

·基础研究·

牛磺熊去氧胆酸通过诱导巨噬细胞M2极化上调IL-1 β 分泌抑制神经源性异位骨化

陈杰文¹, 赖宏熙², 邓毅龙², 陈天俊¹, 黄顺颖¹, 叶 锋¹, 赵兵德¹, 陈树东¹

(1. 广东省中医院骨伤科专科医院//广州中医药大学, 广东 广州 510120; 2. 中山大学附属第一医院脊柱外科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)对脊髓损伤后神经源性异位骨化(NHO)的抑制作用及其可能机制。【方法】选用SPF级雄性C57BL/6小鼠建立NHO模型,小鼠随机分为3组:假手术组(仅椎板切除术)、NHO模型组(脊髓损伤+心脏毒素肌肉注射)和TUDCA治疗组(NHO模型基础上每日灌胃TUDCA 200 mg/kg,连续4周)。通过小动物CT(micro-CT)、H&E染色定量评估异位骨化面积及成熟度;采用流式细胞术定量M2巨噬细胞白细胞介素(IL)-1 β 分泌水平。体外培养RAW264.7巨噬细胞,分为对照组、TNF α 组和TNF α +TUDCA组(TUDCA 200 μ mol/L),检测其极化标志物CD206表达水平;分为对照组、TUDCA 200 μ mol/L组和TUDCA 400 μ mol/L组,检测巨噬细胞IL-1 β 的分泌水平。【结果】与NHO组对比,TUDCA治疗组小鼠的骨量显著减少(12.69 ± 1.13 vs. 7.647 ± 1.19 , $P=0.003$);与TNF α 组相比,qPCR结果显示TNF α +TUDCA组M2巨噬细胞标志物CD206的表达显著上调(0.55 ± 0.019 , 1.11 ± 0.023 , $P<0.001$);与对照组相比,ELISA结果显示TUDCA刺激巨噬细胞可显著上调IL-1 β 的分泌水平(404.7 ± 24.38 vs. 652.8 ± 32.61 , $P=0.003$);TUDCA喂养可上调肌肉局部巨噬细胞分泌IL-1 β 并抑制异位骨化形成。【结论】TUDCA可能通过诱导M2巨噬细胞极化并上调IL-1 β 分泌参与抑制NHO形成,从而减轻脊髓损伤后神经源性异位骨化的发生发展,为拓展TUDCA在脊髓损伤并发症治疗中的应用提供了实验依据。

关键词:神经源性异位骨化;脊髓损伤;牛磺熊去氧胆酸;M2型巨噬细胞;白细胞介素-1 β

中图分类号:R681.5

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2026)04-0690-09

DOI: 10.11714/jssu.med.YX20260063

Tauroursodeoxycholic Acid Inhibits Neurogenic Heterotopic Ossification by Inducing Macrophage M2 Polarization and Upregulating IL-1 β Secretion

CHEN Jiewen¹, LAI Hongxi², DENG Yilong², CHEN Tianjun¹, HUANG Shunying¹,YE Feng¹, ZHAO Bingde¹, CHEN Shudong¹

(1. Orthopedic Hospital of Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Spine Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: CHEN Shudong; E-mail: chenshudong_med@163.com

Abstract:【Objective】To investigate the inhibitory effect of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) on neurogenic heterotopic ossification (NHO) after spinal cord injury and its potential mechanism.【Methods】SPF-grade male C57BL/6 mice were used to establish an NHO model. The mice were randomly divided into three groups: sham operation group (laminectomy only), NHO model group (spinal cord injury + intramuscular injection of cardiotoxin), and TUDCA

收稿日期:2026-04-28

录用日期:2026-07-08

基金项目:广东省中医院自然培育项目(YN2025GZR22)

作者简介:陈杰文,第一作者,住院医师,研究方向:脊髓损伤和异位骨化,E-mail: chenjw8849@163.com;陈树东,通信作者,主任医师,E-mail: chenshudong_med@163.com

treatment group (NHO model + daily intragastric administration of TUDCA at 200 mg/kg for 4 consecutive weeks). The area and maturity of heterotopic ossification were quantitatively assessed by micro-computed tomography (micro-CT) and hematoxylin-eosin (H&E) staining. Flow cytometry was used to quantify the interleukin (IL)-1 β secretion level of M2 macrophages. RAW264.7 macrophages were cultured *in vitro* and divided into control, tumor necrosis factor (TNF) α , and TNF α + TUDCA (200 μ mol/L) groups to detect the expression level of the polarization marker CD206. Additionally, macrophages were divided into control, TUDCA 200 μ mol/L, and TUDCA 400 μ mol/L groups to assess the IL-1 β secretion level.【Results】Compared with the NHO group, the bone volume in the TUDCA-treated group was significantly reduced (12.69 ± 1.13 vs. 7.647 ± 1.19 , $P=0.003$). Compared with the TNF α group, qPCR results showed that the expression of the M2 macrophage marker CD206 was significantly upregulated in the TNF α + TUDCA group (0.55 ± 0.019 , 1.11 ± 0.023 , $P<0.001$). Compared with the control group, ELISA results showed that TUDCA stimulation of macrophages significantly upregulated IL-1 β secretion (404.7 ± 24.38 vs. 652.8 ± 32.61 , $P=0.003$). TUDCA administration upregulated IL-1 β secretion by local muscle macrophages and inhibited heterotopic ossification formation.【Conclusions】TUDCA might participate in inhibiting NHO formation by inducing M2 macrophage polarization and upregulating IL-1 β secretion, thereby alleviating the development and progression of neurogenic heterotopic ossification after spinal cord injury. This finding provides experimental evidence for expanding the application of TUDCA in the treatment of complications following spinal cord injury.

