

## • 研究论文 •

## 巴戟天环烯醚萜苷下调 GSK-3 $\beta$ 抑制 JAK2/STAT3 和 NF- $\kappa$ B 通路 减轻 II 型胶原诱导的关节炎大鼠骨破坏的机制

沈 焱<sup>1</sup>, 孙艺琦<sup>1</sup>, 李鹤鸣<sup>1</sup>, 叶欣园<sup>1</sup>, 杜金蔓<sup>1</sup>, 鲍荣华<sup>2</sup>, 张泉龙<sup>1</sup>,  
秦路平<sup>1\*</sup>, 张巧艳<sup>1\*</sup>

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 杭州市富阳中医骨伤医院, 浙江 杭州 311400)

**摘要:** 探讨巴戟天环烯醚萜苷 (*Morinda officinalis* iridoid glycosides, MOIG) 对类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 大鼠骨丢失的治疗作用, 并对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的破骨细胞功能和活性的作用机制。应用牛 II 型胶原诱导类风湿关节炎大鼠 (type II collagen-induced rheumatoid arthritis rats, CIA) 为模型 (实验中所有操作均获得浙江中医药大学生物伦理委员会批准, 批准号: IACUC-20180410-03), 灌胃给药 8 周, 显微 CT 观察 CIA 大鼠的骨小梁微结构变化, LPS 诱导破骨细胞模型进一步观察体外抗炎性骨质疏松的作用机制。结果表明 MOIG 显著增加 CIA 大鼠骨密度, 改善骨小梁微结构。体外实验表明, MOIG 抑制破骨细胞形成分化、抗酒石酸酸性磷酸酶活性和 F-actin 环的形成, 抑制 TNF 受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6) 的募集和核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白 [inhibitor of nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B), I $\kappa$ B $\alpha$ ] 的降解及 p65 的磷酸化表达, 从而抑制 NF- $\kappa$ B 通路的激活; 同时有效抑制破骨细胞活化 T-细胞核因子 1 (nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1, NFATc1) 和 c-Fos (cellular oncogene fos) 的表达, 以及基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 和组织蛋白酶 K (cathepsin K, CtsK) 的活性; MOIG 还抑制 Janus 激酶 2 (Janus activating kinase 2, JAK2)/信号传导和转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 蛋白的磷酸化表达, 从而抑制 JAK2/STAT3 通路的激活。进一步研究发现, MOIG 显著抑制丝氨酸/苏氨酸激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 的活性, GSK-3 $\beta$  基因沉默显著抑制破骨细胞 F-actin 环的形成、p65 的磷酸化以及 STAT3 信号的激活, 且 MOIG 和 GSK-3 $\beta$  基因沉默同时作用后的效果没有明显差异。因此, MOIG 可通过调控 GSK-3 $\beta$  抑制 JAK2/STAT3 和 NF- $\kappa$ B 通路的激活来减缓 RA 的骨破坏。

**关键词:** 巴戟天环烯醚萜苷; 类风湿关节炎; 骨丢失; 破骨细胞; NF- $\kappa$ B 通路; JAK2/STAT3 通路

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)10-2763-10

## Mechanism of *Morinda officinalis* iridoid glycosides alleviates bone deterioration in type II collagen-induced arthritic rats through down-regulating GSK-3 $\beta$ to inhibit JAK2/STAT3 and NF- $\kappa$ B signaling pathway

SHEN Yi<sup>1</sup>, SUN Yi-qi<sup>1</sup>, LI He-ming<sup>1</sup>, YE Xin-yuan<sup>1</sup>, DU Jin-man<sup>1</sup>, BAO Rong-hua<sup>2</sup>,  
ZHANG Quan-long<sup>1</sup>, QIN Lu-ping<sup>1\*</sup>, ZHANG Qiao-yan<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Hangzhou Fuyang Hospital of TCM Orthopedics and Traumatology, Hangzhou 311400, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the therapeutic effects of *Morinda officinalis* iridoid glycosides

收稿日期: 2024-03-04; 修回日期: 2024-05-05.

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目 (LZ22H280002, LBY21H060002); 国家自然科学基金项目 (82374099).

\*通讯作者 E-mail: zqy1965@163.com; lqjin@zcmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0189

(MOIG) on bone loss of rheumatoid arthritis (RA) rats, and the mechanism of osteoclast function and activity induced by lipopolysaccharide (LPS). RA rats were established by injecting bovin type II collagen. The Bio-ethic Committee of Zhejiang Chinese Medical University approved all experimental protocols associated with this study (IACUC-20180410-03). The collagen-induced arthritis (CIA) rats were administered drug by gavage for 8 weeks; the femoral trabecular micro-structure changes were observed in CIA rats by micro-CT; the LPS-induced osteoclasts model further observed the effect and mechanism of anti-inflammatory osteoporosis *in vitro*. The results indicated that MOIG could markedly increase bone mineral density (BMD) in CIA rats, improve trabecular micro-structure. *In vitro* studies demonstrated that MOIG could significantly inhibit osteoclastogenesis and differentiation, suppress tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) activity, F-actin ring formation, TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) recruitment, and inhibitor of nuclear factor kappa-B $\alpha$  ( $I\kappa B\alpha$ ) degradation as well as p65 phosphorylation, thereby repressing nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway activation. Subsequently, MOIG effectively inhibited osteoclast nuclear factor of activated T-cells c1 (NFATc1) and cellular oncogene Fos (c-Fos) expression, as well as bone resorption related protein activity including matrix metalloprotein 9 (MMP-9) and cathepsin K (CtsK). Meanwhile, MOIG also repressed the phosphorylation expression of Janus activating kinase 2 (JAK2) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), thereby inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway activation. Moreover, further studies found that MOIG could suppress glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) activity, and GSK-3 $\beta$  gene silencing could markedly inhibit osteoclast F-actin ring formation as well as the phosphorylation expression of p65 and STAT3. Of note, compared with GSK-3 $\beta$  gene silencing group, there was no significant difference in the group treated with both MOIG with GSK-3 $\beta$  gene silencing simultaneously. Thus, the results suggested that MOIG may inhibit NF- $\kappa$ B signaling pathway and JAK2/STAT3 signaling pathway activation *via* regulating GSK-3 $\beta$ , thereby alleviating bone destruction in RA.

**Key words:** *Morinda officinalis* iridoid glycoside; rheumatoid arthritis; bone loss; osteoclast; NF- $\kappa$ B signaling pathway; JAK2/STAT3 signaling pathway

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种全身性的自身免疫性疾病, 其特征是炎症性滑膜炎, 并伴有软骨和关节囊的破坏, 最终导致关节强直畸形<sup>[1]</sup>。破骨细胞 (osteoclasts, OC) 是唯一骨吸收功能的多核巨细胞, 其形成分化受巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 和受体激活的核因子  $\kappa$ B 配体 (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, RANKL) 的调控, 且其异位分化和激活对于 RA 炎症关节中的骨质破坏至关重要<sup>[2,3]</sup>。在 RA 炎症状态下, RANKL 被过度激活, 刺激破骨细胞的形成、分化和骨吸收作用, 导致骨基质降解和骨质破坏<sup>[4]</sup>。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 作为炎症性疾病的重要媒介, 可诱导巨噬细胞 RANKL 的表达, 促进 OCs 的形成、融合和存活<sup>[5]</sup>。因此, 抑制破骨细胞功能和骨吸收活性, 可有效地减缓 RA 引发的骨破坏。

