

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.05.0396

论著

# 静磁场抑制 TRPV4 介导的破骨细胞生物学行为减轻骨关节炎

康冉<sup>1</sup>, 李心乐<sup>1</sup>, 方彦雯<sup>2</sup>, 卫敏<sup>2</sup>, 廖钟财<sup>2</sup>, 杨磊<sup>3</sup>, 张平<sup>1,3</sup>

(1.天津医科大学基础医学院人体解剖学系,天津 300070;2.和也健康科技有限公司,安吉 313399;3.河北工业大学生命科学与健康工程学院,健康科学与工程研究中心,河北省生物医学材料与智能诊疗重点实验室,天津 300401)

**摘要** 目的:探讨瞬时受体电位香草蛋白 4(TRPV4)在骨关节炎小鼠中的表达变化以及静磁场影响破骨细胞行为和修复软骨下骨吸收驱动的软骨退变的机制。方法:本研究采用 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 70 只。在实验的第一部分将其按随机数字表法分为对照组(Control 组,  $n=10$ )和骨关节炎组( $n=30$ ),后者根据造模时间分为 OA7d 组( $n=10$ )、OA14d 组( $n=10$ )、OA28d 组( $n=10$ )。免疫组化检测 TRPV4 在不同造模时间软骨下骨中的表达。在实验的第二部分将 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham 组,  $n=10$ )、骨关节炎组(OA 组,  $n=10$ )、骨关节炎联合静磁场治疗组(OAS 组,  $n=10$ )。采用横断内侧面副韧带,切除内侧半月板的方法建立骨关节炎小鼠模型,并使用本实验室特制的 200 mT 的静磁场干预 2 周。通过组织学染色评估静磁场对软骨退变及软骨下骨病理的影响。免疫组化染色评估体内静磁场对 TRPV4 表达的影响。体外分离骨髓源性破骨细胞,采用 TRPV4 拮抗剂 GSK219 验证静磁场对破骨细胞形成、迁移、黏附的作用。ELISA 法检测血清和破骨细胞条件培养基中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )水平。破骨细胞条件培养基培养 ATDC5 细胞,观察破骨细胞对软骨细胞退变的影响。结果:实验第一部分免疫组化结果显示骨关节炎小鼠软骨下骨中 TRPV4 阳性表面呈时间依赖性上调。实验第二部分组织学染色显示静磁场改善软骨下骨微结构,提高骨小梁面积比( $t=4.318, P<0.01$ )及软骨下骨板厚度( $t=10.42, P<0.001$ ),并且降低骨关节炎小鼠国际骨关节炎研究协会评分( $t=3.614, P<0.05$ ),改善软骨损伤;静磁场通过抑制 TRPV4 降低破骨细胞形成、迁移和黏附能力( $t=26.35, 36.56, 35.76$ , 均  $P<0.001$ );且 TRPV4 拮抗剂 GSK219 可模拟静磁场效应。静磁场降低破骨细胞分泌的 TNF- $\alpha$  水平( $t=3.935, P<0.01$ ),减少其对软骨细胞退变的作用( $t=28.52, P<0.001$ )。结论:骨关节炎早期软骨下骨中 TRPV4 表达呈时间依赖性增加。静磁场通过抑制 TRPV4 介导的破骨细胞生物学行为,改善软骨下骨吸收及继发软骨退变。

**关键词** 静磁场;骨关节炎;瞬时受体电位香草蛋白 4;破骨细胞

中图分类号 R684.3

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)05-0396-08

## Static magnetic field inhibits TRPV4-mediated osteoclast biological behavior to alleviate osteoarthritis

KANG Ran<sup>1</sup>, LI Xinle<sup>1</sup>, FANG Yanwen<sup>2</sup>, WEI Min<sup>2</sup>, LIAO Zhongcai<sup>2</sup>, YANG Lei<sup>3</sup>, ZHANG Ping<sup>1,3</sup>

(1.Department of Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Heye Health Technology Co., Ltd., Anji 313399, China; 3.Center for Health Science and Engineering, Hebei Key Laboratory of Biomaterials and Smart Theranostics, School of Health Sciences and Biomedical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China)

**Abstract Objective:** To investigate the expression changes of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in osteoarthritis (OA) and the mechanism by which static magnetic fields (SMF) influence the biological behavior of osteoclasts and repair subchondral bone resorption-driven cartilage degeneration. **Methods:** Seventy SPF grade female C57BL/6 mice were used in this study. In the first part of the experiment, C57BL/6 mice were divided into control group (Control,  $n=10$ ) and osteoarthritis group (OA,  $n=30$ ) according to the random number table method. The OA group was further divided into OA7d group ( $n=10$ ), OA14d group ( $n=10$ ) and OA28d group ( $n=10$ ) according to the time of 7, 14 and 28 days of modeling. The expression of TRPV4 in subchondral bone at different time points was detected by immunohistochemistry. In the second part of the experiment, C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group (Sham group,  $n=10$ ), osteoarthritis group (OA group,  $n=10$ ), osteoarthritis combined with static magnetic field treatment group (OAS group,  $n=10$ ) according to the random number table method. A mouse model of OA was established by transection of the medial collateral ligament and resection of the medial meniscus. The mice were treated with a 200 mT static magnetic field specially designed in our laboratory for 2 weeks. Histological staining was used to evaluate the effect of static magnetic field on cartilage degeneration and subchondral bone pathology. Immunohistochemical staining was used to evaluate the effect of static magnetic field on TRPV4 expression *in vivo*. Bone marrow derived osteoclasts were isolated *in vitro*, and the effects of static magnetic field on

基金项目 国家自然科学基金(81772405,81572100);和也健康科技重明鸟计划(2021006,2022016)

