

利格列汀调控巨噬细胞极化和破骨细胞形成缓解磨损颗粒诱导的骨质溶解

杨鹏, 张巍, 李文明, 李文豪, 吴泽彬, 周军, 耿德春

<https://doi.org/10.12307/2025.393>

投稿日期: 2024-03-28

采用日期: 2024-06-21

修回日期: 2024-07-11

在线日期: 2024-08-07

中图分类号:

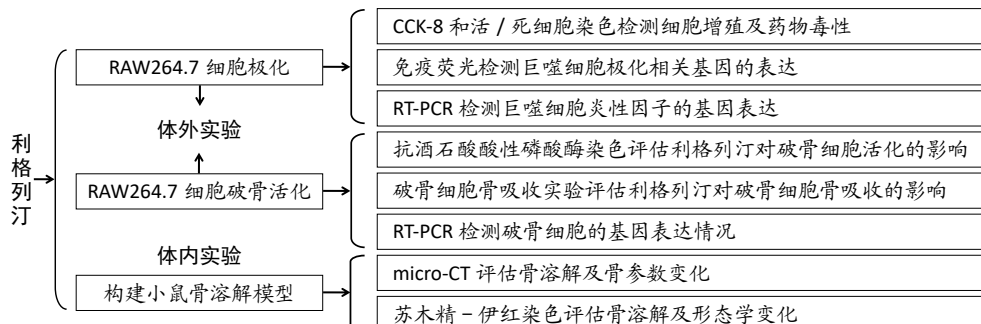
R496; R318; R681

文章编号:

2095-4344(2025)12-02421-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 利格列汀调控巨噬细胞极化和破骨细胞形成缓解磨损颗粒诱导的骨质溶解



文题释义:

利格列汀: 是二肽基肽酶 4 抑制剂的代表, 已注册并有效用于治疗 2 型糖尿病。研究发现, 利格列汀的给药能够降低体内促炎因子(例如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β)的浓度, 从而参与保护心脑血管系统、内分泌系统和中枢神经系统的过程。

无菌性假体松动: 是与关节置换术相关的最常见并发症之一。病理生理过程包括假体磨损或降解产生的颗粒引起局部炎症反应、继而引起假体周围骨溶解, 最终导致假体-骨组织松动。由于术后假体与骨组织界面之间长期活动发生磨损以及假体自身的降解, 在局部产生了假体颗粒并聚集, 颗粒碎片可以激活单核细胞/巨噬细胞, 随后激活的巨噬细胞产生促炎因子等细胞因子, 诱导炎症反应, 由于这些颗粒往往难以降解, 因此骨免疫微环境会不断恶化, 破骨细胞加速成熟, 导致成骨-破骨失衡, 进而导致骨吸收和假体周围骨质溶解的增加。

摘要

背景: 研究发现, 在利格列汀的干预下, 巨噬细胞更多的由 M1 转向 M2 极化, 降低了相关炎症因子的释放, 缓解了局部炎症。

目的: 探讨利格列汀对巨噬细胞极化、破骨细胞活化及磨损颗粒诱导炎症性骨溶解的影响。

方法: (1) 细胞实验: ①巨噬细胞极化: 将 RAW264.7 细胞分 4 组培养, 对照组细胞加入高糖培养基; M1 诱导组加入 M1 诱导培养基(含脂多糖 100 ng/mL 和干扰素 γ 20 ng/mL 的高糖培养基)模拟炎症环境; 利格列汀低、高剂量组分别加入 50, 200 nmol/L 利格列汀处理 4 h 后加入 M1 诱导培养基。巨噬细胞极化诱导 24 h 后, 分别进行巨噬细胞极化免疫荧光染色和 RT-PCR 检测。②破骨细胞活化: 将 RAW264.7 细胞分为 4 组培养, 对照组使用高糖培养基培养, 破骨细胞诱导组、利格列汀低剂量组及高剂量组进行破骨细胞诱导, 待微小破骨细胞形成后, 用利格列汀 (50, 200 nmol/L) 分别干预细胞 3 d, 进行细胞抗酒石酸性磷酸酶染色和 RT-PCR 检测。(2) 动物实验: 将 24 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组, 即假手术组、模型组、利格列汀低剂量组及高剂量组, 后 3 组通过将钛颗粒悬液注射至颅骨表面建立颅骨骨溶解模型, 从造模后第 2 天开始, 利格列汀低、高剂量组分别灌胃利格列汀 (2, 10 mg/kg), 每天 1 次, 造模 3 周后, 检测血清巨噬细胞极化标志蛋白及炎症因子水平, 收集颅骨进行 micro-CT 扫描、骨参数分析及苏木精-伊红染色评估骨溶解及形态学变化。

