

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research苦参酮通过 Ctsk 调控 TLR9 信号通路拮抗
破骨细胞分化的作用机制研究Study of mechanism of kurarinone in antagonizing RANKL – induced osteoclast
differentiation through inhibiting Ctsk – regulated TLR9 signaling pathway何欢^{1a,2}, 方翰林^{1a},
陈炜^{1a,2}, 徐荣^{1a,2},
吴双双^{1a,2}, 刘文锴^{1b},
平静^{1a,2}(1. 抚州医药学院 a. 药学院, b. 临床医学专业,
江西抚州 344000; 2. 江西省教育厅 AI 创新药物
重点实验室, 江西抚州 344000)HE Huan^{1a,2}, FANG Han – lin^{1a},
CHEN Wei^{1a,2}, XU Rong^{1a,2},
WU Shuang – shuang^{1a,2},
LIU Wen – kai^{1b}, PING Jing^{1a,2}(1. Fuzhou Medical University, School of
Pharmacy, Clinical Medicine Program,
Fuzhou 344000, Jiangxi Province,
China; 2. Jiangxi Provincial Department
of Education AI Innovation Drug Key
Laboratory, Fuzhou 344000, Jiangxi
Province, China)作者简介: 何欢(1986 –), 女, 副教授, 主要从事
内分泌药理学的相关工作和研究

通信作者: 平静, 副教授

MP: 13507049200

E – mail: hehuan_0118@163.com

摘要:目的 探讨苦参酮通过组织蛋白酶 K (Ctsk) 调控 Toll 样受体 9 (TLR9) 信号通路对骨髓巨噬细胞 (BMDM) 细胞的作用及其机制。方法 BMDM 细胞分为对照组、模型组 [核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 50 ng · mL⁻¹]、苦参酮组 (RANKL 50 ng · mL⁻¹, 苦参酮 10 μ mol · L⁻¹)、苦参酮 + oe – NC 组 (感染 oe – NC, RANKL 50 ng · mL⁻¹, 苦参酮 10 μ mol · L⁻¹)、苦参酮 + oe – Ctsk 组 (感染 oe – Ctsk, RANKL 50 ng · mL⁻¹, 苦参酮 10 μ mol · L⁻¹)。用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT – PCR) 法检测 Ctsk mRNA 相对表达水平; 用蛋白免疫印迹法检测抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP)、TLR9 等信号通路相关蛋白表达水平; 用免疫荧光法检测破骨细胞分化相关蛋白表达水平; 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测炎症因子水平; 用体外骨吸收试验检测骨吸收情况。结果 对照组、模型组、苦参酮组、苦参酮 + oe – NC 组和苦参酮 + oe – Ctsk 组 Ctsk mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15、2.07 ± 0.28、1.31 ± 0.18、1.34 ± 0.14 和 1.79 ± 0.27, TRAP 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16、2.31 ± 0.44、1.43 ± 0.17、1.38 ± 0.22 和 1.91 ± 0.30, 基质金属蛋白酶 9 (MMP – 9) 蛋白相对荧光水平分别为 1.00 ± 0.15、2.18 ± 0.37、1.33 ± 0.19、1.28 ± 0.17 和 1.62 ± 0.31, 活化 T 细胞核因子 1 (NFATc1) 蛋白相对荧光水平分别为 1.00 ± 0.13、1.87 ± 0.39、1.13 ± 0.21、1.18 ± 0.19 和 1.38 ± 0.22, 整合素 β 1 (Itgb1) 蛋白相对荧光水平分别为 1.00 ± 0.19、1.49 ± 0.25、1.19 ± 0.22、1.14 ± 0.17 和 1.32 ± 0.18, 白细胞介素 – 1 β (IL – 1 β) 水平分别为 (15.28 ± 2.05)、(44.68 ± 7.93)、(31.40 ± 6.08)、(33.75 ± 5.76) 和 (39.62 ± 5.52) pg · mL⁻¹, 白细胞介素 – 18 (IL – 18) 水平分别为 (122.45 ± 22.39)、(317.56 ± 51.51)、(191.72 ± 33.34)、(185.93 ± 32.19) 和 (217.89 ± 33.58) pg · mL⁻¹, 肿瘤坏死因子 – α (TNF – α) 水平分别为 (81.36 ± 12.27)、(216.93 ± 34.39)、(130.89 ± 16.18)、(125.76 ± 15.15) 和 (162.94 ± 26.59) pg · mL⁻¹, 骨吸收陷窝数分别为每片 (35.26 ± 6.35)、(84.72 ± 16.10)、(50.38 ± 9.07)、(47.85 ± 9.09) 和 (61.63 ± 10.89), 骨吸收陷窝相对面积分别为 (0.26 ± 0.05)%、(1.38 ± 0.24)%、(1.04 ± 0.18)%、(1.06 ± 0.16)% 和 (1.27 ± 0.19)%, TLR9 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15、2.05 ± 0.31、1.32 ± 0.16、1.27 ± 0.15 和 1.53 ± 0.24, 髓分化因子 88 (MyD88) 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13、2.18 ± 0.33、1.42 ± 0.18、1.36 ± 0.17 和 1.62 ± 0.26, p – p65/t – p65 分别是 1.00 ± 0.11、2.22 ± 0.34、1.40 ± 0.19、1.39 ± 0.19、1.76 ± 0.27。模型组的上述指标与对照组比较, 苦参酮组的上述指标与模型组比较, 苦参酮 + oe – Ctsk 组的上述指标与苦参酮组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。结论 苦参酮能通过抑制 Ctsk, 抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化、炎症因子分泌及骨吸收功能, 可能是通过抑制 TLR9 通路实现的。