作者简介 康冉(1998-),女,硕士在读,研究方向:静磁场治疗骨关节炎的机制研究;通信作者:张平,E-mail:pizhang2008@163.com。

osteoclast formation, migration and adhesion were verified using TRPV4 antagonist GSK219. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in serum and osteoclast conditioned medium were detected by ELISA. ATDC5 cells were cultured in osteoclast conditioned medium to observe the effect of osteoclasts on the degeneration of chondrocytes. **Results:** In the first part of the experiment, immunohistochemistry results showed a time-dependent upregulation of TRPV4 positive surface in subchondral bone of OA mice. In the second part of the experiment, histological staining showed that static magnetic field improved the microstructure of subchondral bone, increased the area ratio of trabecular bone ( $t=4.318$ ,  $P<0.01$ ) and subchondral bone plate thickness ( $t=10.42$ ,  $P<0.001$ ), reduced Osteoarthritis Research Society International(OARSI) score ( $t=3.614$ ,  $P<0.05$ ), and improved cartilage damage in OA mice. Static magnetic field inhibited the formation, migration and adhesion of osteoclasts by inhibiting TRPV4 ( $t=26.35$ ,  $36.56$ ,  $35.76$ , all  $P<0.001$ ). GSK219, a TRPV4 antagonist, could mimic the static magnetic field effect. Static magnetic field decreased the level of TNF- $\alpha$  secreted by osteoclasts( $t=3.935$ ,  $P<0.01$ ) and reduced its effect on the degeneration of chondrocytes( $t=28.52$ ,  $P<0.001$ ). **Conclusion:** TRPV4 expression in subchondral bone increases in a time-dependent manner in the early stage of OA. Static magnetic field can improve subchondral bone resorption and secondary cartilage degeneration by inhibiting the biological behavior of TRPV4-mediated osteoclasts.

**Key words** static magnetic field; osteoarthritis; TRPV4; osteoclasts

骨关节炎是一种由多种因素引起的关节退行性疾病,影响全球超过 2.5 亿人,是一项重大的社会健康问题<sup>[1]</sup>。机械应力和炎症引起软骨下骨破骨细胞生物学行为活跃,导致过度的骨吸收<sup>[2]</sup>,并且破骨细胞前体和破骨细胞可以释放肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等炎症细胞因子<sup>[3]</sup>,最终导致软骨破坏。因此,抑制破骨细胞可能成为治疗骨关节炎的关键因素。

静磁场分为亚磁场( $<5 \mu\text{T}$ )、弱磁场( $5 \mu\text{T}\sim 1 \text{mT}$ )、中强磁场( $1 \mu\text{T}\sim 1 \text{mT}$ )和强磁场( $>1 \text{T}$ )<sup>[4]</sup>。其具有多种生物效应,包括抑制破骨细胞分化和骨吸收以及促进软骨修复等<sup>[5-6]</sup>。中强磁场可增强软骨生成和改善软骨细胞外基质,减轻骨关节炎小鼠软骨破坏的病理进展<sup>[7]</sup>。静磁场可以抑制破骨细胞的生物学行为,减轻其介导的骨吸收<sup>[8]</sup>。瞬时受体电位香草蛋白 4(TRPV4)是一种钙离子可渗透通道,可响应多种机械刺激<sup>[9]</sup>。研究表明,抑制 TRPV4 激活可使破骨细胞分化减少,改善骨重塑和软骨保护<sup>[10]</sup>。静磁场作为一种穿透性强、不易衰减的物理治疗,能否改善骨关节炎小鼠软骨下骨尚不清楚。本实验采用横断膝关节内侧副韧带,随后切除内侧半月板建立骨关节炎小鼠模型,探究 TRPV4 在骨关节炎中的表达模式及静磁场调节 TRPV4 介导的破骨细胞生物学行为和改善软骨下骨吸收和软骨退变的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 采用 70 只 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠[14 周龄,中国北京军事医学科学院动物中心,生产许可证号:SCXK(京)2022-0002,动物批号:No. 111251241100084366]。实验的第一部分检测骨关节炎的发病机制,将小鼠按随机字数表法分为对照组(Control 组,  $n=10$ )和骨关节炎组( $n=30$ ),后者按照

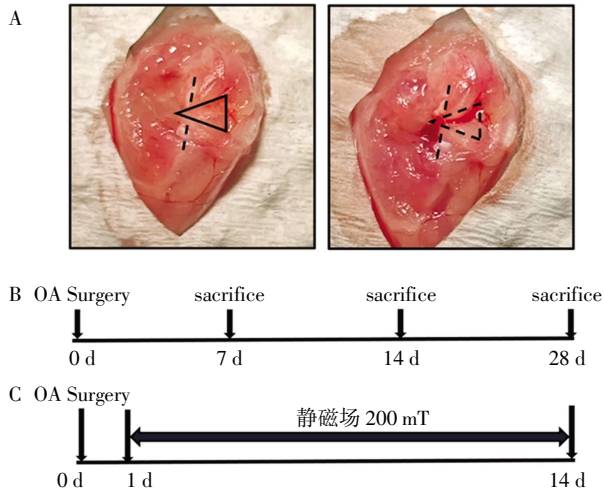
造模时间分为 3 组:7 d(OA7d 组,  $n=10$ )、14 d(OA14d 组,  $n=10$ )、28 d(OA28d 组,  $n=10$ )。实验的第二部分评价静磁场对骨关节炎小鼠的治疗作用,将小鼠按随机字数表法为 3 组:假手术组(Sham 组,  $n=10$ )、骨关节炎组(OA 组,  $n=10$ )和骨关节炎联合静磁场治疗组(OAS 组,  $n=10$ )。所有实验均经天津医科大学伦理委员会批准[SYXK(津)2019-0004],并按照《实验动物护理和使用指南》进行。小鼠在无病原体的条件下饲养,随意进食饲料和水,并在室温( $25^\circ\text{C}$ )塑料笼中自由活动,光/暗循环 12 h。

1.1.2 主要仪器和试剂 石蜡切片机(RM255)购自德国 Leica 公司。光学显微镜 BX53 购自日本 Olympus 公司。DMEM、MEM、胎牛血清(FBS)、青霉素、链霉素和胰蛋白酶购自美国 Invitrogen 公司。M-CSF 和 RANKL 购自美国 PeproTech 公司,ITS 购自中国上海 Beyotime 公司。GSK2193874(简称 GSK219)购自美国 Selleck 公司。抗体 TRPV4 购自美国 Abcam 公司。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)底物试剂盒和免疫组织化学染色试剂盒购自中国北京 ZSGBIO 公司。酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自中国武汉 Bosterbio 公司。除非另有说明,其他化学品均购自美国 Millipore Sigma 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 骨关节炎造模 手术采用无菌技术,麻醉下使用 1.5%异氟醚,流速为 1.0 L/min。右后肢剃毛,用 75%酒精溶液消毒,用手术刀在膝关节内侧沿长轴切开 20 mm,露出右膝关节。横切内侧副韧带,打开关节腔,以便切除内侧半月板(图 1A)。用无菌生理盐水冲洗手术部位以去除组织碎片,并关闭切口。右膝手术结束后,对左膝进行同样的手术。对于 Control 组和 Sham 组只切开皮肤,不进行横断韧带、