目前用于治疗 RA 的药物主要有糖皮质激素、抗风湿药、非甾体抗炎和生物制剂药等, 但长期服用会引起严重的不良反应, 如肝肾损伤、胃肠道毒性、骨髓抑制等<sup>[6,7]</sup>。因此, 研究开发治疗 RA 的高效低毒的特效药依然是一项严峻的挑战。根据中医理论, RA 是由肝肾亏损、寒湿阻痹引起的, 中医常用祛风散寒、除湿通络、滋补肝肾的方法进行治疗<sup>[8]</sup>。中药巴戟天为茜

草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How. 的干燥肉质根, 具有补肝肾、强筋骨、祛风湿的作用<sup>[9]</sup>。研究发现, 巴戟天环烯醚萜苷类成分 (*Morinda officinalis* iridoid glycosides, MOIG) 具有抗炎镇痛、抗骨质疏松和抗氧化等多种药理作用<sup>[10]</sup>。课题组前期研究发现水晶兰苷可通过抑制核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 通路的激活, 缓解 LPS 诱导的小鼠骨丢失, 并增强 LPS 损伤的 MC3T3-E1 细胞的骨形成活性<sup>[11,12]</sup>。此外, 应用 LPS 诱导的骨髓单核细胞 (bone marrow mononuclear cells, BMMs) 来源的 OC 为模型, 发现水晶兰苷能通过 NF- $\kappa$ B 和蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 信号通路抑制活化 T 细胞核因子 1 (nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1, NFATc1), 从而抑制 OC 的形成和骨吸收<sup>[13]</sup>。另一项研究进一步表明, *N*-乙酰半胱氨酸可以通过减少 LPS 诱导的 BMMs 来源的破骨细胞生成过程中的活性氧形成来恢复骨重塑平衡, 从而减轻 LPS 诱导的骨溶解<sup>[14]</sup>。在 RA 中, 高度激活的 NF- $\kappa$ B 和 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK)/信号传导和转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 通路会导致破骨细胞骨吸收异常, 而 GSK-3 $\beta$  能诱导炎症因子释放, 并调控 NF- $\kappa$ B 和 JAK/STAT3 通路<sup>[15]</sup>。目

前, 尚未有研究报道抑制 GSK-3 $\beta$ 的活性能否减轻 RA 引发的骨破坏。因此, 本研究以牛 II 型胶原诱导的类风湿关节炎大鼠 (bovine type II collagen-induced rheumatoid arthritis rats, CIA) 为模型, 观察大鼠的骨丢失情况, 以及 LPS 诱导的 BMMs 来源的 OC 为模型, 观察 MOIG 对 OC 功能的作用和 MOIG 调控 GSK-3 $\beta$  对 OC 功能的影响, 以阐明 MOIG 防治 RA 导致骨丢失的作用机制。

## 材料与方 法

**动物** 54 只 SPF 级 Wistar 雄性大鼠, 3 月龄, 体重 (160~180) g, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 饲养于浙江中医药大学实验动物中心 [许可证号: SCXK (浙) 2013-0016]。饲养条件: 室温 (25  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C 的环境下, 清洁级喂养, 自由饮水及进食。本研究按照《动物福利伦理审查导则》(GB/T 35892-2018) 的建议进行, 并经浙江中医药大学生物伦理委员会批准 (批准号: IACUC-20180410-03)。

**药品与试剂** 巴戟天环烯醚萜苷类成分是从巴戟天干燥的肉质根中提取纯化的有效部位, 主要含有水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸、车叶草苷酸、车叶草苷, 4 种成分经大孔树脂富集后含量达到 60% 以上<sup>[10]</sup>; 阿仑膦酸钠 (杭州默沙东制药有限公司, Alen, 批号 J20130085); 牛 II 型胶原蛋白和弗式不完全佐剂 (美国 Sigma 公司, 货号分别为 180055 和 SLBQ2284V); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、 $\alpha$ -modified minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM)、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 和青霉素/链霉素 (美国 Gibco 公司, 货号分别为 10091-141C、C12571500BT、BL302A 和 15140-122)。M-CSF 和 sRANKL (美国 Peprotech 公司, 货号分别为 315-02-10 和 315-11C-10)。组织蛋白酶 K (cathepsin K, CtsK) 和 p-JAK2 抗体 (美国 Abcam 公司, 货号分别为 ab300569 和 ab32101)。抗 c-Fos、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 和 TNF 受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6) 抗体 (武汉博士德生物技术公司, 货号分别为 BA0207-2、PB9669 和 BM4061)。核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (inhibitor of nuclear factor kappa-B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ )、NFATc1、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$ 、p65、p-p65、STAT3、p-STAT3、JAK2 和 GAPDH 抗体 (美国 Cell Signaling Technology, 货号分别为 8032S、4812S、5558S、12456S、8242S、3033S、4904S、9145S、3230S 和 2118S)。鬼笔环肽 (美国 Sigma-Aldrich 公司, phalloidin, 型号为 P5282)。DAPI 和 BCA 蛋白检测试剂盒 (上海碧云天生物技术公司, 货号分别为 C1005 和 P0012)。si-GSK-3 $\beta$  套装

(广州锐博生物技术有限公司, 货号 Pack1999); RFect<sup>PM</sup> 原代细胞小核酸转染试剂 (常州百代生物科技股份有限公司, 货号 11015)。

**仪器** 连续波长酶标仪 (美国 Bio-TEK 公司, 型号 ELx800); 精密电子天平 (上海恒平科学仪器有限公司, 型号 JA1003); OLYMPUS 光学显微镜 (奥林巴斯公司, 型号 BX61VS)。

**造模与给药** 将质量浓度为 2 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> II 型胶原醋酸溶液按 1:1 滴加至冷的弗氏不完全佐剂中, 在冰浴下不断搅拌, 直至两种液体乳化完全, 滴在水中 30 s 不散开, 即得乳剂。初次免疫用一次性 1 mL 消毒注射器吸取乳剂, 在大鼠距离尾根部 2 cm 处皮内注射 0.2 mL 乳剂, 正常大鼠只在相同部位注射等量的生理盐水; 21 天后用同样方法于相同部位加强注射 1 次。

将模型大鼠按炎症的发展程度随机分成 5 组, 分别为模型组 (CIA model)、阿仑膦酸钠组 (Alen/1.0 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)、巴戟天环烯醚萜苷低、中、高剂量组 (MOIG/25、50、100 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), 每组 9 只。从 28 天开始, 各组大鼠以 10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 剂量灌胃给药, 每天 1 次, 连续 8 周。正常组与模型组分别给予 0.5% 羧甲基纤维素钠。实验过程中每周称量大鼠体重 1 次, 根据大鼠体重调整给药剂量。

**micro-CT 分析** 大鼠以乌拉坦 0.75 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 的剂量麻醉后处死, 取右后肢剔除多余的肌肉组织, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h 以上, 采用 micro-CT (美国 eXplore Locus SP 公司 V2.1.2 版) 分析股骨远端骨组织形态计量学参数。将获得的图像导入 Micview V2.1.2 软件进行三维重建。参数校正基于特定的扫描方<sup>[16]</sup>。三维重建骨图像后, 使用 Advanced Bone Analysis 软件测量形态学参数, 包括骨密度 (bone mineral density, BMD; mg $\cdot$ cc<sup>-1</sup>)、骨体积分数 (bone volume fraction, BVF 或 BV $\cdot$ TV<sup>-1</sup>; %)、骨表面积与骨体积比值 (ratio of bone surface to bone volume, BS $\cdot$ BV<sup>-1</sup>; 1 $\cdot$ mm<sup>-1</sup>)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th; mm)、骨小梁数 (trabecular number, Tb.N; 1 $\cdot$ mm<sup>-1</sup>)、骨小梁分离 (trabecular separation/spacing, Tb.Sp; mm)。

