

• 论 著 •

# 骨包虫病炎症反应通过 IL-34/M-CSF1R/STAT1 信号通路介导破骨细胞活化的分子机制研究\*

何佳奇, 王海滨, 吾路汗·马汗, 谢增如<sup>△</sup>

新疆医科大学第一附属医院创伤骨科, 新疆乌鲁木齐 830054

**摘要:**目的 探讨骨包虫抗原引起的炎症反应及其介导的破骨细胞活化的分子机制。方法 选取 2014 年 1 月至 2023 年 12 月该院健康志愿者个体 13 例和椎体和(或)盆腔骨包虫病患者 13 例血样为研究对象。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定其血清白细胞介素(IL)-34、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平。在体外采用核因子受体激活因子- $\kappa$ B 配体(RANKL)诱导 RAW264.7 细胞向破骨细胞方向分化,将其分为 RANKL 诱导组、RANKL 诱导+包虫抗原处理组、RANKL 诱导+包虫抗原处理+IL-34 抗体组。ELISA 测定细胞培养上清液 IL-34、IL-6、TNF- $\alpha$  水平,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色测定已分化的破骨细胞数所占百分比。采用慢病毒介导巨噬细胞集落刺激因子-1 受体(M-CSF1R)的过表达和 shRNA 敲低,将其分为 RANKL 诱导组、RANKL 诱导+包虫抗原处理组、RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-M-CSF1R shRNA 组、RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-shRNA NT 组、RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-M-CSF1R-OE 组、RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-OE vector 组。实时荧光定量 PCR 测定细胞中 TRAP、降钙素受体(CTR)、组织蛋白酶 K(CTSK) mRNA 相对表达水平,蛋白质印迹法测定细胞中 CTSK、磷酸化(p)-M-CSF1R、M-CSF1R、p-信号转导子和转录激活子 1(STAT1)和 STAT1 的相对表达水平。结果 与健康志愿者比较,骨包虫病患者血清 IL-34、IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.000 1$ )。与 RANKL 诱导组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理组 RAW264.7 细胞内 TRAP、CTR、CTSK mRNA 水平升高( $P < 0.000 1$ ),IL-34、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.000 1$ ),TRAP 染色阳性细胞百分比升高( $P < 0.05$ ),CTSK、p-M-CSF1R/M-CSF1R、p-STAT1/STAT1 的相对表达水平升高( $P < 0.05$ )。与 RANKL 诱导+包虫抗原处理组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理+IL-34 抗体组部分逆转了上述指标的水平( $P < 0.05$ )。与 RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-shRNA NT 组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-M-CSF1R shRNA 组 M-CSF1R 表达水平降低( $P < 0.05$ ),TRAP、CTR、CTSK mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ ),p-M-CSF1R/M-CSF1R 和 p-STAT1/STAT1 的相对表达水平降低( $P < 0.05$ )。与 RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-OE vector 组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-M-CSF1R-OE 组 M-CSF1R 表达水平升高( $P < 0.05$ ),TRAP、CTR、CTSK mRNA 表达水平升高( $P < 0.05$ ),p-M-CSF1R/M-CSF1R、p-STAT1/STAT1 的相对表达水平升高( $P < 0.05$ )。结论 包虫抗原可引起 IL-34 水平升高,激活 M-CSF1R/STAT1 信号轴,促进破骨细胞分化,参与骨包虫病的病理生理性骨溶解。

**关键词:**骨包虫病; 包虫抗原; 白细胞介素-34; 破骨细胞分化; 巨噬细胞集落刺激因子-1 受体/信号转导子和转录激活子 1 信号轴

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.09.012

中图法分类号:R532.32

文章编号:1673-4130(2026)09-1091-09

文献标志码:A

## The molecular mechanisms of osteoclasts activation mediated by IL-34/M-CSF1R/STAT1 signaling pathway during inflammation of bone hydatid disease\*

HE Jiaqi, WANG Haibin, WULUHAN · Mahan, XIE Zengru<sup>△</sup>

Department of Traumatic Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China

**Abstract: Objective** To investigate the molecular mechanism of inflammatory response induced by bone hydatid antigen-mediated osteoclast activation. **Methods** Blood samples of 13 healthy volunteers and 13 patients with vertebral and (or) pelvic bone echinococcosis in the hospital from January 2014 to December 2023 were selected as the objects. The serum levels of interleukin (IL) -34, IL-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$

\* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01D19);“青年科研启航”专项基金项目合同书(2023-QKQW-32)。

作者简介:何佳奇,男,医师,主要从事四肢骨折治疗相关研究。△ 通信作者,E-mail:qia314@sina.com。

(TNF- $\alpha$ ) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). RAW264.7 cells were induced to differentiate into osteoclasts by RANKL in vitro. They were divided into RANKL-induced group, RANKL-induced + hydatid antigen treatment group, RANKL-induced + hydatid antigen treatment + IL-34 antibody group. The levels of IL-34, IL-6 and TNF- $\alpha$  in the culture supernatant were measured by ELISA. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was used to determine the percentage of differentiated osteoclasts. Lentivirus-mediated macrophage-colony stimulating factor-1 receptor (M-CSF1R) overexpression and shRNA knockdown were used. They were divided into RANKL induction group, RANKL induction + hydatid antigen treatment group, RANKL induction + hydatid antigen treatment + Lenti-M-CSF1R shRNA group, and RANKL induction + hydatid antigen treatment + Lenti-shRNA NT group, RANKL induction + hydatid antigen treatment + Lenti-M-CSF1R-OE group, RANKL induction + hydatid antigen treatment + Lenti-OE vector group. The relative expression levels of TRAP, calcitonin receptor (CTR) and cathepsin K (CTSK) mRNA were detected by real-time PCR. The relative expression levels of CTSK, phosphorylated (p-) M-CSF1R, M-CSF1R, p-signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT1 in cells were determined by Western blot. **Results** Compared with healthy volunteers, the serum levels of IL-34, IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly increased in patients with bone echinococcosis ( $P < 0.0001$ ). Compared with the RANKL-induced group, the mRNA levels of TRAP, CTR and CTSK were increased ( $P < 0.0001$ ), the levels of IL-34, IL-6 and TNF- $\alpha$  were increased in RAW264.7 cells induced by RANKL + hydatid antigen treatment ( $P < 0.0001$ ), and the percentage of TRAP staining positive cells and the relative expression levels of CTSK, p-M-CSF1R/M-CSF1R, and p-STAT1/STAT1 were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the RANKL induction + hydatid antigen treatment group, the RANKL induction + hydatid antigen treatment + IL-34 antibody group partially reversed the levels of the above indicators ( $P < 0.05$ ). Compared with RANKL induction + hydatid antigen treatment + Lenti-shRNA NT group, RANKL induction + hydatid antigen treatment + Lenti-M-CSF1R shRNA group M-CSF1R expression decreased ( $P < 0.05$ ), TRAP, CTR, CTSK mRNA expression levels decreased ( $P < 0.05$ ). The relative expression levels of p-M-CSF1R/M-CSF1R and p-STAT1/STAT1 were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with RANKL induction + hydatid antigen treatment + Lenti-OE vector group, RANKL induction + hydatid antigen treatment + Lenti-M-CSF1R-OE group M-CSF1R expression level increased ( $P < 0.05$ ), TRAP, CTR, CTSK mRNA expression levels increased ( $P < 0.05$ ). The relative expression levels of p-M-CSF1R/M-CSF1R and p-STAT1/STAT1 were increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Hydatid antigen can increase IL-34 level, activate M-CSF1R/STAT1 signaling axis, promote osteoclast differentiation, and participate in the pathophysiological osteolysis of bone hydatid disease.

