

• 论 著 •

麦冬多糖对破骨细胞分化的影响研究*

易 倩¹, 张合富¹, 李官翔¹, 樊丽莎¹, 邓加加¹, 张伶燕^{2△}, 张 健²

(1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 520025; 2. 贵州中医药大学实验动物研究所, 贵州 贵阳 520025)

[摘要] 目的 探讨麦冬多糖(OPS)对破骨细胞分化的影响。方法 从 C57BL/6j 小鼠股骨中提取骨髓单核巨噬细胞(BMMs), 在细胞培养液中分别添加 2.5、10.0 和 40.0 $\mu\text{g/mL}$ OPS(A、B、C 组), 对照组未添加 OPS。检测 OPS 对 BMMs 细胞活性、破骨细胞骨吸收能力及抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)活性的影响, 同时分析 OPS 对碳酸酐酶 2(Car2)、组织蛋白酶 K(CTSK)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、TRAP、液泡型 H^+ -ATP 酶(V-ATPase) mRNA 表达的影响。结果 A、B、C 组 48、96 h 时吸光度值比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组(1.00 ± 0.15)比较, B 组成熟破骨细胞数目降低至(0.61 ± 0.06)($P < 0.05$), 而 C 组成熟破骨细胞数目为(0.31 ± 0.03)($P < 0.05$)。与对照组相比, B、C 组 5 d 时破骨细胞 TRAP 活性显著降低($P < 0.05$)。A、B、C 组 7 d 时破骨细胞 TRAP 活性显著低于对照组($P < 0.05$)。A、B、C 组骨吸收面积仅为对照组的 71%、40% 和 6% ($P < 0.05$)。与对照组比较, B、C 组 Car2、CTSK、MMP-9、TRAP、V-ATPase mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$)。结论 OPS 可显著抑制破骨细胞分化功能, 是一种潜在的用于骨质疏松治疗的抗骨吸收药物。

[关键词] 破骨细胞; 麦冬多糖; 分化; 骨吸收; 骨质疏松

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.02.003

中图法分类号: R982

文章编号: 1009-5519(2024)02-0190-06

文献标识码: A

Effect of Ophiopogon japonicus polysaccharides on osteoclast differentiation*

YI Qian¹, ZHANG Hefu¹, LI Guanxiang¹, FAN Lisha¹, DENG Jiajia¹,
ZHANG Lingyan^{2△}, ZHANG Jian²

(1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 520025, China; 2. Institute for Laboratory Animal Research, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 520025, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of Ophiopogon japonicus polysaccharides(OPS) on osteoclast differentiation. **Methods** Bone marrow mononuclear macrophages(BMMs) were extracted from the femur of C57BL/6j mice, and 2.5, 10.0 and 40.0 $\mu\text{g/mL}$ OPS were added to the cell culture medium, respectively(groups A, B and C), while no OPS was added to the control group. The effects of OPS on BMMs cell activity, osteoclast bone resorption capacity and tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) activity were detected. Meanwhile, the effects of OPS on the mRNA expression of carbonic anhydrase 2(Car2), cathepsin K(CTSK), matrix metalloproteinase 9(MMP-9), TRAP and vacuolar H^+ -ATPase(V-ATPase) were analyzed. **Results** There was no significant difference in absorbance of group A, B and C at 48 and 96 h($P > 0.05$). Compared with the control group(1.00 ± 0.15), the number of mature osteoclasts in group B was reduced to (0.61 ± 0.06) ($P < 0.05$), and that in group C was (0.31 ± 0.03) ($P < 0.05$). Compared with the control group, TRAP activity of osteoclasts in group B and C at 5th day was significantly decreased($P < 0.05$). The TRAP activity of osteoclasts in group A, B and C at 7th day was significantly lower than that in control group($P < 0.05$). The bone resorption area of group A, B and C was only 71%, 40% and 6% of that of the control group($P < 0.05$). Compared with the control group, the mRNA expression levels of Car2, CTSK, MMP-9, TRAP, and V-ATPase in group B and C were significantly decreased($P < 0.01$). **Conclusion** OPS can significantly inhibit osteoclast differentiation and bone resorption, which is a potential anti-resorption drug for osteoporosis treatment.