**破骨细胞培养** 取 6~8 周龄 C57BL/6 雄鼠, 脱颈椎处死后用 75% 乙醇溶液浸泡 10 min。超净台下取下肢骨和胫骨, 去除肌肉等多余组织, 用 5 mL 注射器吸取完全培养基将骨髓腔内的骨髓细胞冲出, 收集冲洗液, 1 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 沉淀使用红细胞裂解液处理 2 min 以去除红细胞, 1 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 细胞用 PBS 洗涤 2 次, 即得新鲜骨髓细胞<sup>[17]</sup>。将提取得到的骨髓细胞用含 5 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup> M-CSF 的完全培养基在 37  $^{\circ}$ C 及 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。将未贴壁细胞转

移至离心管中, 1 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min。收集底部细胞用含 30 ng·mL<sup>-1</sup> M-CSF 完全培养基进行培养 3 天, 即得 BMMs。

**细胞增殖** BMMs 以 1×10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 以 30 ng·mL<sup>-1</sup> M-CSF 和浓度为 0.04、0.4、4 μg·mL<sup>-1</sup> MOIG 培养液培养 48 h 后, 吸弃旧的培养基, 每孔加入 100 μL 完全培养基和 10 μL CCK-8 溶液, 37 °C 孵育 1 h, 450 nm 波长处测定吸光度值。

**破骨细胞 TRAP 活性及形成分化的测定** BMMs 以 1×10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种于 96 孔培养板中, 以 30 ng·mL<sup>-1</sup> M-CSF 和 20 ng·mL<sup>-1</sup> sRANKL 的完全培养基诱导 48 h。随后, 用 30 ng·mL<sup>-1</sup> M-CSF、200 ng·mL<sup>-1</sup> LPS 以及浓度为 0.04、0.4、4 μg·mL<sup>-1</sup> MOIG 完全培养液培养 6 天, 每 3 天换液 1 次, 第 6 天镜下计数破骨细胞, 弃去培养液, 用 PBS 洗涤两次, 使用 20 μL 1% Triton X-100 室温破裂细胞 30 min, 加入 TRAP 反应液 100 μL, 37 °C 孵育 30 min, 迅速加入 100 μL TRAP 反应终止液, 405 nm 测定吸光度值, TRAP 活性用每 100 个破骨细胞生成的对硝基苯酚的摩尔数表示。对于 TRAP 阳性的多核细胞染色, OCs 用 4% 多聚甲醛固定, 并使用 TRAP 试剂盒染色。使用倒置显微镜对含有 3 个或更多核的 OCs 的数量和面积进行计数和拍照。

**破骨细胞的 F-actin 环染色** 将 BMMs 细胞诱导的破骨细胞接种于直径为 20 mm 的共聚焦培养皿中, 用 0.04、0.4、4 μg·mL<sup>-1</sup> MOIG 处理 6 天, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% Triton X-100 渗透 5 min, 用 FITC-phalloidin 孵育 45 min, DAPI 染色 10 min, 每个操作步骤均需用 PBS 清洗细胞 2 次, 激光共聚焦显微镜拍摄。

**细胞转染** 将 BMMs 细胞诱导的破骨细胞以 2×10<sup>5</sup> 个/孔铺入 6 孔板, 待细胞贴壁生长至 60%~70%; 干扰试剂制备: 分别取 si-NC 和 si-GSK-3β 试剂各 5 μL, 加入 195 μL 无血清培养基, 吹打混匀, 室温孵育 5 min; 转染试剂制备: 取 Rfect<sup>PM</sup> 原代细胞小核酸转染试剂 32 μL, 加入 768 μL 无血清培养基, 吹打混匀, 室温孵育 5 min; 取 200 μL 转染试剂分别加入干扰试剂管中, 吹打混匀, 室温孵育 20 min; 分别加入 1 600 μL 完全培养基吹打混匀, 再加入对应的 6 孔板中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 转染 24 h 后收集细胞, Western blot 分析转染效率。

**Western blot 分析** 取出细胞弃去培养液, PBS 洗涤 2 次, 加入适量的 IP 蛋白裂解液裂解细胞, 冰上裂解 30 min, 4 °C 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 获得蛋白质上清液。采用 BCA 蛋白质检测试剂盒测得蛋白含量。通过 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质, 并将蛋白湿转至 PVDF 膜上。将膜与 5% 的牛血清蛋白常温孵育 2 h,

然后在 4 °C 下与一抗稀释液 (NFATc1、c-Fos、MMP-9、CtsK、p65、p-p65、IκBα、TRAF6、p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、GAPDH 稀释比例均为 1:1 000) 孵育过夜, TBST 洗 3 次后, 与 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG (稀释 1:3 000) 室温孵育 1 h。TBST 洗 3 次后, 采用 ECL 试剂盒曝光蛋白条带。

**统计学分析** 所有数据分析均采用 GraphPad Prism 5.0 版软件和 IBM SPSS 统计 21.0 软件完成, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。符合正态分布的用 one-way ANOVA 多重比较 LSD (least-significant difference) 法, 及两两比较用 *t*-test 检验, 不符合正态分布的用秩和检验。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

## 结果

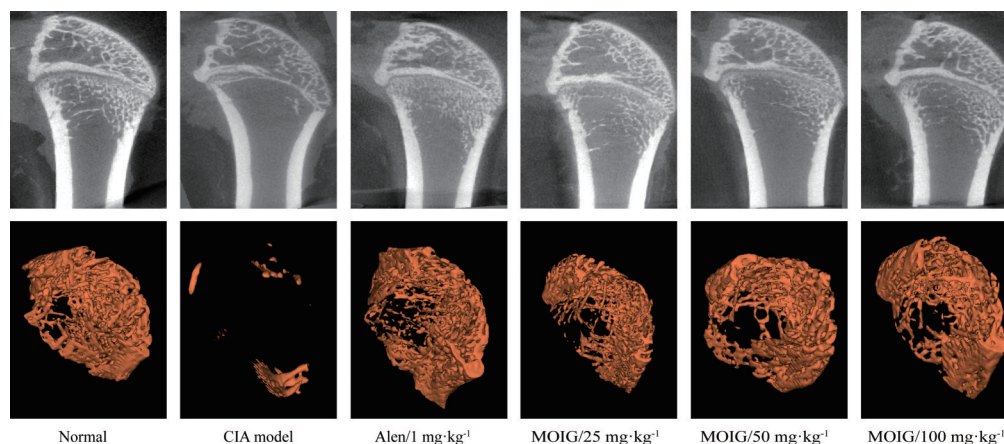
### 1 MOIG 减轻 CIA 大鼠骨组织的破坏

如图 1 所示, 显微 CT 结果表明 CIA 大鼠表现出关节骨质减少。与正常组大鼠相比, CIA 模型组大鼠股骨远端的骨小梁中的骨量较低, 小梁骨之间存在较大的间隔, 股骨远端的三维骨小梁骨结构也被破坏。与 CIA 模型组大鼠相比, Alen 和 MOIG 给药处理显著抑制 CIA 大鼠骨丢失, 表明 MOIG 能减缓 CIA 大鼠的骨丢失, 改善骨小梁微结构。