关键词: 苦参酮; 组织蛋白酶 K; Toll 样受体 9; 破骨细胞分化; 骨质疏松**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001 – 6821.2026.04.010**中图分类号:** R28**文献标志码:** A**文章编号:** 1001 – 6821 (2026) 04 – 0516 – 07

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of kurarinone on bone marrow – derived macrophages (BMDM) cells through regulating toll – like receptor 9 (TLR9) signaling pathway via cathepsin K (Ctsk). **Methods**

BMDM cells were divided into control group, model group [receptor activator of nuclear factor – κ B ligand (RANKL) $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$], kurarinone group (RANKL $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, kurarinone $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), kurarinone + oe – NC group (infected oe – NC, RANKL $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, kurarinone $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and kurarinone + oe – Ctsk group (infected oe – Ctsk, RANKL $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, kurarinone $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT – PCR) was used to detect the relative expression level of *Ctsk* mRNA; Western blot was used to detect the expression levels of tartrate – resistant acid phosphatase (TRAP) and TLR9 signaling pathway – related proteins; immunofluorescence was used to detect the expression levels of osteoclast differentiation – related proteins; enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of inflammatory factors; in vitro bone resorption assay was used to detect bone resorption. **Results** The relative expression levels of *Ctsk* mRNA in the control group, model group, kurarinone group, kurarinone + oe – NC group, and kurarinone + oe – Ctsk group were 1.00 ± 0.15 , 2.07 ± 0.28 , 1.31 ± 0.18 , 1.34 ± 0.14 and 1.79 ± 0.27 , respectively; the relative expression levels of TRAP protein were 1.00 ± 0.16 , 2.31 ± 0.44 , 1.43 ± 0.17 , 1.38 ± 0.22 and 1.91 ± 0.30 , respectively; the relative fluorescence levels of matrix metalloproteinase – 9 (MMP – 9) protein were 1.00 ± 0.15 , 2.18 ± 0.37 , 1.33 ± 0.19 , 1.28 ± 0.17 and 1.62 ± 0.31 , respectively; the relative fluorescence levels of nuclear factor of activated T – cells 1 (NFATc1) protein were 1.00 ± 0.13 , 1.87 ± 0.39 , 1.13 ± 0.21 , 1.18 ± 0.19 and 1.38 ± 0.22 , respectively; the relative fluorescence levels of integrin beta – 1 (Itgb1) protein were 1.00 ± 0.19 , 1.49 ± 0.25 , 1.19 ± 0.22 , 1.14 ± 0.17 and 1.32 ± 0.18 , respectively; the levels of interleukin – 1 β (IL – 1 β) were (15.28 ± 2.05), (44.68 ± 7.93), (31.40 ± 6.08), (33.75 ± 5.76) and (39.62 ± 5.52) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the levels of interleukin – 18 (IL – 18) were (122.45 ± 22.39), (317.56 ± 51.51), (191.72 ± 33.34), (185.93 ± 32.19) and (217.89 ± 33.58) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the levels of tumor necrosis factor – α (TNF – α) were (81.36 ± 12.27), (216.93 ± 34.39), (130.89 ± 16.18), (125.76 ± 15.15) and (162.94 ± 26.59) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the number of bone resorption pits were (35.26 ± 6.35), (84.72 ± 16.10), (50.38 ± 9.07), (47.85 ± 9.09) and (61.63 ± 10.89) per piece, respectively; the relative area of bone resorption pits were (0.26 ± 0.05)%, (1.38 ± 0.24)%, (1.04 ± 0.18)%, (1.06 ± 0.16)% and (1.27 ± 0.19)%, respectively; the relative expression levels of TLR9 protein were 1.00 ± 0.15 , 2.05 ± 0.31 , 1.32 ± 0.16 , 1.27 ± 0.15 and 1.53 ± 0.24 , respectively; the relative expression levels of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) protein were 1.00 ± 0.13 , 2.18 ± 0.33 , 1.42 ± 0.18 , 1.36 ± 0.17 and 1.62 ± 0.26 , respectively; p – p65/t – p65 were 1.00 ± 0.11 , 2.22 ± 0.34 , 1.40 ± 0.19 , 1.39 ± 0.19 , 1.76 ± 0.27 , respectively. Compared model group with control group, compared kurarinone group with the model group, compared the kurarinone + oe – Ctsk group with the kurarinone group, the differences of above indicators were all statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Kurarinone can inhibit RANKL – induced osteoclast differentiation, inflammatory factor secretion, and bone resorption function by suppressing Ctsk, which may be achieved through inhibiting the TLR9 pathway.