**Key words:** bone echinococcosis; hydatid antigen; interleukin-34; osteoclast differentiation; macrophage colony-stimulating factor-1 receptor/signal transducer and activator of transcription 1 signaling axis

囊型棘球蚴病(CE)由细粒棘球蚴的幼虫引起<sup>[1]</sup>。在疫区,CE的年发病率在 $<1/10$ 万至 $200/10$ 万。全球CE疾病负担平均为285500例残疾调整生命年。其中骨骼肌肉受累的病例,称为骨CE,占有所有CE的 $0.5\% \sim 4.0\%$ 。骨CE又称骨包虫病,是所有棘球蚴病中最复杂、最危险的一种,其几乎可以发生于身体的任何骨骼上,但超过半数病例发生在脊柱( $50.0\%$ )和骨盆( $25.0\%$ ),其他骨骼的发病率较低。脊柱部位肌肉骨骼感染常导致严重残疾甚至死亡;非脊柱骨部位感染临床表现往往无特异性,最常见的是疼痛和病理性骨折<sup>[2]</sup>。骨包虫病男女、任何年龄段均可发病,多为儿童时期已被感染,疾病发展 $10 \sim 20$ 年后到成年时期被发现和确诊<sup>[3]</sup>。骨包虫病多见于松质骨,其囊肿本身可直接激活破骨细胞增殖,引起局部病理性骨溶解。囊肿还可沿骨道等阻力较小的微结构向多

个方向侵犯,导致骨折<sup>[3]</sup>。骨包虫病的诊断主要通过X射线、计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)及血清学检测(如针对抗原5的检测)<sup>[4]</sup>。治疗手段主要是手术切除和给予阿苯达唑药物治疗<sup>[3]</sup>。

白细胞介素(IL)-34是一种新发现的细胞因子,是巨噬细胞集落刺激因子-1受体(M-CSF1R)的配体,可替代巨噬细胞集落刺激因子-1(M-CSF1)诱导破骨细胞分化<sup>[5]</sup>。IL-34在各种感染和炎症相关疾病中表达增强,如类风湿关节炎<sup>[6]</sup>、炎症性肠病<sup>[7]</sup>、冠状动脉疾病<sup>[8]</sup>等。多发性骨髓瘤是一种生长在轴骨多个部位的血液系统恶性肿瘤,可导致衰弱的溶骨性疾病。IL-34通过促进破骨细胞分化加重类固醇诱导的股骨头骨坏死<sup>[9-10]</sup>。信号转导子和转录激活子1(STAT1)与线粒体自噬信号轴协调巨噬细胞NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3炎症小体的激活和

炎症性骨丢失<sup>[11]</sup>。而且 STAT1 在骨稳态的维持中发挥关键作用<sup>[12]</sup>。

在本研究中,首先通过测定椎体和(或)盆腔骨包虫病的患者血清 IL-34 等炎症因子的水平;进而在体外细胞水平采用不同方法诱导 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化,通过抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色、酶联免疫吸附试验(ELISA)和蛋白质印迹法(Western blot)检测相关蛋白指标,深入探讨包虫抗原通过上调 IL-34,促进破骨细胞分化,可能参与骨包虫病的病理生理性骨溶解的分子机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料收集** 收集 2014 年 1 月至 2023 年 12 月本院经影像学 and 手术切除获得的骨囊肿,经组织病理学证实为椎体和(或)盆腔骨包虫病的患者血样 13 例。纳入标准:(1)手术前所有患者均具有至少一项影像学检查结果发现骨囊肿位于椎体和(或)盆腔,并怀疑为骨包虫病;(2)所有患者均经手术获得骨囊肿组织,有足够的组织病理学信息,且确诊为骨包虫病;(3)所有患者临床资料完整。排除标准:(1)患者临床资料不完整;(2)手术后随访时间<1 年。从本院血液科收集健康志愿者血样 13 例。所有人体实验均经本院伦理委员会批准(批号:K201305-51)。

**1.2 试剂与仪器** 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系 RAW264.7 细胞购自武汉普诺赛生物科技有限公司。FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂(货号 KR118),FastReal 快速实时荧光定量 PCR (qPCR)预混试剂(SYBR Green,货号 FP217)购自天根生化(北京)科技有限公司(中国)。qPCR 扩增引物的设计和合成委托上海生工生物代为完成。包虫抗原 B 由本实验室常规制备。兔抗小鼠组织蛋白酶 K (CTSK) 单抗(货号 MA5-32602),磷酸化(p)-M-CSF1R 多抗(货号 PA5-121293),M-CSF1R 多抗(货号 PA5-14569),p-STAT1 单抗(货号 33-3400),STAT1 单抗(货号 MA1-037),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,货号 MA5-15738),山羊抗兔 HRP 标记 IgG(H+L)二抗(货号 31460)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。慢病毒载体及慢病毒颗粒的包装实验委托和元生物技术(上海)股份有限公司代为完成。

### 1.3 方法

**1.3.1 ELISA** 使用抗人血清 IL-34、IL-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒对骨包虫病患者血清中上述炎症因子的水平进行测定。使用抗小鼠 IL-34、IL-6 和 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒测定 RAW264.7 细胞培养上清液对应炎症因子的水平。具体操作方法按照说明书中的指导进行即可。

**1.3.2 细胞培养和实验分组** RAW264.7 细胞培养于补充有 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养液中,置于 37 °C 恒温、湿润的 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中维持培养。