Key words: neurogenic heterotopic ossification; spinal cord injury; tauroursodeoxycholic acid; M2 macrophage; interleukin-1 β

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2026, 47(4): 690-698]

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重的中枢神经系统创伤,常导致永久性神经功能缺损,并伴随多种继发性并发症^[1-2]。其中,神经源性异位骨化(neurogenic heterotopic ossification, NHO)是SCI后常见的致残性并发症,表现为关节周围软组织中异常形成成熟骨组织,严重影响患者康复与生活质量^[3]。目前针对NHO的防治手段有限,亟需探索新的干预策略。牛磺熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)是一种内源性亲水性胆汁酸,在肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病模型中均显示出保护作用^[4]。研究表明,TUDCA还可通过靶向STING蛋白抑制STING/NF- κ B/NLRP3通路驱动的神元焦亡,为创伤性脑损伤和神经炎症相关疾病提供了新的治疗靶点^[5]。我们的研究表明,在SCI动物模型中,TUDCA可减轻局部炎症浸润,促进轴突再生和髓鞘修复,改善运动功能恢复^[6]。此外,TUDCA还被发现能够调控巨噬细胞极化,诱导M2型抗炎表型,从而重塑脊髓微环境^[7]。值得注意的是,TUDCA对骨代谢也具有调控潜力,已有研究显示其可影响间充质干细胞的成骨分化,提示TUDCA可能参与骨形成相关病理过程^[8]。白细胞介素-1 β (interleukin, IL-1 β)是一种典型的多功能促炎细胞

因子,生理或低浓度条件下,IL-1 β 可短暂促进成骨前体细胞增殖及成骨相关基因表达^[9];但在慢性炎症或高浓度条件下,IL-1 β 则通过抑制成骨转录因子Runx2和Osx、降低碱性磷酸酶活性,同时诱导RANKL表达促进破骨细胞生成,从而抑制成骨并加剧骨破坏^[10]。M2型巨噬细胞通常被视为组织修复的促进者,但其在异位骨化背景下的作用存在争议:部分研究显示M2巨噬细胞通过分泌TGF- β 1等因子促进异位骨形成,而另一些研究则提示M2来源的IL-1 β 可能抑制成骨分化^[11-12]。基于上述背景,本研究利用小鼠神经源性异位骨化模型,探讨TUDCA对NHO的抑制作用,并初步阐明其可能机制——TUDCA诱导M2巨噬细胞极化并上调IL-1 β 分泌,进而抑制异位骨形成。本研究旨在拓展TUDCA在脊髓损伤并发症治疗中的应用前景,为NHO的防治提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与伦理

SPF级雄性C57BL/6小鼠,3~5周龄,体质量15~25 g,购自中山大学实验动物中心(许可证号:SCXK(粤)2022-0002)。所有动物均饲养于恒温

(22±2)℃、恒湿(50%±10%)、12 h 光/暗循环环境中,自由饮水摄食。所有动物实验方案经广州中医药大学动物伦理委员会审核批准(批准号:20230407006),并严格按照美国国立卫生研究院《实验动物护理与使用指南》及中国《实验动物管理条例》执行。

1.2 NHO 模型的建立

按照前述方法^[13],在全身麻醉下,于小鼠 T11 与 T13 之间行脊髓横断术,并在腓绳肌内注射从非洲射毒眼镜蛇(*Naja pallida*)毒液中纯化的心脏毒素(Cardiotoxin, CDTX, 剂量 0.32 mg/kg),从而构建 NHO 小鼠模型。假手术组(Sham):仅行椎板切除手术,不损伤脊髓,每日灌胃等体积生理盐水,连续给药 4 周。模型对照组(NHO):行 SCI+CDTX 处理,每日灌胃等体积生理盐水。NHO+TUDCA 组:行 SCI+CDTX 处理,每日灌胃 TUDCA(200 mg/kg,溶于生理盐水, Sigma-Aldrich, T0266),连续给药 4 周。

1.3 细胞培养与处理

RAW264.7 细胞系:购自美国 ATCC。培养于 DMEM 高糖培养基(Gibco),添加 10%(v/v)胎牛血清(FBS, Gibco)和 1% (v/v)青霉素/链霉素(终浓度:青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μg/mL, Gibco),于 37℃、体积分数 5% CO₂培养箱中传代培养。

1.4 HE 染色及番红 O-固绿(SOFG)染色

组织样本首先用 40 g/L 多聚甲醛(PFA)固定 24 h,然后在 14% EDTA 中脱钙 4 d。每 24 h 更换一次溶液,依次使用 100 g/L、200 g/L 和 300 g/L 的蔗糖/PBS 溶液。将组织包埋于最适切割温度复合物(OCT)中,在液氮冷却的异戊烷中冷冻,并于-80℃保存。使用 Leica CM1950 冷冻切片机将组织样本切成 8 μm 厚的切片。为了评估组织结构并观察组织内异位骨化(HO)的形成,进行了苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染色及番红 O-固绿(safranin o and fast green staining, SOFG)染色。

1.5 免疫荧光染色

将组织切片和培养细胞用 40 g/L 多聚甲醛(PFA)固定 30 min,然后用 0.3% Triton X-100 透化处理 30 min。PBS 洗涤 3 次后,用 51.5 g/L 正常驴血清封闭 1 h。组织切片和细胞与一抗在 4℃下孵育过夜。详细抗体信息见表 1。PBS 洗涤 3 次后,加入 Alexa-Fluor 594 标记的驴抗兔、Alexa Fluor 488 标记的驴抗小鼠或 Alexa Fluor 488 标记的驴抗大鼠二抗,室温孵育 1 h。最后, PBS 洗涤 3 次,用含