[Key words] Osteoclast; Ophiopogon japonicus polysaccharides; Differentiation; Bone resorption; Osteoporosis

* 基金项目: 贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目[贵中医大创合字(2021)79 号]。

作者简介: 易倩(1999—), 硕士研究生, 主要从事生物制药方面的研究。△ 通信作者, E-mail: zhanglingyan1212@126.com。

骨骼作为维持机体运动的重要器官,在体内发挥着运动、支持、保护、造血、贮存矿物质等功能。正常情况下,机体内成骨细胞介导的骨形成能与破骨细胞介导的骨吸收保持动态平衡,维持骨骼的正常功能^[1]。中老年人,尤其是绝经后的妇女,其破骨细胞过度激活、骨吸收增加,使得骨量降低、骨骼脆性增加,在微观结构上呈现疏松多孔状态,即骨质疏松症。因此,抑制破骨细胞分化成为防治骨量丢失、治疗骨质疏松症的重要靶点。麦冬是我国使用广泛的传统中药。据张锡纯《医学衷中参西录》中记载,麦冬具有养阴润肺、益胃生津、清心除烦等功效。麦冬多糖(OPS)是麦冬的主要成分,在麦冬中的提取率高达 35%,这可能与麦冬的功效有关^[2]。近期研究发现,OPS 的作用更加广泛,具有抗炎、抗氧化、抗衰老、降血糖、保护心肌、提高机体免疫力等多种功效^[2-7]。研究发现,OPS 通过降低氧化应激对巨噬细胞的损伤,减少细胞凋亡,从而起到保护巨噬细胞的作用^[8],但其在骨代谢领域的功能尚未揭示。破骨细胞起源于骨髓单核巨噬细胞(BMMs),是体内唯一具有骨吸收能力的终末分化细胞。本研究探讨了 OPS 对核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)诱导的 BMMs 破骨分化、骨吸收的影响及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8 周 SPF 级 C57BL/6j 雌性小鼠 10 只,体重 18~22 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2022-0011],饲养于贵州中医药大学实验动物研究所动物房[SYXK(黔)2021-0005],温度 20~25℃,湿度 40%~60%,自由采食及饮水,相关饲养及实验操作经贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准(20220131)。麦冬购于张家港市绿色中药饮片有限公司(批号:190115)。

1.2 主要试剂与仪器 α -MEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司),M-CSF、RANKL(美国 Peprotech 公司)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(美国 Sigma 公司),TRAP 活性检测试剂盒、细胞活性试剂盒、青-链霉素双抗、RNAeasyTM 动物 RNA 抽提试剂盒、BeyoRTTM III cDNA 合成试剂盒、BeyoFastTM SYBR Green 定量聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。多功能酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司),相差显微镜(日本 Olympus 公司),T100TM PCP 仪(美国 Bio-Rad 公司),实时荧光定量 PCR 仪(杭州博日科技有限公司),NanoDrop 微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 方法

1.3.1 OPS 提取 参照张靖等^[9]介绍的方法对麦冬中的 OPS 进行提取,主要步骤为:取麦冬 1 000 g 加

95%乙醇浸泡后,经水浴回流提取 2 次,随后药渣加 9 倍量水煎煮 3 次,所有药液合并浓缩至 1 L,进一步经醇沉、乙醚、丙酮洗涤后,60℃下干燥 OPS 粗粉末。随后采用三氯乙酸法去除蛋白质,以苯酚-硫酸法测定 OPS 水平。根据 OPS 测定结果(实测值:88.76%)将其制备成含糖量为 1 mg/mL 的母液,经高压灭菌后,于 4℃保存备用。