结果与结论: ①细胞实验: 与 M1 诱导组比较, 利格列汀低、高剂量组可显著抑制巨噬细胞的 M1 极化、促进 M2 极化 ($P < 0.01$), 且以高剂量组效果更显著 ($P < 0.01$)。与破骨诱导组比较, 利格列汀低、高剂量组可抑制破骨细胞的活化及骨质吸收, 且以高剂量组抑制更显著。与对照组比较, M1 诱导组炎症因子 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), 而与 M1 诱导组相比较, 利格列汀低、高剂量组炎症因子 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 破骨诱导组破骨功能标志物的 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); 与破骨诱导组比较, 利格列汀低、高剂量组破骨功能标志物的 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), 且以高剂量组降低更明显。②动物实验: 钛颗粒植入导致小鼠颅骨骨溶解破坏, 利格列汀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。结果表明利格列汀具有调节巨噬细胞极化、抑制破骨细胞活化及对骨骼系统的保护作用。

关键词: 利格列汀; 巨噬细胞极化; 破骨细胞活化; 磨损颗粒; 无菌性假体松动; 假体周围骨溶解

Linagliptin alleviates wear particle-induced inflammatory osteolysis by regulating macrophage polarization and osteoclast formation

Yang Peng, Zhang Wei, Li Wenming, Li Wenhao, Wu Zebin, Zhou Jun, Geng Dechun

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

Yang Peng, Master candidate, 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

苏州大学附属第一医院骨科, 江苏省苏州市 215006

第一作者: 杨鹏, 男, 1996 年生, 安徽省合肥市人, 汉族, 苏州大学附属第一医院骨科在读硕士, 主要从事骨关节外科及骨免疫相关基础研究

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/0000-0001-5116-0774> (杨鹏)

基金资助: 国家自然科学基金 (82272567), 项目负责人: 耿德春; 苏州市卫生健康委项目 (GSWS2022002), 项目负责人: 耿德春;

江苏省医学研究项目 (ZD2022014), 项目负责人: 耿德春; 苏州市科技项目 (SKJY2021067), 项目负责人: 周军; 2023 年度苏州

市临床重点病种诊疗技术专项项目 (LCZX202302), 项目负责人: 周军

引用本文: 杨鹏, 张巍, 李文明, 李文豪, 吴泽彬, 周军, 耿德春. 利格列汀调控巨噬细胞极化和破骨细胞形成缓解磨损颗粒诱导的骨质溶解 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(12):2421-2428.



Abstract

BACKGROUND: Linagliptin exhibits the capacity to regulate macrophage polarization, shifting them from the pro-inflammatory M1 phenotype towards the anti-inflammatory M2 phenotype. This alteration results in a dampened release of inflammatory mediators, thereby mitigating local inflammation.

OBJECTIVE: To explore the effects of linagliptin on macrophage polarization, osteoclast activation, and inflammatory osteolysis elicited by wear particles.