(1)细胞实验分组-1:①RANKL 诱导组,向 6-孔板细胞培养物中加入 100 ng/mL 可溶性核因子受体激活因子- $\kappa$ B 配体(RANKL)诱导其向破骨细胞分化,连续诱导 6 d,每隔一天换液一次含可溶性 RANKL 的新鲜完全培养液<sup>[13]</sup>;②RANKL 诱导+包虫抗原处理组,向 6-孔板细胞培养物中加入 100 ng/mL 可溶性 RANKL 和 50 ng/mL 包虫抗原 B,诱导其向破骨细胞分化,诱导和培养时间同“RANKL 诱导组”<sup>[14]</sup>。(2)细胞实验分组-2:①RANKL 诱导组和②RANKL 诱导+包虫抗原处理组处理方式同“细胞实验分组-1”;③RANKL 诱导+包虫抗原处理+IL-34 抗体组,向 6-孔板细胞培养物中加入 100 ng/mL 可溶性 RANKL+50 ng/mL 包虫抗原 B+1  $\mu$ g/mL 抗 IL-34 抗体,诱导其向破骨细胞分化,诱导和培养时间同“RANKL 诱导组”。(3)细胞实验分组-3:①RANKL 诱导组和②RANKL 诱导+包虫抗原处理组处理方式同“细胞实验分组-1”;③RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-M-CSF1R shRNA 组;④RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-shRNA NT 组;⑤RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-M-CSF1R-OE 组;⑥RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-OE vector 组,③~⑥分组细胞分别转染 Lenti-M-CSF1R shRNA、Lenti-shRNA NT、Lenti-M-CSF1R-OE 或 Lenti-OE vector 后 48 h 再按照②组处理方式处理细胞。

**1.3.3 转染** 采用慢病毒载体 pSLenti-CMV-EGFP-3xFLAG-WPRE 介导 M-CSF1R 的过表达实验。M-CSF1R 的开放阅读框(ORF)扩增引物为 ORF 上游引物:5'-CTTCCCCACCGAGGCCATG-3', ORF 下游引物:5'-CTAGCCCAGAATGACGGGAC-3'。过表达实验分组为 Lenti-M-CSF1R-OE 组和 Lenti-OE vector 组。采用慢病毒载体 pCLenti-U6-shRNA-CMV-Puro-WPRE 介导 M-CSF1R 的 shRNA 敲低实验。Lenti-M-CSF1R shRNA:5'-GGGGAGGGGCTCAACCTC-3', Lenti-shRNA NT:5'-ACGCTCTC ACTGGCCGGC-3'。敲低实验分组为 Lenti-M-CSF1R shRNA 组和 Lenti-shRNA NT 组。慢病毒颗粒的包装实验也委托和元生物技术(上海)股份有限公司代为完成。慢病毒颗粒感染 RAW264.7 细胞的滴度为  $9.98 \times 10^7$  TU/mL。

**1.3.4 qPCR** 向每 6-孔板一皿细胞培养物中加入 1 mL Trizol 裂解液裂解细胞并提取总 RNA。使用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂反转录合成 cDNA。使用 FastReal qPCR 预混试剂(SYBR Green,货号 FP217)进行 qPCR 扩增。抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)上游引物(5'-3'): CCTCG-GCTGTGCGGCTATG, TRAP 下游引物(5'-3'): CAGTGCTGTGATTTGTGCC;降钙素受体(CTR)上游引物(5'-3'): GTCTGCGTTCCTGAGAA-

CAC, CTR 下游引物 (5' - 3'): CCTTCCAGAG-GAGAAGAAAC; 组织蛋白酶 K (CTSK) 上游引物 (5' - 3'): GAAAAGAGCCTAGCGAAC, CTSK 下游引物 (5' - 3'): GTCTCCGAGGAAATGCTGG。

**1.3.5 Western blot** 向每 6 孔板细胞培养物中加入 1 mL 补充有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液裂解细胞并提取总蛋白质。以 10 微克/孔总蛋白质进行常规 SDS-PAGE。采用半干转印法 (4℃, 80 mA 恒流, 2 h) 将总蛋白质电转印至 PVDF 膜上。使用 5% 脱脂奶粉对 PVDF 膜进行封闭。向膜上滴加一抗工作液, 4℃ 与膜共同孵育过夜; 次日, 向膜上滴加二抗工作液, 室温与膜共同孵育 1 h。使用 ECL 化学发光底物对目的条带进行显影。抗体工作液稀释度如下: CTSK (1 : 1 500 稀释), p-M-CSF1R (1 : 1 000 稀释), M-CSF1R (1 : 1 500 稀释), p-STAT1 (1 : 1 000 稀释), STAT1 (1 : 1 500 稀释), GAPDH (1 : 1 500 稀释), IgG (H+L) 二抗 (1 : 6 000 稀释)。

**1.3.6 TRAP 染色** 使用 TRAP 染色试剂盒对破骨细胞诱导培养物进行 TRAP 活性测定。如果 TRAP 阳性细胞有 3 个或更多的细胞核, 则被认为是已分化

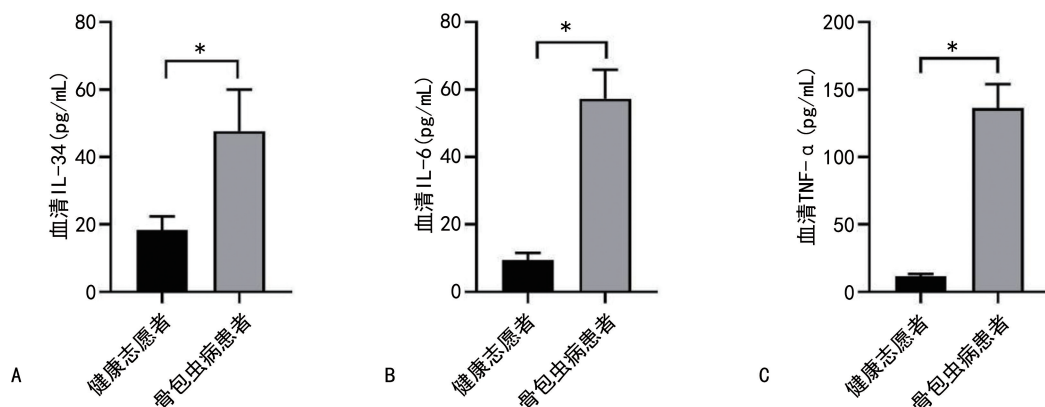
的破骨细胞。在光学显微镜下, 计算至少 5 个随机视野中的 TRAP 阳性染色细胞数所占百分比 (%)。计算方法为 TRAP 阳性染色细胞数 ÷ 视野中所有细胞 × 100 %。

