

# 破骨细胞活化过程中免疫内酯LY267108对核因子κB的抑制

余 剑, 赵建宁(解放军第二军医大学附属南京临床医学院(解放军南京军区南京总医院), 江苏省南京市 210002)

## 文章亮点:

1 文章首次探讨了免疫内酯对破骨细胞活化的抑制作用及机制, 并提出其在防止人工关节无菌性松动中的潜在价值。  
2 实验通过 RANKL、巨噬细胞-集落刺激因子加入小鼠 RAW264.7 细胞系建立破骨细胞诱导模型, 同时加入免疫内酯 LY267108 及其他药物干预, 利用电泳迁移率分析法及蛋白免疫印迹法测定核因子 κB 活性和胞浆内 κB 抑制蛋白 α 含量, 探讨免疫内酯对核因子 κB 的抑制作用。

## 关键词:

组织构建; 骨组织工程; 免疫内酯; 核因子 κB; 人工关节; 无菌性松动; 骨溶解; 破骨细胞

## 主题词:

NF-κB; 人工关节; 破骨细胞; 红霉素

## 摘要

**背景:** 目前尚无理想药物可用于人工关节无菌性松动的防治。研究表明红霉素对假体周围骨溶解具有较强的抑制作用, 然而其抗菌活性却限制了其在人工关节松动防治中的应用。免疫内酯 LY267108 是一种新型红霉素衍生物, 其消除了抗菌活性, 同时保留了抗炎活性。

**目的:** 评价 LY267108 在破骨细胞活化过程中对核因子 κB 的抑制作用。

**方法:** 将 RANKL、巨噬细胞-集落刺激因子加入小鼠 RAW264.7 细胞系建立破骨细胞诱导模型, 同时分别加入不同浓度的阿仑膦酸钠、红霉素及 LY267108 共培养 48 h, 分别采用电泳迁移率分析法及蛋白免疫印迹法测定胞核内核因子 κB 活性和胞浆内 κB 抑制蛋白 α 含量。

**结果与结论:** LY267108 对核因子 κB 具有较强的抑制活性, 10 mg/L LY267108、25 mg/L 红霉素与 10 mg/L 阿仑膦酸钠对核因子 κB 具有相似的抑制作用, 且显著强于 10 mg/L 红霉素, 而 25 mg/L LY267108 具有最强的抑制作用。10 mg/L LY267108、25 mg/L 红霉素与 10 mg/L 阿仑膦酸钠组中胞浆内 κB 抑制蛋白 α 水平差异无显著性意义, 但显著高于 10 mg/L 红霉素组, 而 25 mg/L LY267108 组胞浆内 κB 抑制蛋白 α 水平最高。提示免疫内酯 LY267108 在破骨细胞活化过程中, 对核因子 κB 具有较红霉素更强的抑制作用, 且安全性高于阿仑膦酸钠。同时 LY267108 无抗菌活性的特性, 使其成为防治人工关节无菌性松动的潜在理想药物。而 LY267108 对 κB 抑制蛋白 α 降解的抑制作用, 可能是其抑制核因子 κB 活化的机制之一。

余剑, 赵建宁. 破骨细胞活化过程中免疫内酯 LY267108 对核因子 κB 的抑制[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(15):2309-2313.

## Inhibitory effects of LY267108 on nuclear factor kappa B during osteoclast activation

Yu Jian, Zhao Jian-ning (Nanjing Clinical Medical School Affiliated to the Second Military Medical University (Nanjing General Hospital of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA), Nanjing 210002, Jiangsu Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** No ideal drugs can be used in the prevention and treatment of aseptic loosening of artificial joints. Some researchs showed that erythromycin has strong inhibitory effects on periprosthetic osteolysis. Its antibacterial activity, however, limits its application in artificial joint loosening prevention. LY267108 is a new type of erythromycin derivatives, eliminates the antibacterial activities, and retains the anti-inflammatory activity.

