAGE 凝胶电泳将凝胶上分离到的蛋白条带转移至 PVDF 膜。转移膜置于封闭液中封闭 1 h，一抗用封闭液稀释，4 ℃ 反应过夜，二抗用 1 $\times$ TBST 稀释 300 倍，作用 60 min。ECL 显色及成像。分析条带灰度值，分析蛋白相对表达量。

6 统计学方法 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析，数据以图表的形式展现，计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 描述。进行多组间比较时，数据呈正态分布并且满足方差齐时用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验，方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验、Dunnetts T3 检验。所有的统计检验均采用双侧检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠踝关节软骨病理形态学比较（图 1） 空白对照组、肾虚证组、肾虚证 +WBT 组关节软骨面完整；与空白对照组比较，CIA 组、肾虚证 CIA 组、



注: A 为空白对照组; B 为肾虚证组; C 为肾虚证 +WBT 组; D 为 CIA 组; E 为 CIA+WBT 组; F 为 CIA+MTX 组; G 为肾虚证 CIA 组; H 为肾虚证 CIA+WBT 组; 箭头所示为关节软骨面破坏典型病变处, 其中图 D 箭头所示为血管翳侵蚀软骨层造成严重破坏, 无连续的软骨层

图 1 各组大鼠踝关节软骨甲苯胺蓝染色结果

肾虚证 CIA+WBT 组、CIA+WBT 组、CIA+MTX 组均有不同程度关节软骨面结构破坏, 关节间隙变窄或消失; 与 CIA 组比较, CIA+MTX 组关节软骨面无明显变化, CIA+WBT 组关节软骨面有部分破坏, 相对完整; 与肾虚证 CIA 组比较, 肾虚证 CIA+WBT 组关节软骨面相对完整, 关节间隙清晰。

2 各组大鼠血清中炎症因子 IL-4、IL-33 浓度比较 (表 2) 与空白对照组比较, CIA 组、肾虚证 CIA 组大鼠血清中 IL-4、IL-33 浓度降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与肾虚证 CIA 组比较, 肾虚证 CIA+WBT 组 IL-4 浓度升高 ($P<0.01$)。与 CIA 组比较, CIA+WBT 组 IL-33 浓度升高 ($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠血清中炎症因子 IL-4、IL-33 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-4 (pg/mL)	IL-33 (ng/L)
空白对照	6	21.34 ± 5.41	156.45 ± 36.86
肾虚证	6	19.13 ± 0.78	150.44 ± 15.44
肾虚证 +WBT	6	5.40 ± 1.13	61.42 ± 4.29
CIA	6	9.48 ± 1.14*	92.13 ± 6.95*
CIA+WBT	6	12.91 ± 2.29	123.22 ± 6.67 [△]
CIA+MTX	6	11.97 ± 6.25	85.00 ± 12.75
肾虚证 CIA	6	6.80 ± 0.47**	68.78 ± 27.47*
肾虚证 CIA+WBT	6	9.84 ± 0.24 [△]	92.99 ± 11.00

注: 与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与肾虚证 CIA 组比较, $\Delta P<0.01$; 与 CIA 组比较, $\Delta P<0.01$

3 各组大鼠血清中 OPG、RANKL 浓度比较 (表 3) 与空白对照组比较, 肾虚证 CIA 组大鼠血清中 OPG

浓度显著降低 ($P<0.05$), CIA 组、肾虚证 CIA 组大鼠血清中 RANKL 浓度及 RANKL/OPG 比值升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 CIA 组比较, CIA+WBT 组 OPG 浓度升高 ($P<0.05$), RANKL/OPG 比值降低 ($P<0.01$)。