**1.4 统计学处理** 使用 GraphPad Prism v8 统计学软件进行数据的统计学分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析和事后 Tukey's 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

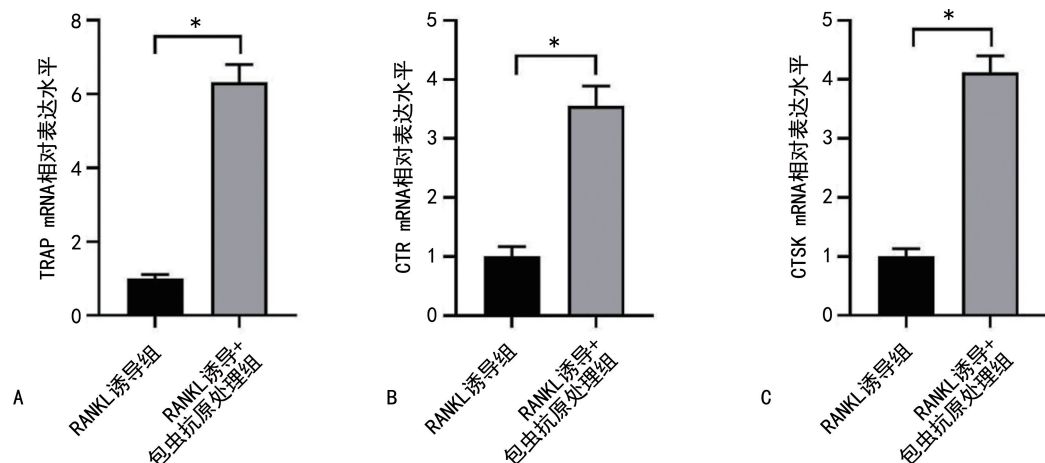
**2.1 骨包虫病患者与健康志愿者血清相关炎症因子水平比较** ELISA 结果显示, 与健康志愿者比较, 骨包虫病患者血清 IL-34、IL-6、TNF-α 水平升高 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

**2.2 不同处理组破骨细胞前体向破骨细胞分化的相关标志物 mRNA 水平比较** qPCR 结果显示, 与 RANKL 诱导组比较, RANKL 诱导 + 包虫抗原处理组 RAW264.7 细胞内 TRAP、CTR、CTSK mRNA 水平升高 ( $P < 0.000 1$ )。见图 2。



注: A~C 分别为各组血清 IL-34、IL-6、TNF-α 水平比较, \*  $P < 0.000 1$ 。

图 1 骨包虫病患者与健康志愿者血清相关炎症因子水平比较



注: A~C 分别为不同处理组 TRAP、CTR、CTSK mRNA 相对表达水平比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 2 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化标志物表达水平测定结果

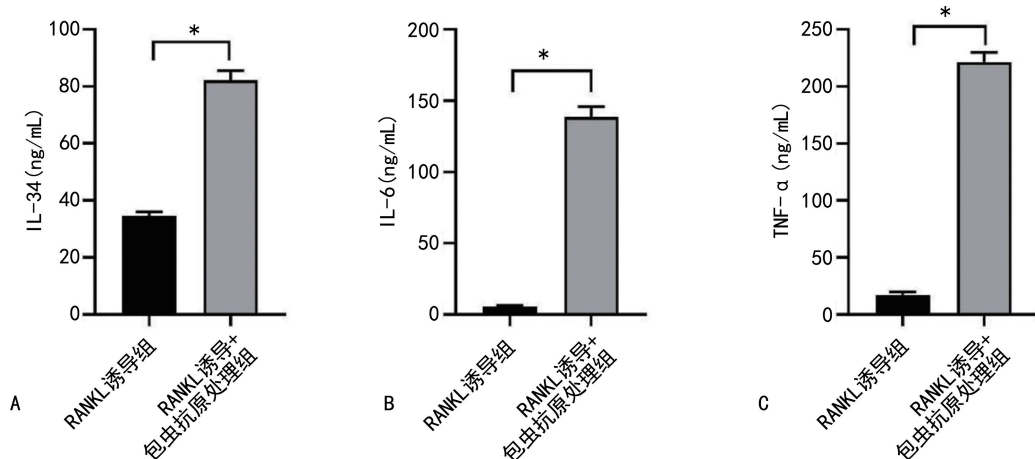
**2.3 不同处理组细胞培养上清液炎症因子水平测定**

ELISA 测定细胞培养上清液炎症因子水平结果显示,

与 RANKL 诱导组比较, RANKL 诱导+包虫抗原处理组 IL-34、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平升高 ( $P < 0.000 1$ )。见图 3。

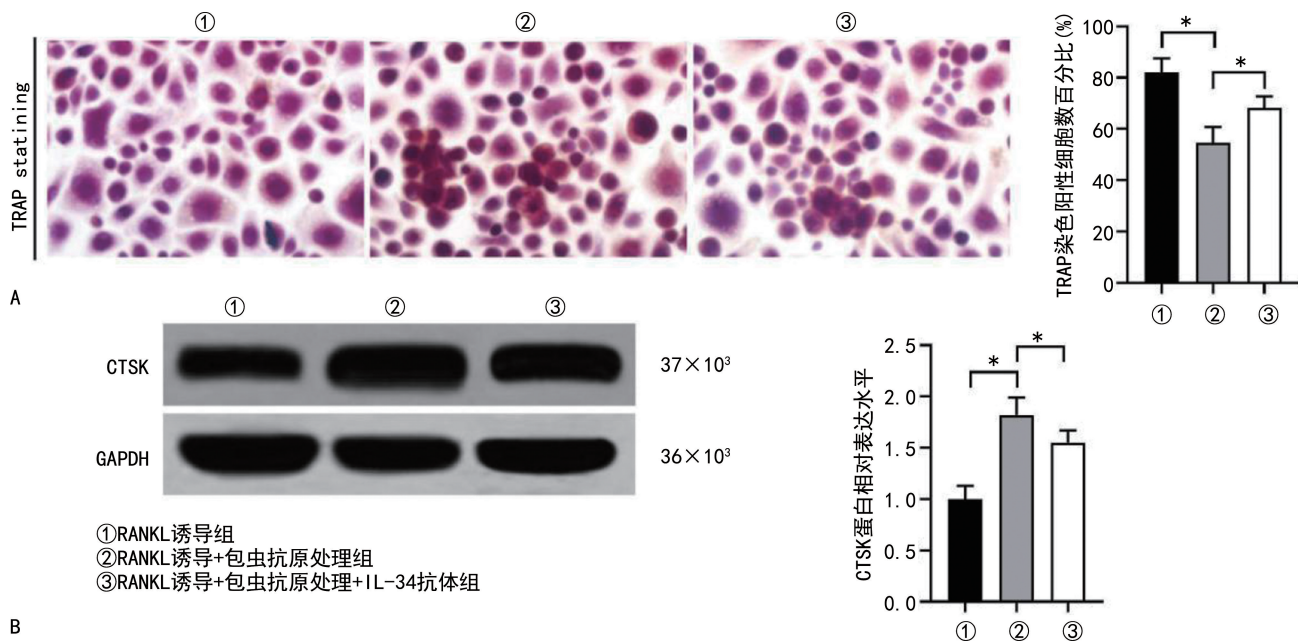
**2.4 不同处理组破骨细胞前体向破骨细胞分化的相关标志物蛋白质表达水平测定** TRAP 染色结果显示, 与 RANKL 诱导组比较, RANKL 诱导+包虫抗原处理组 TRAP 染色阳性细胞百分比增加 ( $P < 0.05$ ); 与 RANKL 诱导+包虫抗原处理组比较,