4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)的 Prolong Gold 抗荧光淬灭封片剂(Molecular Probes, Invitrogen)封片。所有图像使用 Olympus BX63 显微镜(Olympus, 日本)观察。

表 1 抗体列表
Table 1 Antibodies list

Reagent or Resource	Source	Identifier
Antibodies		
OCN	Abcam	Cat# ab93876
CD206	Abcam	Cat# ab64693
IL-1β	Abcam	Cat# ab283818
CD45- APC-Cy7	Biolegend	Cat# 103116
CD11b- PE-Cy7	BioLegend	Cat# 101216
F4/80- FITC	BioLegend	Cat# 123108
CD206- PerCP-Cy5.5	BioLegend	Cat# 141716
IL-1β-FITC	eBioscience	Cat# 11-7114-82

1.6 蛋白提取及 Western blot 分析

提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μg 总蛋白上样于 100 g/L SDS-PAGE 凝胶(Asegene, 中国广州),通过电转印将分离的蛋白转移至 PVDF 膜。膜用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST(50 mmol/L Tris, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 1.1 g/L Tween 20)封闭,然后与一抗在 4℃下于含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 中孵育过夜。一抗信息见表 1。用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,然后与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温孵育 1 h,再用 TBST 洗膜 3 次。使用 ECL 试剂(Thermo Fisher Scientific)检测免疫标记。采用增强化学发光系统检测化学发光信号。

1.7 酶联免疫吸附试验(ELISA)

采用 ELISA 法检测人或小鼠肌肉组织样本中 IL-1β 的含量。按照制造商的说明书,使用 ELISA 试剂盒测定肌肉组织样本中 IL-1β 的蛋白水平。根据制造商的操作规程,使用 IL-1β ELISA 试剂盒评估上清液中的 IL-1β 浓度。收集肌肉裂解液的上清液,随后测定细胞因子产量。使用 Invitrogen 免疫吸附测定试剂盒(Invitrogen, 88-7013A-88)评估 IL-1β 水平。数据通过酶标仪(TECAN, Mount Waverley, Victoria)采集。

1.8 流式细胞术

使用骨骼肌解离试剂盒(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)和 GentleMACS 组织匀浆机(Miltenyi Biotec, Macquarie Park)从肌肉中分离出单细胞。制备单细胞悬液,并用荧光染料标记的抗体进行染色。数据在 BD LSR II 流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA)上采集,并使用 FlowJo v. 10.7.1 软件(Tree Star, Ashland, OR)进行分析。数据以活细胞门内标记细胞的百分比形式获取,每样本采集 50 000 个事件。对于流式细胞分选,细胞用特异性抗体染色,并在流式细胞分选仪(BD Bioscience)上进行分选。

1.9 小动物 CT

标本取自小鼠腓绳肌,并用 40 g/L 多聚甲醛固定。进行小动物 CT(micro-computed tomography, micro-CT)扫描时,将标本装入样品架中,使用 Scanco micro-CT40 扫描仪进行扫描,扫描参数设置为 55 kVp 和 70 μ A。标本的扫描层厚平均为 20 μ m。对于可视化处理,将分割后的数据导入 micro-CT Ray V3.0 软件(Scanco Medical)中,并重建为三维图像。通过重建的三维图像评估异位骨化形成情况,并计算异位骨体积。计算体积时,在含有骨化灶的肌肉周围勾画目标区域(ROI),通过将亨氏单位(hounsfield unit, HU)阈值设为 450 HU 来界定 HO 区域。

1.10 统计学分析

所有实验独立重复至少 3 次。数据以均值 $\pm$ 标准误(SEM)表示。使用 GraphPad Prism 9.0(GraphPad Software, USA)进行统计分析。两组比较采用双尾 Student's *t* 检验;多组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。若方差不齐,采用 Welch's ANOVA 检验。以 * P <0.05、** P <0.01、*** P <0.001 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TUDCA 具有抑制 NHO 的形成的作用

为了明确 TUDCA 是否具有抑制神经源性异位骨化形成的作用,我们构建了 NHO 小鼠模型。通过构建脊髓损伤小鼠,并在小鼠大腿肌肉局部注射心脏毒素(CDTX),成功构建了模拟神经源性异位骨化的小鼠模型,通过小鼠运动功能评分及 qPCR 检测,进一步明确了模型的稳定性(图 1A, 1B)。