表 3 各组大鼠血清中 OPG、RANKL 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OPG (pmol/L)	RANKL (ng/L)	RANKL/OPG (ng/pmol)
空白对照	6	53.92 ± 1.19	116.91 ± 36.52	2.16 ± 0.64
肾虚证	6	48.74 ± 4.87	130.77 ± 36.21	2.65 ± 0.46
肾虚证 +WBT	6	20.22 ± 8.55	219.36 ± 45.19	12.17 ± 5.92
CIA	6	30.91 ± 1.23	192.68 ± 10.28*	6.23 ± 0.25**
CIA+WBT	6	51.81 ± 8.94 [△]	134.06 ± 51.78	2.62 ± 0.92 ^{△△}
CIA+MTX	6	30.40 ± 7.10	157.43 ± 6.18	5.37 ± 1.27
肾虚证 CIA	6	23.81 ± 14.77*	195.13 ± 12.49*	10.06 ± 4.52*
肾虚证 CIA+WBT	6	29.64 ± 2.73	166.74 ± 46.43	5.76 ± 2.13

注: 与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 CIA 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

4 3 组大鼠踝关节骨组织中 OPG、RANKL mRNA 表达及 RANKL/OPG 结果比较 (表 4) 与空白对照组比较, 肾虚证 CIA 组大鼠踝关节骨组织中 OPG mRNA 表达降低, RANKL mRNA 表达升高, RANKL/OPG 比值升高 ($P<0.01$); 与肾虚证 CIA 组比较, 肾虚证 CIA+WBT 组 RANKL mRNA 表达降低, RANKL/OPG 比值降低 ($P<0.01$)。

表 4 3 组大鼠踝关节骨组织中 OPG、RANKL mRNA

表达及 RANKL/OPG 结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OPG	RANKL	RANKL/OPG
空白对照	6	1.01 ± 0.20	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.18
肾虚证 CIA	6	0.27 ± 0.01*	12.34 ± 3.88*	44.97 ± 13.10*
肾虚证 CIA+WBT	6	0.45 ± 0.26	1.11 ± 0.59 [△]	2.55 ± 0.27 [△]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与肾虚证 CIA 组比较,[△] $P < 0.01$

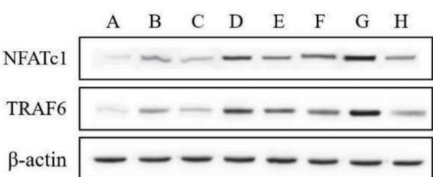
5 各组大鼠踝关节骨组织中 NFATc1、TRAF6 蛋白表达比较(表 5, 图 2) 与空白对照组比较, 肾虚证组大鼠踝关节骨组织中 NFATc1 表达升高($P < 0.05$), CIA 组、肾虚证 CIA 组大鼠 NFATc1、TRAF6 蛋白表达升高($P < 0.01$);与肾虚证 CIA 组比较, 肾虚证 CIA+WBT 组 NFATc1、TRAF6 蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 5 各组大鼠踝关节骨组织中 NFATc1、TRAF6

蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NFATc1	TRAF6
空白对照	6	0.13 ± 0.04	0.11 ± 0.02
肾虚证	6	0.37 ± 0.08*	0.36 ± 0.13
肾虚证 +WBT	6	0.22 ± 0.03	0.27 ± 0.13
CIA	6	0.58 ± 0.12**	0.70 ± 0.17**
CIA+WBT	6	0.48 ± 0.03	0.55 ± 0.18
CIA+MTX	6	0.50 ± 0.02	0.54 ± 0.18
肾虚证 CIA	6	0.86 ± 0.20**	0.83 ± 0.12**
肾虚证 CIA+WBT	6	0.42 ± 0.03 ^{△△}	0.40 ± 0.18 [△]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与肾虚证 CIA 组比较,[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$



注: A 为空白对照组; B 为肾虚证组; C 为肾虚证 +WBT 组; D 为 CIA 组; E 为 CIA+WBT 组; F 为 CIA+MTX 组; G 为肾虚证 CIA 组; H 为肾虚证 CIA+WBT 组

图 2 各组大鼠踝关节骨组织中 NFATc1、TRAF6 蛋白表达电泳图

讨 论

中医学对 RA 骨破坏早有认识, RA 最早见于《内经》,《素问·痹论》:“风寒湿三气杂至, 合而为痹”^[9]。后世医家相继提出了骨痹、肾痹、历节、顽痹、鹤膝风、骨槌风等病名。中医名家焦树德教授总结临床经验, 首次提出“尪痹”, 认为肾虚、髓亏、骨损是其主要病机, 还指出尪痹发病的关键

