

水甘草碱抑制破骨细胞活化缓解磨损颗粒诱导的炎性骨溶解

张巍, 俞磊, 杨鹏, 耿德春

<https://doi.org/10.12307/2024.317>

投稿日期: 2023-03-24

采用日期: 2023-05-15

修回日期: 2023-06-14

在线日期: 2023-07-01

中图分类号:

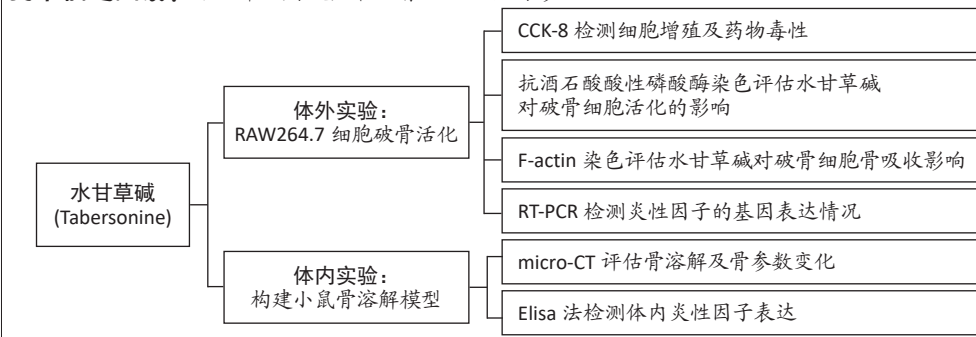
R459.9; R336; R684

文章编号:

2095-4344(2024)10-01519-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 水甘草碱对炎症和破骨细胞活化的影响



文题释义:

水甘草碱: 一种从菊科长春花中提取的吲哚类生物碱, 具有抗炎、抗菌、抗肿瘤的生物活性, 已在神经系统、呼吸系统等多领域开发运用。

假体周围骨溶解: 全关节置换术是严重关节损伤及关节疾病终末期的有效外科干预措施, 由于术后假体/假体或者假体/骨组织间长期磨损, 产生纳米、微米级别的磨损颗粒, 磨损颗粒募集巨噬细胞, 并被其吞噬, 触发炎症因子风暴, 骨微环境中炎症因子浸润导致成骨-破骨偶联失衡, 阻碍假体骨界面整合。

摘要

背景: 水甘草碱因其抗炎生物活性在心肌重塑、急性肾损伤和肺损伤等疾病中表现出良好的治疗作用。假体磨损颗粒常引发无菌性炎症, 炎症因子的大量释放进一步导致了假体周围骨质的破坏和骨量丢失, 然而目前尚无水甘草碱对假体周围骨溶解确切疗效的基础研究。

目的: 探讨水甘草碱对破骨细胞活化、炎症因子表达及磨损颗粒诱导炎性骨溶解的影响。

方法: ①细胞实验: 将RAW264.7细胞分4组培养: 对照组细胞加入完全培养基; 破骨诱导组加入破骨诱导培养基(含50 ng/mL RANKL的完全培养基); 水甘草碱低、高剂量组分别加入1, 5 μ mol/L水甘草碱处理4 h后加入破骨诱导培养基。破骨诱导5 d后, 分别进行抗酒石酸性磷酸酶染色、F-actin染色及RT-PCR检测。②动物实验: 采用随机数字表法将20只C57BL/6J小鼠随机分为假手术组、骨溶解组、水甘草碱低及高剂量组, 每组5只。骨溶解组、水甘草碱低及高剂量组通过将钛颗粒注射至颅骨表面的方法建立颅骨骨溶解模型, 造模后第2天, 水甘草碱低、高剂量组分别腹腔注射10, 20 mg/kg水甘草碱, 每隔1 d注射1次, 直至造模2周后, 收集小鼠动脉血血清进行炎症因子(白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α)检测, 收集颅骨进行micro-CT扫描和骨参数分析。

结果与结论: ①细胞实验: 抗酒石酸性磷酸酶和F-actin染色显示, 与破骨诱导组比较, 水甘草碱低、高剂量组可抑制破骨细胞的活化及骨吸收, 其中以高剂量组抑制更显著。RT-PCR检测结果显示, 与对照组比较, 破骨诱导组3种炎症因子的mRNA表达升高($P < 0.01$); 与破骨诱导组比较, 水甘草碱低及高剂量组3种炎症因子的mRNA表达降低($P < 0.01$), 其中以高剂量组降低更明显。②动物实验: 与假手术组比较, 骨溶解组3种炎症因子水平升高($P < 0.01$); 与骨溶解组比较, 水甘草碱低及高剂量组3种炎症因子水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中以高剂量组降低更明显。micro-CT扫描结果显示, 钛颗粒导致小鼠颅骨骨溶解破坏, 水甘草碱可抑制钛颗粒诱导的骨溶解, 其中以高剂量组抑制作用更显著。③结果表明: 水甘草碱可通过抑制炎症因子释放下调破骨细胞的骨吸收功能来改善钛颗粒诱导的骨溶解、骨破坏。

关键词: 水甘草碱; 炎症因子; 破骨细胞活化; 磨损颗粒; 假体周围骨溶解

Tabersonine alleviates wear particle-induced inflammatory osteolysis by inhibiting osteoclast activation

Zhang Wei, Yu Lei, Yang Peng, Geng Dechun

Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Zhang Wei, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Geng Dechun, Researcher, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Tabersonine has shown good therapeutic effects in diseases such as myocardial remodeling, acute kidney injury and lung injury due to its anti-

苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215006

第一作者: 张巍, 男, 1990年生, 江苏省镇江市人, 汉族, 医学硕士, 主治医师, 主要从事骨关节外科及相关基础研究。

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

<https://orcid.org/0000-0002-6454-4694> (张巍)

基金资助: 国家自然科学基金(8227091833), 项目负责人: 耿德春

引用本文: 张巍, 俞磊, 杨鹏, 耿德春. 水甘草碱抑制破骨细胞活化缓解磨损颗粒诱导的炎性骨溶解 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(10):1519-1525.



inflammatory biological activity. Prosthetic wear particles often lead to aseptic inflammation, and the massive release of inflammatory factors further promotes periprosthetic bone destruction and bone loss; however, there are no basic studies on the efficacy of tabersonine on periprosthetic osteolysis.