RANKL 诱导+包虫抗原处理+IL-34 抗体组 TRAP 染色阳性细胞百分比降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4A。Western blot 结果显示, 与 RANKL 诱导组比较, RANKL 诱导+包虫抗原处理组 CTSK 蛋白相对表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 RANKL 诱导+包虫抗原处理组比较, RANKL 诱导+包虫抗原处理+IL-34 抗体组 CTSK 蛋白相对表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4B。



注: A~C 分别为不同处理组 IL-34、IL-6、TNF- $\alpha$  水平比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 3 不同处理组细胞培养上清液炎症因子水平测定结果



注: A 为 TRAP 染色结果 ( $\times 200$ ); B 为 Western blot 检测 CTSK 蛋白表达水平结果, \*  $P < 0.05$ 。

图 4 TRAP 染色和 Western blot 检测 CTSK 蛋白表达水平结果

**2.5 不同处理组破骨细胞前体向破骨细胞分化相关信号通路水平测定** Western blot 结果显示, 与 RANKL 诱导组比较, RANKL 诱导+包虫抗原处理组 p-M-CSF1R/M-CSF1R 和 p-STAT1/STAT1 的相对表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 RANKL 诱导+包虫抗原处理组比较, RANKL 诱导+包虫抗原处理+IL-34 抗体组 p-M-CSF1R/M-CSF1R 和 p-STAT1/

STAT1 的相对表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

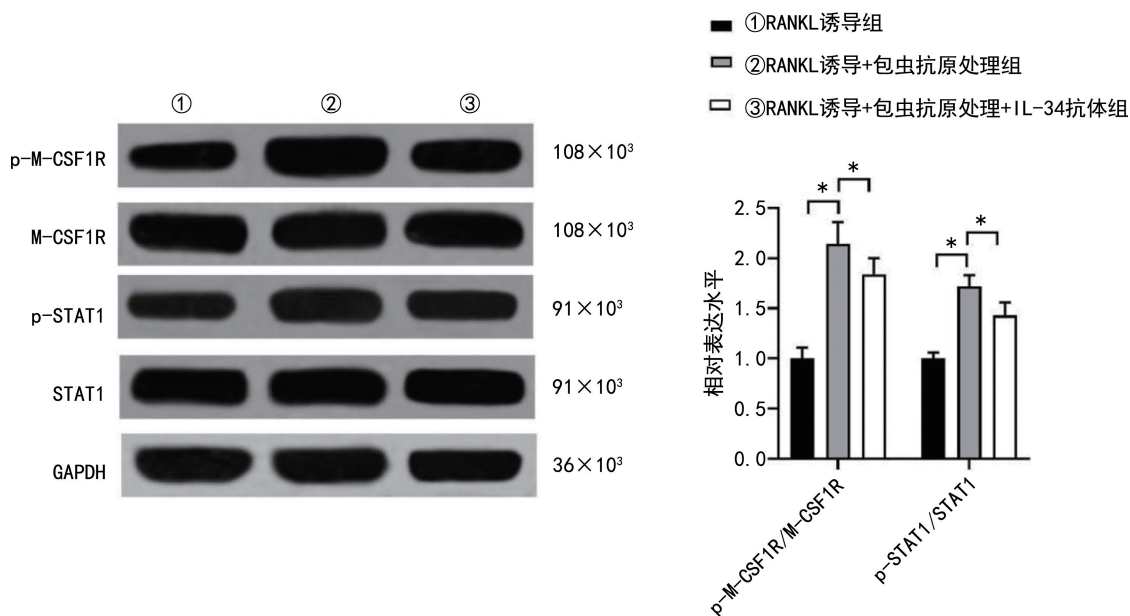
**2.6 Western blot 验证过表达/敲低 M-CSF1R 的效率** Western blot 结果显示, 与 RANKL 诱导组比较, RANKL 诱导+包虫抗原处理组 M-CSF1R 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-shRNA NT 组比较, RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-M-CSF1R shRNA 组 M-CSF1R 表

达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与 RANKL 诱导 + 包虫抗原处理 + Lenti-OE vector 组比较, RANKL 诱导 + 包虫抗原处理 + Lenti-M-CSF1R-OE 组 M-CSF1R 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。见图 6。

**2.7 过表达/敲低 M-CSF1R 上调/下调破骨细胞分化的相关标志物 mRNA 表达水平** qPCR 结果所示, 与 RANKL 诱导组比较, RANKL 诱导 + 包虫抗原处理组破骨细胞分化的相关标志物 TRAP、CTR 和 CTSK mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 RANKL 诱导 + 包虫抗原处理 + Lenti-shRNA NT 组比较, RANKL 诱导 + 包虫抗原处理 + Lenti-M-CSF1R shRNA 组 TRAP、CTR 和 CTSK mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与 RANKL 诱导 + 包虫抗原处理 + Lenti-OE vector 组比较, RANKL 诱导 + 包虫抗原处理 + Lenti-M-CSF1R-OE 组 TRAP、CTR 和 CTSK