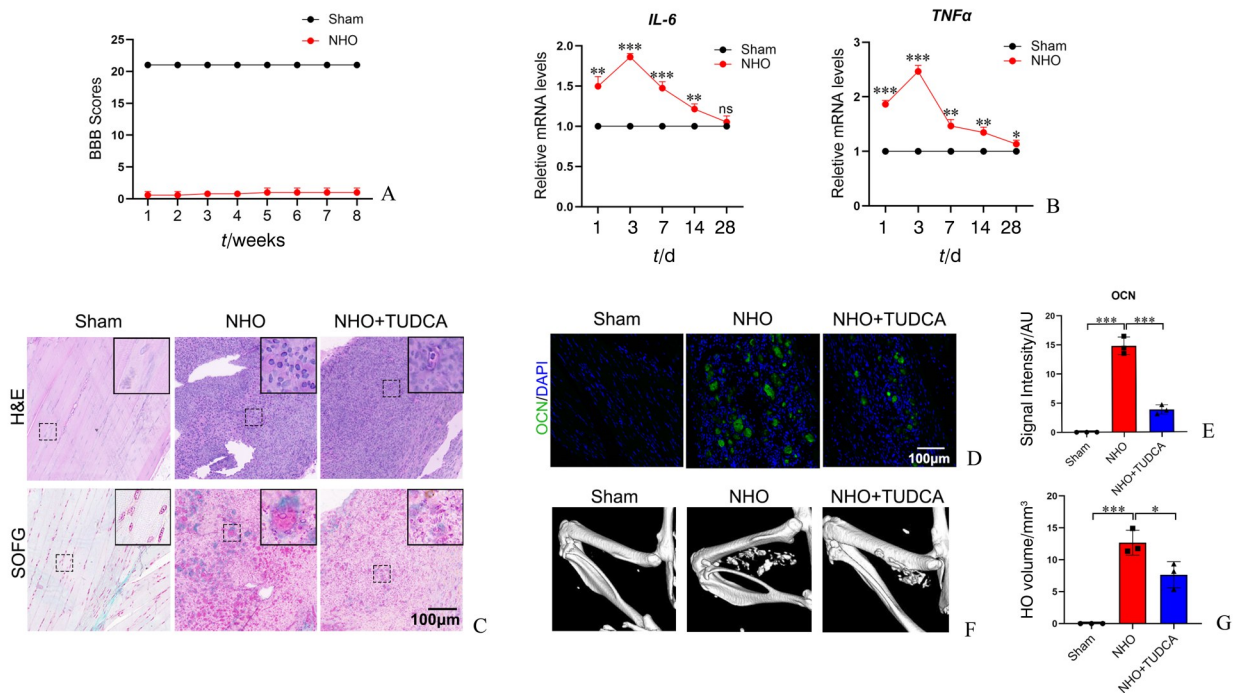
H&E 染色及番红固绿染色结果显示,持续服用 TUDCA 的小鼠大腿局部的骨化灶显著减少(图 1C)。我们进行了免疫荧光实验,*t* 检验显示 TUDCA 组小鼠局部 OCN 荧光强度(3.847 ± 0.46)较 NHO 组小鼠(14.79 ± 0.88)明显减少(图 1D, 1E), $t=11.06$, $P<0.001$,差异有统计学意义。为了更直观的比较异位骨化水平的改变,我们对小鼠小腿进行了 micro-CT 扫描实验。结果显示,TUDCA 组小鼠的大腿骨化量(7.65 ± 1.19)较 NHO 组小鼠(12.69 ± 1.13)显著减少(图 1F, G), $t=3.08$, $P<0.05$,差异有统计学意义。上述结果验证了我们的猜想,TUDCA 在具有改善脊髓损伤功能恢复的同时,也具有减少 NHO 形成的作用。

2.2 TUDCA 调控肌肉驻留巨噬细胞 M2 极化

既往我们发现 TUDCA 可以通过诱导巨噬细胞 M2 极化改善脊髓损伤的组织修复和功能恢复,而损伤后的肌肉局部常常聚集各种免疫细胞如巨噬细胞、T 细胞等,影响的肌肉组织的修复重建,是决定受损肌肉重建或是病理性骨化灶形成的关键因素。通过体外细胞模型实验,我们分为对照组、TNF α 组(诱导 M1 极化)和 TNF α +TUDCA 组进行实验,qPCR 结果显示,TNF α +TUDCA 组 CD206 的 mRNA 相对表达水平(1.11 ± 0.023)较 TNF α 组(0.55 ± 0.019)显著上调,差异具有统计学意义($t=18.79$, $P<0.001$),Western blot 及免疫荧光结果同样提示 TNF α +TUDCA 组 CD206 的表达水平(17.29 ± 1.33)较 TNF α 组(6.97 ± 0.51)显著上调,差异具有统计学意义($t=7.24$, $P<0.01$),TUDCA 可以逆转 TNF α 对巨噬细胞 M1 极化的作用,进一步证实了 TUDCA 具有诱导巨噬细胞 M2 极化的作用(图 2A-D)。上述结果表明,TUDCA 可诱导巨噬细胞 M2 表型极化,M2 极化的巨噬细胞可能是异位骨化的关键因素。

2.3 TUDCA 诱导 M2 巨噬细胞分泌 IL-1 β 调控 NHO 过程

M2 型巨噬细胞在炎症期常分泌多种细胞因子,其中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等具有抑制成骨分化的作用。为探明 TUDCA 对巨噬细胞分泌谱的影响,我们利用不同浓度(0、200、400 μ mol/L)的 TUDCA 刺激 RAW264.7 巨噬细胞,进行 qPCR、Western blot 检测并收集上清液进行 ELISA 检测。qPCR 结果显示,与对照组相比,TUDCA 可显著上调巨噬细胞 IL-1 β 的表达水平,其中 200 μ mol/L



A shows the motor function scores of mice in the Sham and NHO groups indicating the stability of the NHO model, $n=5$. B shows qPCR results indicating the expression levels of IL-6 and TNF α in the injured local muscle of mouse models in the Sham group and the NHO group, showing the stability and reliability of the NHO model, $n=5$. C shows H&E and SOFG staining indicating that decrease heterotopic ossification in TUDCA groups mice compared to NHO groups, 4 weeks of hindlimb of mice, Scale bars: 100 μ m; D, E show that decrease OCN proteins in TUDCA groups mice compared to NHO groups, 4 weeks of hindlimb of mice, Scale bars: 100 μ m, $n=3$, $t=11.06$, $P<0.001$, F, G show decreases heterotopic ossification in TUDCA groups mice compared to NHO groups, $n=3$, $t=3.08$, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