OBJECTIVE: To investigate the effects of tabersonine on osteoclast activation, expression of inflammatory factors and inflammatory osteolysis induced by wear particles.

METHODS: (1) Cell experiment: RAW264.7 cells were divided into four groups for culture. A complete medium was added in the control group. Osteoclast induction medium (50 ng/mL RANKL+complete medium) was added to the osteoclast induction group. 1 and 5 $\mu\text{mol/L}$ tabersonine was added for 4 hours, and then osteoclast induction medium was added to the low- and high-dose tabersonine groups, respectively. After 5 days of induction, tartrate-resistant acid phosphatase staining, F-actin staining and RT-PCR were performed. (2) Animal experiments: Twenty C57BL/6J mice were randomly divided into sham operation group, osteolysis group, low-dose tabersonine group and high-dose tabersonine group ($n=5$ per group). Skull osteolysis model of the skull was established by injecting titanium pellets on the skull surface in the osteolysis group, low-dose tabersonine group and high-dose tabersonine group. On day 2 after model establishment, mice in the low-dose and high-dose tabersonine groups received intraperitoneal injections of 10 and 20 mg/kg tabersonine every 2 days, respectively. 2 weeks after surgery, mouse sera were collected for detecting inflammatory factors (interleukin 1 β , interleukin 6, and tumor necrosis factor α), and cranial bones were collected for micro-CT scan and bone parameter analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Cellular experiments: Tartrate-resistant acid phosphatase staining and F-actin staining showed that compared with the osteoclast induction group, low-dose and high-dose tabersonine significantly inhibited osteoclast activation and bone resorption, and the inhibition was more significant in the high-dose tabersonine group. RT-PCR results showed that compared with the control group, the mRNA expressions of three kinds of inflammatory factors were increased in the osteoclast induction group ($P < 0.01$). Compared with the osteoclast induction group, the mRNA expressions of three kinds of inflammatory factors were decreased in low- and high-dose tabersonine groups ($P < 0.01$), and the decrease was more obvious in the high-dose tabersonine group. (2) Animal experiments: Compared with the sham operation group, the levels of three kinds of inflammatory factors were increased in the osteolysis group ($P < 0.01$). Compared with the osteolysis group, the levels of three kinds of inflammatory factors were decreased in the low- and high-dose tabersonine groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the decrease was more obvious in the high-dose tabersonine group. The micro-CT scan results revealed that titanium particles caused the destruction of cranial osteolysis, and tabersonine could inhibit the osteolysis induced by titanium particles, especially in the high-dose tabersonine group. (3) The results confirm that tabersonine can enhance the osteolysis and bone destruction induced by titanium particles by inhibiting the release of inflammatory factors and down-regulating the bone absorption function of osteoclasts.

Key words: tabersonine; inflammatory factor; osteoclast activation; wear particle; periprosthetic osteolysis

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 8227091833 (to GDC)

How to cite this article: ZHANG W, YU L, YANG P, GENG DC. Tabersonine alleviates wear particle-induced inflammatory osteolysis by inhibiting osteoclast activation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(10):1519-1525.

0 引言 Introduction

全髋关节置换术是近 20 年来发展最成功的外科技术之一，旨在缓解疼痛并改善受损关节活动性，以恢复正常的髋关节功能^[1]。由于假体使用寿命有限以及关节置换术后并发症严重，许多患者需接受进一步的翻修手术。近些年来，社会大众对翻修手术的需求量呈现持续上升趋势，预计到 2030 年每年将超过 10 万例^[2]。相较于初次置换，翻修手术患者的获益较少^[3]。另外，接受二次翻修患者术后再翻修风险为初次置换患者的 5 倍^[4]。围术期死亡率是另一个重要的考虑因素，据报道，翻修 7 d 内每 1 000 例中有 90 例翻修患者死亡，死亡率远超初次置换患者。最后，与初次置换术相比，翻修手术的手术时间、失血量、住院时间和经济成本显著增加^[5]。翻修手术常用于治疗假体周围骨溶解、假体脱位、假体断裂、假体周围骨折以及假体周围感染等假体置换术后并发症，其中假体周围炎性骨溶解是导致假体置入失败和翻修手术的主要原因。因此，缓解假体周围骨溶解、加强假体骨界面整合是避免严重术后并发症、避免不必要的翻修手术、保障患者生命健康、降低经济损失等问题的重要举措。

假体周围骨溶解的病程较长、机制复杂，其共性在于不同的磨损颗粒导致假体周边活化的中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、多核巨细胞等免疫细胞聚集，诱发局部炎性风暴，植入物/组织界面处的巨噬细胞和其他吞噬细胞因难以消化降解磨损颗粒而被异常激活；异常激活的炎性细胞释放大量的白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 等炎性因子，于局部形成炎性风暴，促进了破骨细胞的活化、纤维组织的增殖，抑制成骨细胞活性，最终导致假体周围骨质溶解的发生^[6-10]。大量研究发现，破骨细胞的过度激活在假体骨界面整合失衡中起主要作用^[6, 11]。