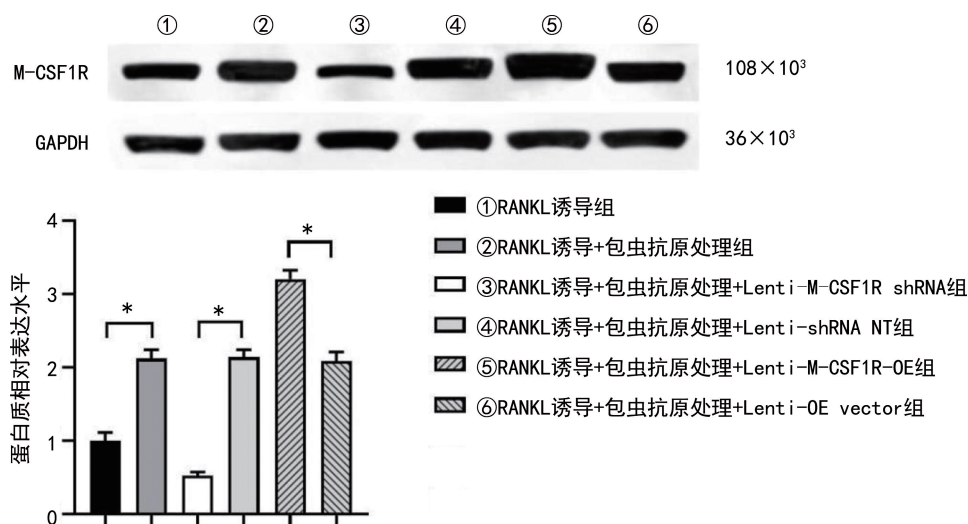
mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。见图 7。

**2.8 过表达/敲低 M-CSF1R 活化/抑制破骨细胞分化相关信号通路** Western blot 结果显示, 与 RANKL 诱导组比较, RANKL 诱导 + 包虫抗原处理组 p-M-CSF1R/M-CSF1R 和 p-STAT1/STAT1 的相对表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 RANKL 诱导 + 包虫抗原处理 + Lenti-shRNA NT 组比较, RANKL 诱导 + 包虫抗原处理 + Lenti-M-CSF1R shRNA 组 p-M-CSF1R/M-CSF1R 和 p-STAT1/STAT1 的相对表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与 RANKL 诱导 + 包虫抗原处理 + Lenti-OE vector 组比较, RANKL 诱导 + 包虫抗原处理 + Lenti-M-CSF1R-OE 组 p-M-CSF1R/M-CSF1R 和 p-STAT1/STAT1 的相对表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。见图 8。



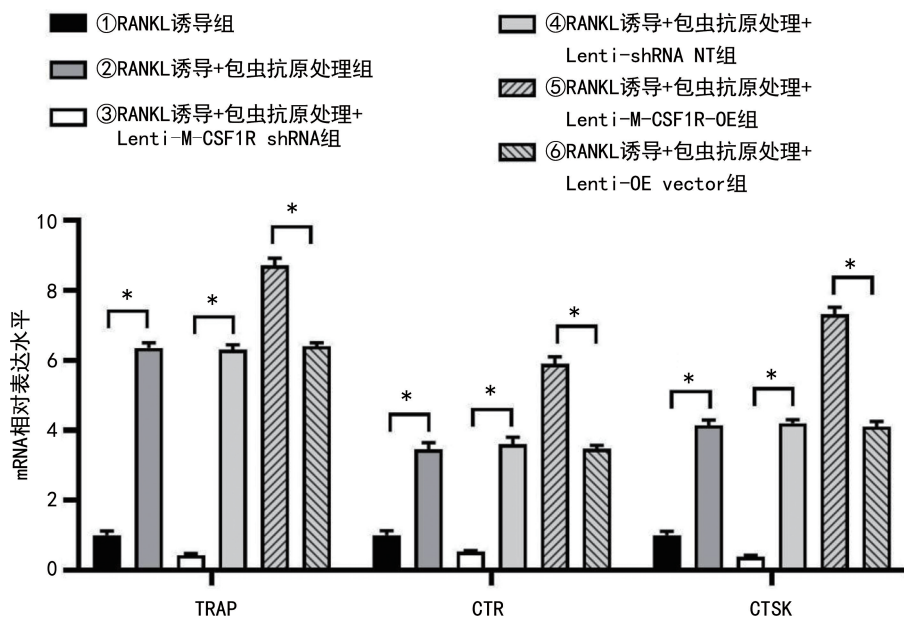
注: \*  $P < 0.05$ 。

图 5 Western blot 检测破骨细胞分化相关信号通路水平结果图



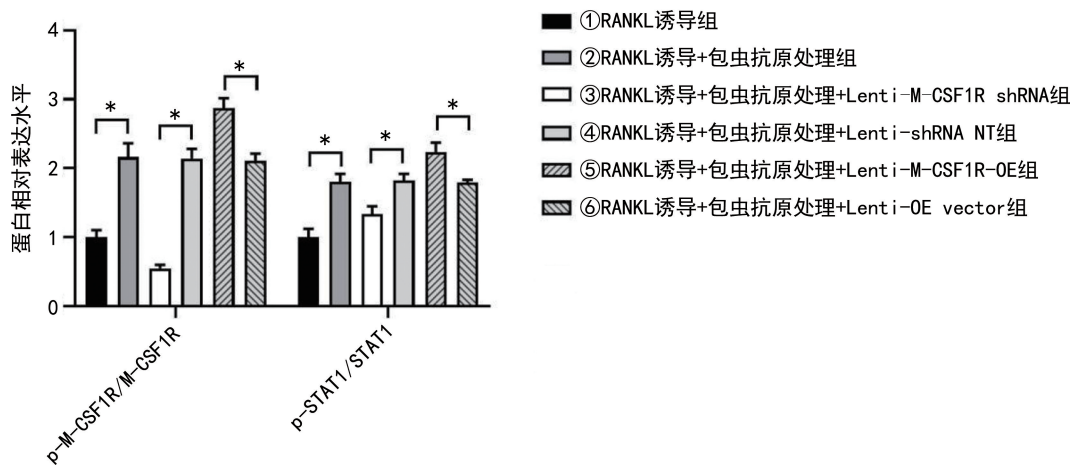
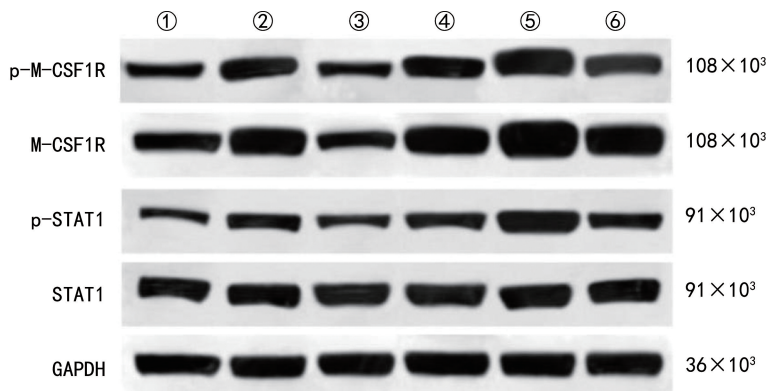
注: \*  $P < 0.05$ 。