Key words: kurarinone; cathepsin K; toll – like receptor 9; osteoclast differentiation; osteoporosis

骨质疏松症是一种以骨量流失、骨微结构破坏为核心的代谢性骨病,严重增加中老年群体骨折风险,其发病机制与破骨细胞过度分化活化导致的骨吸收/骨形成失衡密切相关^[1-2]。目前临床治疗药物存在疗效局限或副作用等问题,从中草药中挖掘安全有效的活性成分成为研究热点^[3]。苦参酮是豆科植物苦参的核心活性成分,已被证实具有抗炎、抗骨吸收等药理活性^[4-5]。值得注意的是,Toll 样受体 9

(toll – like receptor 9,TLR9)信号通路可通过调控下游炎症因子释放,显著促进破骨细胞分化成熟^[6]。组织蛋白酶 K(cathepsin K,Ctsk)作为破骨细胞特异性蛋白酶,在骨基质降解中发挥关键作用,且可能介导 TLR9 通路的调控过程^[7]。但苦参酮是否通过 Ctsk 调控 TLR9 信号通路抑制破骨细胞分化、改善骨质疏松的具体机制尚未明确。本研究旨在系统探讨该作用机制,为苦参酮开发为抗骨质疏松候选药物提供实验依据与理论支撑。

材料与方法

1 材料

细胞 小鼠骨髓巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDM), 购自安徽合肥万物生物科技有限公司。

药品与试剂 苦参酮, 规格: 10 mg, 纯度: 98%, 四川成都普菲德生物技术有限公司生产。Ctsk 质粒, 美国 Invitrogen 公司生产; 小鼠核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL), 湖北武汉博欧特生物科技有限公司生产; 细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒, 弗元(上海)生物科技有限公司生产; 兔抗小鼠 Ctsk、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、活化T细胞核因子1(nuclear factor of activated T-cells 1, NFATc1)、整合素 β 1(integrin beta-1, Itgb1)、TLR9、髓分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、兔抗小鼠磷酸化 NF- κ B p65(phospho-NF- κ B p65, p-p65)、兔抗小鼠总 NF- κ B p65(total NF- κ B p65, t-p65)抗体、GAPDH、 β -actin 抗体和山羊抗兔二抗, 均由英国 Abcam 公司生产; 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒, 上海吉泰依科赛生物技术有限公司生产; IL-18、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒, 湖北武汉菲恩生物科技有限公司生产; 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)相关试剂: TRIzolTM总RNA提取试剂, 美国 Invitrogen 公司生产; PrimeScriptTM II 第一链cDNA合成试剂盒, 日本 TaKaRa 公司生产; Power SYBRTM Green PCR Master Mix, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司生产。

仪器 StepOneTM qRT-PCR 仪, 美国应用生物系统公司产品; DM3000 LED 正置荧光显微镜, 德国 Leica 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[8]

取 BMDM 细胞接种于含 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)培养基中, 随即放入温度 37℃、CO₂体积分数 5% 的培养箱中进行常规培养。

2.2 细胞分组与给药方法

将生长状态良好的 BMDM 细胞按每孔 8×10^3 个的密度接种于 96 孔板中, 分为对照组、模型组、苦参酮组、苦参酮+oe-NC 组、苦参酮+oe-Ctsk 组。苦参酮溶液配制以二甲基亚砜为溶剂。对照组: 正常培养, 不进行任何处理。模型组: 更换为含有 RANKL ($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的诱导培养基培养 5 d。苦参酮组: 更换为含有 RANKL ($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 及苦参酮 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的诱导培养基培养 5 d。苦参酮+oe-NC 组: 预先感染空载慢病毒的 BMDM 细胞, 更换为含 RANKL ($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 及苦参酮 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的诱导培养基培养 5 d。苦参酮+oe-Ctsk 组: 预先感染 Ctsk 过表达慢病毒的 BMDM 细胞, 更换为含 RANKL ($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 及苦参酮 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的诱导培养基培养 5 d。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖能力^[9]

将对照组、模型组细胞以 8×10^3 /孔密度接种于 96 孔板中, 隔天将培养基换成含有不同浓度 (0, 1, 5, 10, 20 和 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 苦参酮的培养基干预, 2 d 后在每个培养孔中加入 CCK-8 工作液, 在避光下孵育 2~4 h, 全自动酶标仪 (450 nm) 测量吸光度值并统计分析实验结果。

2.4 qRT-PCR 法检测 Ctsk mRNA 相对表达水平^[10]