切除半月板操作。术后前 3 d,每天在切口部位涂抹 1%盐酸普拉莫辛软膏。术后切口部位应用丁丙诺啡作为镇痛。第一组实验和第二组实验的时间线如图所示(图 1B、1C)。



注:A:骨关节炎小鼠造模示意图(虚线代表内侧副韧带,三角形显示切除半月板前后的关节腔);B:第一部分实验时间轴;C:第二部分实验时间轴;OA:骨关节炎

图 1 骨关节炎小鼠造模示意图和实验时间轴

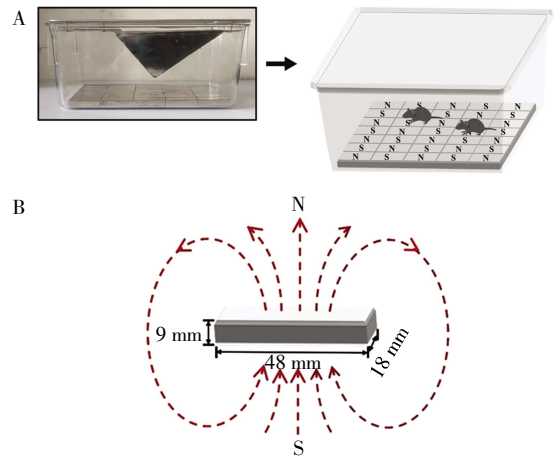
Fig.1 Modeling of osteoarthritis mice and experimental timeline

**1.2.2 静磁场治疗** OAS 组采用静磁场装置治疗。将 35 个永磁体 N 极或 S 极向上交替插入,拼接成一个更大的静磁场装置,该装置为非均匀磁场,磁场方向为垂直方向。通过高斯计测量磁场强度,磁场强度在笼底中心区域(小鼠活动范围)波动范围为 195~205 mT。根据先前实验的结果,选择 200 mT 强度进行实验<sup>[7]</sup>,将装置放置在小鼠笼下,连续 14 d(图 2A),小鼠在笼里正常活动。其他组只放在笼里,没有静磁场干预。单个永磁体的参数如图所示(图 2B)。

### 1.3 组织学实验

**1.3.1 组织处理** 小鼠根据实验时间线进行人道主义处死。剥离小鼠后腿,剔除皮肤、软组织及韧带,留取双后肢膝关节组织(注意保证关节结构完整),保留关节囊。将骨组织标本浸没于 10%中性福尔马林中固定 2 d 后,在 14%的 EDTA 中脱钙 2 周。将骨组织标本用石蜡包埋,进行冠状位切片,厚度为 5  $\mu\text{m}$ 。

**1.3.2 HE、番红 O、TRAP 染色** 使用石蜡包埋的膝关节标本(每组  $n=6$ ),组织切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,进行 HE、番红 O、TRAP 染色,脱水透明后树胶封片,显微镜下每张切片随机选取 5 个高倍视野,观察组织病理形态学改变。测量骨小梁面积比(B.Ar/T.Ar)、软骨下骨板厚度(SBP.Th)、国际骨



注:A:动物实验静磁场装置;B:单个永磁体参数

图 2 静磁场装置示意图

Fig.2 Schematic diagram of static magnetic field device

关节炎研究协会(OARSI)评分、钙化软骨与关节软骨总厚度的比值(CC/TAC)、软骨细胞数量、空泡细胞数量以及 TRAP 染色阳性细胞长度占骨小梁长度的百分比(Oc.S/BS)等数据。

**1.3.3 免疫组织化学染色** 使用石蜡包埋的小鼠膝关节标本(每组  $n=6$ ),石蜡切片经过脱蜡和水化后加入适量内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min。然后将切片与抗 TRPV4 的一抗(稀释比 1:200)在 4℃下孵育过夜,滴加适量反应增强液,室温孵育 20 min 后滴加适量强酶标山羊抗兔 IgG 聚合物,室温孵育 20 min。最后滴加适量的配置新鲜 DAB 液(浓缩 DAB 液 50 mL+DAB 底物液 1 mL),室温孵育 2~10 min,出现明显棕色即可。在正置显微镜下观察、拍照并测量软骨阳性染色细胞与总细胞的比例和软骨下骨阳性细胞表面占总骨小梁表面的比例。

### 1.4 细胞学实验

**1.4.1 细胞分离培养** 小鼠安乐死后,将其用灭菌 1×PBS 溶液清洗后浸于含有 2%FBS 的 MEM- $\alpha$  溶液中。使用灭菌的剪刀剪开髌骨、股骨、胫骨的两端。暴露骨髓腔,采用 5 mL 含有 2%FBS 的 MEM- $\alpha$  溶液的注射器冲取骨髓,使用含有 2 mL Ficoll 无菌离心管过筛细胞,室温下离心。离心后,弃上清液,进行细胞计数,再次离心,获得骨髓来源细胞。

**1.4.2 破骨细胞形成实验** 将分离出的骨髓单个核细胞均匀混悬于 MEM- $\alpha$  培养液,种入 96 孔板中,密度为  $1 \times 10^5$ /孔,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 3 d。培养液中含有 10%FBS、30  $\mu\text{g/L}$  小鼠巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和 20  $\mu\text{g/L}$  小鼠核因子 kappa-B 配体的受体激活因子(RANKL)。在第 4 天,更换为含有 10%FBS、30  $\mu\text{g/L}$  M-CSF 和 100  $\mu\text{g/L}$

RANKL 的 MEM- $\alpha$  培养基。为验证 TRPV4 的作用设置了骨关节炎+TRPV4 抑制剂组(OA+GSK219组),对骨关节炎小鼠骨髓来源的细胞全程使用 GSK219 (浓度 30 nmol/L)抑制 TRPV4。第 6 天按照 TRAP 染色试剂盒说明书进行 TRAP 染色。显微镜下观察、拍片,每孔随机选取 5 个 200 倍视野,测量胞核>3 个的融合破骨细胞的面积,计算单位面积内融合破骨细胞所覆盖的区域百分比[Oc.Ar(%)]。

1.4.3 条件培养基制备 按上述步骤获得成熟破骨细胞,将培养基更换为含 10%FBS 的 MEM- $\alpha$ ,24 h 后,收集上层培养基,1 000 r/min 离心 10 min 后收获上清液为条件培养基(CM),-80℃保存备用。