在于风寒湿邪入肾伤骨、骨质受损, 关节变形; 三邪未侵入肾者, 虽久痹不愈亦不会使骨质受损变形^[10]。中医学认为“肾藏精, 主骨生髓”, 并由此形成了“肾—精—髓—骨”的化生调控体系。

焦树德教授提出“补肾壮骨法”为治疗 RA 骨质受损的根本大法, 并创立了补肾祛寒治尪汤、补肾清化治尪汤、补肾强督治尪汤等一系列治疗 RA 的经典方剂^[11, 12]。而 WBT 是以焦树德教授创立的补肾祛寒治尪汤为主加减制成的中成药, 由桂枝、骨碎补、续断、淫羊藿、熟地、生地、黑顺片、白芍、防风、伸筋草、狗脊、威灵仙、知母、独活、羊骨、皂角刺、红花共 17 味中药组成。方中共 9 味补肾中药, 其中 6 味具有补肾壮骨之功效, 是以补肾壮骨法治 RA 骨破坏的经典中成药。现代药理学研究发现, 方中淫羊藿^[13, 14]、骨碎补^[15, 16]、白芍^[17]、续断^[18]等中药单药及其有效成分能够通过多靶点、多通路直接或间接抑制 OC 分化成熟及骨吸收功能。

OC 作为 RA 骨侵蚀的关键参与者, 其分化成熟受 RANK/RANKL/OPG 系统调控及转录因子 TRAF6、NFATc1 等介导^[2]。RANKL 与 OCPs 表面的 RANK 结合, 诱导 RANK 胞质内构象改变, 募集适配蛋白 TRAF6 并与之结合, 活化 TRAF6, 通过一系列胞内信号转导, 进一步激活下游信号, 包括 NF-κB、c-Jun 氨基末端激酶 (c-JunN-terminal kinase, JNK)、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB 或 Akt)、NFATc1 等, 活化其介导的信号传导途径, 最终使 OCPs 向 OC 分化、成熟。OPG 作为天然 RANKL 的受体, 能竞争性与 RANKL 结合, 阻断 RANK-RANKL 结合, 抑制 OC 过度分化, 体外实验中 OPG 亦能诱导 OC 凋亡, 抑制 OC 形成及骨吸收作用^[19-21]。

本研究验证了 WBT 对踝关节软骨形态学的影响, 以及对 RANKL/OPG 平衡的调控, 并研究在该过程中 OC 分化相关重要转录因子的表达变化情况。大鼠踝关节软骨甲苯胺蓝染色结果显示, WBT 干预后, 关节软骨面结构破坏有所改善, 关节软骨面相对完整, 证实 WBT 能够抑制骨破坏, 保护关节软骨面完整。

采用 ELISA 检测大鼠血清 OPG、RANKL 浓度, 结果表明, 对大鼠进行 CIA 造模能够显著上调 RANKL/OPG 平衡, WBT 干预后, RANKL/OPG 比值显著降低, 证实 WBT 对 CIA 模型大鼠 RANKL/OPG 平衡具有明显下调作用; 而对大鼠进行肾虚证 CIA 造模亦能显著上调 RANKL/OPG 平衡, WBT 干

预后, RANKL/OPG 比值有降低趋势, 但差异无统计学意义。为进一步探究 WBT 对肾虚证 CIA 模型 RANKL/OPG 平衡的调控作用, 采用 RT-qPCR 检测大鼠踝关节骨组织中 OPG、RANKL mRNA 表达, 结果显示, 对大鼠进行肾虚证 CIA 造模能够显著上调骨组织中 RANKL/OPG 平衡, WBT 干预后, RANKL/OPG 比值显著降低, 证实 WBT 亦能显著下调肾虚证 CIA 模型大鼠 RANKL/OPG 平衡。为验证 WBT 通过调控 RANK/RANKL/OPG 通路进而影响 OC 分化增殖及骨吸收功能, 采用 Western Blot 检测各组大鼠踝关节骨组织中 NFATc1、TRAF6 表达。结果提示, 肾虚证 CIA 模型大鼠 NFATc1、TRAF6 表达显著升高, 导致 OC 过度分化; WBT 干预后, NFATc1、TRAF6 表达显著降低。证实 WBT 能够显著下调 NFATc1、TRAF6 的表达, 从而抑制 OC 分化、成熟及增殖。综上所述, WBT 能够下调 RANKL/OPG 平衡, 通过调控 RANK/RANKL/OPG 信号通路, 直接抑制 OC 分化、增殖及骨吸收功能。