收集各组处理后细胞, 使用 TRIzol 法提取总 RNA, 测定浓度与纯度。取 $1 \mu\text{g}$ RNA 通过反转录试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 加入 Ctsk 特异性引物及内参基因 GAPDH 引物, 进行实时荧光定量 PCR。扩增反应参数设定如下: 先于 95℃ 条件下执行 5 min 预变性处理; 后续扩增程序为 95℃ 变性 10 s、60℃ 退火 15 s、72℃ 延伸 20 s, 累计完成 40 轮循环。Ctsk mRNA 的相对表达水平, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法测算。Ctsk 上游引物序列为: 5'-CAGCAGAGGTGTGTAC-TATG-3'; 下游引物序列为: 5'-GCGTTGTTCTTAT-TCCGAGC-3'; GAPDH 上游引物序列为: 5'-AG-GTCGGTGTGAACGGATTG-3'; 下游引物序列为: 5'-TG TAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'。

2.5 免疫荧光法检测 Ctsk、破骨细胞分化相关蛋白表达^[11]

收集各组 BMDM 细胞, 4% 多聚甲醛固定后, 使用 0.2% Triton X-100 透化。5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 小时, 加入一抗 4℃ 孵育过夜。磷酸盐缓冲液洗涤后, 加入对应种属的荧光标记二抗室温避光孵育 1 h, DAPI 复染细胞核。封片后于激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。为对免疫荧光结果进行定量, 实

验采用以下流程:每组实验独立重复3次,每次重复于激光共聚焦显微镜下随机选取至少5个不重叠视野进行图像采集。使用ImageJ软件(National Institutes of Health, USA, Version 1.53)进行定量分析。具体步骤为:将图像转换为8-bit灰度图,设定统一的阈值以区分阳性信号与背景,由软件自动识别细胞轮廓(基于DAPI通道)。测量每个细胞内目标蛋白荧光信号的平均灰度值,并扣除相同条件下无荧光一抗的对照组视野背景值。最终,以对照组的平均荧光强度为1,计算各实验组相对荧光强度。文中所示图片为具有代表性的视野。

2.6 蛋白免疫印迹法检测 TRAP、TLR9 信号通路相关蛋白表达^[10]

各组细胞经收集后,用RIPA裂解液裂解以获取总蛋白,BCA定量法检测蛋白浓度。取等质量蛋白进行凝胶电泳,继而转印至PVDF膜;将膜置于5%脱脂牛奶中,室温封闭2h。分别加入针对TRAP、TLR9、MyD88、p-p65、t-p65、GAPDH、 β -actin的特异性一抗,4℃孵育过夜。TBST洗膜后加入相应HRP标记二抗,室温孵育1h,采用ECL化学发光法显影。利用ImageJ软件对条带灰度进行分析,设定 β -actin为TRAP的内参、GAPDH为TLR9与MyD88的内参,计算得到各目标蛋白的相对表达量。

2.7 ELISA 法检测炎症因子水平^[12]

收集各组细胞培养上清液,4℃、3 000 r·min⁻¹离心10 min去除沉淀。按ELISA试剂盒说明书操作。采用酶标仪以450 nm为检测波长测定吸光度值,参照标准曲线换算各炎症因子的浓度水平。

2.8 体外骨吸收试验^[13]

将BMDM细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于牛骨切片上,培养7天,用4%多聚甲醛固定细胞,梯度乙醇脱水后,使用1%甲苯胺蓝染色5分钟,蒸馏水洗涤。于光学显微镜下观察骨吸收陷窝,使用ImageJ软件定量分析陷窝数量及吸收面积占总面积的比例。

3 统计学处理

用SPSS 24.0软件进行统计分析。计数资料用率(%)表示,计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 苦参酮对 BMDM 细胞活性的影响

采用CCK-8法检测不同浓度苦参酮对BMDM细胞增殖活性的影响。结果显示,与0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

相比,1、5、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苦参酮处理对对照组和模型组的细胞活性无显著影响(均 $P > 0.05$);20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苦参酮处理开始显著抑制对照组和模型组细胞增殖(均 $P < 0.001$)。基于此,后续实验选择10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为苦参酮的作用浓度,见表1。

表1 各组细胞活性的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cell viability in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Cell proliferation rate(%)	
		Control	Model
0($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	10	100.24 $\pm$ 11.40	100.06 $\pm$ 10.99
1($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	10	97.70 $\pm$ 18.94	98.88 $\pm$ 9.14
5($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	10	94.39 $\pm$ 13.34	95.04 $\pm$ 15.56
10($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	10	90.29 $\pm$ 14.42	90.96 $\pm$ 10.12
20($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	10	60.06 $\pm$ 7.46 ***	55.44 $\pm$ 9.95 ***
30($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	10	52.64 $\pm$ 9.36 ***	45.42 $\pm$ 7.25 ***

Compared with 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, *** $P < 0.001$.