1.4.4 破骨细胞迁移实验 使用 transwell 实验评估破骨细胞的迁移能力。诱导骨髓来源的单个核细胞形成前破骨细胞,培养液为含 10% FBS 和 30  $\mu$ g/L M-CSF 的 MEM- $\alpha$  培养基,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 d。迁移实验采用 transwell 小室进行检测。在 transwell 小室外加入含 10% FBS 和 30 ng/mL M-CSF 的 MEM- $\alpha$  培养基,诱导小室内无营养条件的前破骨细胞迁移至小室外。将前破骨细胞种入 transwell 小室内,密度为 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h。OA+GSK219 组使用 GSK219(浓度 30 nmol/L)抑制 TRPV4。常温下 0.5%结晶紫染液染色 30 min,显微镜下观察、拍片,每孔随机选取 5 个 200 倍视野,计数视野内迁移的前破骨细胞的数量(Migrated cells/FV),代表破骨细胞的迁移能力。

1.4.5 破骨细胞黏附实验 为了测定破骨细胞的黏附性,将骨髓来源的单个核细胞诱导形成前破骨细胞,方法同上。将前破骨细胞种入 1%明胶包被好的 96 孔板中,密度为 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔,培养液为含 10% FBS 和 30  $\mu$ g/L M-CSF 的 MEM- $\alpha$  培养基,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 1 h。OA+GSK219 组使用 GSK219 (浓度 30 nmol/L)抑制 TRPV4。用无水甲醇在室温下固定 15 min,使用 0.5%结晶紫染液染色,显微镜下观察、拍片,每孔随机选取 5 个 200 倍视野,计数

视野内黏附的前破骨细胞的数量 (Adherent cells/FV),代表破骨细胞的黏附能力。

1.4.6 ATDC5 细胞培养实验 ATDC5 细胞系以 2  $\times$  10<sup>6</sup> 个/孔的 DMEM 培养,添加 5% FBS、1%青霉素和链霉素,并使用 1% ITS 诱导 7 d。软骨诱导条件培养基由破骨细胞上清提取的条件培养基和 1% ITS 培养基按 1:1 的比例组成。然后,将培养基替换为软骨诱导条件培养基,再培养 7 d,促进细胞分化为软骨细胞。细胞在 10%的缓冲福尔马林中固定 30 min,室温下用 PBS 洗涤,用 1%的阿利新蓝染液 (pH 1.0)孵育至少 2 h,计数蓝染细胞。

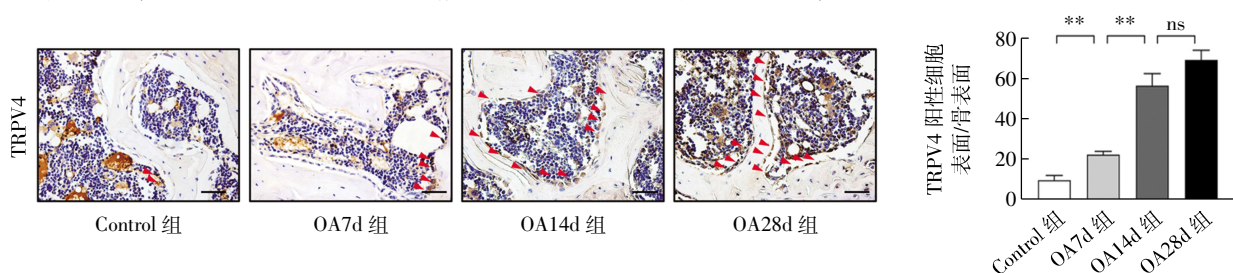
1.5 ELISA 实验 首先进行样本制备,小鼠眼眶采血 0.5 mL 置于冰上,在 4℃下以 3 000 r/min 离心 10 min,取血清 200  $\mu$ L,置于-80℃冰箱保存。血清和条件培养基解冻融化后按照相应试剂盒的操作说明在各组样本中加入 TNF- $\alpha$  抗体和显色试剂。在 450 nm 波长下测定各样本的吸光度值,最后根据预先设置的标准曲线,计算 TNF- $\alpha$  浓度。

1.6 统计学处理 使用 IBM SPSS Statistics 25 统计软件进行数据分析,并采用 Graphpad Prism7 软件进行统计图制作。符合正态分布的计量数据采用  $\bar{x}\pm s$  表示。ANOVA 用于多组间的比较,使用 Fisher 保护最小显著差异(LSD)法进行事后多重比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TRPV4 在骨关节炎小鼠软骨下骨中的表面呈时间依赖性增加 与 Sham 组相比,在 OA 组早期(造模 7、14 d),软骨下骨小梁 TRPV4 阳性表面呈时间依赖性增加( $t=4.462、5.514$ ,均  $P<0.01$ ,图 3);然而造模 14、28 d 的小鼠软骨下骨小梁 TRPV4 阳性表面无显著差异。

2.2 静磁场减轻骨关节炎小鼠的软骨下骨吸收 与 Sham 组相比,OA 组的 B.Ar/T.Ar 降低( $t=4.342$ , $P<0.001$ ,图 4);然而,静磁场治疗使 B.Ar/T.Ar 显著增加( $t=4.318$ , $P<0.01$ )。此外,与 Sham 组相比,OA

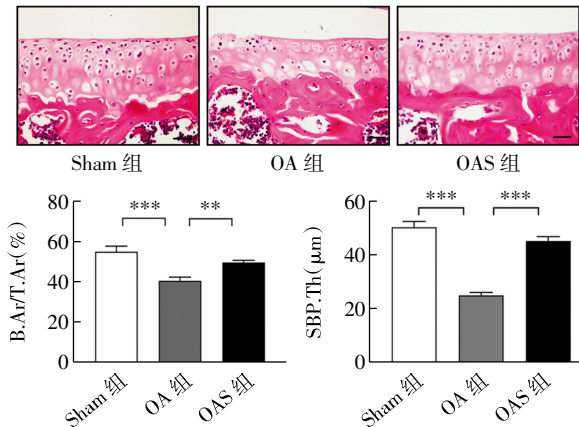


注:ns:无显著差异,\*\* $P<0.01$ ; Control 组:对照组;OA7 d、OA14 d、OA28 d 组:分别为造模 7 d、14 d、28 d 的小鼠;TRPV4:瞬时受体电位香草蛋白 4

图 3 免疫组化检测软骨下骨 TRPV4 表达(400 $\times$ , Bar=50  $\mu$ m)

