

淫羊藿苷抑制钛颗粒诱导的炎症反应

崔京福, 徐耀增, 朱世军, 朱 锋, 付 稳, 邵洪国, 耿德春(苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215006)

文章亮点:

实验的创新在于首次通过体内外实验证实了淫羊藿苷对钛颗粒诱导的肿瘤坏死因子 α , 白细胞介素 1β 因子表达有抑制作用, 抑制作用在蛋白和 mRNA 水平均有体现, 提示淫羊藿苷有望成为预防和治疗假体无菌性松动的有效药物。

关键词:

生物材料; 材料相容性; 淫羊藿苷; 钛颗粒; 炎症反应; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1β ; 国家自然科学基金

主题词:

钛; 系统性炎症反应综合征; 中草药; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1β

基金资助:

江苏省临床医学科技专项资助项目(BL2012004); 国家自然科学基金资助项目(81101399, 81272018, 81372018); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2011303); 江苏省研究生培养创新工程资助项目(CXZZ13_0835)

摘要

背景: 体外实验表明, 淫羊藿苷可抑制脂多糖诱导的急性肺炎, 其抗炎作用在磨损颗粒存在的条件下是否依然有效?

目的: 通过体内外实验相结合的方法探讨淫羊藿苷对磨损颗粒诱导炎症反应的调控作用。

方法: ①体内实验: 将 80 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组, 钛组和钛+淫羊藿苷组采用钛诱导小鼠颅骨无菌炎症模型, 对照组、淫羊藿苷组也进行相同手术过程, 但不植入钛, 淫羊藿苷组、钛+淫羊藿苷组建模当天灌胃给予淫羊藿苷 200 mg/(kg·d), 对照组、钛组灌胃给予等量的安慰剂, 2 周后酶联免疫吸附实验、定量 RT-PCR 检测肿瘤坏死因子 α , 白细胞介素 1β 蛋白或 mRNA 的表达量。②体外实验: 将小鼠单核/巨噬细胞 RAW264.7 分别与核因子 κB 受体配体、核因子 κB 受体配体+淫羊藿苷、核因子 κB 受体配体+钛颗粒及核因子 κB 受体配体+钛颗粒+淫羊藿苷共培养 72 h, ELISA 检测培养基上清中肿瘤坏死因子 α , 白细胞介素 1β 水平, RT-PCR 分析肿瘤坏死因子 α , 白细胞介素 1β 基因 mRNA 表达。

结果与结论: ①体内实验: 在钛颗粒存在的条件下, 口服淫羊藿苷可明显减少颗粒诱导的炎症细胞浸润, 使炎性增厚的骨膜变薄, 抑制颅骨标本中肿瘤坏死因子 α , 白细胞介素 1β 的表达。②体外实验: 经钛颗粒刺激后, 细胞培养基中肿瘤坏死因子 α , 白细胞介素 1β 质量浓度显著增加, 细胞中相应 mRNA 表达量上调, 而经淫羊藿苷干预后这两种炎症因子在蛋白和基因水平的表达量显著下调。结果表明淫羊藿苷在体内外均可显著抑制钛颗粒诱导的炎症反应。

崔京福, 徐耀增, 朱世军, 朱锋, 付稳, 邵洪国, 耿德春. 淫羊藿苷抑制钛颗粒诱导的炎症反应[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(16):2563-2569.

Icariin inhibits titanium particle-induced inflammatory reaction

Cui Jing-fu, Xu Yao-zeng, Zhu Shi-jun, Zhu Feng, Fu Wen, Shao Hong-guo, Geng De-chun (Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies *in vitro* have suggested that icariin can attenuate lipopolysaccharide (LPS)-induced acute pneumonia. Is the anti-inflammatory effect of icariin still valid in the presence of wear particles?

OBJECTIVE: With studies *in vivo* and *in vitro*, to investigate the regulatory effect of icariin on titanium particle-induced inflammatory reaction.

METHODS: (1) Studies *in vivo*: Eighty male C57BL/6 mice aged 6–8 weeks were randomly divided into four groups: control group, icariin group, titanium particle group, and titanium particle+icariin group. Mice in the titanium particle group and titanium particle+icariin group received surgical procedure, and sterile and endotoxin-free titanium particles were implanted on the calvaria surfaces to induce inflammatory reaction. Mice in the control group and icariin group received the same surgery, but no wear particles were implanted. Then icariin was given orally to mice in the titanium particle group and titanium particle+ icariin group with a dose of 200 mg/kg per day for 2 weeks from the day of modeling. Mice in the control group and icariin group were given orally the same dose of placebo. Two weeks later, tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β at protein and mRNA levels were respectively detected with enzyme-linked immunohistochemical (ELISA) and quantitative real time reverse transcription PCR (qRT-PCR) analysis. (2) Studies *in vitro*: Mouse monocyte/macrophage RAW264.7 cells were

崔京福, 男, 1988 年生, 河南焦作孟州市人, 汉族, 苏州大学附属第一医院在读硕士, 主要从事骨关节外科研究。

通讯作者: 耿德春, 副研究员, 苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215006

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.16.017
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)16-02563-07
稿件接受: 2014-03-10

Cui Jing-fu, Studying for master's degree, Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Geng De-chun, Associate investigator, Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Accepted: 2014-03-10

cultured with different conditioned media: control group, nuclear factor receptor ligand κ B (RANKL); icariin group, RANKL+icariin; titanium particle group, RANKL+titanium particles; titanium particle+icariin group, RANKL+icariin+titanium particles. Titanium particles stimulated RAW264.7 cells were co-cultured with RANKL and icariin for 72 hours. Tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β at protein and mRNA levels in the supernatant were detected with ELISA analysis and qRT-PCR, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Results *in vivo*: icariin treatment obviously decreased titanium particle-induced inflammatory cell infiltration and made the thickness of periosteum thinner, down-regulated tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β expressions at protein and mRNA levels. (2) Results *in vitro*: when RAW264.7 cells were stimulated with titanium particles for 72 hours, tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β expressions at protein and mRNA levels in culture media increased obviously; when icariin was administrated, tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β expressions at protein and mRNA levels down-regulated significantly. These results suggest icariin can obviously suppress titanium particle-induced inflammatory reaction *in vivo* and *in vitro*.