1.3.2 小鼠 BMMs 分离和培养 小鼠 BMMs 分离和培养步骤:(1)小鼠麻醉后脱颈处死,浸泡于 75%乙醇中,置于超净工作台上;(2)迅速解剖小鼠并分离出双侧股骨,剔除附着物,用含双抗的无菌磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次后,剪除股骨近、远端,暴露骨髓腔;(3)使用 1 mL 注射器抽取 PBS 反复冲洗骨髓腔,吹出骨髓组织,重悬于 α -MEM 完全培养基,1 200 r/min 离心 8 min 后,弃上清液;(4)使用含 50 ng/mL M-CSF 完全培养基重悬后,接种于 100 mm 细胞培养皿中,过夜;(5)弃培养基,用无菌 PBS 冲洗 3 次后,加 10 mL 含 50 ng/mL M-CSF 完全培养基,隔天换液;(6)重复步骤(5)操作直至细胞呈短梭形,密度达 80%~90%;(7)培养好的细胞使用 PBS 冲洗 3 次,用移液枪吹落后混匀备用,即为 BMMs。后续 BMMs 培养时使用含 50 ng/mL M-CSF 完全培养基,进行破骨分化诱导时采用含 0 ng/mL RANKL、50 ng/mL M-CSF 完全培养基。

1.3.3 BMMs 细胞活性检测 按每孔 3×10^3 个细胞的密度将 BMMs 接种于 96 孔板中,按实验设计分为对照组和 3 个不同水平 OPS 处理组。对照组使用含 50 ng/mL M-CSF 完全培养基(即 0 μ g/mL OPS),OPS 处理组在此基础上加入 2.5、10.0、或 40.0 μ g/mL OPS(A、B、C 组)。在给药后 48、96 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,继续培养 2 h 后,使用酶标仪在 450 nm 波长处测定每孔吸光度(OD)值,计算细胞活性。

1.3.4 BMMs 破骨分化诱导 将 BMMs 按每皿 1×10^5 个细胞的密度接种到 35 mm 培养皿中,过夜后,使用破骨诱导分化完全培养基(α -MEM+10%胎牛血清+1%双抗+1%谷氨酰胺+50 ng/mL RANKL+50 ng/mL M-CSF)进行破骨分化诱导,隔天换液。5 d 后,在显微镜下可见 BMMs 开始汇聚、融合,出现多核细胞,7 d 可见边界清晰、巨大的成熟破骨细胞。

1.3.5 破骨细胞 TRAP 活性检测 为研究 OPS 对 TRAP 活性的影响,将 BMMs 按每皿 1×10^5 个细胞的密度接种到 35 mm 培养皿中,过夜、贴壁。随后,按实验设计更换为含不同水平 OPS(0、2.5、10.0、40.0 μ g/mL)的诱导培养基,隔天换液,7 d 后诱导为成熟的破骨细胞。收集各培养孔细胞,并按照 TRAP 活性检测试剂盒说明书测定破骨细胞 TRAP 活性及

蛋白水平。

1.3.6 破骨细胞形成检测 将 BMMs 诱导为成熟的破骨细胞后,弃培养基,用 PBS 润洗 2 次,每孔加 500 μL 4%多聚甲醛,固定 10 min。弃甲醛、用 PBS 冲洗 2 遍后,按照试剂盒说明书介绍方法进行 TRAP 染色。使用倒置显微镜拍摄染色图,TRAP 阳性且细胞核数目大于或等于 3 个的细胞计为破骨细胞,并通过 ImageJ 软件进行破骨细胞相对大小的计算,破骨细胞相对大小=各组破骨细胞大小/对照组中破骨细胞大小的平均值。

1.3.7 破骨细胞骨吸收能力检测 将 BMMs 按每孔 3×10^3 个细胞的密度接种到骨培养板中,诱导为成熟破骨细胞后,弃培养基,用 0.1%次氯酸钠溶液漂白骨培养板。生物显微镜下观察骨陷窝形成情况,获

取骨吸收图像,并用 Image Pro6.0 软件分析图像。

1.3.8 采用逆转录实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法测定破骨细胞分化标志基因 mRNA 表达 将 BMMs 按每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 6 孔板中,过夜、贴壁后,按 1.3.3 分组培养细胞。7 d 后弃培养基,用预冷的 PBS 冲洗 1 次后,每孔加入 300 μL 总 RNA 提取试剂,按照 RNAeasyTM 动物 RNA 抽提试剂盒说明书的方法提取细胞总 RNA 后,用 Nano-Drop 微量分光光度计测定总 RNA 水平。随后,按 BeyoRTTM III cDNA 合成试剂盒说明书中介绍的方法逆转录合成 cDNA,检测碳酸酐酶 2(Car2)、组织蛋白酶 K(CTSK)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、TRAP、液泡型 H⁺-ATP 酶(V-ATPase) mRNA 表达水平。RT-qPCR 所用引物序列见表 1。