**OBJECTIVE:** To evaluate inhibitory effect of LY267108 on nuclear factor kappa B during osteoclast activation.

**METHODS:** RANKL and macrophage colony-stimulating factor were added to RAW264.7 cell line of a mouse model induced by osteoclasts. Simultaneously, different concentrations of alendronate sodium, erythromycin and LY267108 were cocultured for 48 hours. The activity of nuclear factor kappa B and content of intracytoplasmic inhibitory subunit of nuclear factor kappa B alpha were measured by electrophoretic mobility shift assay and western blot assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** LY267108 has a strong inhibitory effect on nuclear factor kappa B. 10 mg/L LY267108, 25 mg/L erythromycin and 10 mg/L alendronate sodium had similar inhibitory effects on nuclear factor kappa B, which was obviously stronger than 10 mg/L erythromycin. However, 25 mg/L LY267108 had strongest inhibitory effects. No significant difference in intracytoplasmic inhibitory subunit of nuclear factor kappa B alpha levels was detected among 10 mg/L LY267108, 25 mg/L erythromycin and 10 mg/L alendronate sodium groups, but was still apparently higher than 10 mg/L erythromycin group. Levels of intracytoplasmic inhibitory subunit of

余剑, 男, 1982年生, 江苏省东台市人, 汉族, 2007年解放军第四军医大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事关节外科、脊柱外科方面的研究。

通讯作者: 赵建宁, 解放军第二军医大学附属南京临床医学院(南京军区南京总医院), 江苏省南京市 210002

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.15.003  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)15-02309-05

稿件接受: 2014-03-03

Yu Jian, Master, Attending physician, Nanjing Clinical Medical School Affiliated to the Second Military Medical University (Nanjing General Hospital of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA), Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Zhao Jian-ning, Nanjing Clinical Medical School Affiliated to the Second Military Medical Hospital of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA), Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Accepted: 2014-03-03

nuclear factor kappa B alpha were highest in the 25 mg/L LY267108 group. Results indicated that LY267108 in the process of osteoclast activation had stronger inhibitory effects on nuclear factor kappa B compared with erythromycin, and its safety was higher than alendronate sodium. Simultaneously, LY267108 did not have antimicrobial activity, and became a potential ideal drug for prevention and treatment of aseptic loosening of artificial joints. However, the inhibitory effects of LY267108 on the degradation of inhibitory subunit of nuclear factor kappa B alpha would be a mechanism of inhibiting the activation of nuclear factor kappa B.

**Subject headings:** NF-kappa B; joint prosthesis; osteoclasts; erythromycin

Yu J, Zhao JN. Inhibitory effects of LY267108 on nuclear factor kappa B during osteoclast activation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(15):2309-2313.

## 0 引言 Introduction

假体无菌性松动是人工关节置换最常见的并发症<sup>[1]</sup>。尽管无菌性松动的原因很多,但目前认为磨屑诱导的假体周围骨溶解是导致假体松动的主要原因<sup>[2]</sup>。目前已证实,RANKL-RANK-OPG系统途径是磨屑诱导骨溶解的主要发生机制<sup>[3]</sup>。RANKL被证实为假体周围骨溶解的主要使动分子,RANK是破骨及破骨前体细胞表面的一种受体蛋白,骨保护素是一种游离的蛋白碎片,可与RANK竞争性结合RANKL,阻断RANKL和RANK的结合。在人工关节逐渐松动的过程中,大量磨屑产生并被吞噬,导致假体周围软组织中的基质细胞表达RANKL mRNA异常增多,RANKL和骨保护素的平衡被打破<sup>[4-6]</sup>,大量RANKL分子释放,这些RANKL与破骨前体细胞表面的RANK结合,引发级联细胞内信号转导反应,最终使本来呈结合状态的核因子 $\kappa$ B与 $\kappa$ B抑制蛋白发生解离<sup>[7-8]</sup>,移入细胞核中与目的基因结合,启动目的基因转录,从而启动破骨细胞分化激活,产生溶骨反应。近来研究表明红霉素可以通过抑制核因子 $\kappa$ B的活性,从而抑制破骨细胞的分化和激活,进而对假体周围骨溶解具有较强的抑制作用<sup>[9-10]</sup>;然而,红霉素的抗生素本质,限制了其长期使用以防治人工关节松动。