METHODS: (1) Cell experiments: For macrophage polarization, RAW264.7 cells were cultured and divided into four groups: the control group received high-glucose culture medium; the M1-induced group received M1-inducing culture medium (high-glucose culture medium containing 100 ng/mL lipopolysaccharide and 20 ng/mL interferon- γ) to simulate an inflammatory environment; the low- and high-dose linagliptin groups were treated with 50 and 200 nmol/L linagliptin, respectively, for 4 hours before exposure to M1-inducing culture medium. After 24 hours of macrophage polarization induction, immunofluorescence staining and RT-PCR were performed. For osteoclast activation, RAW264.7 cells were cultured and divided into four groups: the control group was cultured with high-glucose culture medium, the osteoclast-induced group and low- and high-dose linagliptin groups were subjected to osteoclast induction. After osteoclast formation, cells were treated with linagliptin (50 and 200 nmol/L) for 3 days. Subsequently, cell tartrate-resistant acid phosphatase staining and RT-PCR were performed. (2) Animal experiments: Twenty-four male C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: sham operation group, model group, low-dose linagliptin group, and high-dose linagliptin group. The model group, low-dose linagliptin group, and high-dose linagliptin group were induced to establish a cranial bone resorption model by injecting titanium particle suspension onto the surface of the skull. Starting from the 2nd day after modeling, the low- and high-dose linagliptin groups were orally administered linagliptin (2 and 10 mg/kg, respectively) once daily. After modeling for 3 weeks, serum macrophage polarization marker protein and inflammatory factor levels were detected; skull samples were collected for micro-CT scanning, bone parameter analysis, and hematoxylin-eosin staining to evaluate osteolysis and morphological changes.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Cell experiments: Both low and high doses of linagliptin significantly suppressed M1 polarization while promoting M2 polarization compared to the M1-induced group ($P < 0.01$). Notably, the high-dose group exhibited a more pronounced inhibitory effect ($P < 0.01$). Inflammatory factor mRNA expression was elevated in the M1-induced group compared with the control group ($P < 0.01$), whereas inflammatory factor mRNA expression was significantly lower in the low- and high-dose linagliptin groups compared with the M1-induced group ($P < 0.01$). There was a significant upregulation of mRNA expression of osteoclast functional markers in the osteoclast-induced group compared with the control group ($P < 0.01$). Conversely, both low and high doses of linagliptin led to a substantial downregulation of mRNA expression of these markers compared with the osteoclast-induced group ($P < 0.01$), with the high-dose group exhibiting a more pronounced reduction. (2) Animal experiments: Titanium particle implantation induced cranial bone resorption damage in mice. Treatment with linagliptin effectively mitigated this bone resorption, with the high-dose group showing superior efficacy. To conclude, linagliptin has been shown to modulate macrophage polarization, inhibit osteoclast activation, and have a protective effect on the skeletal system.

Key words: linagliptin; macrophage polarization; osteoclast activation; abrasion particles; aseptic prosthesis loosening; periprosthetic osteolysis

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 82272567 (to GDC); Suzhou Municipal Health Commission, No. GSWS2022002 (to GDC); Jiangsu Medical Research Program, No. ZD2022014 (to GDC); Suzhou Science and Technology Project, No. SKJY2021067 (to ZJ); 2023 Special Project of Clinical Key Disease Diagnosis and Treatment Technology in Suzhou City, No. LCZX202302 (to ZJ)

How to cite this article: YANG P, ZHANG W, LI WM, LI WH, WU ZB, ZHOU J, GENG DC. Linagliptin alleviates wear particle-induced inflammatory osteolysis by regulating macrophage polarization and osteoclast formation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(12):2421-2428.

0 引言 Introduction

关节置换术是一种替换关节承重表面以减轻疼痛和残疾的外科手术。在过去的十年中，行全髋关节和膝关节翻修术数量有所增加^[1]。尽管植入假体可以较好地恢复患肢的功能，但是假体本身存在的问题也不容忽视，假体的失效严重限制了其使用寿命，患者往往需要进行二次或多次翻修手术^[2]。据统计，假体失效的翻修率也在逐年增加，而翻修手术面临着诸多缺点，包括创伤大、费用高以及疗效差等^[3]，因此，如何有效降低翻修率成为一个亟待解决的问题。近年来的研究发现，翻修的假体周围存在骨溶解现象，其病理机制主要涉及早期的表/界面结合失稳导致无菌性松动^[4]，在磨损颗粒的作用下，被巨噬细胞吞噬并产生大量炎症因子，引起局部炎症反应^[5]，同时破骨细胞过度活化、成骨破骨的偶联失衡，从而产生假体周围骨溶解^[6]。

利格列汀属于二肽基肽酶 4(Dipeptidyl Peptidase 4, DPP-4) 抑制剂，是一种常见的治疗糖尿病药物。研究显示，糖尿病患者罹患骨质疏松和骨折等疾病的概率远高于健康人^[7]，基于对糖尿病的调查研究，发现特定的口服抗糖尿病药物，如西格列汀、格列美脲和胰岛素，可以降低血糖从而改善机体慢性炎症环境^[8]。据报道，利格列汀以浓度依赖性方式显著阻止脂多糖刺激的白细胞介素 6 产生和核因子 κ B/p65 水平，从而预防人脐静脉内皮细胞和人 U937 单核细胞的炎症^[9]。此外，动脉粥样硬化病变中，

利格列汀能抑制炎症介导的二肽基肽酶 4 表达，促进巨噬细胞向 M2 方向极化，从而减缓疾病进程^[10]。

基于利格列汀在多种器官和系统中调控巨噬细胞极化和抗炎的能力，研究团队假设利格列汀通过抑制巨噬细胞极化和破骨细胞过度活化能缓解假体周围骨溶解。其目的在于阐明利格列汀是否能够影响巨噬细胞极化，抑制破骨细胞活化，以及减轻钛颗粒诱导的炎性骨丢失，从而为无菌性假体松动的防治提供新的机制基础和解决思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验，随机对照动物实验；使用 Student's t 检验和单因素方差分析，采取盲法评估。