Subject headings: titanium; systemic inflammatory response syndrome; drugs, chinese herbal; tumor necrosis factor-alpha; interleukin-1beta

Funding: the Clinical Medicine Specific Fund of Jiangsu Province, No. BL2012004; the National Natural Science Foundation of China, No. 81101399, 81272018, 81372018; the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2011303; the Innovation Project for Graduate Culture in Jiangsu Province, No. CXZZ13_0835

Cui JF, Xu YZ, Zhu SJ, Zhu F, Fu W, Shao HG, Geng DC. Icariin inhibits titanium particle-induced inflammatory reaction. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(16):2563-2569.

0 引言 Introduction

关节置换是治疗关节疾患的有效方法,它能缓解疼痛,重建关节功能,使关节炎患者从事日常生活。然而随着时间的推移,金属假体和高分子聚乙烯关节面之间的磨损,金属与骨水泥界面及人工关节各部件间的摩擦产生磨损颗粒,这些微粒释放并进入关节腔隙及周围滑膜组织,引起无菌性炎症和骨溶解,最终导致假体松动^[1-3],而磨损颗粒引起的无菌性炎症是这一病理过程的重要环节^[4-5]。

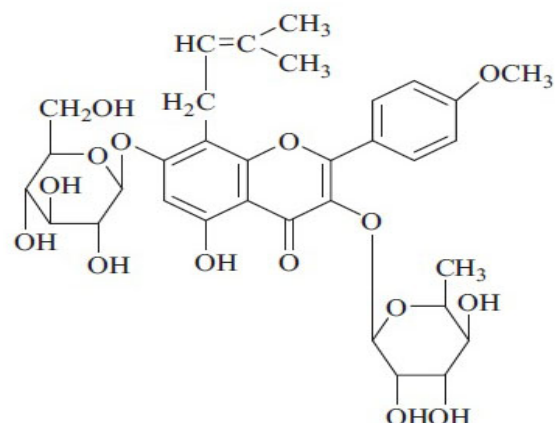
磨损颗粒可分为多种,包括聚乙烯颗粒、骨水泥颗粒、氧化铝陶瓷颗粒、金属颗粒(钴铬钼,钛,钛铝钒)等。不同数量、大小、组成及理化性质的磨损颗粒对炎症反应及假体松动的影响不同,磨损颗粒的性质与关节假体材料密切相关。人工关节置换领域,目前应用比较广泛的假体有钴基合金、纯钛及钛合金假体等。钛以其稳定的化学性质,良好的生物相容性,优良的抗腐蚀性等特性成为制造关节假体的优良材料。与钴、铬、钼等金属相比,钛合金的弹性模量低,与人体骨骼的弹性模量相近,在作为人工关节假体材料时能够将应力遮挡效应引起的不正常骨吸收最小化,进一步增加骨-假体界面的力学稳定性。虽然钛合金关节假体存在着不少问题,如:表面的致密二氧化钛层在体内不能诱导磷酸盐沉积,生物活性差;钛合金与骨之间的机械结合牢度差等,但钛合金表面改性技术的应用显著改善了这一状况,通过物理技术在钛合金表面产生羟基磷灰石涂层,提高了钛合金假体的性能,同时,由无毒元素组成的新型低模量 β -型钛合金假体 $Ti_{35}Nb_2Ta_3Zr$ 的研究使得钛合金关节假体在生物相容性和力学性能上的提升成为可能。虽然钛合金关节假体具有优良的生物学特性,但假体关节面之间的微动和摩擦必然产生磨损颗粒,钛颗粒诱导的无菌性炎症和假体松动同样不可避免。

钛颗粒刺激假体周围发生慢性肉芽肿性炎症反应,慢性炎症刺激使假体与骨之间形成炎性界膜,钛颗粒长期刺

激界膜组织中的成骨细胞、破骨细胞、巨噬细胞、T淋巴细胞、成纤维细胞,使其释放大量溶骨炎性递质及趋化因子^[6],导致无菌性炎症和骨溶解骨溶解,最终诱发关节假体无菌性松动。研究表明,人工关节置换术后15-20年中,10%-15%的人工关节将发生假体失效,超过66%的髋关节翻修和近50%的膝关节翻修由无菌性松动引起^[7]。因此,通过药物疗法预防和治疗假体周围骨溶解和无菌性松动成为研究的热点,而抑制钛颗粒诱导的炎症反应成为重要的途径^[8-9]。

淫羊藿苷(相对分子质量676.67)是从中国传统中药淫羊藿中分离的主要活性成分,研究证明其对骨骼系统具有广泛而有益的效果。据报道,淫羊藿苷可调节成骨细胞增殖,提高碱性磷酸酶活性,促进I型胶原表达;同时还可抑制破骨细胞的分化和形成^[10],促进干细胞成骨分化^[11-12];动物实验表明,淫羊藿苷对切除卵巢的小鼠表现出抗骨质疏松作用^[13-14]。体外实验表明,淫羊藿苷可抑制脂多糖诱导的急性炎症反应^[15],但对磨损颗粒存在环境下炎症反应的影响却鲜有报道。实验旨在探讨淫羊藿苷对钛颗粒诱导炎症反应的干预作用。

淫羊藿苷分子结构式:



1 材料和方法 Materials and methods

设计: 动物体内观察实验及体外细胞培养实验。

时间及地点: 于2012年6月至2013年5月在苏州大学附属第一医院骨科研究所完成。

材料:

实验动物: 80只6-8周龄健康雄性C57Bl/J6小鼠, 由苏州大学动物实验中心提供, 许可证号: SYXK(苏)2012-0045, 平均体质量(20.8±2.1)g, 随机分为对照组、淫羊藿苷组、钛颗粒组与钛+淫羊藿苷组。

淫羊藿苷抑制钛颗粒诱导的炎症反应实验所用主要材料、试剂和仪器:

材料、试剂及仪器	来源
淫羊藿苷、二甲基亚砷	美国 sigma 公司
钛颗粒	美国 Johnson Matthey 公司
核因子 κB 受体配体	美国 R&D 公司
ELISA 试剂盒	美国 BioLegend 公司
α-MEM 培养基、Megafuge 1.0R 离心机	美国 Thermo 公司
胎牛血清	杭州四季青公司
小鼠单核/巨噬细胞系 RAW264.7 细胞 (ATCC 号: TIB-71)	上海生物科学研究所
RNA 提取试剂盒	日本 TaKaRa 公司
青、链霉素	华北制药股份有限公司
内毒素检测鲎试剂盒	厦门鲎试剂实验厂有限公司
PCR 扩增仪	美国 Bio-rad 公司

实验方法:

体内实验:

小鼠颅骨无菌炎症的诱导: 钛组和钛+淫羊藿苷组小鼠按以下方法建立钛颗粒诱导的无菌炎症模型: 小鼠称质量后按50 mg/kg剂量行戊巴比妥腹腔注射麻醉, 麻醉成功后置于无菌条件下, 于颅顶正中切开皮肤, 切口始于两耳正中, 纵向前方延伸长约1 cm, 分离暴露颅骨外骨膜, 清除骨膜至冠、矢状缝及人字缝清晰可见。将5 mg无菌去内毒素的钛颗粒均匀放置于小鼠颅骨表面上, 最后, 用4-0非吸收编织丝线间断缝合皮肤以防止颗粒外露, 轻轻按压小鼠头部使钛分布均匀。对照组、淫羊藿苷组小鼠接受相同的手术步骤行头皮切开、暴露骨面及间断缝合, 但无钛颗粒植入作为对照。术后小鼠送返动物房, 保暖苏醒后淫羊藿苷组和钛+淫羊藿苷组小鼠行200 mg/(kg·d)淫羊藿苷灌胃治疗, 对照组、钛组小鼠予以200 mg/(kg·d)安慰剂(淀粉)灌胃治疗。2周后所有小鼠过量麻醉处死, 取颅骨标本备用, 在二维断层上以冠、矢状缝和人字缝交点为中心选中直径为5 mm的圆形“感兴趣区域”作为研究区域。

苏木精-伊红染色: 将颅骨标本置于4 °C、40 g/L多聚甲醛中固定7 d, 经10%乙二胺四乙酸脱钙30 d后石蜡包埋。厚度4.0-5.0 μm的标本切片置于载玻片上脱蜡, 脱水, 常规苏木精-伊红染色, 二甲苯透明, 中性树胶封固。

酶联免疫吸附(ELISA)检测颅骨标本炎症因子: 新鲜颅骨标本剪切称质量后, 置于血清含量为10 mL/g的α-MEM培养基中, 在含体积分数5%二氧化碳的培养箱中培养72 h后收集上清液, 小鼠特异性ELISA试剂盒检测上清液中肿瘤坏死因子α, 白细胞介素1β含量。分析405 nm波长下各组吸光度值并与标准浓度相比较。

总 mRNA 提取和实时定量反转录-聚合酶链反应(QRT-PCR): 新鲜颅骨标本经剪切称质量后保留“感兴趣区域”, 使用Trizol试剂按操作说明分别从颅骨及各组细胞中提取总 mRNA, 2 μg纯化的总 RNA, 经RNase-free Dnase I处理后在25 μL反应体系中进行反转录, 利用和SYBR染料预混好的extaq酶在PCR扩增仪上进RT-PCR, 扩增肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为管家基因, 校正每个样品Ct值。肿瘤坏死因子α, 上游引物: 5'-CCC AGA CCC TCA CAC TCA GAT-3', 下游引物: 5'-TGG GCT ACA GGC TTG TCA CT-3'; 白细胞介素1β, 上游引物: 5'-TCC TGA ACT CAA CTG TGA AAT GC-3', 下游引物: 5'-CTT CAT CTT TTG GGG TCC GT-3'; 每组检测独立进行3次以确保结果的客观性。将每组基因的mRNA值与相应参照基因比对后标准化, 为了便于比较将对照组基因mRNA含量定为1。

体外实验:

细胞培养: 将小鼠单核/巨噬细胞株RAW264.7细胞以 1.25×10^4 /孔接种于6孔板中, 分4组培养: 对照组以含70 μg/L核因子κB受体配体的α-MEM培养基培养, 淫羊藿苷组以含70 μg/L核因子κB受体配体、 10^{-7} mol/L淫羊藿苷的α-MEM培养基培养, 钛组以含70 μg/L核因子κB受体配体、0.1 g/L钛颗粒的α-MEM培养基培养, 钛+淫羊藿苷组以含70 μg/L核因子κB受体配体、0.1 g/L钛颗粒、 10^{-7} mol/L淫羊藿苷的α-MEM培养基培养。除此之外, 各组培养基中另含体积分数10%胎牛血清、100 U/mL青、链霉素。所有组别培养72 h后做炎症因子检测。