免疫内酯是2005年Fecik等<sup>[11]</sup>命名的,具有更强抗炎及免疫调节活性而无抗菌活性的一类新型红霉素衍生物,考虑到红霉素的抗骨溶解作用,推测假设免疫内酯对破骨细胞的分化和激活亦可能具有强烈抑制作用。如果这种假设成立,那么免疫内酯毫无疑问将是防治人工关节松动的理想药物之一。

LY267108是近年来LO.Kibwage和H.A.Kirst两个研究小组各自独立发现的免疫内酯类化合物<sup>[12]</sup>,现有研究表明,LY267108无抗菌活性,而其免疫调节活性则大大增强。学者在经典的诱导单核细胞向巨噬细胞分化实验中发现,LY267108的活性是红霉素活性的30倍,提示免疫内酯LY267108的免疫活性较红霉素显著增强。对T淋巴细胞增殖影响的研究结果显示LY267108和红霉素抑制T淋巴细胞的增殖IC<sub>50</sub>值分别为(176.38±10.42)  $\mu$ mol/L和(606.28±35.43)  $\mu$ mol/L;在3.0-30.0 mg/L之间 LY267108引起T淋巴细胞G<sub>2</sub>/M期周期阻滞<sup>[13-14]</sup>。然而,目前尚未见有关免疫内酯LY267108对破骨细胞活化抑制作用及机制的文献报道。

文章通过建立破骨细胞诱导模型并以LY267108为代表进行药物干预,探讨免疫内酯对破骨细胞活化的抑制作用及机制,并与红霉素及阿仑膦酸钠等作比较。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 对比观察实验。

**时间及地点:** 解放军第二军医大学南京临床医学院(南京军区南京总医院)骨科研究所。

**材料:**

免疫内酯LY267108抑制核因子 $\kappa$ B实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7	南京大学生命科学院
红霉素、免疫内酯LY267108	沈阳药科大学制药工程学院
阿仑膦酸钠	杭州默沙东制药有限公司
DMEM全培养液、聚蔗糖-泛影葡胺分层液(FICOLL)	上海试剂厂
CO <sub>2</sub> 细胞培养箱(LB27)	东京池本理化工业株式会社制造
电泳迁移率分析试剂盒及蛋白质免疫印迹相关抗体试剂	美国Promega公司

**实验方法:**

**破骨细胞诱导模型的建立及药物干预<sup>[14-15]</sup>:** 细胞培养小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7传代后,取第三四代细胞洗涤3次,加DMEM全培养液制成细胞悬液,细胞计数,调整细胞浓度至 $4 \times 10^8$  L<sup>-1</sup>,锥虫蓝排除法检测细胞活力均大于95%。向培养板中滴加细胞悬液,每板接种7孔,每孔加3 mL。共制备14板,7板用于细胞核中核因子 $\kappa$ B活性的电泳迁移率分析法检测,另7板用于细胞浆内 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 含量的Western blot测定。每板制备方法均同下。置37 °C,体积分数5%CO<sub>2</sub>恒温恒湿培养箱培养4 h,使细胞贴壁,洗涤除去非贴壁细胞。每板第1孔加DMEM全培养液3 mL(空白组),将2-7孔加入浓度均为50  $\mu$ g/L的RANKL和巨噬细胞-集落刺激因子的DMEM全培养液(第2孔为诱导模型组),于第3孔加入阿仑膦酸钠使其浓度为10 mg/L(10 mg/L阿仑膦酸钠组),于第4孔加入红霉素使其浓度为10 mg/L(10 mg/L红霉素组),于第5孔加入红霉素使其浓度为25 mg/L(25 mg/L红霉素组),于第6孔加入免疫内酯LY267108使其浓度为10 mg/L(10 mg/L LY267108组),于第