如表 1 所示, 与正常大鼠相比, CIA 模型大鼠的 BMD 显著降低 (P < 0.001)。与 CIA 模型大鼠相比, Alen 和 MOIG 处理的大鼠的 BMD 值显著升高 (P < 0.01, P < 0.001)。骨小梁微结构分析结果显示, 与正常大鼠相比, CIA 模型大鼠的骨小梁微结构参数 Tb.N、Tb.Th 和 BV·TV<sup>-1</sup> 显著降低 (P < 0.01, P < 0.001), BS·BV<sup>-1</sup> 和 Tb.Sp 显著增加 (P < 0.01, P < 0.001)。与 CIA 模型组大鼠相比, Alen 和 MOIG 给药治疗后, CIA 大鼠骨小梁 BV·TV<sup>-1</sup>、Tb.N 和 Tb.Th 显著增加 (P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001), Tb.Sp 和 BS·BV<sup>-1</sup> 显著降低 (P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001)。结果表明, 关节炎对发炎关节周围骨骼具有特别强烈的恶化作用, MOIG 可以减缓关节炎引发的不利影响。

### 2 MOIG 对 LPS 诱导的破骨细胞的形成分化和 F-actin 环形成的影响

如图 2A 所示, 0.04、0.4 和 4 μg·mL<sup>-1</sup> MOIG 对 BMM 的活力无明显作用。如图 2B 所示, LPS 诱导的破骨细胞形态清晰, 细胞体积增大, 呈现出摊鸡蛋样, 并有向外延伸的伪足, 含有多个细胞核, 经 TRAP 染色后胞浆被染成紫色, 表明 LPS 诱导 BMM 细胞可分化成破骨细胞。如图 2C~G 所示, MOIG 在 0.04、0.4、4 μg·mL<sup>-1</sup> 浓度下显著抑制破骨细胞的形成分化, 减少破骨细胞数目及面积, 并且显著抑制破骨细胞 TRAP



**Figure 1** 2D and 3D micro-CT of CIA rat femur. CIA: Collagen-induced rheumatoid arthritis; Alen: Alendronate; MOIG: *Morinda officinalis* iridoid glycosides

**Table 1** Effects of MOIG on bone histomorphometry in CIA rats.  $n = 9$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs normal group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$  vs CIA model group. BMD: Bone mineral density; BV·TV<sup>1</sup>: Bone volume fraction; BS·BV<sup>1</sup>: Ratio of bone surface to bone volume; Tb.Th: Trabecular thickness; Tb.N: Trabecular number; Tb.Sp: Trabecular separation/spacing

| Group                        | BMD/mg·cc <sup>-1</sup>           | BV·TV <sup>1</sup> /%    | BS·BV <sup>1</sup> /1·mm <sup>-1</sup> | Tb.Th/mm                         | Tb.N/1·mm <sup>-1</sup>  | Tb.Sp/mm                 |
|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Normal                       | 306.38±26.76                      | 0.30±0.05                | 25.30±1.92                             | 0.079±0.006                      | 3.82±0.37                | 0.19±0.04                |
| CIA model                    | 168.86±42.51***                   | 0.07±0.08**              | 42.84±11.98***                         | 0.050±0.012***                   | 1.11±1.07**              | 1.83±1.44**              |
| Alen/1.0 mg·kg <sup>-1</sup> | 297.67±51.16 $\Delta\Delta\Delta$ | 0.28±0.11 $\Delta\Delta$ | 26.44±3.80 $\Delta\Delta\Delta$        | 0.070±0.015 $\Delta\Delta$       | 3.84±1.16 $\Delta\Delta$ | 0.15±0.04 $\Delta\Delta$ |
| MOIG/25 mg·kg <sup>-1</sup>  | 262.34±64.43 $\Delta\Delta\Delta$ | 0.21±0.12 $\Delta$       | 29.05±5.44 $\Delta\Delta\Delta$        | 0.071±0.013 $\Delta\Delta$       | 2.77±1.31 $\Delta$       | 0.40±0.28 $\Delta$       |
| MOIG/50 mg·kg <sup>-1</sup>  | 246.04±50.49 $\Delta\Delta\Delta$ | 0.19±0.08 $\Delta$       | 31.17±8.71 $\Delta\Delta$              | 0.068±0.017 $\Delta\Delta$       | 2.67±0.65 $\Delta$       | 0.33±0.14 $\Delta$       |
| MOIG/100 mg·kg <sup>-1</sup> | 310.61±32.35 $\Delta\Delta\Delta$ | 0.30±0.07 $\Delta\Delta$ | 23.85±2.77 $\Delta\Delta\Delta$        | 0.085±0.009 $\Delta\Delta\Delta$ | 3.48±0.46 $\Delta\Delta$ | 0.21±0.05 $\Delta\Delta$ |

的活性。

F-actin 环是破骨细胞形成的一个重要的特征, 对于破骨细胞的骨吸收至关重要<sup>[18]</sup>。如图 2H 所示, 对照组破骨细胞 F-actin 环壁厚且完整, MOIG 在 0.04、0.4、4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度下均能显著抑制破骨细胞 F-actin 环的数目, 使得 actin 环的壁变薄, 甚至破坏环壁, 4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  作用效果最好。

### 3 MOIG 对 LPS 诱导的破骨细胞转录因子和骨吸收蛋白的影响

NFATc1 和 c-Fos 是重要的破骨细胞转录因子, 介导破骨细胞的形成分化<sup>[18]</sup>。如图 3 所示, MOIG 显著抑制破骨细胞 NFATc1 和 c-Fos 的表达。在破骨细胞中, NFATc1 和 c-Fos 的激活, 将促进骨吸收相关蛋白 MMP-9 和 CtsK 的表达, 从而使破骨细胞发挥骨吸收作用。MOIG 显著抑制 LPS 引起的破骨细胞 MMP-9 和 CtsK 的表达, 从而初步探讨 MOIG 抑制破骨细胞骨吸收作用的机制。

### 4 MOIG 抑制 LPS 诱导的破骨细胞 NF- $\kappa$ B 通路和 JAK2/STAT3 通路的激活

NF- $\kappa$ B 信号通路参与了破骨细胞成熟和分化的调控。如图 4A~D 所示, MOIG 能显著抑制 LPS 刺激破骨细胞中 TRAF6 的募集, 进而抑制 I $\kappa$ B $\alpha$  的降解和 p65