1.2 时间及地点 实验于 2023-06-15/2024-03-15 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 细胞和试剂 实验所用小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 购自中国科学院上海细胞库；利格列汀 (linagliptin, 阿拉丁)；纳米级钛颗粒 (埃普瑞)；胎牛血清、高糖 DMEM 培养基 (HyClone)；CalceinAM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒、SYBR Green PCR 预混液 (Yeasen, 上海, 中国)；小鼠来源核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)(R&D)；小鼠来源诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase,

iNOS) 抗体、精氨酸酶 1(arginase-1, ARG-1) 抗体 (abcam); 抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒 (碧云天); 牛骨切片 (阳明生物科技)。

1.3.2 实验动物 24 只 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 体重 28–32 g, 从苏州大学动物中心获得, 使用许可证号: SYXK(苏)2021-0074。小鼠被饲养在符合 SPF 级别标准的动物房内, 环境设定为恒定的室温 25 °C 和相对湿度 60%, 且按照 12 h 的昼夜交替周期进行光照调节。它们可自由获取实验室标准食物和自来水。该实验获得苏州大学伦理委员会的批准 (批准号: SUDA20230605A02)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞实验

(1) 细胞培养: 使用 RAW264.7 细胞作为 M0 巨噬细胞和破骨细胞前体细胞, 使用高糖 DMEM 培养基, 含有体积分数 10% 胎牛血清以及 1% 青霉素 / 链霉素的 Dulbecco 改良的 Eagle 高糖培养基进行培养; 细胞培养环境: 标准细胞培养箱, 37 °C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 环境。

(2) 增殖毒性实验: 使用 CCK-8 和活 / 死细胞染色评估不同浓度利格列汀对 RAW264.7 细胞活力的影响, 同时决定利格列汀合适的干预浓度。按照 CCK-8 操作说明, 分别制作标准曲线和待测细胞样品。待测样品处理: 在 96 孔板中配制 100 μL 的细胞悬液, 细胞密度为 4×10³/孔, 将培养板放在培养箱预培养 24 h。向培养板加入 10 μL 不同浓度的利格列汀 (0, 50, 100, 200, 400 nmol/L), 继续培养 24 h 和 72 h。向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 之后将培养板在培养箱内孵育 1 h。孵育结束后, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值。此外, 将 RAW264.7 细胞 2×10³ 个与 500 μL 高糖培养基制成细胞悬液, 之后接种于 24 孔细胞板中, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的利格列汀 (0, 50, 100, 200, 400 nmol/L), 继续孵育 24 h 和 72 h。孵育结束后, 使用活 / 死细胞染色试剂盒对细胞进行染色, 并放置于显微镜下观察。

(3) 巨噬细胞极化: 将 RAW264.7 细胞分 4 组培养, 对照组细胞加入高糖培养基; M1 诱导组: 加入 M1 诱导培养基 (含脂多糖 100 ng/mL 和干扰素 γ 20 ng/mL 的高糖培养基) 模拟炎症环境; 利格列汀低、高剂量组分别加入 50, 200 nmol/L 利格列汀处理 4 h 后加入 M1 诱导培养基。巨噬细胞极化诱导 24 h 后, 分别进行巨噬细胞极化免疫荧光染色、RT-PCR 检测巨噬细胞极化相关基因和巨噬细胞炎症因子的基因表达。

(4) 破骨细胞活化诱导: 将 RAW264.7 细胞以 2×10⁴/孔的细胞密度接种于 24 孔板中, 加入高糖培养基制成细胞悬液每孔接种 0.5 mL。8 h 后细胞已贴壁, 分为 4 组: 对照组使用高糖培养基培养, 破骨诱导组、利格列汀低剂量组及高剂量组加入破骨细胞诱导培养基进行破骨诱导 (加

入 50 ng/mL 核因子 κB 受体活化因子配体)。待微小破骨细胞形成后, 利格列汀低、高剂量组分别用利格列汀 (50, 200 nmol/L) 干预细胞 3 d。之后进行细胞抗酒石酸酸性磷酸酶染色和 RT-PCR 检测。