7孔加入免疫内酯LY267108使其浓度为25 mg/L(25 mg/L LY267108组)。混匀, 同条件培养48 h。分组情况见表1。

表1 破骨细胞诱导模型药物干预的分组情况

Table 1 Drug intervention grouping in osteoclast-induced models

组别	处理方法
空白组	DMEM 全培养液
诱导模型组	RANKL+巨噬细胞-集落刺激因子
10 mg/L 阿仑膦酸钠组	RANKL+巨噬细胞-集落刺激因子+10 mg/L 阿仑膦酸钠
10 mg/L 红霉素组	RANKL+巨噬细胞-集落刺激因子+10 mg/L 红霉素
25 mg/L 红霉素组	RANKL+巨噬细胞-集落刺激因子+25 mg/L 红霉素
10 mg/L LY267108 组	RANKL+巨噬细胞-集落刺激因子+10 mg/L LY267108
25 mg/L LY267108 组	RANKL+巨噬细胞-集落刺激因子+25 mg/L LY267108

**电泳迁移率分析法(EMSA)检测细胞核中核因子 $\kappa$ B活性<sup>16)</sup>**: 依电泳迁移率分析试剂盒说明书操作。主要步骤: 提取细胞核蛋白; 标记核因子 $\kappa$ B寡核苷酸探针(磷酸化反应); 检测寡核苷酸探针标记百分率; 清除未标记寡核苷酸; 寡核苷酸探针与细胞核蛋白的结合反应; 7%非解离聚丙烯酰胺凝胶电泳; 放射自显影; 将显影结果经扫描仪输入电脑, 用电泳区带分析软件Image Tool软件分析蛋白区带, 并用积分灰度值表示。

**蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测细胞浆内 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 水平**: 用细胞刮子将细胞从培养皿上刮下来, 加入SDS上样缓冲液裂解细胞, 煮沸5 min并离心, 取上清。胞浆蛋白经考马斯亮蓝蛋白定量后点样, 行10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕, 将分离胶部分靠阴极侧, 硝酸纤维素膜靠阳极侧进行电转。用T-TBS溶液清洗硝酸纤维素膜, 将膜置于含50 g/L脱脂奶粉的T-TBS溶液中封闭非特异性结合1 h后用T-TBS溶液漂洗3次, 每次10 min(以下同)。将膜与1:2 000兔抗 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 多克隆抗体4 °C条件下共孵育过夜, T-TBS溶液漂洗。加入1:200生物素标记的羊抗兔IgG后室温孵育1 h, T-TBS溶液漂洗。加入1:200辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(SPA-HRP), 室温孵育1 h, T-TBS溶液漂洗后置于DAB

溶液中避光显色10 min。将滤膜用光密度扫描仪输入电脑, 用电泳区带分析软件Image Tool分析蛋白区带, 并用积分灰度值表示。

**主要观察指标**: 胞核内活化核因子 $\kappa$ B活性及胞浆内 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 水平。

**统计学分析**: 由第一作者采用SPSS 13.0软件包行单因素方差分析及 $q$ 检验, 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 应用电泳迁移率分析法检测核因子 $\kappa$ B活性** 10 mg/L阿仑膦酸钠组、10、25 mg/L红霉素组、10、25 mg/L LY267108组均显著高于空白组, 低于诱导模型组( $P < 0.05$ ); 10 mg/L红霉素组显著高于10 mg/L阿仑膦酸钠组及25 mg/L红霉素组( $P < 0.05$ ), 10 mg/L阿仑膦酸钠组、25 mg/L红霉素组、10 mg/L LY267108组差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 10 mg/L LY267108组显著高于25 mg/L LY267108组( $P < 0.05$ , 表2, 图1)。

表2 各组细胞核内核因子 $\kappa$ B活性与细胞浆内 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 蛋白水平比较

Table 2 Comparison of intranuclear nuclear factor kappa B activity and intracytoplasmic inhibitory subunit of nuclear factor kappa B alpha protein level in each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $\times 10^4$  integral gray value)

组别	核因子 $\kappa$ B活性	$\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 蛋白水平
空白组	3.79 $\pm$ 0.57	21.01 $\pm$ 0.81
诱导模型组	21.57 $\pm$ 0.52	9.42 $\pm$ 0.54
10 mg/L 阿仑膦酸钠组	8.57 $\pm$ 0.31	18.49 $\pm$ 0.14
10 mg/L 红霉素组	11.32 $\pm$ 0.61	16.37 $\pm$ 0.73
25 mg/L 红霉素组	8.61 $\pm$ 0.27	18.23 $\pm$ 0.49
10 mg/L LY267108 组	9.72 $\pm$ 0.37	17.28 $\pm$ 0.69
25 mg/L LY267108 组	5.95 $\pm$ 0.16	19.52 $\pm$ 0.71