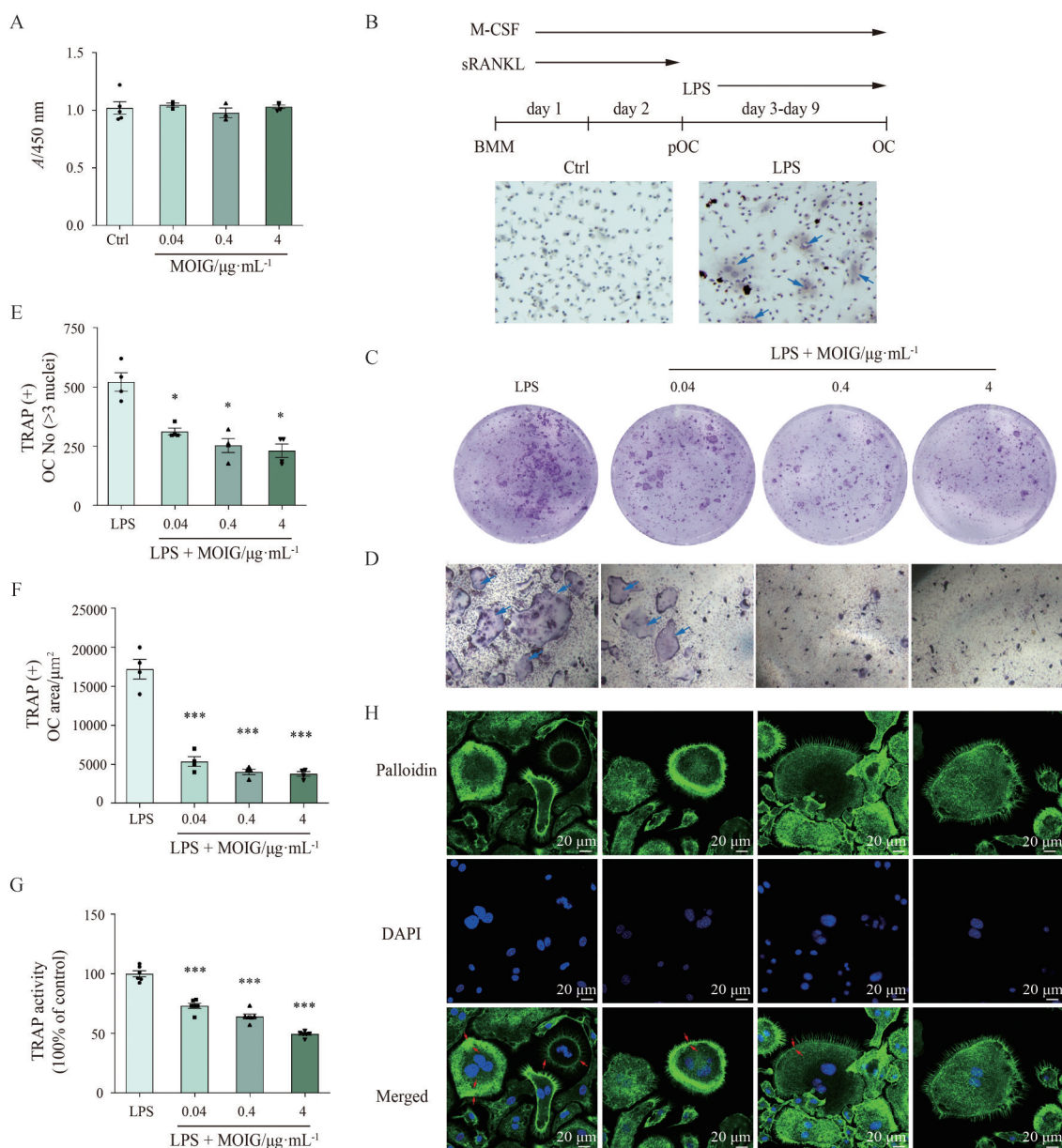
的磷酸化, 从而抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活。

JAK2/STAT3 信号通路参与破骨细胞的形成。如图 4E~G 所示, MOIG 能显著抑制 LPS 刺激破骨细胞中 JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化, 从而抑制 JAK2/STAT3 信号通路的激活, 抑制破骨细胞的形成。此外, 如图 4H 所示, MOIG 还能显著促进 GSK-3 $\beta$  的磷酸化表达, 从而抑制 GSK-3 $\beta$  的活性。

### 5 MOIG 调控 GSK-3 $\beta$ 抑制破骨细胞 F-actin 环的形成以及 NF- $\kappa$ B 通路和 STAT3 信号的激活

据报道, GSK-3 $\beta$  同时参与 NF- $\kappa$ B 通路和 STAT3 信号的调控, 从而刺激破骨细胞的活性<sup>[15]</sup>。用 si-GSK-3 $\beta$  转染破骨细胞, 构建 GSK-3 $\beta$  基因敲低模型 (图 5A)。如图 5B 所示, si-GSK-3 $\beta$  处理显著抑制了 F-actin 环的形成, MOIG 与 si-GSK-3 $\beta$  处理抑制破骨细胞的 F-actin 环形成, 但与 si-GSK-3 $\beta$  组无显著差异。综上所述, MOIG 可能通过调控 GSK-3 $\beta$  活性来调控破骨细胞 F-actin 环的形成。

如图 5C~E 所示, MOIG 显著抑制 p65 蛋白的磷酸化, 降低 STAT3 磷酸化, 但无显著差异。用 si-GSK-3 $\beta$  转染破骨细胞后, 显著抑制 STAT3 和 p65 磷酸化; 与 si-GSK-3 $\beta$  组相比, si-GSK-3 $\beta$  与 MOIG 联合处理后, p65 和 STAT3 蛋白磷酸化无明显差异。以上结果提



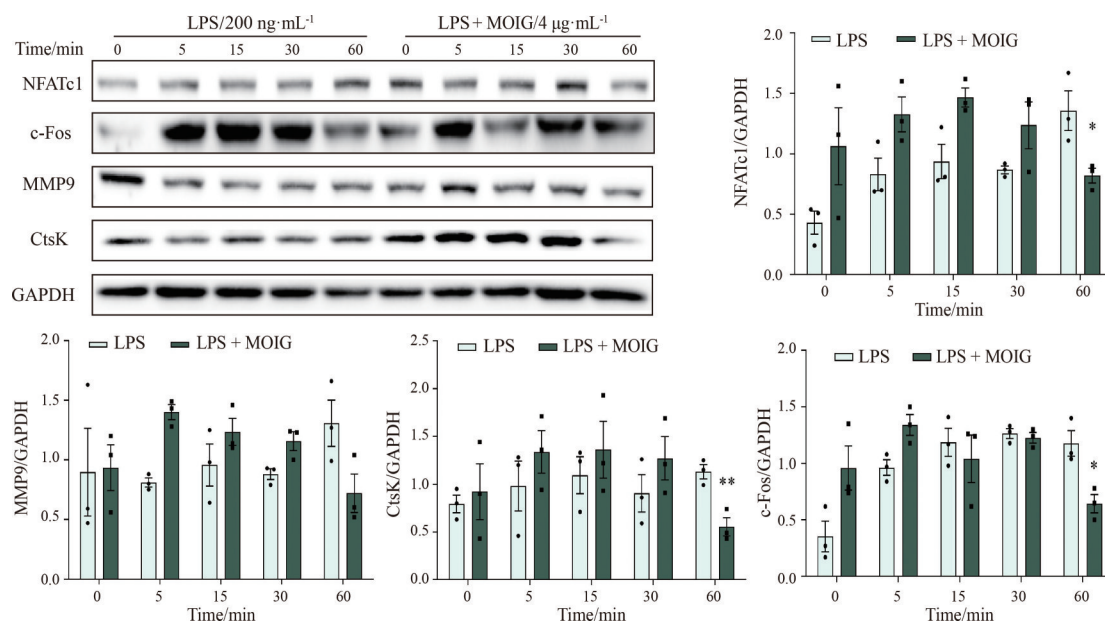
**Figure 2** Effect of MOIG on the formation and differentiation as well as F-actin ring formation of OCs induced by lipopolysaccharide (LPS). **A**: Effect of MOIG on the proliferation of OCs; **B**: BMMs were incubated for 2 d with macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  ligand (RANKL). These preosteoclasts (pOCs) were further incubated for 6 d with M-CSF in the absence or presence of LPS. OCs were stained for TRAP activity; **C**, **D**: Inhibitory effects of MOIG on the formation of OCs; **E**, **F**: The number of TRAP (+) OC with  $\geq 3$  nuclei (**E**) and average area ( $\mu\text{m}^2$ , **F**); **G**: TRAP activity of OCs treated with MOIG measured by *p*-nitrophenyl sodium phosphate method; **H**: F-actin rings of OCs were stained with phalloidin and DAPI respectively, and then imaged with a fluorescence microscope ( $\times 400$ ).  $\rightarrow$ Blue arrow indicates OCs;  $\rightarrow$ Red arrow indicates the wall thickness of the F-actin rings.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^*P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$  vs LPS group. TRAP: Tartrate resistant acid phosphatase; OC: Osteoclast