(5) 抗酒石酸酸性磷酸酶染色: 除去培养基, 用 PBS 洗涤细胞, 使用多聚甲醛固定细胞, 之后使用抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒对细胞进行染色。使用显微镜观察并记录破骨细胞图像, 染色阳性结果为多核细胞 (≥ 3 个细胞核), 即破骨细胞, 最后使用 Image J 对每组的破骨细胞数量进行定量分析。

(6) 破骨细胞骨吸收实验: 将 RAW264.7 细胞 2×10⁵ 个 / 孔的细胞密度接种到 24 孔板中的牛骨切片上, 每孔加入 0.5 mL 培养液, 并用 50 ng/mL 核因子 κB 受体活化因子配体刺激以获得成熟的破骨细胞。微小破骨细胞成形后, 用利格列汀 (50, 200 nmol/L) 干预细胞 3 d。使用扫描电子显微镜对每组切片上的骨吸收凹坑进行拍照并使用 Image J 软件进行定量。

(7) 实时荧光定量聚合酶链反应 RT-PCR: 使用 Trizol 试剂裂解细胞, 随后采用氯仿提取总 RNA。用 1 μg 的总量 RNA 为初始模板, 实现反转录合成互补脱氧核糖核酸 (cDNA)。qRT-PCR 检测在 CFX96™ 热循环仪 (BioRad Laboratories) 中进行, 将 cDNA 与 SYBR Green PCR 按比例混合预混液和相应的引物。采用热循环仪 (Thermo Fisher Scientific) 进行聚合酶链式反应。PCR 反应条件为: 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。以 β-actin 基因作为管家基因, 将各组的表达归一化的平均表达。引物购自中国生工生物工程股份有限公司, 引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列
Table 1 | Primer sequences

基因	正向引物序列 (5'–3')	反向引物序列 (3'–5')
肿瘤坏死因子 α	CTG AGG TCA ATC TGC CCA AGT AC	CTT CAC AGA GCA ATG ACT CCA AAG
白细胞介素 1β	ACT CAT TGT GGC TGT GGA GA	TTG TTC ATC TCG GAG CCT GT
NFATc1	GGG TCA GTG TGA CCG AAG AT	GGA AGT CAG AAG TGG GTG GA
基质金属蛋白酶 9	CGT GTC TGG AGA TTC GAC TTG A	TTG GAA ACT CAC ACG CCA GA
β-actin	TCA TTG ACC TCA ACT ACA TGG T	CTA AGC AGT TGG TGG TGC AG

1.4.2 动物实验 根据实验设计, 小鼠被随机分为 4 个不同的组别: 假手术组 (PBS 植入)、模型组 (钛颗粒植入)、利格列汀低剂量组 (钛颗粒植入) 和利格列汀高剂量组 (钛颗粒植入)。

(1) 建立颅骨骨溶解模型: ①制备钛颗粒悬浊液: 将 1.0 g 钛颗粒加入 10.0 mL PBS 充分混匀制成钛颗粒悬浊液, 注射量为 30 μL 钛颗粒悬浊液。②建立模型: 模型组、利格列汀低剂量组及高剂量组小鼠通过将钛颗粒悬浊液注

射至颅骨表面建立颅骨骨溶解模型。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (60 mg/kg) 麻醉小鼠，待麻醉起效后剃除小鼠头顶的毛发，剔除毛发的区域从两耳到两眼。在颅骨中线切开皮肤后，钝性分离剔除骨膜，充分暴露颅骨，将事先准备好的钛颗粒悬浊液 (30 μ L PBS，含有 30 mg 钛颗粒) 植入颅骨中线区。将刮去骨膜并注射 30 μ L PBS 的小鼠设为假手术组。手术结束后，缝合小鼠手术切口，在原环境继续饲养。③药物干预：术后第 2 天开始进行干预治疗，模型组和假手术组不做处理，利格列汀低剂量组和高剂量组分别灌胃利格列汀 (2，10 mg/kg，动物给药剂量依据 CCK-8 实验，确定了利格列汀的最低有效剂量和最高安全剂量)，每天 1 次。在造模后的第 3 周，将小鼠麻醉后脱颈处死，将获取的颅骨使用甲醛固定 48 h。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	探讨利格列汀对巨噬细胞极化、破骨细胞活化及磨损颗粒诱导炎性骨溶解的影响
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
选择动物的条件	8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠
动物品系及来源	雄性 C57BL/6J 小鼠由苏州大学动物中心提供
造模技术描述	麻醉后于小鼠颅骨中线切开皮肤，钝性分离剔除骨膜，充分暴露颅骨，将钛颗粒悬浊液 (含有 30 mg 钛颗粒) 植入颅骨中线区
造模主要诱导用药	钛颗粒悬浊液
动物数量及分组方法	小鼠随机分为 4 组：假手术组、模型组、利格列汀低剂量组和利格列汀高剂量组，每组 6 只
造模成功评价指标	造模 2 周后进行 micro-CT 检测，结果显示颅骨骨质稀疏，孔隙增加，证明成功建立了颅骨骨溶解模型
造模后实验观察指标	① micro-CT 评估骨溶解及骨参数变化；②血清诱导型一氧化氮合酶、精氨酸酶 1、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 水平；③苏木精-伊红染色评估骨溶解及形态学变化
造模后动物处理	造模 3 周后，使用 micro-CT 扫描小鼠颅骨，收集眼球动脉血液，麻醉后处死小鼠，收集颅骨
伦理委员会批准	该实验获得苏州大学伦理委员会的批准 (批准号：SUDA20230605A02)