图 6 Western blot 检测 RAW264.7 细胞中过表达/敲低 M-CSF1R 的效率



注: \*  $P < 0.05$ 。

图7 qPCR检测RAW264.7细胞中过表达/敲低M-CSF1R后破骨细胞分化相关标志物mRNA相对表达水平



注: \*  $P < 0.05$ 。

图8 Western blot检测RAW264.7细胞中过表达/敲低M-CSF1R对破骨细胞分化相关信号通路活化水平的影响

### 3 讨论

IL-34在发育、体内平衡和疾病中发挥重要作用。在人类中,IL-34 mRNA广泛存在于脑、脾、卵巢、前列腺、结肠、胸腺、睾丸、小肠、肾、肝、肺和心脏。IL-34的表达可由促炎细胞因子、病原体相关分子模式、化学物质刺激等诱导<sup>[14]</sup>。促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 可通过核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和c-Jun氨基末端激酶

(JNK)途径促进IL-34的表达。IL-6、IL-10、IL-17A、 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )等细胞因子也能刺激IL-34的分泌和表达。反过来,IL-34也参与调节上述多种炎症因子及其信号通路的表达和激活<sup>[6,15]</sup>。在特定的炎症性疾病中,如类风湿性关节炎,IL-34刺激滑膜成纤维细胞和外周血单核细胞分泌RANKL和骨保护素(OPG),介导破骨细胞分化和骨溶解<sup>[16]</sup>。在胶原诱

导的骨关节炎中 IL-34 介导软骨退化<sup>[17]</sup>。然而,之前未有研究深入探讨骨包虫病患者外周循环 IL-34 水平是否参与介导细粒棘球蚴幼虫感染导致的骨溶解。在本研究中检测的 13 例椎体和(或)盆腔骨包虫病患者的血样结果发现,与健康志愿者血样比较,上述患者血清中 IL-34、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平升高。体外细胞水平实验结果也显示,与 RANKL 诱导组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理组 RAW264.7 细胞培养上清液炎症因子 IL-34、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平升高。

在体外细胞水平实验中,与 RANKL 诱导组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理组 RAW264.7 细胞内 TRAP、CTR、CTSK mRNA 和蛋白质相对表达水平升高,TRAP 染色阳性细胞数百分比增多。与 RANKL 诱导+包虫抗原处理组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理+IL-34 抗体组 TRAP、CTR、CTSK mRNA 和蛋白质相对表达水平降低,TRAP 染色阳性细胞百分比降低。提示 IL-34 参与介导包虫抗原刺激的破骨细胞活化相关信号通路的激活。TRAP 是破骨细胞分泌的一种磷酸酶,能够抑制骨桥蛋白(OPN)的磷酸化而促进骨矿化过程<sup>[18]</sup>。TRAP 染色阳性是已分化破骨细胞的典型标志物。破骨细胞分泌 CTR 可直接作用于骨细胞抑制其溶骨作用<sup>[19]</sup>。CTR 也是破骨细胞分化的典型标志物。活化 T 细胞核因子 C1(NFATc1)介导上调表达 CTSK,促进破骨细胞生成和骨吸收<sup>[20]</sup>。本研究的结果说明包虫抗原能够进一步促进 RANKL 诱导的破骨细胞分化。

M-CSF-1 和 IL-34 共用 M-CSF1R,且在人类单核细胞中,这两种配体所触发的信号通路并无差异,均能够促进单核细胞、巨噬细胞和破骨细胞的分化与存活<sup>[21]</sup>。M-CSF1R 在未成熟的髓系前体细胞中的表达水平较低,随着髓系细胞的成熟其表达水平将升高。M-CSF1R 介导的信号转导和 RANKL 或 IL-34 对于破骨细胞的功能、增殖和从前体细胞分化至关重要。配体结合会导致 M-CSF1R 迅速形成二聚体并发生自磷酸化。M-CSF1R 细胞质结构域中的 6 个酪氨酸残基(Tyr559、Tyr697、Tyr708、Tyr721、Tyr807 和 Tyr974)及癌基因形式的 Csf1r 中的两个酪氨酸残基(Tyr544 和 Tyr921)均可发生磷酸化。这些磷酸化的酪氨酸残基位点将作为包含 Src 同源域 2 结构域的衔接蛋白的结合位点,二者结合后进一步转导下游信号事件。其中 Tyr708 将介导 STAT1 的磷酸化激活<sup>[22]</sup>。随后,NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路被激活,从而诱导 NFATc1 的表达,NFATc1 是破骨细胞生成的主调节因子,推动破骨细胞分化程序<sup>[22-23]</sup>。

STAT1 信号是细胞促存活的关键信号,对于维持骨稳态至关重要。STAT1 信号在 NFATc1 上游,抑制骨坏死,增强维持骨稳态<sup>[24]</sup>。STAT1 可通过 STAT1/JAK2 信号轴抑制成骨细胞增殖和分化,加

速破骨细胞介导的骨吸收<sup>[25]</sup>。在本研究中,与 RANKL 诱导组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理组 p-M-CSF1R/M-CSF1R 和 p-STAT1/STAT1 的相对表达水平升高;而与 RANKL 诱导+包虫抗原处理组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理+IL-34 抗体组 TRAP 染色阳性细胞百分比降低,CTSK 蛋白相对表达水平降低;p-M-CSF1R/M-CSF1R 和 p-STAT1/STAT1 的相对表达水平降低( $P < 0.05$ )。说明加入 IL-34 抗体拮抗 IL-34,能够部分抵消包虫抗原处理引起的 IL-34 水平升高和随之激活的 M-CSF1R/STAT1/SMAD7 信号轴及其介导的对破骨细胞分化的促进作用。

进一步的体外细胞实验证明,与 RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-shRNA NT 组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-M-CSF1R shRNA 组 TRAP、CTR 和 CTSK mRNA 相对表达水平降低,且 p-M-CSF1R/M-CSF1R 和 p-STAT1/STAT1 的相对表达水平降低;与 RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-OE vector 组比较,RANKL 诱导+包虫抗原处理+Lenti-M-CSF1R-OE 组 TRAP、CTR 和 CTSK mRNA 表达水平升高,且 p-M-CSF1R/M-CSF1R 和 p-STAT1/STAT1 的相对表达水平升高。提示过表达/敲低 M-CSF1R 通过激活/抑制 STAT1 的磷酸化活化/抑制破骨细胞分化。