表注: LY267108对核因子 $\kappa$ B具有较强的抑制活性, 10 mg/L LY267108、25 mg/L红霉素与10 mg/L阿仑膦酸钠对核因子 $\kappa$ B具有相似的抑制作用, 且显著强于10 mg/L红霉素, 而25 mg/L LY267108具有最强的抑制作用, 这一结果与 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 蛋白水平测定的结果完全吻合。

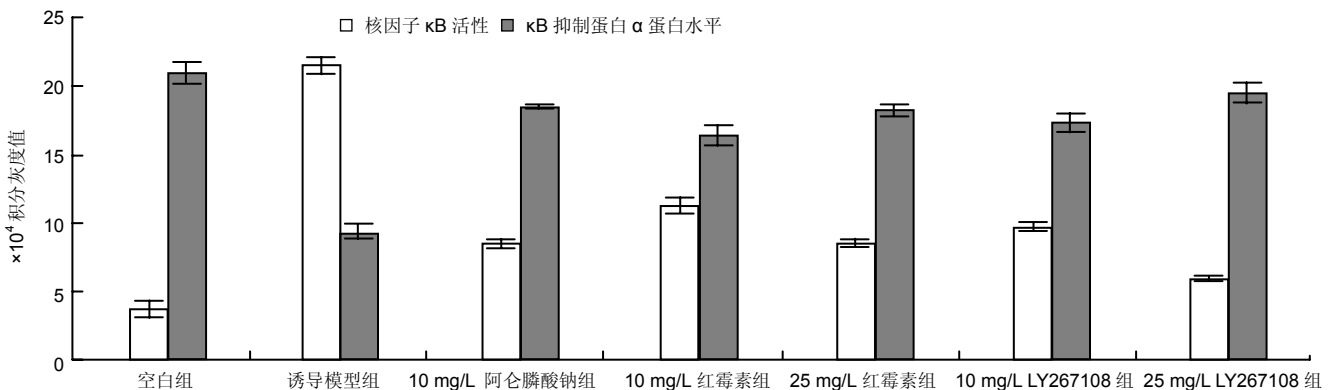


图1 各组细胞核内核因子 $\kappa$ B活性与细胞浆内 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 蛋白水平比较

Figure 1 Comparison of intranuclear nuclear factor kappa B activity and intracytoplasmic inhibitory subunit of nuclear factor kappa B alpha protein level in each group

图注: LY267108对核因子 $\kappa$ B具有较强的抑制活性, 10 mg/L LY267108、25 mg/L红霉素与10 mg/L阿仑膦酸钠对核因子 $\kappa$ B具有相似的抑制作用, 且显著强于10 mg/L红霉素, 而25 mg/L LY267108具有最强的抑制作用, 与 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 蛋白水平测定的结果吻合。

2.2 Western blot检测 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 蛋白水平 10 mg/L阿仑膦酸钠组、10, 25 mg/L红霉素组、10, 25 mg/L LY267108组均显著低于空白组, 高于诱导模型组( $P < 0.05$ ); 10 mg/L红霉素组显著低于10 mg/L阿仑膦酸钠组及25 mg/L红霉素组( $P < 0.05$ ), 10 mg/L阿仑膦酸钠组、25 mg/L红霉素组、10 mg/L LY267108组差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 10 mg/L LY267108组显著低于25 mg/L LY267108组( $P < 0.05$ , 表2, 图1)。

### 3 讨论 Discussion

人工关节松动发生的过程中, 磨屑刺激巨噬细胞释放肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素1、白细胞介素6、前列腺素E2等大量炎症因子, 从而开启RANK/RANKL/OPG信号通路, 激活核因子 $\kappa$ B, 从而使得破骨细胞分化激活, 发挥骨溶解作用<sup>[17]</sup>。破骨细胞的分化激活是假体周围骨溶解的直接原因, 在这个过程中, 核因子 $\kappa$ B起到关键的枢纽作用。通过抑制核因子 $\kappa$ B的活性来防治骨溶解, 是目前药物预防人工关节松动的一个重要思路。