示, MOIG 可能通过调控 GSK-3 $\beta$  来抑制 NF- $\kappa\text{B}$  通路和 STAT3 信号的激活, 从而抑制破骨细胞的功能。

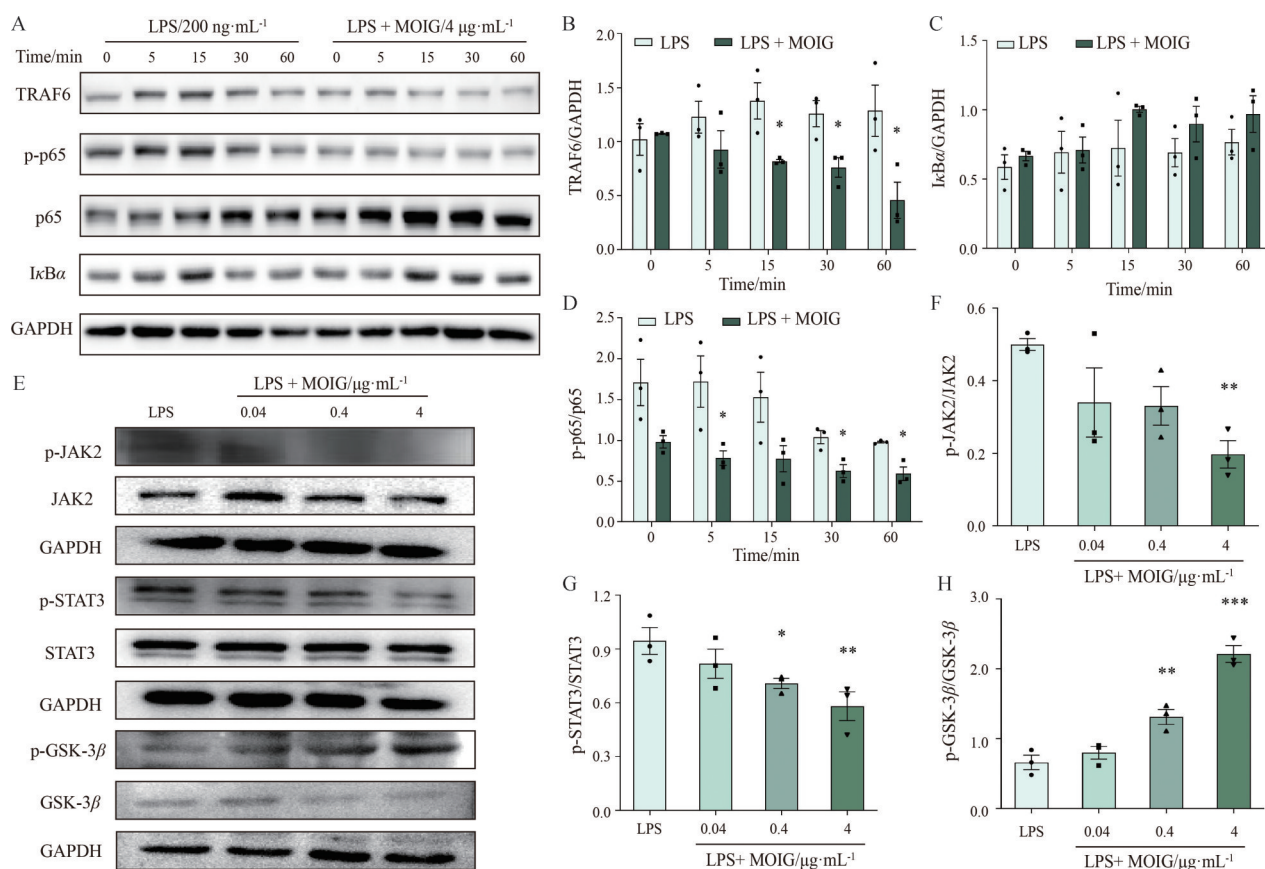
### 讨论

RA 是一种自身免疫性疾病, 主要表现为关节僵硬、畸形、肿胀、疼痛、骨质侵蚀和关节功能丧失<sup>[19,20]</sup>。

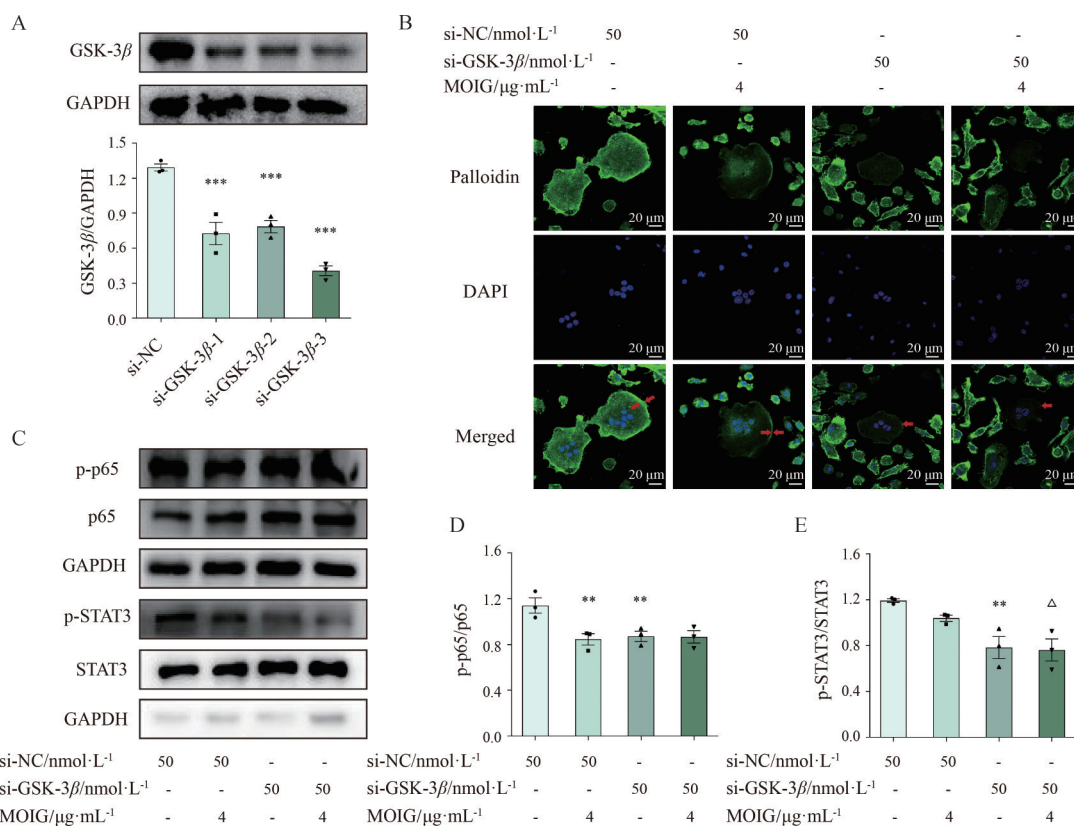
RA 的炎症反应是 RA 患者骨微结构恶化的重要原因。RA 在发展过程中会产生大量的炎症因子, 诱导成骨细胞和滑膜细胞分泌 RANKL, 并降低成骨细胞中 OPG 的表达, 导致成骨细胞的骨形成能力下降, 破骨细胞的骨吸收活性增强, 最终引起骨丢失<sup>[21,22]</sup>。根据中医“肾主骨生髓”的理论, RA 被认为是属于“痹症”的范畴, 虚