2 苦参酮调控 Ctsk 对 BMDM 细胞 Ctsk 表达的影响

采用qRT-PCR与免疫荧光检测各组细胞中Ctsk mRNA及蛋白表达水平。结果显示,与对照组相比,模型组Ctsk mRNA及蛋白相对荧光水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与模型组相比,苦参酮组Ctsk mRNA及蛋白相对荧光水平均明显降低(均 $P < 0.001$);与苦参酮组相比,苦参酮+oe-NC组Ctsk mRNA及蛋白相对荧光水平在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$);与苦参酮+oe-NC组相比,苦参酮+oe-Ctsk组Ctsk mRNA均显著升高($P < 0.001$),见表2。

表2 各组组织蛋白酶 K(Ctsk) mRNA 及蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of cathepsin K (Ctsk) mRNA and protein expression levels in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Ctsk protein	Ctsk mRNA
Control	10	1.00 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.15
Model	10	2.21 $\pm$ 0.33 ***	2.07 $\pm$ 0.28 ***
Kurarinone	10	1.33 $\pm$ 0.23 ###	1.31 $\pm$ 0.18 ###
Kurarinone + oe - NC	10	1.30 $\pm$ 0.32	1.34 $\pm$ 0.14
Kurarinone + oe - Ctsk	10	1.77 $\pm$ 0.28 $\Delta\Delta\Delta$	1.79 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta\Delta$

Control group: Non treatment; Model group: Treated with 50 ng·mL⁻¹ receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL); Kurarinone group: Treated with 50 ng·mL⁻¹ RANKL and 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ kurarinone; Kurarinone + oe - NC group: Infected with oe - NC, then treated with 50 ng·mL⁻¹ RANKL and 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ kurarinone; Kurarinone + oe - Ctsk group: Infected with oe - Ctsk, then treated with 50 ng·mL⁻¹ RANKL and 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ kurarinone. Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ### $P < 0.001$; Compared with the kurarinone + oe - NC group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

3 苦参酮调控 Ctsk 对破骨细胞标志性蛋白 TRAP 表达的影响

对照组、模型组、苦参酮组、苦参酮 + oe - NC 组和苦参酮 + oe - Ctsk 组 TRAP 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 2.31 ± 0.44 、 1.43 ± 0.17 、 1.38 ± 0.22 和 1.91 ± 0.30 。与对照组相比,模型组 TRAP 蛋白相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$);与模型组相比,苦参酮组 TRAP 蛋白相对表达水平明显降低 ($P < 0.001$);与苦参酮组相比,苦参酮 + oe - NC 组 TRAP 蛋白相对表达水平在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与苦参酮 + oe - NC 组相比,苦参酮 + oe - Ctsk 组 TRAP 蛋白相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。

4 苦参酮调控 Ctsk 对破骨细胞分化相关蛋白表达的影响

采用免疫荧光法检测破骨细胞分化关键蛋白 MMP-9、NFATc1 及 Itgb1 的表达水平。结果显示,与对照组相比,模型组 MMP-9、NFATc1 及 Itgb1 的荧光强度均显著升高 (均 $P < 0.001$)。与模型组相比,苦参酮组三种蛋白的荧光强度均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。与苦参酮组相比,苦参酮 + oe - NC 组三种蛋白的荧光强度在统计学上差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与苦参酮 + oe - NC 组相比,苦参酮 + oe - Ctsk 组三种蛋白的荧光强度均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 3。

表 3 各组破骨细胞分化相关蛋白相对荧光水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative fluorescence levels of osteoclast differentiation-related proteins in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	MMP-9	NFATc1	Itgb1
Control	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.19
Model	$2.18 \pm 0.37^{***}$	$1.87 \pm 0.39^{***}$	$1.49 \pm 0.25^{***}$
Kurarinone	$1.33 \pm 0.19^{###}$	$1.13 \pm 0.21^{###}$	$1.19 \pm 0.22^{\#}$
Kurarinone + oe - NC	1.28 ± 0.17	1.18 ± 0.19	1.14 ± 0.17
Kurarinone + oe - Ctsk	$1.62 \pm 0.31^{\Delta\Delta}$	$1.38 \pm 0.22^{\Delta}$	$1.32 \pm 0.18^{\Delta}$

Dose and n refer to table 2. MMP-9: Matrix metalloproteinase-9; NFATc1: Nuclear factor of activated T-cells 1; Itgb1: Integrin beta-1; Compared with the control group, $^{***}P < 0.001$; Compared with the model group, $^{\#}P < 0.05$, $^{###}P < 0.001$; Compared with the kurarinone + oe - NC group, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$.