Fig.3 The expression of TRPV4 in subchondral bone was detected by immunohistochemistry (400 $\times$ , Bar=50  $\mu$ m)

组 SBP.Th 明显变薄( $t=10.58, P<0.001$ , 图 4);OAS 组的 SBP.Th 显著增加( $t=10.42, P<0.001$ )。



注: \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; Sham 组: 假手术组; OA 组: 骨关节炎组; OAS 组: 骨关节炎联合静磁场治疗组; B.Ar/T.Ar: 骨小梁面积与总组织面积之比; SBP.Th: 软骨下骨板厚度

图 4 软骨下骨 HE 染色形态学检查 (400×, Bar=50 μm)

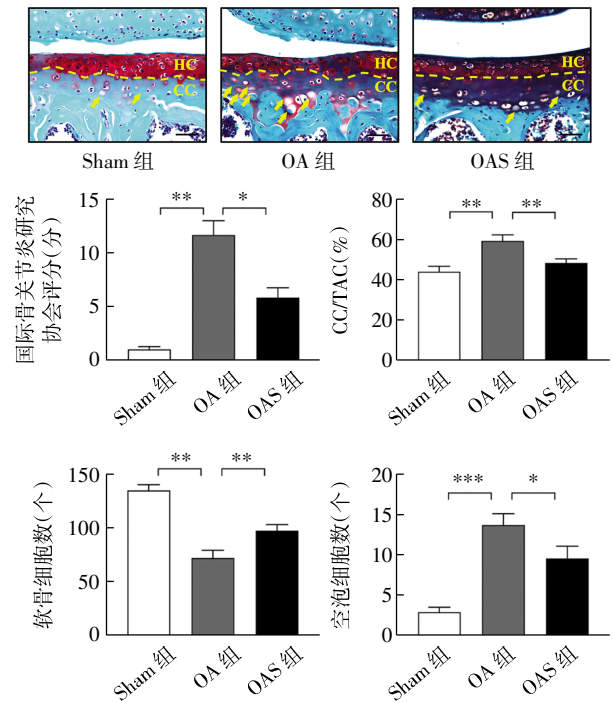
Fig.4 Morphological examination of subchondral bone by HE staining (400×, Bar=50 μm)

2.3 静磁场减轻骨关节炎小鼠的软骨退变 与 Sham 组相比, OA 组关节软骨 OARSI 评分升高( $t=7.854, P<0.01$ , 图 5); 但静磁场治疗后软骨退化程度降低, OARSI 评分明显降低( $t=3.614, P<0.05$ )。OA 组钙化软骨(CC)厚度增加, 钙化软骨与关节软骨总厚度之比(CC/TAC)增高( $t=3.850, P<0.01$ , 图 5); 与 OA 组相比, OAS 组 CC/TAC 降低( $t=3.024, P<0.01$ )。与 Sham 组相比, OA 组软骨细胞数量明显减少( $t=6.994, P<0.01$ , 图 5); 然而, OAS 组软骨细胞计数增加( $t=2.774, P<0.01$ )。此外, 与 Sham 组相比, OA 组空泡细胞数量显著增加( $t=7.084, P<0.001$ , 图 5); 与 OA 组相比, OAS 组的空泡细胞数量减少( $t=2.011, P<0.05$ )。

2.4 静磁场通过 TRPV4 抑制破骨细胞的生物学行为 Sham 组软骨下骨小梁表面 TRAP<sup>+</sup>破骨细胞稀少, OA 组 Oc.S/BS 明显增加( $t=7.963, P<0.001$ , 图 6); 与 OA 组相比, OAS 组 Oc.S/BS 显著降低( $t=4.322, P<0.001$ )。

OA 组软骨下骨 TRPV4 阳性表面明显高于 Sham 组( $t=9.155, P<0.001$ , 图 7); 然而, 静磁场降低了这一趋势( $t=4.780, P<0.001$ )。

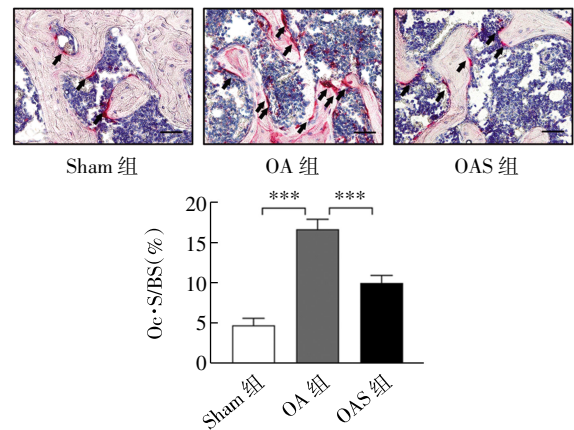
破骨细胞 TRAP 染色结果显示, 与 Sham 组相比, OA 组融合破骨细胞占据的面积比例(Oc.Ar%)明显增加( $t=44.94, P<0.001$ , 图 8); 静磁场治疗后, OAS 组 Oc.Ar%明显减少( $t=26.35, P<0.001$ ); 使用 TRPV4 抑制剂 GSK219 阻断 TRPV4 后, OA+GSK219 组的 Oc.Ar%相较于 OA 组减少( $t=19.00, P<0.001$ )。抑制



注: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; Sham 组: 假手术组; OA 组: 骨关节炎组; OAS 组: 骨关节炎联合静磁场治疗组; HC: 透明软骨; CC: 钙化软骨; 黄色虚线: 潮标; CC/TAC: 钙化软骨与关节软骨总厚度之比

图 5 软骨番红 O 染色形态学检查 (400×, Bar=50 μm)

Fig.5 Morphological examination of cartilage by Safranin O staining (400×, Bar=50 μm)

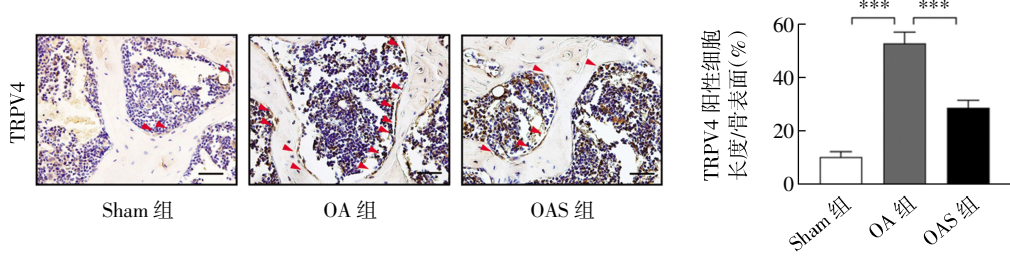


注: \*\*\* $P<0.001$ ; Sham 组: 假手术组; OA 组: 骨关节炎组; OAS 组: 骨关节炎联合静磁场治疗组; Oc.S/BS: TRAP 染色阳性细胞长度占骨小梁长度的百分比