**Figure 3** Effect of MOIG on transcription factors and bone resorption protein in OCs induced by LPS.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs LPS group. NFATc1: Nuclear factor of activated T-cells c1; c-Fos: Cellular oncogene fos; MMP-9: Matrix metalloprotein 9; CtsK: Cathepsin K



**Figure 4** Effect of MOIG on the NF- $\kappa$ B pathway and JAK2/STAT3 pathway in OCs induced by LPS. A: The images of Western blot for TRAF6, p-p65, p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  of OCs induced by LPS at different time points; B-D: The quantification analysis of TRAF6, I $\kappa$ B $\alpha$  and p-p65/p65 based on the results of (A) by using an ECL detection system, respectively; E: The images of Western blot for p-JAK2, JAK2, p-STAT3, STAT3, p-GSK-3 $\beta$  and GSK-3 $\beta$ ; F-H: The quantification analysis of p-JAK2, JAK2, p-STAT3, STAT3, p-GSK-3 $\beta$  and GSK-3 $\beta$  based on the results of (E) by using an ECL detection system, respectively.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs LPS group. NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa-B; JAK2: Janus activating kinase 2; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; TRAF6: TNF receptor associated factor 6; I $\kappa$ B $\alpha$ : Inhibitor of nuclear factor kappa-B; GSK-3 $\beta$ : Glycogen synthase kinase-3 $\beta$



**Figure 5** Effect of MOIG on F-actin ring formation as well as NF- $\kappa$ B pathway and STAT3 signaling in OCs with GSK-3 $\beta$  gene interference. A: Three different gene interference sites of GSK-3 $\beta$ ; B: F-actin rings of OCs stained with phalloidin and DAPI respectively, and then imaged with a fluorescence microscope ( $\times 400$ ); C: The images of Western blot for p65, p-p65, STAT3 and p-STAT3 of OCs; D, E: The images and quantification analysis of Western blot for p-p65, p65, p-STAT3 and STAT3. Red arrow indicates the wall thickness of the F-actin rings.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs si-NC group;  $\Delta P < 0.05$  vs si-NC+MOIG group. NC: Normal control

实夹杂为该病的主要病机,因此中医多采用补肾填精等方法来进行治疗<sup>[8]</sup>。在本研究中,采用牛II型胶原诱导的CIA模型,观察MOIG对RA骨丢失的效果,应用显微CT成像来定量评估骨小梁的骨丢失和微结构的改变。结果表明MOIG显著增加CIA大鼠骨密度,改善股骨远端骨小梁微结构,提示MOIG可预防RA诱导的骨丢失。

在RA条件下,滑膜巨噬细胞释放TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6等细胞因子,刺激NF- $\kappa$ B通路的激活。高度活化的NF- $\kappa$ B导致各种促炎细胞因子增加,从而增强破骨细胞的形成、分化和骨吸收活性,最终导致关节骨质侵蚀<sup>[13,23]</sup>。在本研究中,MOIG抑制LPS诱导的破骨细胞中NF- $\kappa$ B信号通路的激活,提示MOIG通过抑制破骨细胞中炎症刺激的NF- $\kappa$ B信号通路的激活来减轻骨破坏。

破骨细胞是由M-CSF和RANKL诱导BMMs分化而来的多核巨细胞,其主要功能是重塑骨骼<sup>[24]</sup>。研究显示,NF- $\kappa$ B激活RANKL或TNF后,可诱导破骨细胞分化的关键转录因子c-Fos和NFATc1的激活,促进破

骨细胞的分化,并增强破骨细胞特异性标记酶TRAP、MMP-9和Ctsk的活性<sup>[25-27]</sup>。TRAP是破骨细胞特征性标志酶,反映破骨细胞的骨吸收活性<sup>[28]</sup>。Ctsk是破骨细胞中最重要的细胞因子,对骨组织具有特异性降解活性,反映了破骨细胞的骨吸收功能<sup>[29]</sup>。MMP参与了骨的发育、修复以及细胞外基质的重塑。破骨分化过程中MMP-9的表达上调,进而刺激骨吸收<sup>[30,31]</sup>。F-actin环是破骨细胞附着于骨基质表面进行骨吸收的重要结构,被认为是破骨细胞活化的功能性标志物,与破骨细胞的迁移和骨吸收功能密切相关<sup>[32]</sup>。本研究表明,MOIG处理抑制LPS诱导的破骨细胞的形成和分化及F-actin环的形成,降低TRAP、NFATc1、c-Fos、MMP-9和Ctsk的表达,进一步证明MOIG具有减轻CIA大鼠骨破坏的作用。

JAK2/STAT3信号通路参与RA病理过程中炎症反应和免疫反应的启动和发展,并参与骨代谢的调控<sup>[33]</sup>。在破骨细胞形成过程中,JAK/STAT通路的激活提高了RANKL的表达,抑制了OPG的表达,进而促进了破骨细胞的分化<sup>[34]</sup>。更重要的是,在前体细胞分化

为破骨细胞中同样被激活<sup>[35]</sup>。因此, JAK2 和 STAT3 蛋白在 RANKL 诱导的破骨细胞生成中起着重要作用。在本研究中, MOIG 抑制破骨细胞中 JAK2/STAT3 信号通路的激活, 从而抑制 RA 中破骨细胞的骨吸收。

GSK-3 $\beta$  是一种使糖原合成酶失活的蛋白激酶, 在糖原代谢、细胞周期控制、凋亡、胚胎发育和细胞分化等方面发挥多种调节功能。研究表明, GSK-3 $\beta$  通过 STAT3 和 NF- $\kappa$ B 信号通路参与 RA 发生发展过程中破骨细胞的增殖和分化的调控<sup>[36]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号通路和 JAK2/STAT3 信号通路的激活上调 MMP9 和 CtsK 的表达, 加剧 RA 的骨破坏<sup>[15]</sup>。有研究报道 GSK-3 $\beta$  的抑制剂 TDZD-8 能明显缓解 CIA 小鼠的关节病变<sup>[37]</sup>。然而, 目前尚未有 GSK-3 $\beta$  激动剂的研究报道。随后查阅相关文献发现, Cheng 等<sup>[38]</sup>用 EGFR siRNA 干扰肺上皮细胞的方法, 研究 amphiregulin 对 EGFR/JNK/AP-1 介导 TGF- $\beta$  诱导的人肺上皮细胞-间充质转化的作用。因此, 根据 Cheng 等<sup>[38]</sup>的研究设计思路, 在本研究中利用 siRNA 沉默 GSK-3 $\beta$  基因来阐明 MOIG 的作用效果, 结果表明沉默 GSK-3 $\beta$  能够显著抑制破骨细胞 F-actin 环形成的影响, 且联合 MOIG 作用后, 效果与沉默 GSK-3 $\beta$  组相当, 提示 MOIG 可能通过调控 GSK-3 $\beta$  来抑制破骨细胞的功能。

综上所述, 本研究从微观角度对 CIA 大鼠远端股骨的骨微结构进行检测, 更直观地反映 CIA 大鼠骨微结构的异常; 在机制上, 通过基因沉默的方法, 初步明确了 GSK-3 $\beta$  对破骨细胞功能的调控机制。后期可深入探讨 MOIG 调控 GSK-3 $\beta$  对体内动物实验的影响, 进一步确证 MOIG 调控关节炎骨丢失的作用机制, 为 RA 的预防和治疗提供科学依据。