5 苦参酮调控 Ctsk 对 BMDM 细胞分泌炎症因子水平的影响

采用 ELISA 法检测细胞上清液中炎症因子 IL-1 β 、IL-18 及 TNF- α 的含量。结果显示,与对照组相比,模型组三种炎症因子的分泌水平均显著升高 (均 $P < 0.001$)。与模型组相比,苦参酮组三种炎

症因子的分泌水平均明显降低 (均 $P < 0.001$)。与苦参酮组相比,苦参酮 + oe - NC 组三种炎症因子水平在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。与苦参酮 + oe - NC 组相比,苦参酮 + oe - Ctsk 组三种炎症因子水平均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 4。

表 4 各组炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of inflammatory factor levels in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	IL-1 β (pg · mL ⁻¹)	IL-18 (pg · mL ⁻¹)	TNF- α (pg · mL ⁻¹)
Control	15.28 ± 2.05	122.45 ± 22.39	81.36 ± 12.27
Model	$44.68 \pm 7.93^{***}$	$317.56 \pm 51.51^{***}$	$216.93 \pm 34.39^{***}$
Kurarinone	$31.40 \pm 6.08^{###}$	$191.72 \pm 33.34^{###}$	$130.89 \pm 16.18^{###}$
Kurarinone + oe - NC	33.75 ± 5.76	185.93 ± 32.19	125.76 ± 15.15
Kurarinone + oe - Ctsk	$39.62 \pm 5.52^{\Delta}$	$217.89 \pm 33.58^{\Delta}$	$162.94 \pm 26.59^{\Delta\Delta}$

Dose and n refer to table 2. IL-1 β : Interleukin-1 β ; TNF- α : Tumor necrosis factor- α . Compared with the control group, $^{***}P < 0.001$; Compared with the model group, $^{###}P < 0.001$; Compared with the kurarinone + oe - NC group, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$.

6 苦参酮调控 Ctsk 对破骨细胞体外骨吸收功能的影响

通过在骨片上培养破骨细胞并染色观察,评估其骨吸收能力。结果显示,与对照组相比,模型组形成的骨吸收陷窝数量及相对面积均显著增加 (均 $P < 0.001$)。与模型组相比,苦参酮组骨吸收陷窝数量及相对面积均明显减少 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。与苦参酮组相比,苦参酮 + oe - NC 组 2 项指标在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。与苦参酮 + oe - NC 组相比,苦参酮 + oe - Ctsk 组骨吸收陷窝数量及相对面积均显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 5。

表 5 各组骨吸收功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of bone resorption function in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Number of bone resorption pits (per piece)	Relative area of bone resorption pits (%)
Control	35.26 ± 6.35	0.26 ± 0.05
Model	$84.72 \pm 16.10^{***}$	$1.38 \pm 0.24^{***}$
Kurarinone	$50.38 \pm 9.07^{###}$	$1.04 \pm 0.18^{###}$
Kurarinone + oe - NC	47.85 ± 9.09	1.06 ± 0.16
Kurarinone + oe - Ctsk	$61.63 \pm 10.89^{\Delta\Delta}$	$1.27 \pm 0.19^{\Delta}$

Dose and n refer to table 2. Compared with the control group, $^{***}P < 0.001$; Compared with the model group, $^{###}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$; Compared with the kurarinone + oe - NC group, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$.

7 苦参酮调控 Ctsk 对 BMDM 细胞 TLR9 信号通路相关蛋白表达水平的影响

采用蛋白免疫印迹检测 TLR9 信号通路相关蛋白相对表达水平。结果显示,与对照组相比,模型组 TLR9 与 MyD88 蛋白相对表达水平及 p - p65/t - p65 比值均显著升高(均 $P < 0.001$)。与模型组相比,苦参酮组 TLR9 与 MyD88 蛋白相对表达水平及 p - p65/t - p65 比值均明显降低(均 $P < 0.001$)。与苦参酮组相比,苦参酮 + oe - NC 组 2 种蛋白相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与苦参酮 + oe - NC 组相比,苦参酮 + oe - Ctsk 组 TLR9、MyD88 蛋白相对表达水平及 p - p65/t - p65 比值均显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),见图 1 和表 6。

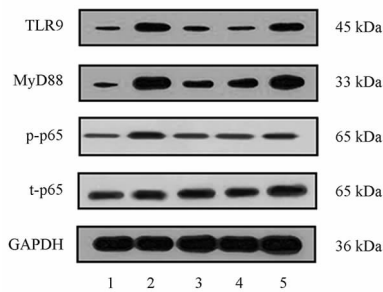


图 1 蛋白免疫印迹检测 Toll 样受体 9 (TLR9) 信号通路相关蛋白表达

Figure 1 Western blot detection of the expression of toll - like receptor 9 (TLR9) signaling pathway - related proteins

1: Control group; 2: Model Group 3: Kurarinone group 4: Kurarinone + oe - NC group; 5: Kurarinone + oe - Ctsk group

表 6 各组 TLR9 信号通路相关蛋白相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 6 Comparison of relative expression levels of TLR9 signaling pathway - related proteins in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	TLR9	MyD88	p - p65/t - p65
Control	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.11
Model	2.05 ± 0.31 ***	2.18 ± 0.33 ***	2.22 ± 0.34 ***
Kurarinone	1.32 ± 0.16 ###	1.42 ± 0.18 ###	1.40 ± 0.19 ###
Kurarinone + oe - NC	1.27 ± 0.15	1.36 ± 0.17	1.39 ± 0.19
Kurarinone + oe - Ctsk	1.53 ± 0.24 $\Delta\Delta$	1.62 ± 0.26 Δ	1.76 ± 0.27 $\Delta\Delta$

MyD88: Myeloid differentiation factor 88; Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ### $P < 0.001$; Compared with the kurarinone + oe - NC group, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$.