图1 TUDCA组小鼠异位骨化程度的变化

Fig. 1 Changes in heterotopic ossification levels in TUDCA-treated mice

TUDCA组(1.84 ± 0.093)刺激后IL-1 β 表达升高最为明显(图3A),差异具有统计学意义($t=9.034$, $P<0.001$)。ELISA结果显示与对照组相比(404.7 ± 24.38),TUDCA可显著上调巨噬细胞IL-1 β 的分泌水平,其中200 μ mol/L TUDCA组(652.8 ± 32.61)刺激后IL-1 β 表达升高最为明显(图3B),差异具有统计学意义($t=9.043$, $P<0.001$)。Western blot结果同样提示200 μ mol/L TUDCA组显著上调IL-1 β 蛋白的分泌水平(图3C)。由此我们推测,IL-1 β 可能是TUDCA诱导M2极化后所分泌的关键调控因子。

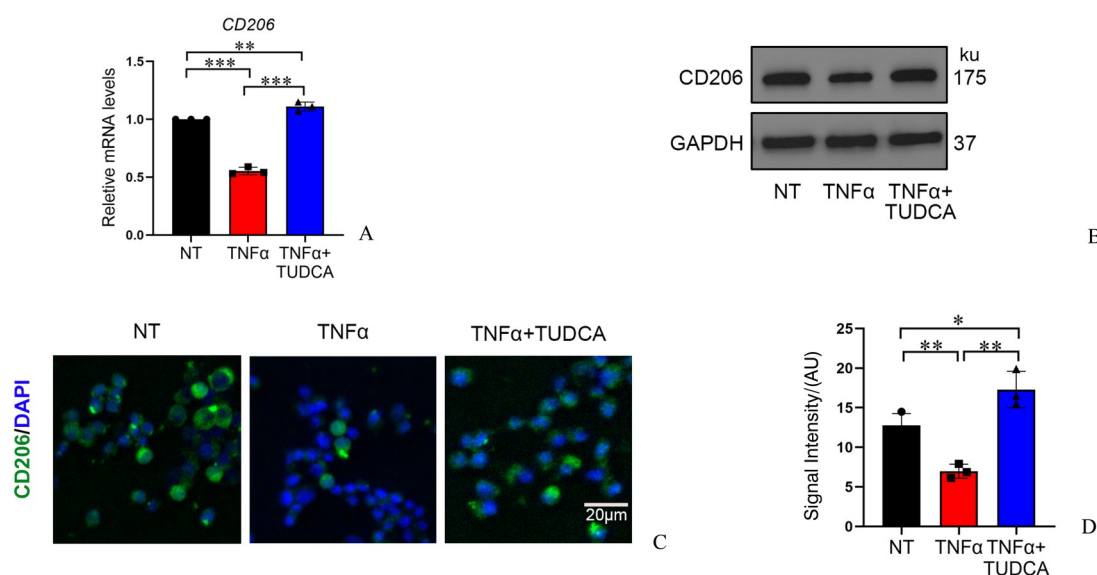
2.4 TUDCA可能通过诱导M2巨噬细胞极化并上调IL-1 β 分泌参与抑制NHO形成

为了验证我们的猜想,我们通过构建NHO小鼠模型,并持续给予TUDCA口服。通过流式细胞术检测小鼠大腿局部巨噬细胞分泌IL-1 β 的表达水平,发现TUDCA组小鼠IL-1 β 较NHO组小鼠上调(图4A)。我们进行了ELISA实验,通过 t 检验分

析结果同样表明NHO+TUDCA组小鼠的IL-1 β 水平(201.2 ± 12.58)较NHO组(127.4 ± 7.99)显著上调(图4B),差异具有统计学意义($t=4.955$, $P<0.01$)。通过免疫荧光分析发现,异位骨化灶周围M2巨噬细胞显著增多,而NHO+TUDCA组NHO小鼠IL-1 β 的荧光强度(10.71 ± 0.79)较NHO组显(2.65 ± 0.29)显著上调,差异具有统计学意义($t=9.516$, $P<0.001$)。同时,异位骨化灶(虚线标注)的形成也显示减少(图4C,4D)。以上结果说明TUDCA可能通过诱导M2巨噬细胞极化,上调肌肉局部的IL-1 β 水平,从而参与抑制NHO形成。

3 讨论

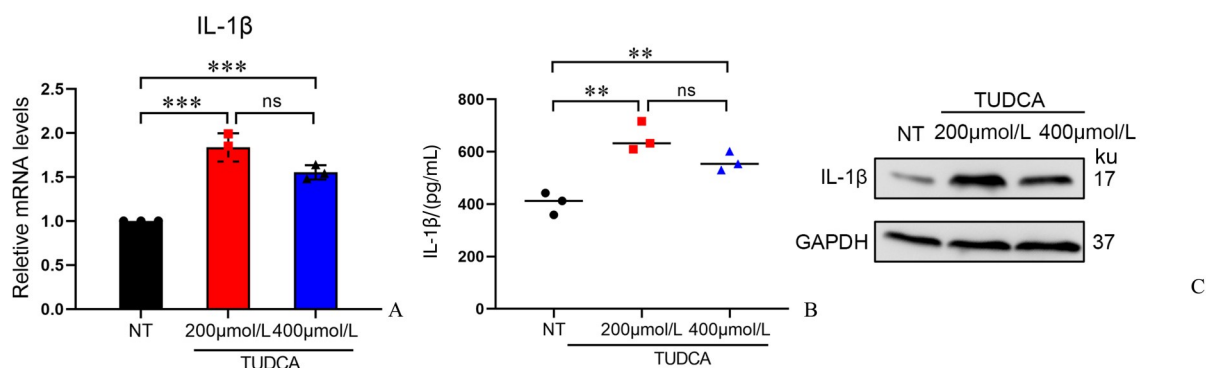
本研究中,我们成功构建了小鼠神经源性异位骨化模型,并通过持续喂养TUDCA检测NHO小鼠异位骨化量的变化,证实TUDCA具有抑制脊髓损伤小鼠异位骨化的作用。此外,我们还发现