(2)micro-CT 断层扫描：造模 3 周后，使用 micro-CT (型号：SkyScan1176) 扫描小鼠颅骨，采用 9 μ m 的分辨率以及 50 kV 和 200 μ A 的条件，以获取高质量的图像数据。随后，使用了一系列软件工具，对扫描获得的颅骨图像进行了重建和骨参数分析。这些软件提供了多种功能，包括图像重建、三维重建、骨组织分析等，为深入了解颅骨结构提供了重要支持。分析骨骼质量，包括骨密度 (mg/cm³)、骨表面积与骨体积的比值 (1/mm) 和孔隙率 (%)。

(3)Elisa 检测：造模 3 周后，将小鼠麻醉后，收集眼球动脉血液，离心后取上清，分别使用相应 Elisa 试剂盒检测血清诱导型一氧化氮合酶、精氨酸酶 1、肿瘤坏死因

子 α 、白细胞介素 1 β 的水平，首先将配制好的标准品和样品加入酶标孔中，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min，洗去未结合抗原，加入酶标试剂 37 $^{\circ}$ 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。

(4) 苏木精-伊红染色：对经过 micro-CT 扫描后对颅骨组织进行处理，包括固定、脱钙、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片及染色。苏木精-伊红染色步骤：将组织切片放入二甲苯中脱蜡，在无水乙醇中浸泡，并逐渐转移到不同体积分数的乙醇中，梯度为 100%，95%，80% 和 70%，最后放置在去离子水中，进行苏木精染液染色，使用 1% 盐酸进行脱色。在体积分数 70% 的乙醇中浸泡 1 min，pH 8.7 的含氨蒸馏水处理 5 min，蒸馏水冲洗 5 min。将切片放入伊红染液中染色 5 min，随后分别在体积分数 70%，80% 和 90% 的乙醇中脱水 1 min，无水乙醇中脱水 10 min，二甲苯中处理 3 min。将切片晾干后，滴加中性树脂，并盖上盖玻片封固，自然晾干。在显微镜下观察到细胞核呈蓝色，而胞质和其他组织呈深浅不等的粉红色。

1.5 主要观察指标 利格列汀对巨噬细胞极化、炎症因子的表达水平、破骨细胞形成和钛颗粒诱导的骨溶解的影响。

1.6 统计学分析 采用了 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。通过对数据进行 Student's *t* 检验和单因素方差分析 (ANOVA)，能够全面评估不同组之间的差异性，并判断这些差异是否具有统计学上的显著性，*P* < 0.05 及 0.01 被视为组间差异有显著性意义和有非常显著性意义，该文章的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 细胞实验结果

2.1.1 利格列汀对 RAW264.7 细胞活性的影响 利格列汀是常见的二肽基肽酶 4 抑制剂 (分子结构式见图 1A)。将 RAW264.7 细胞分别暴露于浓度为 0-400 nmol/L 的利格列汀中进行了 24 h 和 72 h 的干预，并使用 CCK-8 和活/死细胞染色检测 RAW264.7 细胞活力和增殖毒性。结果显示，当利格列汀的浓度低于 200 nmol/L 时，各组吸光度值均未受到显著影响；当利格列汀浓度达到 400 nmol/L 时，450 nm 处吸光度值急剧降低 (图 1B)。在利格列汀低于 200 nmol/L 时，细胞均无明显死亡，当浓度达到 400 nmol/L，出现一定数量死细胞；处理 72 h 后，利格列汀 400 nmol/L 干预的细胞数量显著低于其他低浓度组，并出现大量死细胞，说明达到 400 nmol/L 利格列汀抑制细胞增殖并对细胞有毒性作用 (图 1C)。根据上述结果，实验选择 50 nmol/L 作为低剂量利格列汀和 200 nmol/L 作为高剂量利格列汀进行后续实验。