水甘草碱分离提纯自菊科长春花，具有抗炎和抗癌等多种生物学活性^[12-13]。据报道，水甘草碱通过抑制核因子 κB 通路和 P38/JNK 通路降低肺组织炎症反应，并抑制骨髓来源巨噬细胞分泌促炎递质^[14]。另外有研究指出，水甘草碱靶向抑制 TAK1 介导的炎症级联反应，并对血管紧张素 II 介导的心肌损伤具有保护作用^[15]。基于水甘草碱在多组织内的抗炎性能，项目组提出水甘草碱通过抑制炎性反应改善破骨细胞异常活化，并进一步缓解假体周围骨溶解的假设，旨在阐明水甘草碱能否改善骨微环境炎症、抑制破骨细胞活化以及钛颗粒诱导的炎性骨丢失，以期开发假体周围骨溶解防治新措施。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验和体内动物实验，两组间均数比较采用 student t 检验，多组间均数比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 2 月至 2023 年 2 月在苏州大学附属第一医院骨科研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 主要细胞、材料和试剂 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 购自中国科学院细胞库；水甘草碱 (HPLC $\geq 95\%$, Cas 4429-63-4) 购自上海阿拉丁生物科技股份有限公司；金属钛颗粒 (不规则形，直径 60–120 nm) 购自 Johnson Matthey 公司；胎牛血清、高糖 DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司；3% 戊巴比妥钠、抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒购自美国 Sigma 公司；小鼠来源核因子 κB 受体活化因子配体购自 R&D 公司；罗丹明标记 F-actin 试剂盒购自中国爱必信生物科技有限公司；dNTP 试剂购自日本 Takara 公司；NanoDrop-2 000 购自美国赛默飞公司；小鼠来源白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的 Elisa 试剂盒购自南京建成科技有限公司。

1.3.2 实验动物与分组 20 只雄性 C57BL/6J 小鼠, SPF 级, 6–8 周龄, 体质量 28–32 g, 从苏州大学动物中心获得, 许可证号: SYXK(苏)2021-0074。实验小鼠饲养于标准环境中: 室温 26 °C, 湿度约 55%, 每天光照 12 h, 自由活动, 自主进食。采用随机数字表法将小鼠随机分为假手术组、骨溶解组、水甘草碱低剂量组、水甘草碱高剂量组, 每组 5 只。实验获得苏州大学伦理委员会批准 (批准号: SUDA20221123A02)。

1.4 实验方法

1.4.1 RAW264.7 细胞的培养 使用高糖 DMEM+ 体积分数 10% 胎牛血清 +1% 青霉素 / 链霉素双抗配制完全培养基进行 RAW264.7 细胞的培养, 置于恒温 37 °C、体积分数 5%CO₂ 培养箱内培养。当细胞融合度达到 100% 时进行传代。

1.4.2 水甘草碱对 RAW264.7 细胞增殖的影响及细胞毒性作用 在进行细胞实验之前, 使用 CCK-8 检测试剂盒测定水甘草碱的细胞毒性, 筛选适宜浓度的水甘草碱。

将 RAW264.7 细胞以 4×10^3 / 孔的密度接种到 96 孔板中, 每孔加入 100 μ L 完全培养基进行孵育。待细胞贴壁后, 向每个孔中加入不同浓度 [0 (对照), 1, 3, 5, 10, 20 μ mol/L] 的水甘草碱继续孵育 24, 48, 72 h, 空白组仅加入完全培养基 (无细胞)。待孵育完毕, 吸除培养基, 每孔加入 10% CCK-8 孵育液, 37 °C 避光孵育 2 h, 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度值 (A 值), 以评估水甘草碱对 RAW264.7 细胞增殖的影响。孵育 72 h 后, 采用 CCK-8 法检测细胞存活率与细胞生长抑制率。

细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$

细胞生长抑制率 = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$

1.4.3 体外实验

破骨细胞活化诱导: 将 RAW264.7 细胞以 4×10^4 / 孔的密度接种于 24 孔板, 加入完全培养基孵育过夜。第 2 天细胞已贴壁, 分 4 组培养: 对照组、破骨诱导组继续使用完全培养基进行培养, 水甘草碱低、高剂量组分别加入 1, 5 μ mol/L 水甘草碱, 孵育 4 h; 然后, 破骨诱导组及水甘草碱低、高剂量组进行破骨诱导 (加入 50 ng/mL 核因子 κ B 受体活化因子配体)。各组细胞每 2 d 换液 1 次。破骨诱导 5 d 后, 进行细胞抗酒石酸酸性磷酸酶染色和 F-actin 染色、RT-PCR 检测。

细胞抗酒石酸酸性磷酸酶染色: 吸除培养基终止细胞干预, 用 PBS 洗涤 3 次, 40 g/L 多聚甲醛固定样品 10 min, 并使用抗酒石酸酸性磷酸酶染色液孵育 30 min。使用显微镜观察, 具有明显褶皱边界、抗酒石酸酸性磷酸酶染色阳性的多核细胞 (≥ 3 个细胞核) 被鉴定为破骨细胞, 记录图像并用 Image J 进行定量分析。

细胞 F-actin 染色: 使用 PBS 洗涤干预后的细胞, 40 g/L 多聚甲醛固定, 以 PBS 洗 3 次, 0.1% Triton 冰上打孔 10 min, 以 PBS 洗 3 次; 然后使用配制好的罗丹明标记 F-actin 染液于 37 °C 避光孵育 60 min, 随后 DAPI 染色液避光孵育 10 min。使用蔡司荧光显微镜获取图像, Image J 对肌动蛋白环面积比例进行定量分析。

RT-PCR 检测: 用 Trizol 试剂裂解各组 RAW264.7 细胞, 然后用氯仿提取总 RNA。NanoDrop-2000 用于鉴定各组样品的纯度和浓度。使用 PrimeScript RT 预混液将 RNA 反转录成 cDNA。热循环仪用于聚合酶链式反应, 反应条件: 95 °C 热启动 5 min; 95 °C 变性 30 s; 55–65 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s; 其中变性、退火、延伸进行 30 个循环。使用 dNTP 试剂和无 RNase-H 的混合物测量白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 的 mRNA 表达水平。GAPDH 基因作为破骨细胞分化过程中的管家基因。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列

Table 1 | Primer sequences

基因	前导引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (3'-5')
小鼠源白细胞介素 1 β	ACT CAT TGT GGC TGT GGA GA	TTG TTC ATC TCG GAG CCT GT
小鼠源白细胞介素 6	TCG TGG AAA TGA GAA AAG AGT G	AGT GCA TCA TCG TTG TTC ATA CA
小鼠源肿瘤坏死因子 α	CTG AGG TCA ATC TGC CCA AGT AC	CTT CAC AGA GCA ATG ACT CCA AAG
GAPDH	GCA AGT TCA ACG GCA CAG	CGC CAG TAG ACT CCA CGA C