A shows the qPCR results indicating the expression levels of CD206 in macrophages after stimulation with PBS, TNF α and TNF α +TUDCA, $t=18.79$, $P < 0.001$; B shows the Western blot results indicating the expression levels of CD206 in macrophages after stimulation with PBS, TNF α and TNF α +TUDCA. C shows immunofluorescence results indicating the expression levels of CD206 in macrophages after stimulation with PBS, TNF α and TNF α +TUDCA. bar=20 μ m. D shows quantification of the mean fluorescence intensity of CD206 in immunofluorescence group in C. $n = 3$, $t=7.24$, $P < 0.01$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图2 TUDCA 诱导巨噬细胞M2极化

Fig. 2 TUDCA induces M2 polarization of macrophages



A shows the qPCR results indicating the expression level of IL-1 β secreted by macrophages after TUDCA stimulation, $t=9.034$, $P < 0.001$; B shows the ELISA results indicating the expression level of IL-1 β secreted by macrophages after TUDCA stimulation, $t=9.043$, $P < 0.001$. C shows the Western blot results indicating the expression level of IL-1 β secreted by macrophages after TUDCA stimulation. $n = 3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

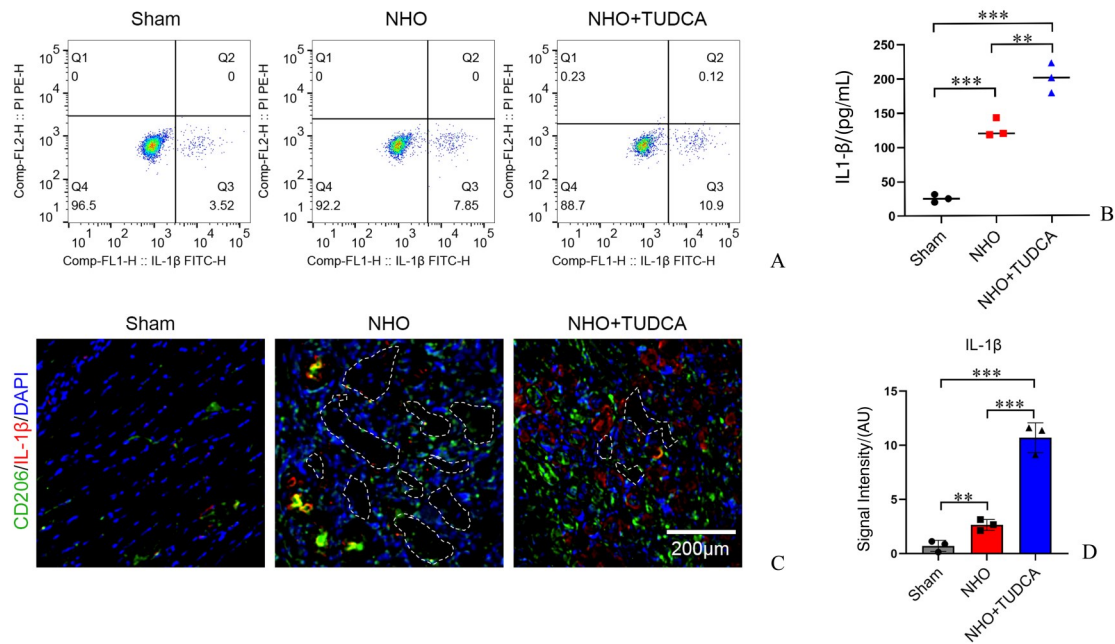
图3 TUDCA 刺激可上调巨噬细胞分泌IL-1 β 的水平

Fig. 3 TUDCA stimulation upregulates the level of IL-1 β secreted by macrophages

TUDCA可诱导巨噬细胞向M2型极化,而肌肉驻留的M2巨噬细胞分泌的IL-1 β 能够抑制成骨分化,从而减轻脊髓损伤小鼠的异位骨化程度。这些结果表明,TUDCA不仅有利于脊髓损伤的恢复,还能减少其常见并发症——神经源性异位骨化的发生。

TUDCA目前在临床上可用于治疗胆汁淤积性肝病^[14]。既往研究显示,TUDCA在脊髓损伤中具有调控炎症、氧化应激等作用,表现出神经保护效

应^[15];其不仅可通过诱导巨噬细胞M2极化来控制损伤脊髓局部的炎症水平,还可通过NF- κ B通路促进神经再生,在脊髓损伤治疗中展现出良好的应用前景^[6]。此外,TUDCA还能调控骨髓间充质干细胞的成骨分化,对骨重建发挥关键作用^[16]。基于此,我们推测TUDCA可能调控脊髓损伤小鼠的异位骨化过程。为模拟神经源性异位骨化的病理过程,我们在脊髓损伤小鼠右侧大腿肌肉局部注射心



A shows the flow cytometry results indicating the expression level of IL-1 in macrophages in the muscle tissue of mice in each group; B shows the ELISA results indicating the expression level of IL-1 in the muscle tissue of mice in each group, $n=3$, $t=4.955$, $P<0.01$; C shows the immunofluorescence results indicating the expression level of IL-1 around the heterotopic ossification (indicated by dotted lines) in the local muscle tissue of mice in each, Scale bars: 200 μm; D shows quantification of the mean fluorescence intensity of IL-1β in immunofluorescence group in C, $n=3$, $t=9.516$, $P<0.001$, $n=3$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图4 TUDCA可能通过上调肌肉局部IL-1β的水平参与抑制异位骨化的形成