**致谢:** 感谢浙江中医药大学药学科研究中心公共平台的大力支持。

**作者贡献:** 沈焱设计实验方案和撰写文章; 孙艺琦分析数据和作图; 李鹤鸣、杜金蔓和叶欣园负责实验操作; 鲍荣华和张泉龙负责指导实验方案; 张巧艳和秦路平负责指导实验方案、文章的审阅和修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Schett G, McInnes IB, Neurath MF. Reframing immune-mediated inflammatory diseases through signature cytokine hubs [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385: 628-639.
- [2] Yokota K. Osteoclast differentiation in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Med*, 2023, 13: 6-11.
- [3] Bauer DC, Black DM, Bouxsein ML, et al. Treatment-related changes in bone turnover and fracture risk reduction in clinical trials of anti-resorptive drugs: a meta-regression [J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33: 634-642.
- [4] Yokota K, Sato K, Miyazaki T, et al. Characterization and function of tumor necrosis factor and interleukin-6-induced osteoclasts in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73: 1145-1154.
- [5] Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360: 346-351.
- [6] Chen YJ, Li KM, Jiao MY, et al. Reprogrammed siTNF $\alpha$ /neutrophil cytopharmaceuticals targeting inflamed joints for rheumatoid arthritis therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 787-803.
- [7] Dubrovsky AM, Lim MJ, Lame NE. Osteoporosis in rheumatic diseases: anti-rheumatic drugs and the skeleton [J]. *Calcif Tissue Int*, 2018, 102: 607-618.
- [8] Chen WJ, Li T, Xu MZ, et al. Exploring biological connotation of blood stasis syndrome of rheumatoid arthritis and establishment of improved animal models based on syndrome-symptom mapping [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 2434-2441.
- [9] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 83-84.
- [10] Zhang JH, Xin HL, Xu YM, et al. *Morinda officinalis* How. --a comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 213: 230-255.
- [11] Shen Y, He YQ, Zhang Q, et al. Preparation of *Morinda officinalis* iridoid glycosides and the inhibitory effect on bone resorption of osteoclasts [J]. *Acad J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报)*, 2019, 40: 149-156.
- [12] He YQ. Studies on Effects and Mechanism of Iridoid Glycoside and Anthraquinone Compounds from *Morinda officinalis* Radix for Regulating Bone Metabolism (巴戟天环烯醚萜苷及蒽醌类成分调节骨代谢的作用及机制研究) [D]. Shanghai: Naval Medical University, 2019.
- [13] Zhang Q, Hu SJ, He YQ, et al. Monotropein protects against inflammatory bone loss and suppresses osteoclast formation and bone resorption by inhibiting NFATc1 via NF- $\kappa$ B and Akt/GSK-3 $\beta$  pathway [J]. *Nutrients*, 2022, 14: 3978.
- [14] Yan GQ, Guo Y, Guo JW, et al. N-Acetylcysteine attenuates lipopolysaccharide-induced osteolysis by restoring bone remodeling balance via reduction of reactive oxygen species formation during osteoclastogenesis [J]. *Inflammation*, 2020, 43: 1279-1292.
- [15] Koistinaho J, Malm T, Goldsteins G. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ : a mediator of inflammation in Alzheimer's disease? [J] *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 2011: 129753.
- [16] Xia TS, Dong X, Jiang YP, et al. Metabolomics profiling reveals *Rehmanniae Radix Preparata* extract protects against glucocorticoid-induced osteoporosis mainly via intervening steroid hormone biosynthesis [J]. *Molecules*, 2019, 24: 253.

- [17] Shen Y, Wang N, Zhang Q, et al. Jin-Tian-Ge ameliorates ovariectomy-induced bone loss in rats and modulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis *in vitro* [J]. Chin Med, 2022, 17: 78.
- [18] Steffen U, Schett G, Bozec A. How autoantibodies regulate osteoclast induced bone loss in rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1483.
- [19] Di Paola R, Cuzzocrea S. Predictivity and sensitivity of animal models of arthritis [J]. Autoimmun Rev, 2008, 8: 73-75.
- [20] Dinser R. Animal models for arthritis [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2008, 22: 253-267.
- [21] Garimella MG, Kour S, Piprode V, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells prevent systemic bone loss in collagen-induced arthritis [J]. J Immunol, 2015, 195: 5136-5148.
- [22] Shen Y, Sun YQ, Li HM, et al. UPLC-Q-TOF-MS-based metabolomics reveals mechanism of *Morinda officinalis* iridoid glycosides in treating rheumatoid arthritis and bone loss [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2024, 49: 453-460.
- [23] Wang L, Qiu XM, Gui YY, et al. Bu-Shen-Ning-Xin decoction: inhibition of osteoclastogenesis by abrogation of the RANKL-induced NFATc1 and NF- $\kappa$ B signaling pathways *via* selective estrogen receptor  $\alpha$  [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 3755-3766.
- [24] Wawrzyniak A, Balawender K. Structural and metabolic changes in bone [J]. Animals (Basel), 2022, 12: 1946.
- [25] Asagiri M, Sato K, Usami T, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis [J]. J Exp Med, 2005, 202: 1261-1269.
- [26] Kubota T, Hoshino M, Aoki K, et al. NF- $\kappa$ B inhibitor dehydroxymethyllepoxyquinomicin suppresses osteoclastogenesis and expression of NFATc1 in mouse arthritis without affecting expression of RANKL, osteoprotegerin or macrophage colony-stimulating factor [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9: R97.
- [27] Fukushima H, Nakao A, Okamoto F, et al. The association of Notch2 and NF-kappaB accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28: 6402-6412.
- [28] Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy [J]. Autoimmunity, 2008, 41: 218-223.
- [29] Zou NY, Liu R, Li CJ. Cathepsin K<sup>+</sup> non-osteoclast cells in the skeletal tystem: function, models, identity, and therapeutic implications [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 818462.
- [30] Deng WD, Ding ZB, Wang YY, et al. Dendrobine attenuates osteoclast differentiation through modulating ROS/NFATC1/MMP9 pathway and prevents inflammatory bone destruction [J]. Phytomedicine, 2022, 96: 153838.
- [31] Kim YJ, Kim YM, Lee H, et al. Tetracycline analogs inhibit osteoclast differentiation by suppressing MMP-9-mediated histone H3 cleavage [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 4038.
- [32] Kanehisa J, Yamanaka T, Dol S, et al. A band of F-actin containing podosomes is involved in bone resorption by osteoclasts [J]. Bone, 1990, 11: 287-293.
- [33] Li J. JAK-STAT and bone metabolism [J]. JAKSTAT, 2013, 2: e23930.
- [34] Li CH, Xu LL, Zhao JX, et al. CXCL16 upregulates RANKL expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the JAK2/STAT3 and p38/MAPK signaling pathway [J]. Inflamm Res, 2016, 65: 193-202.
- [35] Kim HJ, Kim HJ, Choi Y, et al. Zoledronate enhances osteocyte-mediated osteoclast differentiation by IL-6/RANKL axis [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 1467.
- [36] Martin M, Rehani K, Jope RS, et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3 [J]. Nat Immunol, 2005, 6: 777-784.
- [37] Zhou HY, Liu J, Zeng JS, et al. Inhibition of GSK-3 $\beta$  alleviates collagen II-induced rheumatoid arthritis in rats [J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 1047-1052.
- [38] Cheng WH, Kao SY, Chen CL, et al. Amphiregulin induces CCN2 and fibronectin expression by TGF- $\beta$  through EGFR-dependent pathway in lung epithelial cells [J]. Respir Res, 2022, 23: 381.