将钛颗粒用体积分数70%乙醇浸泡48 h去除内毒素, PBS冲洗3次后在180 °C烤箱中烘烤6 h, 通过商业鲎试剂盒检测钛颗粒内毒素水平低于0.1 EU/mL。将灭菌去内毒素的钛颗粒悬浮在α-MEM培养基中进行超声处理和涡旋振荡, 之后与RAW264.7细胞共同培养。所用钛颗粒质量浓度为0.1 g/L, 研究表明这个质量浓度与假体周围组织中存在的钛颗粒质量浓度相似^[16-17]。将淫羊藿苷溶解在二甲基亚砷中, 用α-MEM稀释为 10^{-7} mol/L后用0.22 μmol/L的滤器除菌。溶解有淫羊藿苷的无菌α-MEM用来配制淫羊藿苷组及钛+淫羊藿苷组条件培养基。

RAW264.7细胞炎症因子检测: 收集各组培养基上清液, 4 °C 2 000 r/min下离心5 min, 离心半径20 cm, 去除钛颗粒, 取上清液100 μL加入到覆盖有抗肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β单克隆抗体的96孔板中, 37 °C孵育90 min, 再加入100 μL酶标二抗, 37 °C反应120 min; TBS

洗涤3次, 加入200 μ L底物溶液37 $^{\circ}$ C反应30 min, 酶标仪上450 nm测定A值。根据标准品A值得出目标因子浓度。

RAW264.7细胞RNA提取和实时定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR): 利用RT-PCR法分析不同处理组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 基因表达水平。操作简述如下: 使用Trizol试剂从RAW264.7细胞中提取总RNA, 根据制造商的说明, 2 μ g纯化总RNA经RNase-free DNase I处理后, 在20 μ L反应体系中进行反转录, 利用和SYBR染料预混好的extaq酶在PCR扩增仪上进行RT-PCR, 管家基因GAPDH作为参照基因。每组细胞独立检测3次以确保结果的客观性。根据Livak等^[18]描述的方法将每组基因的mRNA值与相应参照基因比对后标准化。

主要观察指标: 体内外实验中, 各组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 的表达。

统计学分析: 使用SPSS 17.0软件做Student's-*t* 检验或one-way方差分析检测组间统计学差异。 $P < 0.05$ 被认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 体内实验结果

2.1.1 实验动物一般情况 术后各组小鼠均在1 h内苏醒并自由活动, 正常进食, 精神状态佳。实验期间小鼠切口愈合佳, 无红肿、渗液等不良反应。实验过程中无动物死亡。

2.1.2 淫羊藿苷抑制钛颗粒诱导的炎性细胞浸润 苏木精-伊红染色显示对照组和淫羊藿苷组小鼠颅骨骨膜内细胞总量较少, 成纤维细胞较多, 炎性细胞较少, 骨膜较薄; 与对照组相比, 钛组小鼠颅骨骨膜增厚明显, 骨膜内可见大量细胞浸润, 炎性细胞居多, 成纤维细胞较少, 经淫羊藿苷后情况有所好转(图1)。Paint.NET软件测量结果表明对照组、淫羊藿苷组、钛组、钛+淫羊藿苷组颅骨骨膜厚度分别为(0.07 \pm 0.01), (0.06 \pm 0.01), (0.28 \pm 0.04), (0.12 \pm 0.02) mm。钛组与对照组颅骨骨膜厚度比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 说明钛颗粒的刺激使骨膜炎性增厚明显; 钛+淫羊藿苷组与钛组颅骨骨膜厚度相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 说明淫羊藿苷治疗后炎性增厚的骨膜显著变薄; 对照组及淫羊藿苷组骨膜厚度相比差异无显著性意义($P > 0.05$); 淫羊藿苷组与钛+淫羊藿苷组颅骨骨膜厚度相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 这表明淫羊藿苷未能完全抑制钛颗粒诱导的炎症反应。

2.1.3 淫羊藿苷下调肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 基因mRNA表达 设定对照组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β mRNA表达量为1, 钛组中二者表达量分别升至7.6 \pm 0.6和9.8 \pm 0.9, 两组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 这表明钛颗粒显著上调肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 基因转录水平, 钛颗粒的炎症诱导作用在基因层面表现明显; 钛+淫羊藿苷组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β mRNA表达量分别降至2.4 \pm 0.2和2.1 \pm 0.2, 与钛组相比差异有显著性意义($P <$

0.05), 这表明淫羊藿苷抑制肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 释放的机制涉及mRNA水平下调, 这从基因层面解释了ELISA检测结果; 淫羊藿苷组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 基因mRNA表达量分别为0.8 \pm 0.1和0.8 \pm 0.1, 与对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$), 这表明对于正常小鼠淫羊藿苷不能抑制肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 基因表达量(图2A)。

2.1.4 淫羊藿苷抑制肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 蛋白的释放 对照组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 蛋白质量浓度分别为(237.1 \pm 37.4) ng/L和(133.8 \pm 19.6) ng/L; 钛颗粒植入后, 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 质量浓度在钛组增长明显, 分别达到(1447.8 \pm 78.2) ng/L和(889.2 \pm 45.9) ng/L, 与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 这说明植入的钛颗粒刺激骨组织释放过量的炎症因子; 钛+淫羊藿苷组经淫羊藿苷口服治疗后肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 蛋白质量浓度下降至(568.8 \pm 42.3) ng/L和(279.3 \pm 19.4) ng/L, 与钛组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 这表明淫羊藿苷可显著抑制钛颗粒引起的骨组织炎症因子释放; 但与淫羊藿苷组相比, 钛+淫羊藿苷组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 蛋白质量浓度仍偏高($P < 0.05$), 这表明淫羊藿苷的抑制作用是有限的, 只是部分削弱了钛颗粒诱导的炎症因子释放但未能彻底消除, 尽管抑制作用是不完全的, 但炎症因子浓度的减少有利于局部反应的缓解和炎症细胞浸润减少, 这与苏木精-伊红染色结果相一致; 淫羊藿苷组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 蛋白质量浓度分别为(99.0 \pm 26.2) ng/L和(96.0 \pm 13.9) ng/L, 与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 这表明在无钛颗粒刺激的情况下, 淫羊藿苷对正常小鼠肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 炎症因子释放无明显抑制作用(图2B)。