RA 作为一种慢性自身免疫病, 炎症因子的过度分泌在 RA 骨破坏的发生发展中发挥重要作用, 炎症反应亦能直接或间接促进 OC 分化及骨吸收功能, 多种细胞因子参与 RANK/RANKL/OPG 通路及 OC 分化过程的微观调控, 包括促炎因子 IL-34、IL-6、IL-17、IL-1、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、IL-23 等; 抗炎因子 IL-33、IL-10、IL-4、干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)、IL-27、IL-3 等^[22-24]。越来越多的炎性细胞因子已被确定为新的骨调节因子, 可作为 RA 骨破坏的潜在治疗靶点。既往研究表明, IL-4 能够抑制 RANKL 诱导的 NFATc1 转录表达; 下调 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 RANKL 表达^[25-27]。IL-33 能够抑制 RANKL 诱导的 OC 分化; 诱导 OC 凋亡^[28-30]。为探究 WBT 对大鼠血清中炎症因子浓度的影响, 采用 ELISA 检测大鼠血清中抗破骨因子 IL-4、IL-33 水平。实验发现, 肾虚证 CIA 模型大鼠血清 IL-4 浓度显著降低, WBT 干预后, IL-4 显著升高。CIA 模型大鼠血清 IL-33 显著降低, WBT 干预后, IL-33 显著升高。证实 WBT 能够显著上调 IL-4、IL-33 浓度。综上所述, WBT 能够显著上调抗破骨因子 IL-4、IL-33 浓度, 抑制炎症反应, 亦间接抑制 OC 分化及骨吸收作用。

本研究对补肾壮骨法 (WBT) 调控 RANK/RANKL/OPG 通路抑制骨吸收的机制进行了初步验证, 研究表明: (1) WBT 能够下调 RANKL/OPG 平衡, 通过调控 RANK/RANKL/OPG 信号通路, 直接

抑制 OC 分化、增殖及骨吸收功能。(2) WBT 能够显著上调抗破骨因子 IL-4、IL-33 浓度, 抑制炎症反应, 亦间接抑制 OC 分化及骨吸收作用。初步证实 WBT 能够通过调控 RANK/RANKL/OPG 信号通路, 抑制骨吸收、改善骨代谢, 从而治疗 RA 骨破坏。

然而, 在研究结果中, 部分检测指标组间表达水平可见较为明显的趋势变化, 而统计学显示差异无统计学意义, 考虑与本次实验样本量较少有关, 日后可加大样本量, 进一步行实验论证。此外, 仅通过动物实验评估 RANK/RANKL/OPG 通路尚不能系统全面地反映 WBT 的作用机制, 因此未来还需要进一步完善细胞实验、临床观察, 结合现代基因芯片、分子生物学等技术, 从临床-动物-细胞-分子体系逐层解析验证, 探索 RANK/RANKL/OPG 通路与其他信号通路的交互串扰作用, 明确 WBT 干预骨吸收、改善骨代谢的机制, 为 RA 骨破坏的早期诊断与中西协同精准治疗奠定坚实的理论基础。

利益冲突: 本文内容无任何利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 2018 中国类风湿关节炎诊疗指南 [J]. 中华内科杂志, 2018, 57 (4): 242-251.
- [2] Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology [J]. Histochem Cell Biol, 2018, 149 (4): 325-341.
- [3] 帅波, 沈霖, 马陈, 等. 尪痹片联合甲氨蝶呤片对类风湿性关节炎患者血清 DKK-1 及关节滑膜侵蚀的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28 (6): 16-20.
- [4] Wang JM, Luo J, Xu Y, et al. Wang-Bi Tablet, a Chinese patent medicine, modulates the balance of Th1/Th2, in a collagen-induced arthritis mouse model [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 40 (3): 401-406.
- [5] 王燕, 赵宏艳, 刘梅洁, 等. 类风湿关节炎肾虚证大鼠模型的建立 [J]. 中西医结合学报, 2011, 9 (9): 973-982.
- [6] 方肇勤主编. 大鼠 / 小鼠辨证论治实验方法学 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 86-97.
- [7] Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, et al. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56 (2): 544-554.