1.4.4 体内实验

构建小鼠颅骨骨溶解模型: 在手术前, 所有小鼠腹膜内注射 3% 戊巴比妥钠 60 mg/kg 进行麻醉。待麻醉起效后, 于小鼠颅骨备皮, 进行手术区域消毒、铺单, 于颅骨中线切开皮肤, 刮除骨膜, 将含有 40 mg 钛颗粒的 40 μ L PBS 注射到骨溶解组、水甘草碱低及高剂量组小鼠颅骨表面, 假手术组注射 40 μ L PBS。缝合切口, 继续饲养小鼠。术后第 2 天开始干预治疗, 水甘草碱低、高剂量组分别腹腔注射 10, 20 mg/kg 水甘草碱, 隔日 1 次, 直至造模 2 周后。造模 2 周后, 麻醉后给予安乐死处理, 将获取的颅骨于 40 g/L 多聚甲醛固定 48 h。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题:

造模目的	探讨不同剂量水甘草碱对磨损颗粒诱导颅骨溶解的影响
选择动物的条件	6–8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠, 初始体质量 28–32 g
模型与所研究疾病的关系	磨损颗粒导致局部骨微环境炎性改变、促进局部溶解丢失, 是假体周围骨溶解的经典模型
动物来源及品系	C57BL/6J 雄性小鼠, 由苏州大学动物中心提供
造模技术描述	麻醉小鼠后, 于小鼠颅骨矢状缝处做 1 cm 纵行切口, 刮除骨膜, 在颅骨表面均匀注射 20 mg 钛颗粒, 最后缝合皮肤
动物数量及分组方法	采用随机数字表法将 20 只小鼠随机分为假手术组、骨溶解组及水甘草碱低、高剂量组, 每组 5 只
造模成功评价指标	造模 2 周后, micro-CT 检测显示颅骨骨质稀疏、孔隙增加则可视为成功构建骨溶解模型
造模后观察指标	①小鼠血清炎症因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的水平; ②小鼠颅骨结构变化; ③颅骨感兴趣区域骨密度、骨体积分数、骨表面积骨体积比值和孔隙率的变化
造模后动物处理	造模 2 周后, 麻醉后进行安乐死处理, 检测相应指标
伦理委员会批准	实验获得苏州大学伦理委员会批准 (批准号: SUDA20221123A02)

炎症因子水平检测: 收集小鼠眼球动脉血液, 离心后取上清, 分别使用白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的 Elisa 试剂盒进行检测, 首先将配制好的标准品和样

品加入酶标孔中, 37 °C 孵育 30 min, 洗去未结合抗原, 加入酶标试剂 37 °C 孵育 30 min, 加入显色试剂避光孵育 30 min, 最后加入终止液并于酶标仪下检测。

micro-CT 断层扫描: 预先刮除小鼠颅骨表面金属钛颗粒, 避免扫描产生金属尾影。通过高分辨率显微 CT (SkyScan1176, 比利时) 在 9 μm 、50 kV 和 200 μA 下进行扫描获取图像, 并通过 NRecon、DataViewer、CTAn 和 Mimics 等软件进行颅骨重建及骨参数分析。主要评估的骨形态学参数为: 骨密度 (mg/cm^3)、骨体积分数 (%)、骨表面积骨体积比值 ($1/\text{mm}$) 和孔隙率 (%)。

1.5 主要观察指标 水甘草碱对破骨细胞活化、炎症因子产生和钛颗粒诱导炎性骨溶解的影响。

1.6 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验的所有结果进行分析, 结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达。两组均数间比较使用 student t 检验, 多组均数间比较使用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 被认为组间差异有显著性意义。该文统计学方法已经由苏州大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

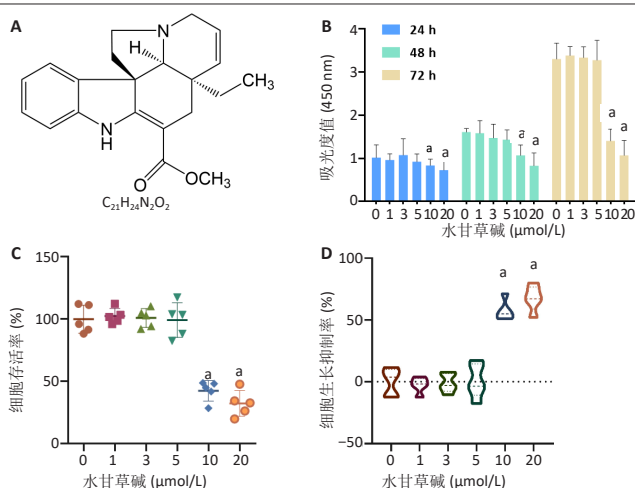
2.1 水甘草碱对 RAW264.7 细胞增殖的影响及细胞毒性作用 水甘草碱是一种菊科长春花提取物质 (分子结构式见图 1A), 将 RAW264.7 细胞分别暴露于 0–20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的水甘草碱中 24, 48, 72 h, 并进行 CCK-8 检测。检测结果显示, 当水甘草碱浓度低于 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 细胞吸光度值均未受到显著影响; 当水甘草碱浓度上升至 10, 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 细胞吸光度值急剧降低, 见图 1B, 提示水甘草碱浓度 $\leq 5 \mu\text{mol}/\text{L}$ 时对 RAW264.7 细胞的增殖活性无影响。另外, 使用水甘草碱干预 72 h, 若水甘草碱浓度 $\leq 5 \mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 细胞存活率与对照组无明显差异 ($P > 0.05$), 见图 1C; 当水甘草碱浓度为 10, 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 细胞抑制率分别达到 (57.41 ± 8.25)% 和 (67.60 ± 10.40)%, 见图 1D, 提示 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 及以上浓度的水甘草碱影响 RAW264.7 细胞的增殖, 对 RAW264.7 细胞具有毒性作用。鉴于以上细胞抑制率检测结果, 课题组选用 1, 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的水甘草碱进行细胞实验。