在这个思路下, 目前研究较多的药物主要包括双膦酸盐及红霉素两大类, 这两种药物对核因子 $\kappa$ B都有一定的抑制作用, 遗憾的是却都存在一些临床上难以忽略的缺陷<sup>[18-23]</sup>。红霉素在体代谢很快, 因此如果用于防治骨溶解需要长期使用, 然而其自身固有的抗生素属性, 不允许临床上长期服用; 双膦酸盐虽然无需连续长期使用, 但是临床已有报道其易导致下颌骨坏死等并发症, 同时其常见的胃肠道反应也不容忽视。

免疫内酯是近年来新发现的一大类十二元环红霉素衍生物, 其具有抗炎及免疫调节活性, 而消除了红霉素固有的抗菌活性<sup>[24]</sup>。LY267108是近年来IO.Kibwage和H.A.Kirst两个研究小组各自独立发现的免疫内酯类化合物, 其化学结构上属于十二元大环内酯类化合物, 化学结构较为新颖(图2)。现有的研究表明, LY267108无抗菌活性, 亦无胃动素样作用, 而其免疫调节活性则显著增强。国内吴岚等<sup>[13]</sup>通过实验发现, 免疫内酯LY267108对T淋巴细胞增殖较红霉素抑制作用更强, 提示其具有更强的抗炎活性。而迄今为止, 尚未见免疫内酯在骨溶解防治中的研究报道。

本文通过在小鼠RAW264.7细胞培养系中加入RANKL及巨噬细胞-集落刺激因子, 建立破骨细胞诱导模型, 同时进行药物干预。核因子 $\kappa$ B测定实验结果表明, 在破骨细胞的分化过程中, LY267108对核因子 $\kappa$ B具有较强的抑制活性, 10 mg/L LY267108、25 mg/L红霉素与10 mg/L阿仑膦酸钠对核因子 $\kappa$ B具有相似的抑制作用, 且显著强于10 mg/L红霉素, 而25 mg/L LY267108具有最强的抑制作用。

在正常静息细胞, 核因子 $\kappa$ B与 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 结合成无活性的三聚体存在于胞浆中,  $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 掩盖了核因子 $\kappa$ B核移位序列, 抑制核因子 $\kappa$ B核移位。在RANKL、巨噬

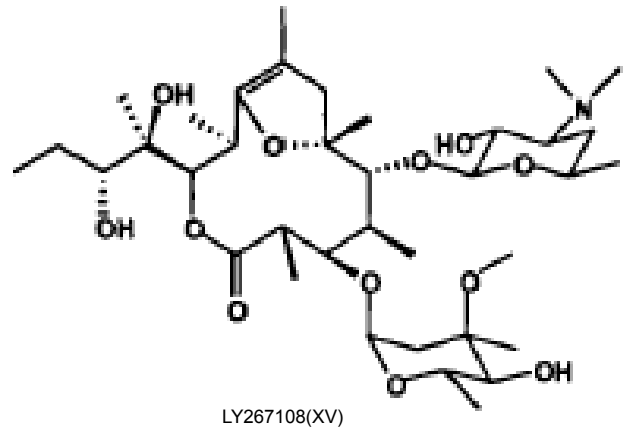


图2 免疫内酯 LY267108 的分子结构

Figure 2 Molecular structure of LY267108

图注: LY267108 是近年来 IO.Kibwage 和 H.A.Kirst 两个研究小组各自独立发现的免疫内酯类化合物, 其化学结构上属于十二元大环内酯类化合物, 化学结构较为新颖。