2.1.2 利格列汀对巨噬细胞极化的影响 免疫荧光染色和流式细胞技术的结果显示,在脂多糖(100 ng/mL)和干扰素 γ (20 ng/mL)的存在下,与M1诱导组相比,利格列汀干预组M1极化标志蛋白诱导型一氧化氮合酶荧光强度显著下调($P < 0.01$),M2极化标志蛋白精氨酸酶1荧光强度显著上调($P < 0.01$),但低剂量组和高剂量组差异无显著性意义(图2A-C),提示利格列汀抑制巨噬细胞M1极化和促进巨噬细胞M2极化的途径可能不同;进一步提取各组细胞的总RNA,从基因转录层面检测了巨噬细胞炎症因子的表达水平(图2D)。结果显示,与M1诱导组相比,利格列汀干预组炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β mRNA显著下调($P < 0.01$),且利格列汀高剂量组低于利格列汀低剂量组($P < 0.05$),表明利格列汀调控巨噬细胞:抑制M1极化和促进M2极化,且在0-200 nmol/L范围内具有浓度依赖性。

2.1.3 利格列汀对破骨细胞活化的影响

(1)抗酒石酸酸性磷酸酶染色:在核因子 κ B受体活化因子配体的刺激下,观察多个巨噬细胞形成的成熟破骨细胞,并可观察到破骨细胞内部红染,与破骨细胞诱导组相比较,利格列汀低剂量组及高剂量组破骨细胞数量显著减少($P < 0.01$),且利格列汀高剂量组破骨细胞数量少于利格列汀低剂量组($P < 0.05$)(图3A)。

(2)电子显微镜的观察:为了更直观地观察利格列汀抑制破骨细胞骨吸收功能,进行了破骨细胞骨吸收实验。扫描电子显微镜观察发现:与破骨诱导组相比,利格列汀各剂量组的骨片吸收坑的平均面积均显著下降($P < 0.01$),并且利格列汀高剂量组的骨片吸收坑面积小于利格列汀低剂量组($P < 0.05$)(图3B, C)。

(3)RT-PCR检测:与破骨诱导组相比,利格列汀干预组NFATc1、基质金属蛋白酶9均显著下调($P < 0.01$),而利格列汀高剂量组基质金属蛋白酶9较利格列汀低剂量组下调($P < 0.05$)(图3D),表明利格列汀以浓度依赖性的方式抑制了破骨细胞活化、减弱了破骨细胞骨吸收能力。此外,利格列汀高剂量组与低剂量组NFATc1的mRNA相对表达无显著差异,提示利格列汀在NFATc1/基质金属蛋白酶9信号通路的传导过程中发挥了重要作用。

2.2 动物实验结果

2.2.1 实验动物数量分析 所有24只小鼠均被纳入到实验结果分析。

2.2.2 利格列汀对钛颗粒诱导的骨溶解的影响 对颅骨扫描并进行3D重建,对颅骨表面手术干预区域进行骨溶解度和骨参数分析。3D重建图像显示,与假手术组相比,模型组的颅盖广泛侵蚀。模型组小鼠颅盖广泛侵蚀;而利格列汀以浓度依赖性的方式缓解了颅骨的骨质破坏。进一步分析,骨侵蚀参数也证实了利格列汀的保护作用,与模