讨 论

在全球人口老龄化问题日益凸显的当下,骨质疏松、类风湿关节炎等骨代谢紊乱性疾病的发病率持续

攀升,不仅严重损害患者骨骼健康与生活质量,也给社会医疗体系带来沉重负担。该类疾病的核心病理机制在于破骨细胞过度激活所致的骨吸收异常增强。因此,抑制破骨细胞分化与功能是治疗此类疾病的关键方向^[14]。苦参酮作为豆科植物苦参的天然活性成分,虽已被证实具有抗炎、抗肿瘤等多种活性,但其在骨代谢中的作用机制尚不明确^[15]。Ctsk 作为破骨细胞分泌的关键蛋白酶,在骨基质降解及破骨细胞分化过程中发挥核心作用^[16]。本研究基于 CCK - 8 实验结果,选用对细胞活性无显著影响的 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苦参酮进行后续机制探讨。该浓度的选择旨在确保观察到的效应源于药物的特异性生物学作用,同时避免细胞毒性干扰。本研究发现,RANKL 诱导后 Ctsk 表达显著升高,苦参酮可有效下调其表达。这一结果表明,RANKL 可能通过激活下游信号促进 Ctsk 转录与翻译;苦参酮则可能通过抑制相关转录因子活性或促进 Ctsk mRNA 降解来发挥作用。

破骨细胞过度分化是骨代谢疾病的核心病理环节,TRAP 是破骨细胞分化的特异性标志物,NFATc1 是调控破骨细胞分化成熟的关键蛋白,MMP - 9 参与降解骨基质非胶原成分,Itgb1 介导破骨细胞与骨面的紧密粘附^[17 - 19]。实验结果显示,RANKL 诱导后上述分化相关蛋白表达均显著升高,苦参酮可有效抑制其表达,且该效应可被 Ctsk 过表达逆转。这提示苦参酮通过下调 Ctsk,抑制了破骨细胞的分化进程。从机制分析,NFATc1 作为破骨细胞分化的核心转录因子,可直接调控 TRAP、MMP - 9 等下游靶基因的表达,而 Ctsk 可能通过增强 NFATc1 转录活性;苦参酮下调 Ctsk 后,该通路激活受阻,NFATc1 表达降低,进而抑制下游分化相关蛋白的表达,最终阻碍破骨细胞分化成熟^[20]。

炎症反应是驱动破骨细胞过度激活的重要因素,IL - 1 β 、IL - 18、TNF - α 等促炎因子可显著增强破骨细胞分化与骨吸收功能^[21]。本研究发现,RANKL 诱导后促炎因子分泌增加、骨吸收功能显著增强,苦参酮可有效抑制上述效应,且 Ctsk 过表达可逆转该调控作用。这表明苦参酮抑制破骨细胞骨吸收功能。可能的机制为,Ctsk 可促进促炎因子分泌,进而增强破骨细胞分化与骨吸收;苦参酮下调 Ctsk 后,促炎因子分泌减少,同时抑制骨基质降解关键酶的表达,最终降低破骨细胞骨吸收能力,Ctsk 过表达则可恢复这一功能^[22]。为深入阐明其下游信号传导机制,本研究进一步检测了 TLR9 通路的核心下游节点。实验结果显示,苦参酮在抑制 TLR9 及其衔接蛋白 MyD88 表达的同时,也显著降低了 NF - κB p65 的磷酸化水平。

这一发现至关重要,它将苦参酮的分子作用点从上游受体延伸到了关键的细胞内信号枢纽。TLR9/MyD88信号通路是免疫与骨代谢的关键通路,在炎症介导的破骨细胞激活中发挥重要调控作用,该通路激活后,经典的下游事件即是启动 NF- κ B 等转录因子的活化^[23]。本研究表明,苦参酮对 TLR9/MyD88 的抑制是功能性的,能够有效阻断其下游 NF- κ B 信号的传导。从机制上分析,Ctsk 可能通过降解胞外基质释放内源性 TLR9 配体,从而启动该信号轴;苦参酮通过下调 Ctsk 表达,可能减少了配体的释放,进而从源头上抑制了 TLR9/MyD88/NF- κ B 通路的整体活化。而 NF- κ B 作为调控破骨细胞分化的核心转录因子,其活性的降低,可直接导致下游 NFATc1 等关键分化蛋白的表达受抑。这在分子层面完整地解释了苦参酮为何能同时抑制破骨细胞分化标志物表达、促炎因子分泌及骨吸收功能。

本研究提示:苦参酮可能通过下调 Ctsk 表达,进而抑制 TLR9/MyD88/NF- κ B 信号轴的活化,减少促炎因子分泌,抑制破骨细胞分化核心转录因子及下游靶蛋白表达,最终协同降低破骨细胞骨吸收功能。