图 6 TRAP 染色检测软骨下骨破骨细胞活性 (400×, Bar=50 μm)  
Fig.6 The activity of osteoclasts in subchondral bone was detected by TRAP staining (400×, Bar=50 μm)

TRPV4 可减少破骨细胞形成, 这与静磁场的作用效果相似。迁移(图 9)和黏附(图 10)的趋势与破骨细胞形成的结果一致。

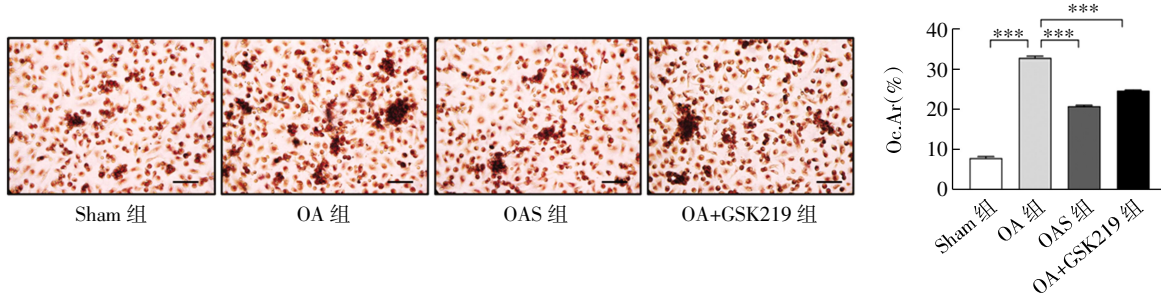
2.5 静磁场通过抑制破骨细胞的分泌活性减轻软骨退化 血清检测结果显示, 与 Sham 组相比, OA 组血清 TNF-α 水平升高( $t=11.40, P<0.001$ , 图 11),



注: \*\*\* $P < 0.001$ ; Sham 组:假手术组;OA 组:骨关节炎组;OAS 组:骨关节炎联合静磁场治疗组;TRPV4:瞬时受体电位香草蛋白 4

图 7 免疫组化检测软骨下骨 TRPV4 表达(400 $\times$ , Bar=50  $\mu\text{m}$ )

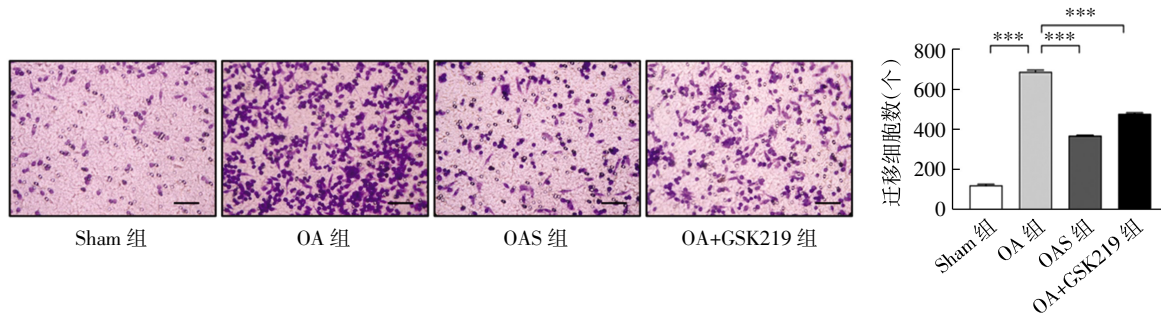
Fig.7 The expression of TRPV4 in subchondral bone was detected by immunohistochemistry (400 $\times$ , Bar=50  $\mu\text{m}$ )



注: \*\*\* $P < 0.001$ ; Sham 组:假手术组;OA 组:骨关节炎组;OAS 组:骨关节炎联合静磁场治疗组;OA+GSK219 组:骨关节炎+TRPV4 抑制剂组;Oc.Ar(%):单位面积内融合破骨细胞所覆盖的区域百分比

图 8 TRAP 染色检测破骨细胞的形成(400 $\times$ , Bar=50  $\mu\text{m}$ )

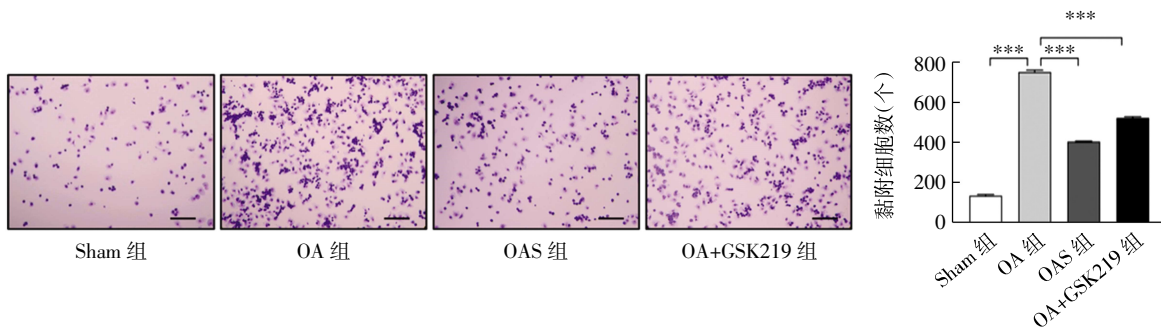
Fig.8 Osteoclast formation was detected by TRAP staining (400 $\times$ , Bar=50  $\mu\text{m}$ )



注: \*\*\* $P < 0.001$ ; Sham 组:假手术组;OA 组:骨关节炎组;OAS 组:骨关节炎联合静磁场治疗组;OA+GSK219 组:骨关节炎+TRPV4 抑制剂组

图 9 结晶紫染色检测破骨细胞的迁移(400 $\times$ , Bar=50  $\mu\text{m}$ )

Fig.9 Osteoclast migration was detected by crystal violet staining (400 $\times$ , Bar=50  $\mu\text{m}$ )