2.2 体外细胞培养实验结果

2.2.1 淫羊藿苷下调钛颗粒诱导的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β mRNA表达 设定对照组RAW264.7细胞中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β mRNA表达量均为1。钛组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 基因转录量分别为4.1 \pm 1.0和10.1 \pm 2.0, 与对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 说明钛颗粒显著上调RAW264.7细胞中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 基因表达量; 钛+淫羊藿苷组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β mRNA表达量下调至2.1 \pm 0.8和7.0 \pm 1.2, 与钛组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 说明淫羊藿苷显著抑制钛颗粒诱导的炎症因子基因表达量; 淫羊藿苷组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β mRNA表达量分别为0.9 \pm 0.1和0.9 \pm 0.1, 与对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$), 这表明无钛颗粒刺激的环境下, 淫羊藿苷对RAW264.7细胞肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 基因表达量无明显影响, 这与体内PCR结果相一致; 与淫羊藿苷组相比, 钛+淫羊藿苷组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β mRNA水平均显著上调($P < 0.05$), 这表明钛颗粒刺激环境下淫羊藿苷对炎症因子抑制作用的不完全性(图3A)。

2.2.2 淫羊藿苷抑制钛颗粒诱导的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白释放 对照组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白水平分别为(79.0 \pm 12.8) ng/L和(66.0 \pm 7.8) ng/L。钛组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白水平为(259.4 \pm 17.1) ng/L和(265.8 \pm 14.2) ng/L, 与对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 说明钛颗粒刺激后炎症因子浓度上升明显; 钛+淫羊藿苷组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白水平分别为(147.2 \pm 17.1) ng/L和(132.1 \pm 9.2) ng/L, 与钛组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 说明淫羊藿苷干预可显著降低钛颗粒诱导的炎症因子释放; 淫羊藿苷组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白水平分别为(56.0 \pm 9.6) ng/L和(47.0 \pm 6.3) ng/L, 与对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$), 这说明淫羊藿苷对正常RAW264.7细胞炎症因子释放无明显抑制作用, 这一结果与体内ELISA分析结果一致(图3B)。

3 讨论 Discussion

骨代谢包括骨形成和骨吸收的动态平衡, 以及对成骨细胞的精确调控过程。在人工关节无菌性松动的病理过程中, 假体表面相互摩擦产生的磨损微粒扰乱了这种动态平衡, 导致炎症性骨吸收及假体无菌性松动的发生^[19-21]。这些微粒与巨噬细胞相接触时, 巨噬细胞将其吞入但不能消化, 不断的吞噬作用导致巨噬细胞分泌高浓度的促炎性细胞因子, 如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β ^[22-23]。炎症因子直接或间接刺激破骨细胞活性增强和骨溶解的发生^[24]。因此, 磨损颗粒诱导的无菌性炎症在假体周围骨溶解的发生和发展中扮演重要角色^[25], 抑制无菌性炎症反应成为药物治疗假体周围骨溶解的重要环节^[26]。

在磨损颗粒诱导释放的众多递质中, 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 是引起骨溶解的主要炎症因子并在假体周围组织中过量表达^[27-29]。肿瘤坏死因子 α 主要由单核巨噬细胞系统产生, 是一种强有力的促炎症细胞因子, 作为炎症反应的枢纽, 可以诱导白细胞介素 1β 、白细胞介素6等协同因子的释放, 对炎症反应具有明显促进作用。肿瘤坏死因子 α 通过促进破骨前体细胞增殖和分化引起骨溶解, 即使在核因子 κB 受体配体缺乏的情况下, 肿瘤坏死因子 α 的破骨诱导作用仍然存在。相似的巨噬细胞的自分泌作用会使局部白细胞介素 1β 浓度增高, 白细胞介素 1β 可直接引起成熟破骨细胞聚集, 也可通过核因子 κB 受体配体/核因子 κB 受体交联对破骨前体细胞产生诱导分化作用。有研究通过将携带白细胞介素受体拮抗剂基因的反转录病毒转染小鼠后, 发现其可明显降低小鼠核因子 κB 受体的水平, 证实了白细胞介素1受体拮抗剂可有效预防骨溶解, 由此说明了白细胞介素1与骨溶解的密切关系^[30]。骨溶解发生前, 周围滑膜液中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 的表达量显著上调, 高浓度的肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 引起巨噬细胞聚集和破骨细胞活化, 导致骨溶解发生。研究证实降低肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 的表达能够抑制磨损颗粒引起的

炎症反应, 以及破骨细胞介导的骨溶解效应。因此, 在防治颗粒诱导骨溶解的众多研究中, 抑制炎症因子如肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 释放量成为重要的环节。

目前用于抗炎及抑制骨溶解的药物很多, 如肿瘤坏死因子 α 拮抗剂、环氧化酶抑制剂等都能够抑制磨损颗粒诱导巨噬细胞炎症因子的释放, 减少破骨细胞性骨吸收; 二磷酸盐类药物不仅抑制破骨细胞性骨吸收, 还可以阻断甲羟戊酸途径诱导破骨细胞凋亡、抑制破骨细胞分化, 同时还可促进成骨的分化和成熟; 他汀类药物不但能刺激骨形成, 而且对骨吸收及改建也有影响, 它参与调控骨代谢的整个过程, 从而增加骨生成量及骨质强度。但这些化学药物对肝肾系统的不良反应使其临床应用受到限制; 淫羊藿苷为植物类天然化合物, 将其应用于预防和治疗磨损颗粒诱导的炎症反应将更加安全可靠。