表 1 破骨细胞分化标志基因的引物序列

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
Car2	CAT TAC TGT CAG CAG CGA GCA	GAC GCC AGT TGT CCA CCA TC
CTSK	ACG GAG GCA TTG ACT CTG AAG ATG	GGA AGC ACC AAC GAG AGG AGA AAT
MMP-9	GTC CAG ACC AAG GGT ACA GC	ATA CAG CGG GTA CAT GAG CG
TRAP	TGT GGC CAT CTT TAT GCT	GTC ATT TCT TTG GGG CTT
V-ATPase	CCA CTG GAA GCC CAG TAA ACA GA	GAA CGT ATG AGG CCA GTG AGC A
GAPDH	TGC ACC ACC AAC TGC TTA G	GGA TGC AGG GAT GAT GTT C

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以率或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同水平 OPS 对 BMMs 细胞活性的影响 A、B、C 组 48、96 h 时 OD 值比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见图 1。

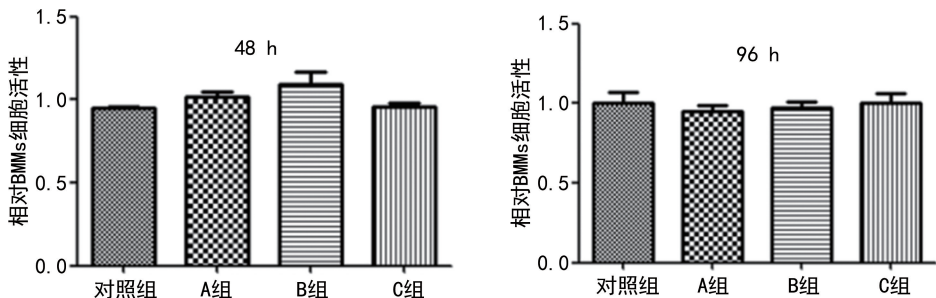


图 1 不同水平 OPS 对 BMMs 细胞活性的影响

2.2 不同水平 OPS 对破骨细胞分化的影响 细胞培养 7 d 后,经固定、TRAP 染色,在倒置显微镜下观察可见,对照组中出现大量多核、肥大、煎饼样的成熟破骨细胞。与未添加 OPS 的对照组相比,添加 OPS 会显著抑制破骨细胞生成。B 组成熟破骨细胞数目显著下降,C 组只有极少量破骨细胞生成。见图 2。与对照组(1.00 ± 0.15)比较,B 组成熟破骨细胞数目降低至(0.61 ± 0.06)(*P*<0.05),而 C 组成熟破骨细胞数目为(0.31 ± 0.03)(*P*<0.05)。见图 3。

2.3 不同水平 OPS 对破骨细胞 TRAP 活性的影响 与对照组相比,B、C 组 5 d 时破骨细胞 TRAP 活性显著降低(*P*<0.05)。A、B、C 组 7 d 时破骨细胞 TRAP 活性显著低于对照组(*P*<0.05)。见图 4。

2.4 不同水平 OPS 对破骨细胞骨吸收能力的影响 对照组中出现大量骨吸收陷窝,A 组骨吸收陷窝明显减少,C 组仅可见少量骨吸收陷窝。见图 5。以对照组骨吸收面积为 1,进一步统计分析显示,A、B、C 组骨吸收面积仅为对照组的 71%、40%和 6%(*P*<0.05)。见图 6。