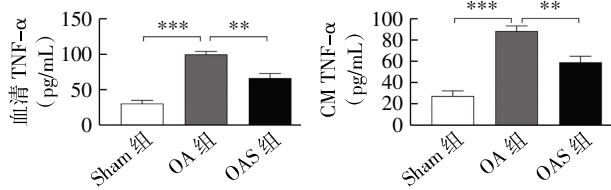
注: \*\*\* $P < 0.001$ ; Sham 组:假手术组;OA 组:骨关节炎组;OAS 组:骨关节炎联合静磁场治疗组;OA+GSK219 组:骨关节炎+TRPV4 抑制剂组

图 10 结晶紫染色检测破骨细胞的黏附(400 $\times$ , Bar=50  $\mu\text{m}$ )

Fig.10 Osteoclast adhesion was detected by crystal violet staining (400 $\times$ , Bar=50  $\mu\text{m}$ )

OAS 组水平降低( $t=4.358, P < 0.01$ )。破骨细胞条件培养基的检测结果显示,与 Sham 组相比,OA 组条件培养基 TNF- $\alpha$  水平升高 ( $t=8.907, P < 0.001$ ,图 11),OAS 组水平降低( $t=3.935, P < 0.01$ )。

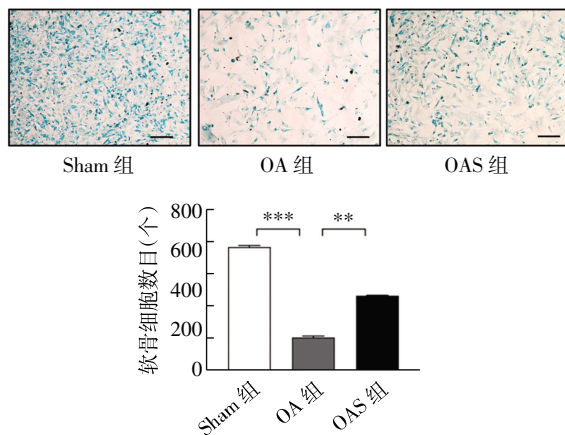
阿利新蓝染色检测结果显示,与 Sham 组相比,OA 组软骨细胞数量明显减少( $t=44.14, P < 0.001$ ,图 12);而 OAS 组软骨细胞数量明显增加( $t=28.52, P < 0.001$ )。



注: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Sham组:假手术组;OA组:骨关节炎组;OAS组:骨关节炎联合静磁场治疗组;TNF- $\alpha$ :肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;CM:条件培养基

图11 ELISA检测TNF- $\alpha$ 水平

Fig.11 The level of TNF- $\alpha$  was detected by ELISA



注: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Sham组:假手术组;OA组:骨关节炎组;OAS组:骨关节炎联合静磁场治疗组

图12 阿利新蓝染色检测软骨细胞分化(400 $\times$ , Bar=50  $\mu$ m)

Fig.12 Chondrocyte differentiation was detected by Alcian blue staining (400 $\times$ , Bar=50  $\mu$ m)

### 3 讨论

随着人口老龄化加剧和肥胖人群比例的增多,骨关节炎的发病率不断升高,65岁以上的发病率高达80%<sup>[11]</sup>。临床治疗主要采用药物治疗以缓解疼痛和改善基本功能<sup>[12]</sup>。然而,当疾病进展到终末期时,往往需要进行关节置换手术<sup>[13]</sup>,这一手术风险大,费用高,并且伴随术后疼痛加重、假体周围骨折、假体关节感染等并发症<sup>[14-16]</sup>。因此,早期干预和治疗对于延缓骨关节炎进展和改善长期预后至关重要。

TRPV4是一种机械敏感性离子通道,在骨关节炎软骨细胞的表达显著上调,是骨关节炎潜在的调节靶点,其表达水平与软骨退变和凋亡的严重程度相关<sup>[17]</sup>。本研究发现,TRPV4在早期骨关节炎小鼠软骨下骨中的表达呈时间依赖性增加,但晚期不显著,提示软骨下骨的TRPV4参与了早期骨关节炎的进展。本研究结果还表明,静磁场治疗增加了骨小梁面积和软骨下骨板厚度,抑制了骨质流失。此外,静磁场治疗改善了骨关节炎小鼠的OARSI评分,并减少了钙化软骨的比例,说明静磁场治疗能够改善骨关节炎诱导的软骨下骨吸收和软骨损害。该结果与

之前报道的静磁场对骨关节炎的有益作用一致<sup>[5]</sup>。进一步探索静磁场发挥作用的机制发现其降低了软骨下骨的TRPV4阳性染色表面。据报道,关节内注射TRPV4抑制剂可以改善骨关节炎大鼠的关节功能和疼痛<sup>[18]</sup>。也有研究显示,关节内注射外泌体通过调节TRPV4,改善骨关节炎软骨下骨重塑<sup>[10]</sup>。

在骨关节炎的早期阶段,破骨细胞介导的骨吸收增强,导致软骨下骨中小梁骨丢失,由于关节组织的相互依赖性,软骨下骨形态和结构变化破坏了关节软骨结构完整性和功能平衡,加速了骨关节炎的进展<sup>[19]</sup>。先前的研究表明,抑制破骨细胞的活性可有效改善骨关节炎软骨下骨微结构和软骨损伤<sup>[20]</sup>。本研究发现,在体内实验中,静磁场抑制了骨小梁表面破骨细胞的活性;在体外实验中,静磁场抑制了破骨细胞的形成、迁移和黏附。静磁场对软骨下骨微结构的改善是通过抑制破骨细胞的生物学实现的。而使用GSK219抑制破骨细胞中的TRPV4可抑制破骨细胞形成、迁移和黏附作用,证明TRPV4可以调节破骨细胞的生物学行为,TRPV4抑制剂与静磁场的效果相似。因此,笔者提出静磁场的治疗作用与抑制TRPV4介导的破骨细胞生物学行为密切相关。据报道,3、15和50 mT的静磁场抑制小鼠骨髓来源细胞的破骨细胞形成,其中15 mT的效果最大<sup>[8]</sup>。在另一项研究中,500 nT和200 mT的静磁场促进Raw264.7的破骨细胞分化和骨吸收,上调破骨细胞相关基因,而16 T则表现出抑制作用<sup>[21]</sup>。本研究表明,200 mT的静磁场抑制RANKL诱导的多核破骨细胞生成和TRAP活性。推测这些研究结果的差异可能是由于磁场方向或细胞来源的差异所致。