淫羊藿是小檗科淫羊藿属植物, 具有补肾壮阳、强筋健骨、祛风除湿的功效, 其有效成分淫羊藿苷在心脑血管系统、骨代谢、免疫系统、神经系统、性功能及肿瘤治疗等方面均有广泛的药理作用。对骨骼系统, 淫羊藿苷的抗骨质疏松效果包括促进成骨细胞形成和抑制破骨细胞分化两个方面, 在去卵巢骨质疏松小鼠模型中, 淫羊藿苷通过加强骨形成和减少骨吸收改善骨代谢, 提高松质骨质量, 产生抗骨质疏松作用。体外研究进一步揭示, 淫羊藿苷对成骨细胞的促进作用通过雌激素受体介导的ERK和JNK信号通路实现^[31], 淫羊藿苷作用后, 成骨细胞中BMP-2、SMAD4、Cbfa1表达和NO合成量增加^[32], 而这有助于成骨细胞增殖、分化和钙质沉淀。淫羊藿苷对破骨细胞的抑制作用也是明显的, p38和JNK通路对破骨细胞活化起重要作用, 而淫羊藿苷通过抑制p38和JNK通路的活化及诱导破骨细胞凋亡, 显著削弱破骨细胞蚀骨能力, 减少骨溶解。同时, 淫羊藿苷可以上调OPG/核因子 κB 受体配体比例抑制骨吸收。研究发现在无磨损颗粒存在的环境中, 淫羊藿苷具有抑制肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6 mRNA表达和促进转化生长因子 $\beta 1$ mRNA表达的作用; 同时, 淫羊藿苷可以提高大鼠股骨骨密度, 而不升高血清雌激素水平, 推测淫羊藿苷的作用机制可能与阻断某些细胞因子如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6的表达有关。有学者指出淫羊藿苷通过干预巨噬细胞ERK信号转导途径调控肿瘤坏死因子 α 释放量, 进而缓解局部炎症反应。

实验通过体内模拟无菌性炎症的发生及体外细胞培养实验, 检测淫羊藿苷对磨损颗粒诱导炎症反应的抑制效果。结果表明, 钛颗粒引起小鼠颅骨骨膜炎症增厚, 炎症细胞浸润明显, 肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 蛋白浓度增加, mRNA水平上调显著; 淫羊藿苷口服治疗2周后, 炎症增厚的骨膜变薄, 炎症细胞浸润减少, 两种炎症因子浓度下降明显, 相应的mRNA转录量下调, 虽然肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 蛋白浓度未降至对照组水平, 但抗炎作用是明显的。体外细胞培养结果表明, 经钛颗粒刺激后的RAW264.7

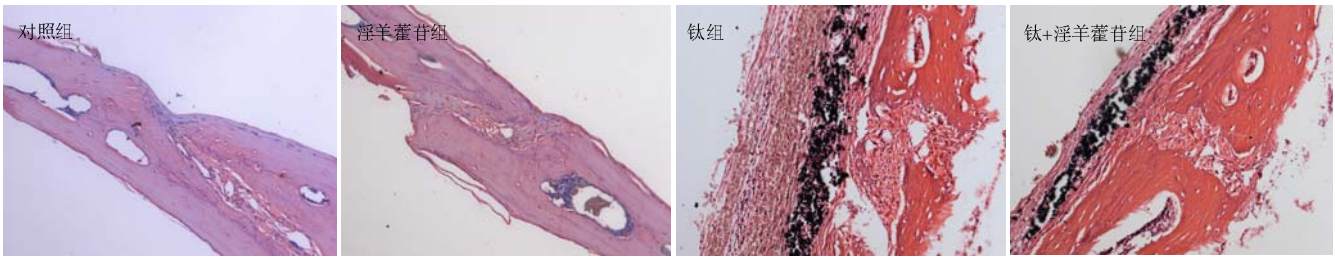


图 1 经不同方法干预 2 周后的小鼠颅骨切片(苏木精-伊红染色, ×200)

Figure 1 Murine calvaria samples after 2 weeks of different interventions (hematoxylin-eosin staining, ×200)

图注: ①钛组和钛+淫羊藿苷组采用钛诱导小鼠颅骨无菌炎症模型, 对照组、淫羊藿苷组也进行相同手术过程, 但不植入钛, 淫羊藿苷组、钛+淫羊藿苷组建模当天灌胃给予 200 mg/(kg·d), 对照组、钛组灌胃给予等量的安慰剂。②对照组与淫羊藿苷组骨膜较薄, 炎症反应轻微; 与对照组及淫羊藿苷组相比, 钛组小鼠颅骨骨膜增厚, 炎症细胞浸润明显, 经淫羊藿苷治疗后骨膜厚度变薄, 炎症反应减轻。

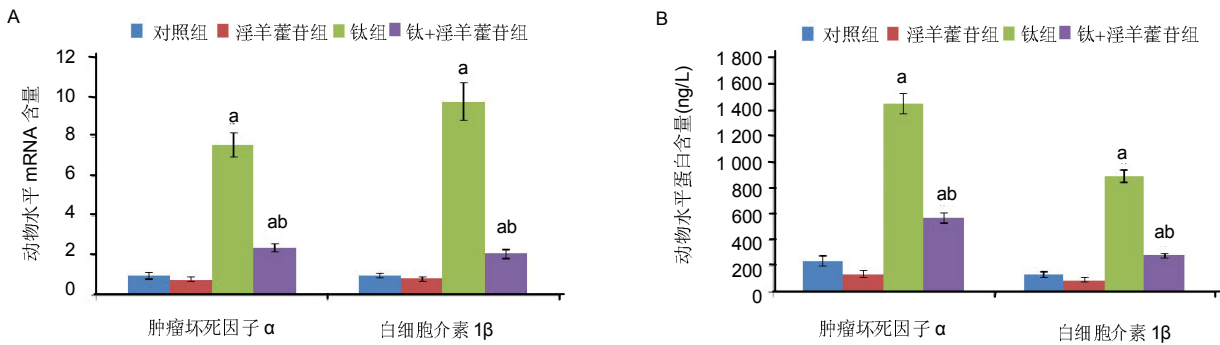


图 2 经不同方法干预 2 周后的小鼠颅骨标本炎症因子检测

Figure 2 Detection of inflammatory factors after 2 weeks of different interventions