2.2 体外实验结果

2.2.1 水甘草碱对破骨细胞活化的影响 抗酒石酸酸性磷酸酶染色显示, 破骨诱导组细胞融合形成抗酒石酸酸性磷酸酶阳性多核破骨细胞, 与破骨诱导组比较, 使用水甘草碱干预后破骨细胞形成显著减少, 并且水甘草碱高剂量组对破骨细胞活化的抑制作用强于水甘草碱低剂量组 ($P < 0.05$), 见图 2A、B。

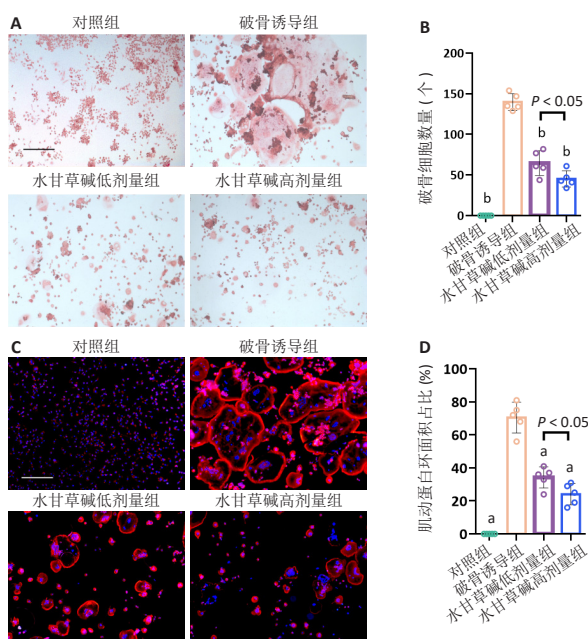
F-actin 环的形成和破骨细胞的迁移、侵袭、黏附能力有关, 是反映破骨细胞活性的重要指标。F-actin 染色显示, 在破骨诱导过程中破骨细胞 F-actin 环逐步融合形成, 使用水甘草碱干预后破骨细胞 F-actin 环面积占比较破骨诱导组均降低, 并且水甘草碱高剂量组对 F-actin 的形成抑制作用强于水甘草碱低剂量组 ($P < 0.05$), 见图 2C、D。

鉴于以上发现, 课题组推断在安全剂量范围内水甘草碱



图注: A 为水甘草碱分子结构式; B 为不同浓度水甘草碱干预细胞 24, 48, 72 h 后的 CCK-8 检测结果, 与相应时间点 0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组比较, $^aP < 0.01$; C 为不同浓度水甘草碱干预 72 h 后的细胞存活率, 与 0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组比较, $^aP < 0.01$; D 为不同浓度水甘草碱干预 72 h 后的细胞生长抑制率, 与 0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组比较, $^aP < 0.01$

图 1 | 不同浓度水甘草碱对 RAW264.7 细胞存活率及生长抑制率的影响
Figure 1 | Effect of different concentrations of tabersonine on the survival rate and growth inhibition rate of RAW264.7 cells



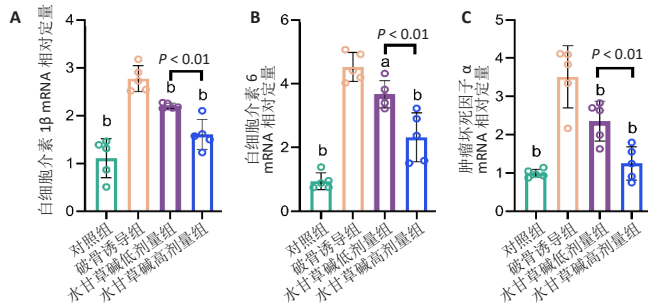
图注: A 为各组抗酒石酸酸性磷酸酶染色图像, 标尺 =100 μm ; B 为抗酒石酸酸性磷酸酶阳性破骨细胞数量的定量分析, 与破骨诱导组比较, $^bP < 0.01$; C 为各组 F-actin 染色图像, F-actin 呈红色, DAPI 呈蓝色, 标尺 =100 μm ; D 为破骨细胞肌动蛋白环面积占比定量分析, 与破骨诱导组比较, $^aP < 0.01$

图 2 | 不同剂量水甘草碱对破骨细胞活化的作用
Figure 2 | Effects of different doses of tabersonine on osteoclast activation

以浓度依赖性形式抑制了破骨细胞的激活。

2.2.2 水甘草碱对破骨细胞活化过程中炎症因子表达的影响 RT-PCR 检测结果显示, 与对照组比较, 破骨诱导组白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的 mRNA 表达均显著上调 ($P < 0.01$); 与破骨诱导组比较, 水甘草碱干预组白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的 mRNA 表达均降

低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且水甘草碱高剂量组的抑炎作用强于水甘草碱低剂量组 ($P < 0.01$), 见图 3。



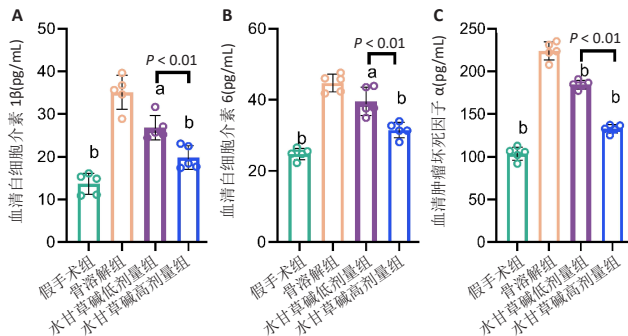
图注: A-C 分别各组炎症因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的 mRNA 表达定量分析结果, 与破骨诱导组比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$
图 3 | 不同剂量水甘草碱对破骨细胞内促炎因子表达的影响