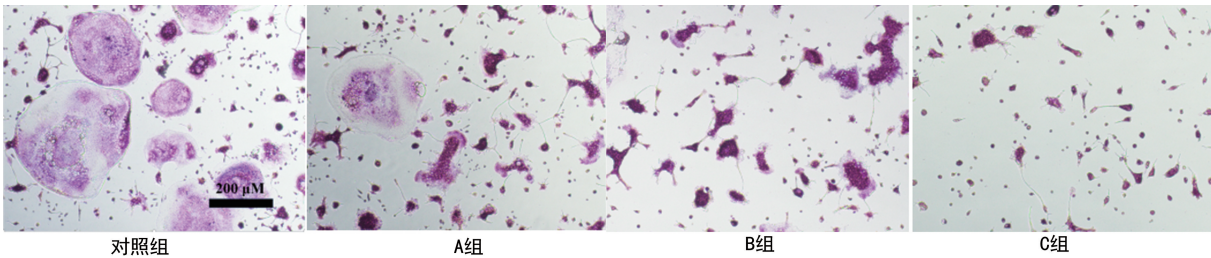


图 2 倒置显微镜下观察各组破骨细胞分化情况 (TRAP 染色,100×)

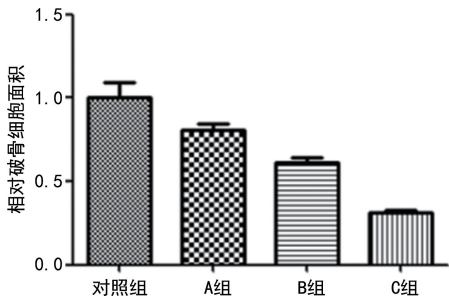


图 3 不同水平 OPS 对破骨细胞分化的影响

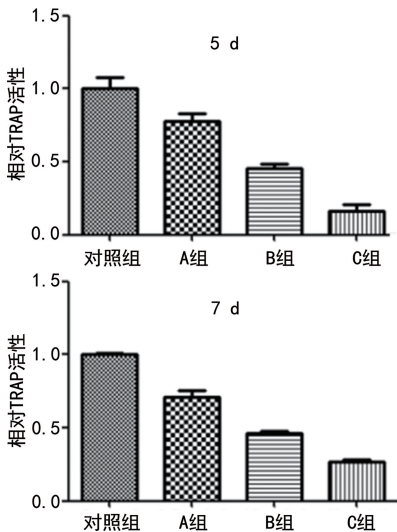


图 4 不同水平 OPS 对破骨细胞 TRAP 活性的影响

2.5 不同水平 OPS 对破骨细胞相关基因 mRNA 表达水平的影响 与对照组比较,B、C 组 Car2、CTSK、

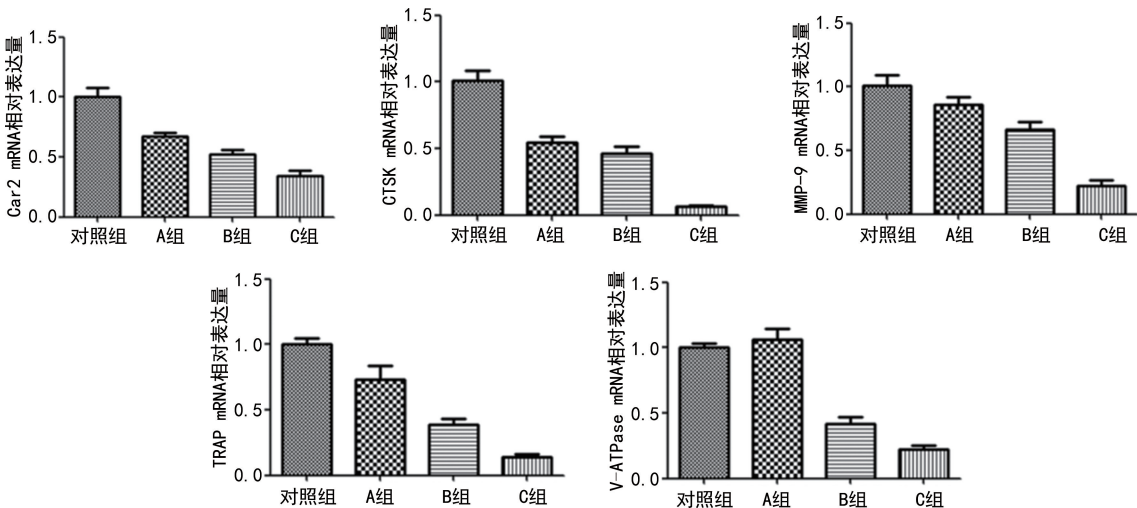


图 7 不同水平 OPS 对 Car2、CTSK、MMP-9、TRAP、V-ATPase mRNA 表达水平的影响

MMP-9、TRAP、V-ATPase mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$)。见图 7。