- [8] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [9] 唐·王冰撰注; 鲁兆麟主校. 黄帝内经素问[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997: 8.
- [10] 焦树德, 杜甫云. 痿痹的辨证论治[J]. 中医杂志, 1992, 33(3): 11-13.
- [11] 焦树德. 再谈痿痹的辨证论治[J]. 中医杂志, 1997, 38(11): 504-505.
- [12] 焦树德. 类风湿关节炎从痿痹论治[J]. 江苏中医药, 2008, 40(1): 5-6.
- [13] Kim B, Lee KY, Park B. Icariin abrogates osteoclast formation through the regulation of the RANKL-mediated TRAF6/NF- κ B/ERK signaling pathway in Raw264.7 cells[J]. *Phytomedicine*, 2018, 51: 181-190.
- [14] 杨楠. 淫羊藿苷通过 LAP 途径抑制典型自噬抑制破骨分化的机制研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.
- [15] 刘朝晖, 马剑雄, 田爱现, 等. 柚皮苷对破骨细胞分化和极化影响的初步探究[J]. 天津医药, 2020, 48(12): 1141-1145.
- [16] 张峻玮, 李琰, 薛海鹏, 等. 骨碎补经骨髓间充质干细胞调节 OPG/RANKL/RANK 通路抑制破骨细胞的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(5): 617-624.
- [17] 贾敏, 张寒. 白芍总苷对体外培养的成骨细胞和破骨细胞的影响[J]. 西北药学杂志, 2010, 25(5): 357-359.
- [18] 刘开飞. 川续断皂苷 VI 通过抑制破骨细胞生成来保护胶原诱导型关节炎引起的骨破坏[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [19] Atilano-Miguel S, Barbosa-Cortés L, Ortiz-Muñoz R. Duchenne muscular dystrophy: RANK/RANKL/OPG (receptor activator of nuclear factor- κ B/RANK ligand/osteoprotegerin) system and glucocorticoids[J]. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 2022, 79(5): 275-283.
- [20] Boyce BF, Xing L. Functions of RANK/RANKL/OPG in bone modeling and remodeling[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473(2): 139-146.
- [21] 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.
- [22] Zhou P, Zheng T, Zhao B. Cytokine-mediated immunomodulation of osteoclastogenesis[J]. *Bone*, 2022, 164: 116540.
- [23] Amarasekara DS, Yun H, Kim S, et al. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks[J]. *Immune Netw*, 2018, 18(1): e8.
- [24] 杨林, 吕丹, 沈小芳, 等. 细胞因子对类风湿性关节炎骨平衡的调节作用[J]. 生命科学, 2019, 31(1): 35-43.
- [25] Liu F, Chen F, Yang L, et al. Melittin acupoint injection in attenuating bone erosion in collagen-induced arthritis mice via inhibition of the RANKL/NF- κ B signaling pathway[J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2023, 13(9): 5996-6013.
- [26] Cheng J, Liu J, Shi Z, et al. Interleukin-4 inhibits RANKL-induced NFATc1 expression via STAT6: a novel mechanism mediating its blockade of osteoclastogenesis[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(11): 3385-3392.
- [27] te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, et al. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes[J]. *Blood*, 1990, 76(7): 1392-1397.
- [28] 罗帅, 李小枫, 黄成, 等. 炎症因子在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(3): 330-338.
- [29] Kiyomiya H, Ariyoshi W, Okinaga T, et al. IL-33 inhibits RANKL-induced osteoclast formation through the regulation of Blimp-1 and IRF-8 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(2): 320-326.
- [30] Lima IL, Macari S, Madeira MF, et al. Osteoprotective effects of IL-33/ST2 link to osteoclast apoptosis[J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(12): 3338-3348.

(收稿: 2022-09-01 在线: 2023-11-07)

责任编辑: 汤静