细胞-集落刺激因子诱导的破骨细胞分化过程中,  $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 发生磷酸化及降解和核因子 $\kappa$ B解离, 允许核因子 $\kappa$ B移位至胞核, 与其相应的基因启动子序列结合, 启动基因转录<sup>[25-26]</sup>。因此 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 降解是核因子 $\kappa$ B活化的前提。本实验结果显示, LY267108作用下, 胞浆内 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 呈现较高水平, 表明LY267108抑制了 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 的降解, 从而抑制了核因子 $\kappa$ B向细胞核内的转位活化。10 mg/L LY267108、25 mg/L红霉素与10 mg/L阿仑膦酸钠组中胞浆内 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 含量水平差异无显著性意义, 但显著高于10 mg/L红霉素组, 而25 mg/L LY267108组胞浆内 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 含量水平最高。这一结果与核因子 $\kappa$ B活性测定的结果完全吻合, 充分佐证了免疫内酯LY267108在破骨细胞分化中对核因子 $\kappa$ B强大的抑制作用, 也提示了LY267108对 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ 降解的抑制作用, 可能是其抑制核因子 $\kappa$ B活化的机制之一。

本实验结果可以看到, 相同浓度条件下, LY267108对核因子 $\kappa$ B抑制作用较红霉素更强, 但与阿仑膦酸钠相比似乎无显著差异, 然而考虑到阿仑膦酸钠存在导致下颌骨坏死等严重并发症的风险, 且胃肠道不良反应较大, 而LY267108无相关风险, 因此LY267108安全性更高。

本实验的不足之处是仅在分子水平观察了LY267108对核因子 $\kappa$ B活性的影响, 但并未在细胞水平观察LY267108究竟对破骨细胞活化的作用。后续将进一步在细胞水平研究LY267108对破骨细胞活化的影响, 并与本实验的结果进行对照, 评价LY267108作用下, 破骨细胞活化过程中分子水平变化和细胞水平变化的相关性。

核因子 $\kappa$ B是细胞分化与细胞凋亡等信号通路的交汇点, 在破骨细胞分化激活的信号通路中起着重要的枢纽作用, 抑制核因子 $\kappa$ B的过度表达可直接抑制破骨细胞的活化。本实验结果表明, 免疫内酯LY267108在破骨细胞活化过程中, 对核因子 $\kappa$ B具有较强的抑制作用, 且在一定范围

内其抑制效应与剂量浓度呈正相关, 同样剂量浓度下免疫内酯LY267108对核因子κB的抑制作用较红霉素更强, 而同为10 mg/L的LY267108与阿仑膦酸钠对核因子κB的抑制作用无显著差异。因此, 鉴于免疫内酯LY267108无抗菌活性, 同时在破骨细胞活化过程中对核因子κB具有更强的抑制作用, 其将有可能成为抑制假体周围骨溶解, 防治人工关节无菌性松动的理想药物。