Fig. 4 TUDCA might participate in inhibiting heterotopic ossification by upregulating the level of IL-1β in local muscle tissue

脏毒素,诱导肌肉损伤与修复失衡。术后第4周,形成成熟的异位骨化灶,micro-CT三维重建显示小鼠肌肉局部稳定形成的骨化灶,H&E染色和SOFG染色可见成熟骨化灶的形成,qPCR同时验证了模型局部肌肉炎症水平的稳定,充分证实了NHO模型构建成功。该模型高度还原了SCI后软组织内异常成骨的病理特征,可重复性好,是研究神经源性异位骨化的可靠工具^[13]。在此基础上,我们在NHO模型小鼠造模过程中给予TUDCA连续灌胃直至术后4周造模结束。micro-CT三维重建显示,与NHO组小鼠相比,TUDCA治疗组小鼠的异位骨化体积显著减少。H&E染色和SOFG染色均证实骨化灶明显缩小。上述结果表明,TUDCA可有效抑制SCI后NHO的形成。然而,TUDCA调控异位骨化的具体分子机制,及其分泌产物发挥作用,仍有待深入阐明。

巨噬细胞是损伤组织局部聚集的关键免疫细胞,在炎症反应和组织修复中发挥重要作用。既往研究表明,在骨组织修复与再生过程中,M2型巨噬

细胞的作用具有显著的双向性^[17]。一方面,M2巨噬细胞通过构建抗炎微环境和直接激活成骨信号,成为促进骨愈合的核心,有效抑制M1型巨噬细胞主导的急性炎症,同时释放BMP-2、TGF-β1等成骨相关生长因子^[11,18-20],从而驱动间充质干细胞向成骨细胞分化。另一方面,在某些病理条件下,M2巨噬细胞却表现出抑制成骨甚至促进异常骨形成的作用。在异位骨化中,M2巨噬细胞通过分泌TGF-β1促进间充质干细胞的募集与成骨分化^[21],并可通过介导内皮-间充质转化参与HO的发病,因此抑制M2巨噬细胞浸润成为减轻HO的潜在治疗策略^[22]。由此可见,M2巨噬细胞在成骨中的角色具有高度的时空依赖性,鉴于这种双重作用,如何在骨再生治疗中实现对M2极化的精准调控,仍是未来转化医学的重要方向。本研究结果显示,神经源性异位骨化病灶周围存在显著的巨噬细胞聚集。体内实验免疫荧光染色显示,巨噬细胞在异位骨化边缘呈环状分布,且数量明显高于周围正常肌肉组织。进一步体外实验发现,TUDCA处理巨噬

细胞后,M2型极化标志物CD206的mRNA表达水平较对照组显著升高,同时免疫荧光染色显示CD206阳性细胞比例显著增加,证实TUDCA可有效诱导巨噬细胞向M2表型转化。

IL-1 β 作为一种关键的促炎细胞因子,在骨代谢中同样呈现出复杂的双向调节作用。在特定生理或低度炎症条件下,适宜浓度的IL-1 β 可短暂时促进成骨细胞前体的增殖,并通过激活NF- κ B及MAPK信号通路上调BMP-2等成骨相关因子的表达,从而在一定程度上促进骨形成^[16]。然而,在大多数病理状态,尤其是慢性炎症或高浓度IL-1 β 暴露下,其主要表现为抑制成骨并促进骨吸收^[23]。IL-1 β 可通过抑制Runx2、Osx等成骨转录因子的表达,降低碱性磷酸酶活性和矿化能力,从而显著抑制成骨细胞的分化与成熟;同时,IL-1 β 还能有效诱导成骨细胞和基质细胞表达RANKL,增强破骨细胞的生成与活化,打破骨形成与骨吸收的平衡,最终导致骨丢失^[24-25]。本研究中,TUDCA诱导的M2巨噬细胞极化伴随IL-1 β 分泌显著上调。在NHO小鼠模型中,持续给予TUDCA喂养后,异位骨化程度显著下降,免疫荧光结果提示TUDCA组小鼠异位骨化局部IL-1 β 水平显著升高。这些结果提示,TUDCA介导的巨噬细胞分泌更多IL-1 β ,

从而抑制异位骨化灶的形成。本研究揭示了IL-1 β 在NHO中发挥抑制骨化的作用,这与既往研究中IL-1 β 在病理情况下的作用相一致。然而,既往Jean-Pierre Lévesque研究团队的发现有所不同,该团队研究表明NHO的形成与脊髓损伤小鼠肌肉损伤后局部IL-1 β 表达上调呈正相关^[26]。我们推测这与喂养TUDCA后,肌肉局部微环境的改变以及更高浓度的IL-1 β 水平有关。由此可见,IL-1 β 对成骨及抑骨形成的双向调控作用与浓度高度相关,也依赖局部免疫微环境。TUDCA诱导巨噬细胞的M2极化极大改变了损伤肌肉局部的炎症微环境,本研究为双向调控增添了新的证据。然而由于条件所限,本研究未进一步探讨TUDCA诱导IL-1 β 上调的具体分子机制,以及IL-1 β 调控成骨分化的详细通路;后续研究应结合细胞模型及NHO动物模型,通过免疫荧光、茜素红染色等一系列实验,全面阐释TUDCA抑制NHO形成的机制。

综上所述,本研究在细胞和动物水平上证实,TUDCA可能通过诱导M2巨噬细胞极化并上调IL-1 β 分泌参与抑制NHO形成,从而减轻脊髓损伤小鼠的异位骨化程度。本研究拓展了TUDCA在脊髓损伤治疗中的应用潜力,揭示了其在减少脊髓损伤并发症中的关键作用。