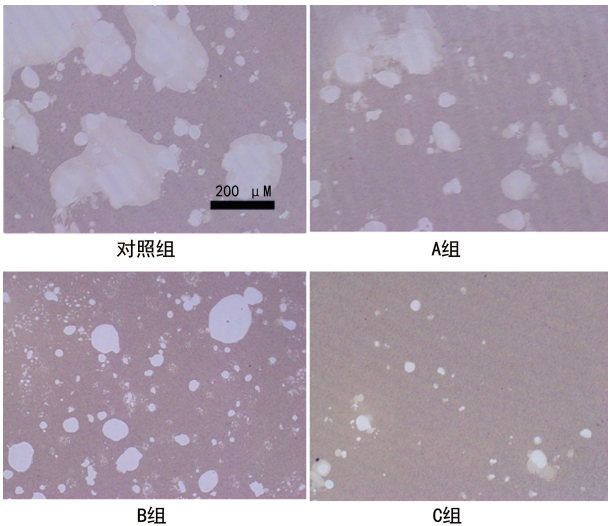


图 5 骨吸收图 (100×)

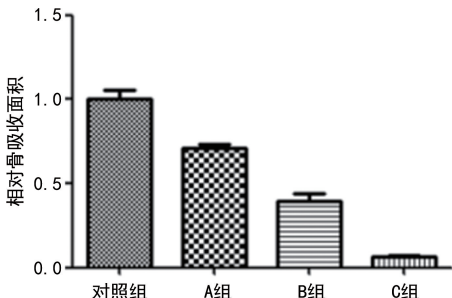


图 6 不同水平 OPS 对破骨细胞骨吸收能力的影响

3 讨 论

麦冬是一种广泛使用的传统中草药,OPS 作为麦冬的主要成分,具有抗炎、抗氧化、降血糖、保护心肌、提高机体免疫力等功效。王晓颖^[10]研究发现,麦冬糖浆能显著降低放射性肺炎模型小鼠血浆中白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、转化生长因子 β 1、肺组织的脯氨酸、超氧化物歧化酶、MMP-2 及其组织抑制物蛋白水平。OPS 还能够调节单胺氧化酶 B、IL-2、TNF- α 、IL-6、 γ 干扰素及 IL-10 mRNA 表达,增强机体免疫力^[11]。最近研究发现,OPS 还具有抗肿瘤作用,羧甲基化修饰的 OPS 能有效地抑制癌细胞增殖^[12]。且给 S-180 荷瘤小鼠灌胃 2.0 g/kg OPS,可显著提高巨噬细胞吞噬能力及血清 IL-1 β 、TNF- α 水平^[13]。然而,OPS 对骨吸收的影响鲜有报道。

破骨细胞来源于单核巨噬细胞系统^[14]。破骨细胞的过度激活及伴随骨吸收功能的过度活化是造成机体骨质疏松的重要原因。破骨细胞的活性主要体现在能否从单核巨噬细胞分化为破骨细胞,以及其溶骨功能的强弱。本研究结果显示,40.0 μ g/mL 及以下水平的 OPS 对 BMMs 增殖无明显抑制作用。对 RANKL 和 M-CSF 诱导的破骨细胞进行 TRAP 染色及骨吸收能力检测,结果显示,添加 OPS 能显著抑制破骨细胞形成,减少骨吸收,且 40.0 μ g/mL OPS 处理的 BMMs 几乎不能形成成熟的破骨细胞。因此,OPS 是一种潜在的有效抗骨吸收药物。OPS 对破骨细胞的显著抑制作用可能与其抗氧化和抗炎功能相关。最近研究发现,OPS 可有效地清除氧自由基,降低 HIH/3T3 细胞损伤诱导的单线态氧的产生及炎症因子表达量^[15]。另一方面,麦冬水提物能显著抑制 LPS 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 中一氧化氮的分泌和 TNF- α 蛋白表达,从而发挥抗炎作用^[16]。在破骨细胞分化过程中,氧自由基的升高能激活机体的破骨细胞,促进骨吸收^[17-19]。多种炎症因子如 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-11 等可显著促进破骨细胞的分化^[20]。既然 OPS 具有有效的抗氧化及抗炎作用,而且活性氧及炎症因子在破骨细胞分化过程中发挥重要作用,那么 OPS 对破骨细胞分化功能的抑制也与其抗氧化及抗炎作用相关,具体的机制有待进一步研究。