Figure 3 | Effects of different doses of tabersonine on the expression of proinflammatory cytokines in osteoclasts

2.3 体内实验结果

2.3.1 实验动物数量分析 20 只小鼠全部进入结果分析。

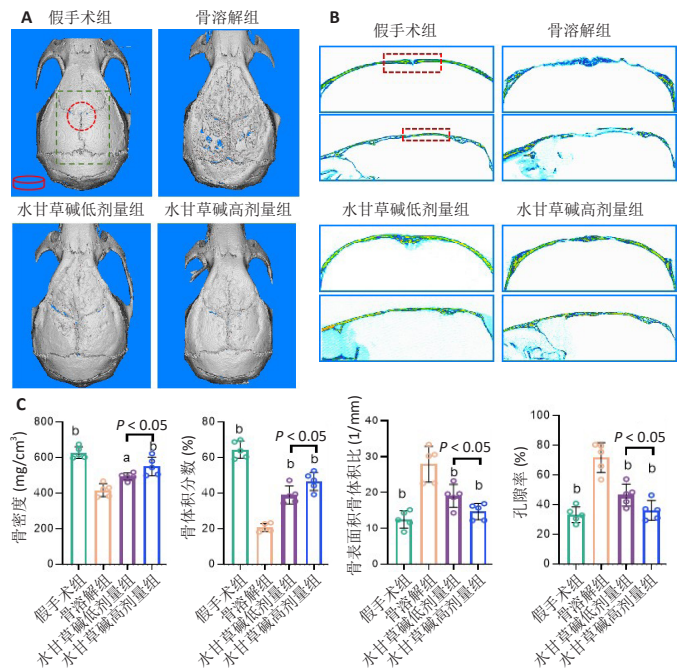
2.3.2 水甘草碱对钛颗粒诱导炎症的影响 与假手术组比较, 骨溶解组小鼠血清中白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的水平升高 ($P < 0.01$); 与骨溶解组比较, 水甘草碱干预组小鼠血清中 3 种炎症因子水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且水甘草碱高剂量组的抑制作用强于水甘草碱低剂量组 ($P < 0.01$), 见图 4。



图注: A-C 分别为小鼠血清白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的质量浓度。与骨溶解组比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$
图 4 | 不同剂量水甘草碱对钛颗粒诱导小鼠体内炎症的作用

Figure 4 | Effects of different doses of tabersonine on inflammation induced by titanium particles in mice

2.3.3 水甘草碱对钛颗粒诱导骨质破坏的影响 使用 micro-CT 对颅骨进行扫描, 并进行 2D 和 3D 重建, 对颅骨感兴趣区域 (矢状缝和冠状缝交界处直径 200 mm、高度 20 mm 的圆柱体区域) 进行骨溶解度和骨参数分析。2D 和 3D 重建图像显示, 骨溶解组小鼠颅骨受到广泛侵蚀, 颅腔封闭性丢失; 与骨溶解组比较, 水甘草碱干预组明显缓解了小鼠颅骨的骨质侵蚀破坏, 见图 5A、B。基于感兴趣区域的骨参数分析发现, 相较于假手术组, 骨溶解组小鼠颅骨感兴趣区域的骨密度和骨体积分数降低 ($P < 0.01$)、骨表面积骨体积比值和颅骨孔隙率升高 ($P < 0.01$), 成功构建骨溶解模型; 与骨溶解组比较, 水甘草碱干预逆转了钛颗粒导致的骨参数变化 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中水甘草碱高剂量组的疗效好于水甘草碱低剂量组 ($P < 0.05$), 见图 5C。



图注: A 为各组小鼠颅骨 CT 三维重建图像 (绿框内为骨溶解骨破坏区域, 红圈内为进行骨参数分析的感兴趣区域); B 为小鼠颅骨感兴趣区域 (方框) 冠状面以及矢状面图像; C 为感兴趣区域骨密度、骨体积分数、骨表面积骨体积比值和孔隙率的定量分析结果。与骨溶解组比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$
图 5 | 不同剂量水甘草碱对钛颗粒诱导小鼠骨溶解的作用

Figure 5 | Effects of different doses of tabersonine on osteolysis induced by titanium particles in mice

3 讨论 Discussion

假体周围骨溶解是全关节置换术后最常见的并发症, 是一种渐进的、活跃的生物级联反应, 可由多种类型磨损颗粒引起^[16-17]。传统假体中聚乙烯在空气中与伽马射线相结合, 可导致自由基产生增加, 这是全髋关节置换术后常见的问题, 这些自由基可促进更多磨损颗粒产生, 进一步加重骨质溶解, 最终导致假体无菌性松动^[18]。既往研究发现, 磨损颗粒可以导致局部炎症因子风暴和破骨细胞的过度活化^[19-21], 然而其具体机制不清, 缺乏对应的治疗药物, 假体周围骨溶解的防治工作仍具有较大的挑战性。由于传统抗骨吸收药物不能解决假体周围炎症问题、治疗作用有限、不良反应较多^[22-24], 临床上亟需开发缓解局部炎症风暴、抑制破骨细胞活化的有效药物。此次研究发现, 水甘草碱作为一种吡咯生物碱在体外可以缓解破骨细胞活化过程中炎症因子的表达、抑制破骨细胞的形成, 在体内可以下调钛颗粒诱导的炎症风暴、减少钛颗粒放置区域的骨丢失和骨破坏, 为临床防治假体周围骨溶解提供了新的药物选择。

水甘草碱是在菊科长春花、玫瑰花等多种药用植物中发现的吡咯生物碱, 具有较强的抗癌和抗炎保护作用。在呼吸系统中, 水甘草碱可显著改善脂多糖诱导的毛细血管内皮损伤和肺上皮损伤, 减少炎症细胞浸润^[14]; 在心血管系统中, 水甘草碱靶向 TAK1 并抑制 TAK1 介导的炎症级联反应, 缓解血管紧张素 II 介导的心脏炎症和心肌纤维化^[15]; 随着研究的进一步深入, 研究人员还发现水甘草碱可以通过抑制核