**致谢:** 感谢南京大学生命科学院惠赠小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7, 感谢沈阳药科大学制药工程学院惠赠免疫内酯LY217108化合物。

**作者贡献:** 第一作者及通讯作者负责实验设计, 第一作者负责实验实施及结果成文, 通讯作者负责审核。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 免疫内酯是近年来新发现的一大类十二元环红霉素衍生物, 其具有抗炎及免疫调节活性, 同时消除了红霉素固有的抗菌活性。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Gallo J, Goodman SB, Konttinen YT, et al. Osteolysis around total knee arthroplasty: a review of pathogenetic mechanisms. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(9):8046-8058.
- [2] O'Neill SC, Queally JM, Devitt BM, et al. The role of osteoblasts in peri-prosthetic osteolysis. *Bone Joint J*. 2013; 95-B(8):1022-1026.
- [3] Holt G, Murnaghan C, Reilly J, et al. The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;460:240-252.
- [4] Stadelmann VA, Terrier A, Pioletti DP. Microstimulation at the bone-implant interface upregulates osteoclast activation pathways. *Bone*. 2008;42(2):358-364.
- [5] Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporosis Rep*. 2007;5(3):98-104.
- [6] Wedemeyer C, Neuerburg C, Pfeiffer A, et al. Polyethylene particle-induced bone resorption in alpha-calcitonin gene-related peptide-deficient mice. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(7):1011-1019.
- [7] Liu Q, Wu H, Chim SM, et al. SC-514, a selective inhibitor of IKKβ attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis and NF-κB activation. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(12): 1775-1783.
- [8] Yoon WJ, Kim KN, Heo SJ, et al. Sargachromanol G inhibits osteoclastogenesis by suppressing the activation NF-κB and MAPKs in RANKL-induced RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434(4):892-897.
- [9] Ren W, Blasler R, Peng X, et al. Effect of oral erythromycin therapy in patients with aseptic loosening of joint prostheses. *Bone*. 2009;44(4):671-677.
- [10] Purdue PE, Koulouvaris P, Nestor BJ, et al. The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis. *HSS J*. 2006;2(2): 102-113.
- [11] Fecik RA, Ngu Yen PL, VenkaTraman L. Approaches to the synthesis of immunolides: selective immune-modulatory macrolides for cystic fibrosis. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2005;8(6):741-747.
- [12] Greenwood B1, Dieckman D, Kirst HA, et al. Effects of LY267108, an erythromycin analogue derivative, on lower esophageal sphincter function in the cat. *Gastroenterology*. 1994;106(3):624-628.
- [13] 吴岚, 张为革, 赵丽娟, 等. 十二元环红霉素衍生物对T淋巴细胞增殖和细胞周期的影响[J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 22(5): 390-394.
- [14] Tsubaki M, Komai M, Itoh T, et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit RANKL- and M-CSF-induced osteoclast formation through the inhibition of ERK1/2 and Akt activation. *J Biomed Sci*. 2014;21(1):10.
- [15] GuezGuez A, Prod'homme V, Mouska X, et al. 3BP2 adapter protein is required for receptor activator of NFκB ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *J Biol Chem*. 2010;285(27):20952-20963.
- [16] Yang J, Zeng Z, Wu T, et al. Emodin attenuates high glucose-induced TGF-β1 and fibronectin expression in mesangial cells through inhibition of NF-κB pathway. *Exp Cell Res*. 2013;319(20):3182-3189.
- [17] Singh PP, van der Kraan AG, Xu J, et al. Membrane-bound receptor activator of NFκB ligand (RANKL) activity displayed by osteoblasts is differentially regulated by osteolytic factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;422(1):48-53.
- [18] Qu S, Bai Y, Liu X, et al. Study on in vitro release and cell response to alendronate sodium-loaded ultrahigh molecular weight polyethylene loaded with alendronate sodium wear particles to treat the particles-induced osteolysis. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(2):394-403.
- [19] Abdelmoula LC, Ben Mbarek R, Ben Hadj Yahia C, et al. Bisphosphonates: indications in bone diseases other than osteoporosis. *Tunis Med*. 2011;89(6):511-516.
- [20] Wilkinson JM, Little DG. Bisphosphonates in orthopedic applications. *Bone*. 2011;49(1):95-102.
- [21] Ren W, Markel DC. Emerging ideas: can erythromycin reduce the risk of aseptic loosening? *Clin Orthop Relat Res*. 2011; 469(8):2399-2403.
- [22] Ren W, Zhang R, Hawkins M, et al. Efficacy of periprosthetic erythromycin delivery for wear debris-induced inflammation and osteolysis. *Inflamm Res*. 2010;59(12):1091-1097.
- [23] Markel DC, Zhang R, Shi T, et al. Inhibitory effects of erythromycin on wear debris-induced VEGF/Flt-1 gene production and osteolysis. *Inflamm Res*. 2009;58(7):413-421.
- [24] Mereu A, Moriggi E, Napoletano M, et al. Design, synthesis and in vivo activity of 9-(S)-dihydroerythromycin derivatives as potent anti-inflammatory agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006; 16(22):5801-5804.
- [25] Lee YH, Schiemann WP. Fibromodulin suppresses nuclear factor-kappaB activity by inducing the delayed degradation of IKBA via a JNK-dependent pathway coupled to fibroblast apoptosis. *J Biol Chem*. 2011;286(8):6414-6422.
- [26] Lopez-Granados E, Keenan JE, Kinney MC, et al. A novel mutation in NFKBIA/IKBA results in a degradation-resistant N-truncated protein and is associated with ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Hum Mutat*. 2008;29(6): 861-868.