CTSK 作为半胱氨酸蛋白酶家族中的一员,在破骨细胞中溶酶体和细胞质囊泡中大量表达^[21],其参与有机骨基质蛋白中 I 型胶原、骨桥接素和骨粘连蛋白的降解,是发挥骨吸收功能的一个关键酶^[22]。人 CTSK 突变会导致致密性成骨不全,小鼠 CTSK 基因敲除会出现骨基质降解障碍^[23]。ATPase 属于质子泵的一种,位于破骨细胞膜的褶皱缘处,用于维持破骨细胞封闭区的酸性环境。ATPase 基因敲除小鼠的

破骨细胞成熟度降低、骨吸收功能受到影响,骨骼硬度增加^[24]。Car2 主要存在于破骨细胞中的胞浆中,能催化二氧化碳的水合作用,产生质子^[21]。TRAP 位于破骨细胞的微粒体中,通过褶皱缘分泌进入封闭区,与其他酶一起参与骨基质中矿化物的降解,是骨吸收和破骨细胞活性的良好标志物,但其确切的生理作用还不清楚^[25]。MMP-9 属于基质金属蛋白酶家族中的一员。作为一种胞外蛋白酶,MMP-9 在破骨细胞中高度表达,参与细胞外基质的降解,最终通过影响破骨细胞的迁移而影响破骨细胞活性^[26-27]。MMP-9 能特异性溶解非矿化软骨,促进破骨细胞活化;MMP-9 缺乏会延缓破骨细胞募集,抑制骨吸收,同时 MMP-9 还可以抑制成骨过程中细胞迁移^[28]。因此,可通过检测破骨细胞分化过程中上述基因表达的变化,探索 OPS 影响破骨细胞分化的机制。

本研究中,OPS 可浓度依赖性地抑制 M-CSF 和 RANKL 刺激下参与胶原蛋白降解和骨陷窝形成的 CTSK 和 MMP-9 mRNA 表达,提示 OPS 对破骨细胞的骨吸收功能具有明显的抑制作用。破骨细胞中,Car2 催化产生的质子经 V-ATPase 转运至破骨细胞褶皱缘,并维持吸收陷窝的酸性环境。本研究结果显示,添加 OPS 可以抑制破骨细胞中 Car2 和 V-ATPase mRNA 表达,提示 OPS 可能会升高骨陷窝 pH 值,抑制骨吸收酶活性,降低骨吸收。

综上所述,OPS 可显著抑制破骨细胞分化功能,抑制骨吸收,但其深层机制仍不清楚,有待进一步研究。

参考文献

[1] 黄微星,万玲君,黄幻,等. 茛菪酰胺抑制破骨细胞分化的机制研究[J]. 浙江医学,2023,45(1): 8-14.

[2] 杨阳,施艳茹,伋琳,等. 麦冬多糖对衰老大鼠皮肤形态及 5-羟色胺表达变化影响的实验研究[J]. 陕西医学杂志,2022,51(12):1488-1491.

[3] BERTUCCI V,NIKOLIS A,SOLISH N,et al. Efficacy and safety of flexible hyaluronic acid fillers in lip and perioral enhancement[J]. J Drugs Dermatol,2021,20(4):402-408.

[4] FAN Y,MA X,MA L,et al. Antioxidative and immunological activities of ophiopogon polysaccharide liposome from the root of ophiopogon japonicus[J]. Carbohydr Polym,2016,135:110-120.