软骨下骨和软骨相互作用的一个关键途径是破骨细胞和软骨细胞之间的相互作用。软骨细胞可以通过白细胞介素-1 $\beta$ 、白细胞介素-6、TNF- $\alpha$ 等细胞因子调节破骨细胞活性<sup>[22]</sup>。相反,破骨细胞分泌的某些物质可影响软骨细胞代谢和功能<sup>[23-24]</sup>。据报道,来自破骨细胞和软骨细胞的介质可能会通过微裂纹或侵入性血管扩散和运输<sup>[25]</sup>,进而实现破骨细胞和软骨细胞的相互作用。据报道体外共培养骨关节炎破骨细胞和软骨细胞,可引起软骨细胞增殖抑制以及软骨退化标志物表达增加<sup>[26]</sup>。本研究以条件培养基的方式建立了共培养系统,证实了静磁场通过减少破骨细胞分泌的TNF- $\alpha$ 改善软骨细胞分化。本研究为骨关节炎软骨下骨病理变化影响软骨退变提供了证据。

综上所述,TRPV4对早期骨关节炎有重要的调节作用并可作为关键的治疗靶点。此外,本研究初

步证明静磁场作为一种穿透性强、不易衰减的无创物理治疗模式,可以通过抑制 TRPV4 介导的破骨细胞生物学行为来减轻骨吸收和软骨退变,达到治疗骨关节炎的目的。本研究证实 TRPV4 为力学刺激模式下的新靶点,为静磁场治疗骨关节炎的临床转化提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2019, 393(10182):1745-1759.
- [2] PANG C, WEN L, QIN H, et al. Sotrastaurin, a PKC inhibitor, attenuates RANKL-induced bone resorption and attenuates osteochondral pathologies associated with the development of OA[J]. *Cell Mol Med*, 2020, 24(15):8452-8465.
- [3] LI H, HONG S, QIAN J, et al. Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells[J]. *Blood*, 2010, 116(2):210-217.
- [4] WANG S, LIU Y, LOU C, et al. Moderate static magnetic field promotes fracture healing and regulates iron metabolism in mice[J]. *Bio-med Eng Online*, 2023, 22(1):107.
- [5] YANG J, FENG Y, LI Q, et al. Evidence of the static magnetic field effects on bone-related diseases and bone cells[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2023, 177:168-180.
- [6] KIM E C, PARK J, NOH G, et al. Effects of moderate intensity static magnetic fields on osteoclast differentiation in mouse bone marrow cells[J]. *Bioelectromagnetics*, 2018, 39(5):394-404.
- [7] SUN Y, FANG Y, LI X, et al. A static magnetic field enhances the repair of osteoarthritic cartilage by promoting the migration of stem cells and chondrogenesis[J]. *Orthop Translat*, 2023, 39:43-54.
- [8] KIM E C, PARK J, NOH G, et al. Effects of moderate intensity static magnetic fields on osteoclastic differentiation in mouse bone marrow cells[J]. *Bioelectromagnetics*, 2018, 39(5):394-404.
- [9] KHATIB N S, MONSEN J, AHMED S, et al. Mechanoregulatory role of TRPV4 in prenatal skeletal development[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(4):eade2155.
- [10] FU Y, CUI S, ZHOU Y, et al. Dental pulp stem cell-derived exosomes alleviate mice knee osteoarthritis by inhibiting TRPV4-mediated osteoclast activation[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5):4926.
- [11] QUICKE J G, CONAGHAN P G, CORP N, et al. Osteoarthritis year in review 2021: epidemiology & therapy[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(2):196-206.
- [12] KOLASINSKI S L, NEOGIT, HOCHBERG M C, et al. 2019 American college of rheumatology/arthritis foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(2):220-233.
- [13] JANG S, LEE K, JU J H. Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5):2619.
- [14] TEIMOURI M, MOTIFIFARD M, LALEHZAR S S, et al. Persistent pain following total knee arthroplasty: the role of underlying diseases[J]. *J Res Med Sci*, 2023, 28:57.
- [15] LOMBARDO D J, SILJANDER M P, SOBH A, et al. Periprosthetic fractures about total knee arthroplasty[J]. *Musculoskelet Surg*, 2020, 104(2):135-143.
- [16] THEIL C, BOCKHOLT S, GOSHEGER G, et al. Surgical management of periprosthetic joint infections in hip and knee Megaprotheses[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2024, 60(4):583.
- [17] XU B, XING R, HUANG Z, et al. Excessive mechanical stress induces chondrocyte apoptosis through TRPV4 in an anterior cruciate ligament-transected rat osteoarthritis model[J]. *Life Sci*, 2019, 228:158-166.
- [18] HINATA M, IMAI S, SANAKI T, et al. Sensitization of transient receptor potential vanilloid 4 and increasing its endogenous ligand 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in rats with monoiodoacetate-induced osteoarthritis[J]. *Pain*, 2018, 159:939-947.
- [19] DING D, WANG L, YAN J, et al. Zoledronic acid generates a spatiotemporal effect to attenuate osteoarthritis by inhibiting potential Wnt5a-associated abnormal subchondral bone resorption[J]. *PLoS One*, 2022, 17(7):e0271485.
- [20] LI X, YANG J, LIU D, et al. Knee loading inhibits osteoclast lineage in a mouse model of osteoarthritis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:24668.
- [21] ZHANG J, MENG X, DING C, et al. Regulation of osteoclast differentiation by static magnetic fields[J]. *Electromagn Biol Med*, 2017, 36(1):8-19.
- [22] RAMADAN D E, HARIYANI N, INDRAWATI R, et al. Cytokines and chemokines in periodontitis[J]. *Eur J Dent*, 2020, 14(3):483-495.
- [23] DAI J, DONG R, HAN X, et al. Osteoclast-derived exosomal let-7a-5p targets Smad2 to promote the hypertrophic differentiation of chondrocytes[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(1):C21-C33.
- [24] DAI J, HU Z, ZENG F, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-212-3p suppressed the anabolism and accelerated the catabolism of chondrocytes in osteoarthritis by targeting TGF- $\beta$ 1/Smad2 signaling[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 751:109827.
- [25] HU W, CHEN Y, DOU C, et al. Microenvironment in subchondral bone: predominant regulator for the treatment of osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80(4):413-422.
- [26] ZHANG R, LI G, ZENG C, et al. Mechanical stress contributes to osteoarthritis development through the activation of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1)[J]. *Bone Joint Res*, 2018, 7(11):587-594.

(2025-03-07 收稿)