综上所述,在本研究中,虽然未深入探讨包虫抗原通过何种信号通路上调了 IL-34 的分泌。但是根据目前的结果可知,包虫抗原可引起 IL-34 水平升高,激活 M-CSF1R/STAT1 信号轴,促进破骨细胞分化,参与骨包虫病的病理生理性骨溶解。

## 参考文献

- [1] 马超,黄金勇,罗雪峰,等.骨包虫病诊治的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2021,16(5):608-613.
- [2] MENG Y,REN Q,XIAO J,et al. Progress of research on the diagnosis and treatment of bone cystic echinococcosis [J]. Front Microbiol, 2023,14:1273870.
- [3] YANG L,TUXUNJIANG P,LIU W,et al. Vertebral and pelvic echinococcosis in northwestern China[J]. Int Orthop, 2023,47(5):1153-1162.
- [4] 常玉山,杨来红,何雄,等.骨包虫病的影像学表现[J].中国 CT 和 MRI 杂志,2023,21(12):172-174.
- [5] SHANG J,XU Y,PU S,et al. Role of IL-34 and its receptors in inflammatory diseases [J]. Cytokine, 2023, 171: 156348.
- [6] YANG H,LUO Y,LAI X. Il-34 regulates MAPKs,PI3K/Akt, JAK and NF- $\kappa$ B pathways and induces the expression of inflammatory factors in RA-FLS[J]. Clin Exp Rheumatol, 2022, 40(9):1779-1788.
- [7] LEIOS I,CANSEVER D,UTZ S G,et al. Emerging roles of IL-34 in health and disease[J]. J Exp Med, 2020, 217(3):

e20190290.

- [8] BOLAYIR H A, KARASU M, ALI GELEN M, et al. Inflammatory and cardiac biomarkers in pulmonary arterial hypertension; the prognostic role of IL-34 [J]. *Heart Lung*, 2025, 69: 202-207.
- [9] WANG F, MIN H S, SHAN H, et al. IL-34 aggravates steroid-induced osteonecrosis of the femoral head via promoting osteoclast differentiation [J]. *Immune Netw*, 2022, 22(3): e25.
- [10] BAGHDADI M, ISHIKAWA K, NAKANISHI S, et al. A role for IL-34 in osteolytic disease of multiple myeloma [J]. *Blood Adv*, 2019, 3(4): 541-551.
- [11] ZHU L, WANG Z, SUN X, et al. STAT3/mitophagy axis coordinates macrophage NLRP3 inflammasome activation and inflammatory bone loss [J]. *J Bone Miner Res*, 2023, 38(2): 335-353.
- [12] ZHOU S, DAI Q, HUANG X, et al. STAT3 is critical for skeletal development and bone homeostasis by regulating osteogenesis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6891.
- [13] GUO J, REN R, SUN K, et al. PERK controls bone homeostasis through the regulation of osteoclast differentiation and function [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 847.
- [14] FREUCHET A, SALAMA A, REMY S, et al. IL-34 and CSF-1, deciphering similarities and differences at steady state and in diseases [J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 110(4): 771-796.
- [15] LI X, LEI Y, GAO Z, et al. IL-34 affects fibroblast-like synoviocyte proliferation, apoptosis and function by regulating IL-17 [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 16378.
- [16] HO A, NGALA B, YAMADA C, et al. IL-34 exacerbates pathogenic features of Alzheimer's disease and Calvaria osteolysis in triple transgenic (3x-Tg) female mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 166: 115435.
- [17] CHAE D S, HAN S, LEE M K, et al. BMP-2 genome-edited human MSCs protect against cartilage degeneration via suppression of IL-34 in collagen-induced arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8223.
- [18] YILMAZ D, MARQUES F C, FISCHER Y, et al. Elucidating the mechano-molecular dynamics of TRAP activity using CRISPR/Cas9 mediated fluorescent reporter mice [J]. *Heliyon*, 2024, 10(12): e32949.
- [19] DAVEY R A, CLARKE M V, GOLUB S B, et al. The calcitonin receptor regulates osteocyte lacunae acidity during lactation in mice [J]. *J Endocrinol*, 2021, 249(1): 31-41.
- [20] XIN Y, LIU Y, LIU D, et al. New function of RUNX2 in regulating osteoclast differentiation via the AKT/NFATc1/CTSK axis [J]. *Calcif Tissue Int*, 2020, 106(5): 553-566.
- [21] BOULAKIRBA S, PFEIFER A, MHAIDLY R, et al. IL-34 and CSF-1 display an equivalent macrophage differentiation ability but a different polarization potential [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 256.
- [22] MUN S H, PARK P S U, PARK-MIN K H. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(8): 1239-1254.
- [23] 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.
- [24] ZHANG S, LIU Y, MA Z, et al. Osteoking promotes bone formation and bone defect repair through ZBP1-STAT1-PKR-MLKL-mediated necroptosis [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 13.
- [25] HE D, LIU F, CUI S, et al. Mechanical load-induced H2S production by periodontal ligament stem cells activates M1 macrophages to promote bone remodeling and tooth movement via STAT1 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 112.

(收稿日期: 2025-10-08 修回日期: 2026-01-15)

(上接第 1090 页)

- [17] GUO J T, WANG L, YU H B. Knockdown of NEAT1 mitigates ox-LDL-induced injury in human umbilical vein endothelial cells via miR-30c-5p/TCF7 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(18): 9633-9644.
- [18] ZHANG Y, ZHANG Z, WEI R, et al. IL (interleukin)-6 contributes to deep vein thrombosis and is negatively regulated by miR-338-5p [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(2): 323-334.
- [19] WANG S, WANG F, REN J, et al. LncRNA NEAT1 promotes vascular endothelial cell dysfunction via miR-218-5p/GAB2 and serves as a diagnostic biomarker for deep vein thrombosis [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2023, 29: 10760296231179447.
- [20] TOLDO S, MEZZAROMA E, BUCKLEY L F, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 236: 108053.
- [21] KLEI L R, HU D, PANEK R, et al. MALT1 protease activation triggers acute disruption of endothelial barrier integrity via CYLD cleavage [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(1): 221-232.
- [22] KONDREDDY V, KESHAVA S, DAS K, et al. The Gab2-MALT1 axis regulates thromboinflammation and deep vein thrombosis [J]. *Blood*, 2022, 140(13): 1549-1564.

(收稿日期: 2025-06-05 修回日期: 2025-12-11)