参考文献:

- [1] LEBOFF M S, GREENSPAN S L, INSOGNA K L, *et al.* The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis[J]. *Osteoporos Int*, 2022, 33(10):2049—2102.
- [2] ANAM A K, INSOGNA K. Update on osteoporosis screening and management[J]. *Med Clin North Am*, 2021, 105(6):1117—1134.
- [3] 高增杰,杨扉扉,李丽莉,等. 抗骨质疏松症中药的作用机制研究进展[J]. *世界中医药*, 2025, 20(5):848—855.
- [4] LIU L, WANG Z, QI Y, *et al.* Kurarinone alleviates cGAS-STING-triggered inflammatory diseases by targeting STING[J]. *Phytother Res*, 2025, 39(8):3450—3465.
- [5] LONG L, LUO H, WANG Y, *et al.* Kurarinone, a flavonoid from radix sophorae flavescentis, inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in mouse bone marrow-derived monocyte/macrophages[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2024, 397(9):7071—7087.
- [6] SCHNEIDER AH, TAIRA TM, PÁBLIO GA, *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate bone erosion in rheumatoid arthritis by enhancing RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181(3):429—446.
- [7] KONDO T, OKAWA H, HOKUGO A, *et al.* Oral microbial extracellular DNA initiates periodontitis through gingival degradation by fibroblast-derived cathepsin K in mice[J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1):962.
- [8] 叶蓓,成宇,司玉莹,等. 低氧环境中 PADI4 促进破骨细胞分化和骨吸收功能的研究[J]. *现代免疫学*, 2021, 41(5):361—367.
- [9] 何强,钱卫庆,姚年伟,等. 地黄梓醇对新生大鼠炎性成骨细胞的保护作用[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(29):4626—4631.
- [10] 江曼亚,叶悦,张琼谊,等. 知柏地黄汤治疗绝经后骨质疏松的机制研究[J]. *药学报*, 2023, 58(10):3040—3048.
- [11] 杨启恒,刘士博,刘航航,等. SIRT1 调控 BMSCs 成骨分化与 H 型血管生成促进骨质疏松骨缺损愈合的研究[J]. *口腔医学研究*, 2024, 40(9):785—792.
- [12] 王超,邹秀强,刘晓,等. Apelin-13 通过 Nr2-焦亡通路抑制 RANKL 诱导的巨噬细胞向破骨细胞分化[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2025, 31(3):343—348, 408.
- [13] 叶蓓,成宇,司玉莹,等. 低氧环境中 PADI4 促进破骨细胞分化和骨吸收功能的研究[J]. *现代免疫学*, 2021, 41(5):361—367.
- [14] HUANG X, LAN Y, SHEN J, *et al.* M2 macrophages secrete glutamate-containing extracellular vesicles to alleviate osteoporosis by reshaping osteoclast precursor fate[J]. *Mol Ther*, 2024, 32(4):1158—1177.
- [15] LI W, YIN X, YAN Y, *et al.* Kurarinone attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through activating the PI3K/Akt signaling by upregulating IGF1 expression in human ovarian granulosa cells[J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(1):28—38.
- [16] LI Y, ZHUANG Q, TAO L, *et al.* Urolithin B suppressed osteoclast activation and reduced bone loss of osteoporosis via inhibiting ERK/NF- κ B pathway[J/OL]. *Cell Prolif*, 2022, 55(10):e13291. 2022-06-16[2026-01-30]. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9528769/>
- [17] YANG C, TAO H, ZHANG H, *et al.* TET2 regulates osteoclastogenesis by modulating autophagy in OVX-induced bone loss[J]. *Autophagy*, 2022, 18(12):2817—2829.
- [18] LI X, JIANG Y, LIU X, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived apoptotic bodies alleviate alveolar bone destruction by regulating osteoclast differentiation and function[J]. *Int J Oral Sci*, 2023, 15(1):51.
- [19] YANG J G, SUN B, WANG Z, *et al.* Exosome-targeted delivery of METTL14 regulates NFATc1 m6A methylation levels to correct osteoclast-induced bone resorption[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(11):738.
- [20] LU J, SHI X, FU Q, *et al.* New mechanistic understanding of osteoclast differentiation and bone resorption mediated by P2X7 receptors and PI3K-Akt-GSK3 β signaling[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1):100.
- [21] YAO Z, GETTING S J, Locke I C. Regulation of TNF-induced osteoclast differentiation[J]. *Cells*, 2021, 11(1):132.
- [22] RONG K, WANG D, PU X, *et al.* Inflammatory macrophage-derived itaconate inhibits DNA demethylase TET2 to prevent excessive osteoclast activation in rheumatoid arthritis[J]. *Bone Res*, 2025, 13(1):60.
- [23] SCHNEIDER A H, TAIRA T M, PÁBLIO G A, *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate bone erosion in rheumatoid arthritis by enhancing RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181(3):429—446.

(本文编辑:崔兰卿 收稿日期 2026-01-30)