因子 κB 信号通路介导的炎症因子释放, 来改善高脂饮食和饱和脂肪酸诱导的肾细胞损伤^[25], 并能抑制脂多糖诱导的小胶质细胞炎症反应^[26], 由此可见, 水甘草碱对多器官都具有抑炎保护作用。另外, 水甘草碱在骨骼系统退行性疾病骨质疏松症中也体现出良好的治疗作用^[27]。骨髓来源巨噬细胞是破骨细胞的前体细胞, 研究发现水甘草碱能同骨髓来源巨噬细胞中炎症小体 NLRP3 的 NACHT 结构域结合, 抑制炎症小体寡聚化, 进而干扰炎症小体的进一步激活, 缓解腹膜炎、败血症的进展^[28]。基于前期研究人员对水甘草碱抗炎作用的探索, 此次研究推断水甘草碱能通过调控炎症因子水平, 缓解假体周围骨溶解的发生发展。此次研究结果发现, 在核因子 κB 受体活化因子配体诱导的破骨细胞活化过程中伴随着白细胞介素 1β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 等炎症细胞因子的表达增加, 而水甘草碱在安全浓度内以剂量依赖性形式降低了炎症因子负荷; 在钛颗粒诱导的颅骨骨溶解模型中, 钛颗粒促进了血清炎症风暴的发生, 隔日接受水甘草碱显著缓解了机体炎症因子的激活释放。

假体周围骨溶解是由巨噬细胞、破骨细胞、成骨细胞和成纤维细胞等多细胞参与的复杂过程, 目前其病理机制尚不清楚。值得注意的是, 假体周围骨溶解中骨质破坏和骨量丢失的直接原因在于破骨细胞和成骨细胞偶联失衡^[29]。破骨细胞来源于单核巨噬细胞谱系^[30], 其过度激活占据骨重塑紊乱的主导地位, 而炎症递质间的协调互动加剧破骨细胞的激活, 加重骨损伤丢失^[31]。因此, 通过抑制炎症因子的释放, 实现对破骨细胞过度活化的抑制是治疗假体周围骨溶解的良好策略。WEI 等^[32]的研究发现, 类黄酮可以抑制炎症并下调活性氧累积来抑制破骨细胞的活化。WEN 等^[33]开发了 MiR-92a 实现了对巨噬细胞 M1/M2 极化的调控, 进而减轻了炎症因子的释放, 缓解了钛颗粒诱导的颅骨溶解。此次研究同样发现水甘草碱在对破骨细胞活化以及钛颗粒诱导的骨溶解中的抗炎作用。正如预期的, 在破骨细胞活化过程中加入不同剂量的水甘草碱后, 融合形成的破骨细胞数量显著减少, 反映其骨吸收功能的 F-actin 环的形成同样显著降低; 在钛颗粒诱导的颅骨溶解模型中, 骨溶解组小鼠颅骨骨破坏严重、孔隙增加, 在接受水甘草碱治疗后, 骨破坏骨丢失明显缓解, 颅骨骨密度及骨体积分数显著升高, 骨表面积骨体积比值及颅骨孔隙率显著降低。

然而, 研究中同样存在几个局限性: ①首先, 尽管小鼠颅骨骨溶解模型被广泛用于假体周围骨溶解的机制研究, 并取得了一定的成绩, 然而其模型仍存在待改进之处。小鼠颅骨骨溶解模型以扁平骨为研究对象, 并不能完全模拟人体长骨骨溶解的组织结构变化; 另外, 骨溶解过程漫长, 小鼠模型中钛颗粒并非持续累积释放, 且小鼠骨质溶解过程仅持续了 2 周, 与人体内病理变化存在差异。②其次, 磨损颗粒类型由假体材质决定, 尽管钛颗粒和聚乙烯颗粒在体内均能诱导类似的炎症反应及骨质溶解^[34-36], 人工磨损颗粒的选择仍

有待优化。③此外, 既往研究已发现了水甘草碱通过对核因子 κB 信号通路、巨噬细胞极化、细胞焦亡的调控进而影响炎症因子的表达释放, 然而此次研究中并未对水甘草碱调控炎症、破骨细胞活化以及钛颗粒诱导的颅骨溶解的具体机制进行探讨。课题组将针对以上不足改进骨溶解模型, 并进一步研究水甘草碱的具体作用机制。

综上所述, 此次研究发现天然植物萃取物水甘草碱无明显细胞毒性, 通过抑制炎症因子的表达、缓解破骨细胞的形成及其骨吸收功能来改善小鼠骨溶解预后, 为人体假体周围骨溶解的防治工作提供了新的药物支持。

作者贡献: 张巍进行实验设计; 耿德春进行实验审核; 张巍、俞磊、杨鹏共同进行实验实施、实验评估; 张巍成文。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] SHETH NP, ROZELL JC, PAPROSKY WG. Evaluation and Treatment of Patients With Acetabular Osteolysis After Total Hip Arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg*. 2019;27(6):e258-e267.
- [2] KURTZ S, ONG K, LAU E, et al. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(4):780-785.
- [3] MAHOMED NN, BARRETT JA, KATZ JN, et al. Rates and outcomes of primary and revision total hip replacement in the United States medicare population. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85(1):27-32.
- [4] ONG KL, LAU E, SUGGS J, et al. Risk of subsequent revision after primary and revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(11):3070-3076.
- [5] SCHWARTZ AM, FARLEY KX, GUILD GN, et al. Projections and Epidemiology of Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States to 2030. *J Arthroplasty*. 2020;35(6S):S79-S85.
- [6] GOODMAN SB, MA T. Cellular chemotaxis induced by wear particles from joint replacements. *Biomaterials*. 2010;31(19): 5045-5050.
- [7] OLLIVERE B, WIMHURST JA, CLARK IM, et al. Current concepts in osteolysis. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(1):10-15.
- [8] BITAR D, PARVIZI J. Biological response to prosthetic debris. *World J Orthop*. 2015;6(2):172-189.
- [9] HOLT G, MURNAGHAN C, REILLY J, et al. The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;460:240-252.
- [10] HODGES NA, SUSSMAN EM, STEGEMANN JP. Aseptic and septic prosthetic joint loosening: Impact of biomaterial wear on immune cell function, inflammation, and infection. *Biomaterials*. 2021;278:121127.
- [11] LI Y, LING J, JIANG Q. Inflammasomes in Alveolar Bone Loss. *Front Immunol*. 2021;12:691013.