图注: ①钛组和钛+淫羊藿苷组采用钛诱导小鼠颅骨无菌炎症模型, 对照组、淫羊藿苷组也进行相同手术过程, 但不植入钛, 淫羊藿苷组、钛+淫羊藿苷组建模当天灌胃给予 200 mg/(kg·d), 对照组、钛组灌胃给予等量的安慰剂。②与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与钛组比较, ^b $P < 0.05$ 。③植入的钛颗粒刺激骨组织释放过量炎症因子, 加入淫羊藿苷治疗可显著抑制钛颗粒引起的骨组织炎症因子释放, 但抑制作用是有限的, 只是部分削弱了钛颗粒诱导的炎症因子释放但未能彻底消除; 在无钛颗粒刺激的情况下, 淫羊藿苷对正常小鼠肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 炎症因子释放无明显抑制作用。

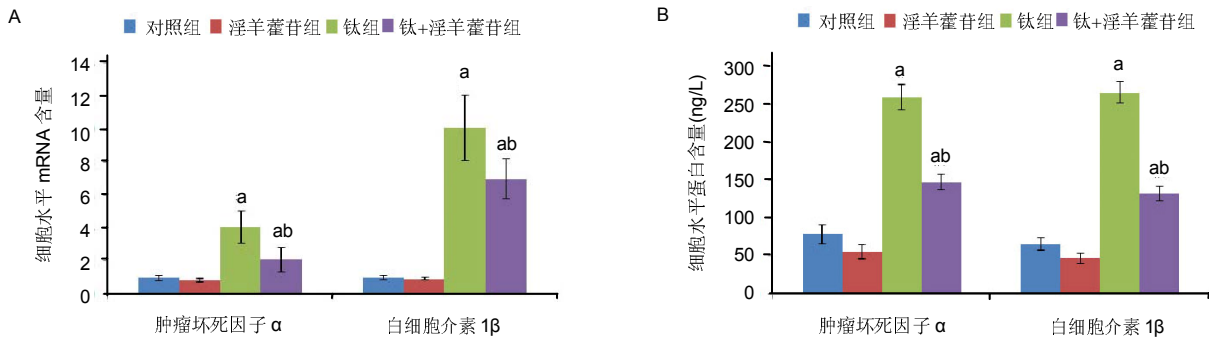


图 3 以不同培养基培养 RAW264.7 细胞 72 h 后的细胞炎症因子检测

Figure 3 Detection of inflammatory factors of RAW264.7 cells cultured in different media for 72 hours

图注: ①对照组以含 70 $\mu\text{g/L}$ 核因子 κB 受体配体的 $\alpha\text{-MEM}$ 培养基培养, 淫羊藿苷组以含 70 $\mu\text{g/L}$ 核因子 κB 受体配体、 10^{-7} mol/L 淫羊藿苷的 $\alpha\text{-MEM}$ 培养基培养, 钛组以含 70 $\mu\text{g/L}$ 核因子 κB 受体配体、0.1 g/L 钛颗粒的 $\alpha\text{-MEM}$ 培养基培养, 钛+淫羊藿苷组以含 70 $\mu\text{g/L}$ 核因子 κB 受体配体、0.1 g/L 钛颗粒、 10^{-7} mol/L 淫羊藿苷的 $\alpha\text{-MEM}$ 培养基培养。②与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与钛组比较, ^b $P < 0.05$ 。③钛颗粒可刺激炎症因子的表达, 淫羊藿苷干预后可显著降低钛颗粒诱导的炎症因子释放($P < 0.05$), 但钛颗粒刺激环境下淫羊藿苷对炎症因子的抑制作用不完全; 淫羊藿苷对正常 RAW264.7 细胞炎症因子释放无明显抑制作用。

细胞培养基中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 浓度显著增加, 细胞中mRNA表达量上调, 而淫羊藿苷口服干预后这两种炎性因子表达量在蛋白和基因水平显著下调, 差异有显著性意义。上述结果提示淫羊藿苷通过下调炎性因子肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 的表达抑制无菌性炎症反应的发生。

体外实验已经证实, 淫羊藿苷可以抑制破骨细胞的分化及炎症因子的释放, 对骨代谢有促进作用, 试验表明,

在钛颗粒存在的条件下, 淫羊藿苷的抗炎作用仍然存在, 因此, 通过抑制局部炎症反应, 淫羊藿苷有望成为预防和治疗假体无菌性松动的有效药物。

作者贡献: 崔京福、耿德春进行实验设计, 实验实施为崔京福、朱世军, 实验评估为徐耀增, 资料收集为朱峰, 崔京福成文, 耿德春、徐耀增审核, 崔京福对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物处置方法符合科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

学术术语: 无菌性炎症-是人体发生机体障碍疾病和顽固疼痛的部位没有细菌感染, 病理检查和组织切片找不到任何微生物侵害的迹象, 从病理变化上来看是无菌性的, 没有病原菌的炎症, 因而抗生素治疗无效。