参考文献

- [1] Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, et al. Traumatic spinal cord injury[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17018.
- [2] Zeller SL, Stein A, Frid I, et al. Critical care of spinal cord injury[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2024, 24(9): 355-363.
- [3] Alexander KA, Tseng HW, Salga M, et al. When the nervous system turns skeletal muscles into bones: How to solve the conundrum of neurogenic heterotopic ossification [J]. Curr Osteoporos Rep, 2020, 18(6): 666-676.
- [4] Romero-Ramírez L, Nieto-Sampedro M, Yanguas-Casús N. Tauroursodeoxycholic acid: more than just a neuroprotective bile conjugate[J]. Neural Regen Res, 2017, 12(1): 62-63.
- [5] Xu J, Luo Y, Lu F, et al. Tauroursodeoxycholic acid modulates neuroinflammation via STING/NF- κ B inhibition after traumatic brain injury[J]. Int Immunopharmacol, 2025, 165: 115471.
- [6] Hou Y, Zhang Y, Ma L, et al. Tauroursodeoxycholic acid regulates macrophage/monocyte distribution and improves spinal microenvironment to promote nerve regeneration through inhibiting NF- κ B signaling pathway in spinal cord injury[J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1554945.
- [7] Han GH, Kim SJ, Ko WK, et al. Transplantation of tauroursodeoxycholic acid-inducing M2-phenotype macrophages promotes an anti-neuroinflammatory effect and functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. Cell Prolif, 2021, 54(6): e13050.
- [8] Kang H, Yang S, Lee J. Tauroursodeoxycholic acid enhances osteogenic differentiation through EGFR/P-AKT/CREB1 pathway in mesenchymal stem cells[J]. Cells, 2023, 12(11). doi: 10.3390/cells12111463.
- [9] Bousch JF, Beyersdorf C, Schultz K, et al. Proinflammatory cytokines enhance the mineralization, proliferation, and metabolic activity of primary human osteoblast-like cells [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(22). doi: 10.3390/ijms252212358.
- [10] Mo S, Jang JS, Lee SH, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals periodontal ligament fibroblast heterogeneity with distinct IL-1 β and rankl expression in periodontitis [J]. Mol Cells, 2024, 47(4): 100059.
- [11] Muñoz J, Akhavan NS, Mullins AP, et al. Macrophage

- polarization and osteoporosis: a review[J]. *Nutrients*, 2020, 12(10). doi: 10.3390/nu12102999.
- [12] Zhang Q, Wu B, Yuan Y, et al. CGRP-modulated M2 macrophages regulate osteogenesis of MC3T3-E1 via Yap1[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 697: 108697.
- [13] Genêt F, Kulina I, Vaquette C, et al. Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by macrophage-mediated inflammation in muscle[J]. *J Pathol*, 2015, 236(2): 229-240.
- [14] Zangerolamo L, Vettorazzi JF, Rosa LRO, et al. The bile acid tudeca and neurodegenerative disorders: an overview[J]. *Life Sci*, 2021, 272: 119252.
- [15] Hou Y, Luan J, Huang T, et al. Tauroursodeoxycholic acid alleviates secondary injury in spinal cord injury mice by reducing oxidative stress, apoptosis, and inflammatory response[J]. *J Neuroinflamm*, 2021, 18(1): 216.
- [16] Cha KY, Cho W, Park S, et al. Generation of bioactive MSC-EVs for bone tissue regeneration by tauroursodeoxycholic acid treatment[J]. *J Control Release*, 2023, 354: 45-56.
- [17] 蒋雨璨,李明政,张红梅.巨噬细胞亚型与破骨细胞形成关系的研究进展[J]. *重庆医科大学学报*, 2023, 48(3): 341-345.
- Jiang YC, Li MM, Zhang HM. Research progress on the link between macrophage subtypes and osteoclast formation[J]. *J Chongqing Med Univ*, 2023, 48(3): 341-345.
- [18] Cai G, Lu Y, Zhong W, et al. Piezo1-mediated M2 macrophage mechanotransduction enhances bone formation through secretion and activation of transforming growth factor- β 1[J]. *Cell Prolif*, 2023, 56(9): e13440.
- [19] Chen X, Wan Z, Yang L, et al. Exosomes derived from reparative M2-like macrophages prevent bone loss in murine periodontitis models via IL-10 mRNA[J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 110.
- [20] Pajarinen J, Lin T, Gibon E, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing[J]. *Biomaterials*, 2018, 196: 80-89.
- [21] Liu C, Huang X, Li S, et al. M2 macrophage-derived exosomes reverse TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transformation in BEAS-2B cells via the TGF- β RI/Smad2/3 signaling pathway[J]. *Eur J Med Res*, 2025, 30(1): 271.
- [22] Yao B, Nie H, Zhou J, et al. M2 macrophages promote heterotopic ossification through MSX2 binding to LEF1-mediated endothelial-mesenchymal transition[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2026, 17(1): e2296.
- [23] Ruscitti P, Cipriani P, Carubbi F, et al. The role of IL-1 β in the bone loss during rheumatic diseases[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 782382.
- [24] Mao CY, Wang YG, Zhang X, et al. Double-edged-sword effect of IL-1 β on the osteogenesis of periodontal ligament stem cells via crosstalk between the NF- κ B, MAPK and BMP/Smad signaling pathways[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(7): e2296.
- [25] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2010, 7(1): 33-42.
- [26] Tseng HW, Kulina I, Girard D, et al. Interleukin-1 is overexpressed in injured muscles following spinal cord injury and promotes neurogenic heterotopic ossification[J]. *J Bone Miner Res*, 2021, 37(3): 531-546.

(编辑 孙慧兰)