[5] SUN W,HU W,MENG K,et al. Activation of macrophages by the ophiopogon polysaccharide liposome from the root tuber of ophiopogon japoni-

- cus[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91: 918-25.
- [6] 张琳, 杨范莉, 张祺嘉钰, 等. 不同提取方法对不同产地麦冬中芦丁和麦冬多糖含量及其抗氧化活性的影响[J]. *西北药学杂志*, 2020, 35(3): 317-321.
- [7] 宋娜, 苏东峰, 刘晓燕, 等. 麦冬多糖对糖尿病围绝经期大鼠血清 SOD、GSH-Px、CAT、MDA 水平的影响[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2019, 38(6): 979-984.
- [8] 周梦玲. 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B/NLRP3 信号通路探讨麦冬多糖调节干燥综合征炎性微环境的机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [9] 张靖, 朱秀高, 王士勇, 等. 麦冬多糖对鸡新城疫病毒作用的体外研究[J]. *中国家禽*, 2021, 43(7): 50-56.
- [10] 王晓颖. 麦冬对 C57BL/6 小鼠放射性肺炎的防治作用研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
- [11] 范明明, 张嘉裕, 张湘龙, 等. 麦冬的化学成分和药理作用研究进展[J]. *中医药信息*, 2020, 37(4): 130-134.
- [12] 张小平, 孙润广, 王小梅, 等. 化学修饰水提麦冬多糖 WPOJ 的抗肿瘤活性研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(4): 368-373.
- [13] 许娇红, 张红雷, 刘用国. 短葶山麦冬多糖对 S-180 荷瘤小鼠免疫调节功能的影响[J]. *海峡药学*, 2021, 33(12): 16-18.
- [14] YANG D, WAN Y. Molecular determinants for the polarization of macrophage and osteoclast[J]. *Semin Immunopathol*. 2019, 41(5): 551-563.
- [15] 文丹, 付成, 丁菲. 麦冬多糖的抗氧化、降血糖活性研究[J]. *江汉大学学报(自然科学版)*, 2023, 51(3): 55-67.
- [16] 曹春琪, 赵跃东, 张旗, 等. 麦冬不同提取部位对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响[J]. *中医药信息*, 2016, 33(2): 11-15.
- [17] WEI L, CHEN W, HUANG L, et al. Alpinetin ameliorates bone loss in LPS-induced inflammation osteolysis via ROS mediated P38/PI3K signaling pathway[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 184: 106400.
- [18] LAHA D, SARKAR J, MAITY J, et al. Polyphenolic compounds inhibit osteoclast differentiation while reducing autophagy through limiting ROS and the mitochondrial membrane potential[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(9): 1220.
- [19] 郭婉怡, 袁蓓, 张锐雪, 等. 活性氧(ROS)对类风湿性关节炎骨破坏的影响研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37: 2182-2193.
- [20] YASUDA H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system[J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1): 2-11.
- [21] 王子阳. 长链非编码 RNA gsm5532 在破骨细胞分化过程的作用与机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2019.
- [22] 刘鑫. NVP-BHG712 抑制破骨细胞分化作用及机制研究[D]. 济南: 齐鲁医学院, 2022.
- [23] KARKABI S, REIS N D, LINN S, et al. Pyknodysostosis: Imaging and laboratory observations[J]. *Calcif Tissue Int*, 1993, 53(3): 170-173.
- [24] 张鑫. 巴戟天含药血清对破骨细胞整合素 $\beta 3$ 、V-ATP 酶及 TNF- α 的影响[D]. 厦门: 厦门大学, 2019.
- [25] 续慧云, 任丽, 王东恩. 骨生物学基础与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2023: 32-49.
- [26] 姚金丹. IL-17 对破骨细胞 MMP-9 表达水平的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [27] 陈辉文. 新补骨脂异黄酮抑制破骨细胞分化、减轻小鼠去卵巢后骨质丢失的作用及机制研究[D]. 上海: 海军军医大学, 2021.
- [28] ENGSIG M T, CHEN Q J, VU T H, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones[J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(4): 879-890.

(收稿日期: 2023-05-08 修回日期: 2023-06-29)