- [12] NEJAT N, VALDIANI A, CAHILL D, et al. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): the two faces of a versatile herb. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015: 982412.
- [13] QU Y, EASSON ML, FROESE J, et al. Completion of the seven-step pathway from tabersonine to the anticancer drug precursor vindoline and its assembly in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(19): 6224-6229.
- [14] ZHANG D, LI X, HU Y, et al. Tabersonine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing TRAF6 ubiquitination. *Biochem Pharmacol*. 2018;154:183-192.
- [15] DAI C, LUO W, CHEN Y, et al. Tabersonine attenuates Angiotensin II-induced cardiac remodeling and dysfunction through targeting TAK1 and inhibiting TAK1-mediated cardiac inflammation. *Phytomedicine*. 2022;103:154238.
- [16] 张云鸽, 宋科官. 假体周围磨损颗粒诱导骨溶解: 钙调磷酸酶/活化T细胞核因子信号通路作用的研究进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2017;21(7):1115-1122.
- [17] SUN KY, WU Y, XU J, et al. Niobium carbide (MXene) reduces UHMWPE particle-induced osteolysis. *Bioact Mater*. 2022;8:435-448.
- [18] CALLAGHAN JJ, HENNESSY DW, LIU SS, et al. Cementing acetabular liners into secure cementless shells for polyethylene wear provides durable mid-term fixation. *Clin Orthop Relat Res*. 2012;470(11): 3142-3147.
- [19] LU Y, XU X, YANG C, et al. Copper modified cobalt-chromium particles for attenuating wear particle induced-inflammation and osteoclastogenesis. *Biomater Adv*. 2023;147:213315.
- [20] YIN J, YIN Z, LAI P, et al. Pyroptosis in Periprosthetic Osteolysis. *Biomolecules*. 2022;12(12):1733.
- [21] ZHAO F, CANG D, ZHANG J, et al. Chemerin/ChemR23 signaling mediates the effects of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles on the balance between osteoblast and osteoclast differentiation. *Ann Transl Med*. 2021;9(14):1149.
- [22] FERREIRA P, BATES P, DAOUB A, et al. Is bisphosphonate use a risk factor for atypical periprosthetic/peri-implant fractures?- A metaanalysis of retrospective cohort studies and systematic review of the current evidence. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2023;109(2):103475.
- [23] FIORILLO L, CICCUI M, TOZUM TF, et al. Impact of bisphosphonate drugs on dental implant healing and peri-implant hard and soft tissues: a systematic review. *BMC Oral Health*. 2022;22(1):291.
- [24] KAWAHARA M, KUROSHIMA S, SAWASE T. Clinical considerations for medication-related osteonecrosis of the jaw: a comprehensive literature review. *Int J Implant Dent*. 2021;7(1):47.
- [25] QIAN C, WANG J, LIN W, et al. Tabersonine attenuates obesity-induced renal injury via inhibiting NF-kappaB-mediated inflammation. *Phytother Res*. 2023. doi: 10.1002/ptr.7756.
- [26] SHI J, WANG C, SANG C, et al. Tabersonine Inhibits the Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammatory Response in BV2 Microglia Cells via the NF-kappaB Signaling Pathway. *Molecules*. 2022; 27(21):7521.
- [27] SUN X, GAN L, LI N, et al. Tabersonine ameliorates osteoblast apoptosis in rats with dexamethasone-induced osteoporosis by regulating the Nrf2/ROS/Bax signalling pathway. *AMB Express*. 2020;10(1):165.
- [28] XU HW, LI WF, HONG SS, et al. Tabersonine, a natural NLRP3 inhibitor, suppresses inflammasome activation in macrophages and attenuate NLRP3-driven diseases in mice. *Acta Pharmacol Sin*. 2023. doi: 10.1038/s41401-022-01040-z.
- [29] KIM JM, LIN C, STAVRE Z, et al. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020;9(9):2073.
- [30] 谢冰洁, 冯捷, 韩向龙. 破骨细胞生物学特征的研究与进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2017,21(11):1770-1775.
- [31] YAO Y, CAI X, REN F, et al. The Macrophage-Osteoclast Axis in Osteoimmunity and Osteo-Related Diseases. *Front Immunol*. 2021;12: 664871.
- [32] WEI L, CHEN W, HUANG L, et al. Alpinetin ameliorates bone loss in LPS-induced inflammation osteolysis via ROS mediated P38/PI3K signaling pathway. *Pharmacol Res*. 2022;184:106400.
- [33] WEN Z, LIN S, LI C, et al. MiR-92a/KLF4/p110delta regulates titanium particles-induced macrophages inflammation and osteolysis. *Cell Death Discov*. 2022;8(1):197.
- [34] HU X, PING Z, GAN M, et al. Theaflavin-3,3'-digallate represses osteoclastogenesis and prevents wear debris-induced osteolysis via suppression of ERK pathway. *Acta Biomater*. 2017;48:479-488.
- [35] PING Z, WANG Z, SHI J, et al. Inhibitory effects of melatonin on titanium particle-induced inflammatory bone resorption and osteoclastogenesis via suppression of NF-kappaB signaling. *Acta Biomater*. 2017;62:362-371.
- [36] GREEN JM, HALLAB NJ, LIAO YS, et al. Anti-oxidation treatment of ultra high molecular weight polyethylene components to decrease periprosthetic osteolysis: evaluation of osteolytic and osteogenic properties of wear debris particles in a murine calvaria model. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(5):325.

(责任编辑: GW, ZN, QY, YJ)