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] Wooley PH, Schwarz EM. Aseptic loosening. *Gene Ther.* 2004; 11(4):402-407.
- [2] Holt G, Murnaghan C, Reilly J, et al. The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res.* 2007; 460:240-252.
- [3] Rao AJ, Gibon E, Ma T, et al. Revision joint replacement, wear particles, and macrophage polarization. *Acta Biomater.* 2012; 8: 2815-2823.
- [4] Goodman SB, Ma T, Chiu R, et al. Effects of orthopaedic wear particles on osteoprogenitor cells. *Biomaterials.* 2006; 27: 6096-6101.
- [5] Rao AJ, Nich C, Dhulipala LS, et al. Local effect of IL-4 delivery on polyethylene particle induced osteolysis in the murine calvarium. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101:1926-1934.
- [6] Holt G, Murnaghan C, Reilly J, et al. The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res.* 2007; 460:240-252.
- [7] Sundfeldt M, Carlsson LV, Johansson CB, et al. Aseptic loosening, not only a question of wear: A review of different theories. *Acta Orthop.* 2006; 77(2):177-197.
- [8] Schwarz EM, Campbell D, Totterman S, et al. Use of volumetric computerized tomography as a primary outcome measure to evaluate drug efficacy in the prevention of peri-prosthetic osteolysis: a 1-year clinical pilot of etanercept vs. placebo. *J Orthop Res.* 2003; 21:1049-1055.
- [9] Shanbhag AS. Use of bisphosphonates to improve the durability of total joint replacements. *J Am Acad Orthop Surg.* 2006; 14:215-225.
- [10] Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, et al. Icaritin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF- κ β regulated HIF-1 α and PGE2 synthesis. *Phytomedicine.* 2011; 18:176-185.
- [11] Zhao J, Ohba S, Shinkai M, et al. Icaritin induces osteogenic differentiation in vitro in a BMP- and Runx2-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 369(2): 444-448.
- [12] Zhang JF, Li G, Meng CL, et al. Total flavonoids of *Herba Epimedii* improves osteogenesis and inhibits osteoclastogenesis of human mesenchymal stem cells. *Phytomedicine.* 2009; 16(6-7):521-529.
- [13] Nian H, Ma MH, Nian SS, et al. Antiosteoporotic activity of icaritin in ovariectomized rats. *Phytomedicine.* 2009; 16:320-326.
- [14] Peng S, Zhang G, Zhang BT, et al. The beneficial effect of Icaritin on osteoporotic bone is dependent on the treatment initiation timing in adult ovariectomized rats. *Bone.* 2013; 55(1):230-240.
- [15] Xu CQ, Liu BJ, Wu JF, et al. Icaritin attenuates LPS-induced acute inflammatory responses: involvement of PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2010; 642: 146-153.
- [16] von Knoch M, Jewison DE, Sibonga JD, et al. The effectiveness of polyethylene versus titanium particles in inducing osteolysis in vivo. *J Orthop Res.* 2004; 22(2):237-43.
- [17] Lee SS, Woo CH, Chang JD, et al. Roles of Rac and cytosolic phospholipase A2 in the intracellular signalling in response to titanium particles. *Cell Signal.* 2003; 15(3):339-345.
- [18] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(-Delta Delta C_T) Method. *Methods.* 2001; 25:402-408.
- [19] Wooley PH, Morren R, Andary J, et al. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch. *Biomaterials.* 2002; 23:517-526.
- [20] Geng D, Mao H, Wang J, et al. Protective effects of COX-2 inhibitor on titanium particle induced inflammatory osteolysis via the down-regulation of RANK/RANKL. *Acta Biomater.* 2011; 7:3216-3221.
- [21] Geng DC, Xu YZ, Yang HL, et al. Inhibition of titanium particle-induced inflammatory osteolysis through inactivation of cannabinoid receptor 2 by AM630. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 95:321-326.
- [22] Bi Y, Seabold JM, Kaar SG, et al. Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 2082-2091.
- [23] Holding CA, Findlay DM, Stamenkov R, et al. The correlation of RANK, RANKL and TNF α expression with bone loss volume and polyethylene wear debris around hip implants. *Biomaterials.* 2006; 27:5212-5219.
- [24] Hamlet S, Ivanovski S. Inflammatory cytokine response to titanium chemical composition and nanoscale calcium phosphate surface modification. *Acta Biomater.* 2011; 7: 2345-2353.
- [25] Rao AJ, Nich C, Dhulipala LS, et al. Local effect of IL-4 delivery on polyethylene particle induced osteolysis in the murine calvarium. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101: 1926-1934.
- [26] Geng DC, Zhu XS, Mao HQ, et al. Protection against titanium particle-induced osteoclastogenesis by Cyclooxygenase-2 selective inhibitor. *J Biomed Mater Res A.* 2011; 99A: 516-522.
- [27] Taki N, Tatsoi JM, Lowe R, et al. Comparison of the roles of IL-1, IL-6, and TNF α in cell culture and murine models of aseptic loosening. *Bone.* 2007; 40:1276-1283.
- [28] Holding CA, Findlay DM, Stamenkov R, et al. The correlation of RANK, RANKL and TNF α expression with bone loss volume and polyethylene wear debris around hip implants. *Biomaterials.* 2006; 27:5212-5219.
- [29] 赵旭红, 伍骥, 李松林, 等. 全膝关节置换假体松动时滑膜液中的诊断性标志物[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(26):4782-4788.
- [30] Hirakawa K, Jacobs JJ, Urban R, et al. Mechanisms of failure of total hip replacements: lessons learned from retrieval studies. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; 420:10-17.
- [31] Song L, Zhao J, Zhang X, et al. Icaritin induces osteoblast proliferation, differentiation and mineralization through estrogen receptor-mediated ERK and JNK signal activation. *Eur J Pharmacol.* 2013; 714(1-3):15-22.
- [32] Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, et al. Icaritin isolated from *Epimedium pubescens* regulates osteoblast anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa1 expression. *Phytomedicine.* 2010; 17(6):414-423.