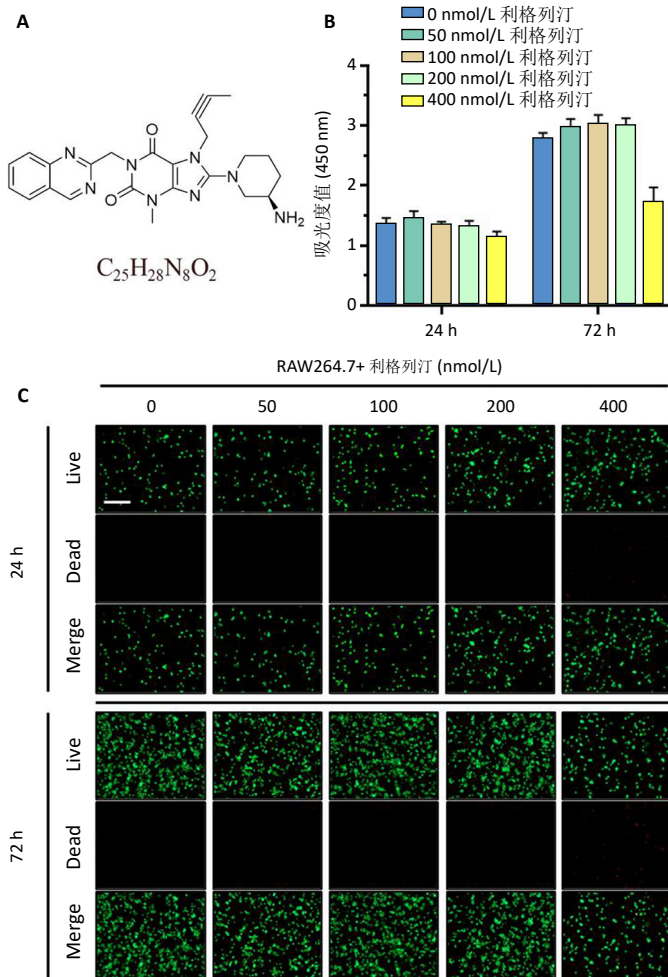
型组相比,利格列汀干预组的小鼠颅骨骨密度显著升高($P < 0.01$)、骨表面积骨体积比值和颅骨孔隙率显著降低($P < 0.01$)。苏木精-伊红染色还显示利格列汀组骨质溶解减弱,骨侵蚀减少。以上结果表明,利格列汀在钛颗粒诱导的小鼠颅骨骨溶解模型中显著缓解了骨质破坏。见图4。

2.2.3 利格列汀对钛颗粒诱导的炎症的免疫调控 基于利格列汀对巨噬细胞极化和破骨细胞的作用,拟探究其对假体周围骨溶解的治疗效果。为此,使用钛颗粒构建了小鼠骨溶解模型,并在造模后的3周内,采取每日灌胃利格列汀进行干预治疗。随后收集小鼠血清样本,并利用Elisa检测了其中极化标志蛋白及炎症因子的表达水平。结果显示,与假手术组相比,体内植入钛颗粒显著提高了小鼠血清中诱导型一氧化氮合酶、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 的表达水平($P < 0.01$, $P < 0.05$),同时降低了M2极化标志蛋白精氨酸酶1的表达水平。而利格列汀的干预则不同程度地逆转了钛颗粒诱导的炎症因子表达,且高剂量利格列汀对小鼠炎症因子的逆转作用优于利格列汀低剂量组(均 $P < 0.05$)。见图5。

3 讨论 Discussion

假体的无菌性松动仍然是关节置换后远期并发症之一,也是全关节置换术最常见的并发症^[11],最主要的病理机制是局部炎症和假体周围骨溶解。由于关节长期的活动,假体-骨组织界面发生磨损产生颗粒,在被巨噬细胞吞噬后,巨噬细胞更多的发生M1极化,导致M1/M2比例上升,同时释放大炎症因子,导致骨免疫微环境紊乱,破骨细胞过度活化,并且由于磨损颗粒的不可降解性和持续刺激,会引发并持续局部炎症,进一步导致假体周围骨溶解^[12]。值得指出的是,在骨免疫微环境紊乱过程中,多种细胞参与或推动了这一过程的发生与发展。巨噬细胞是免疫反应中最为活跃的细胞之一^[13-15],研究显示涉及环加氧酶2的释放^[16]、Toll样受体信号通路^[17]、肿瘤坏死因子信号通路等免疫应答过程^[18]。此外,对破骨细胞的研究同样深入广泛,例如通过抑制核因子 κ B^[19]、MAPK等信号通路抑制细胞形成^[20]。同时,免疫系统与其他系统交流和串扰也使得骨免疫微环境的情况变得更为复杂,包括神经和免疫反应等^[21]。

骨免疫微环境是在假体植入过程中需要考虑的一个重要因素^[22]。研究指出,无菌松动假体界面处泡沫状巨噬细胞表达骨相关基因和蛋白质可能会导致该部位骨重塑的紊乱,在部分炎症部位间充质细胞未能表达任何所需的成骨mRNA或蛋白质^[23]。以往针对假体周围骨溶解机制的治疗往往忽略了免疫微环境对骨稳态平衡的重要性,或者难以找到兼顾改善骨免疫微环境和调节骨细胞功能的有效方法。更多的治疗方法倾向于单纯抑制破骨细胞



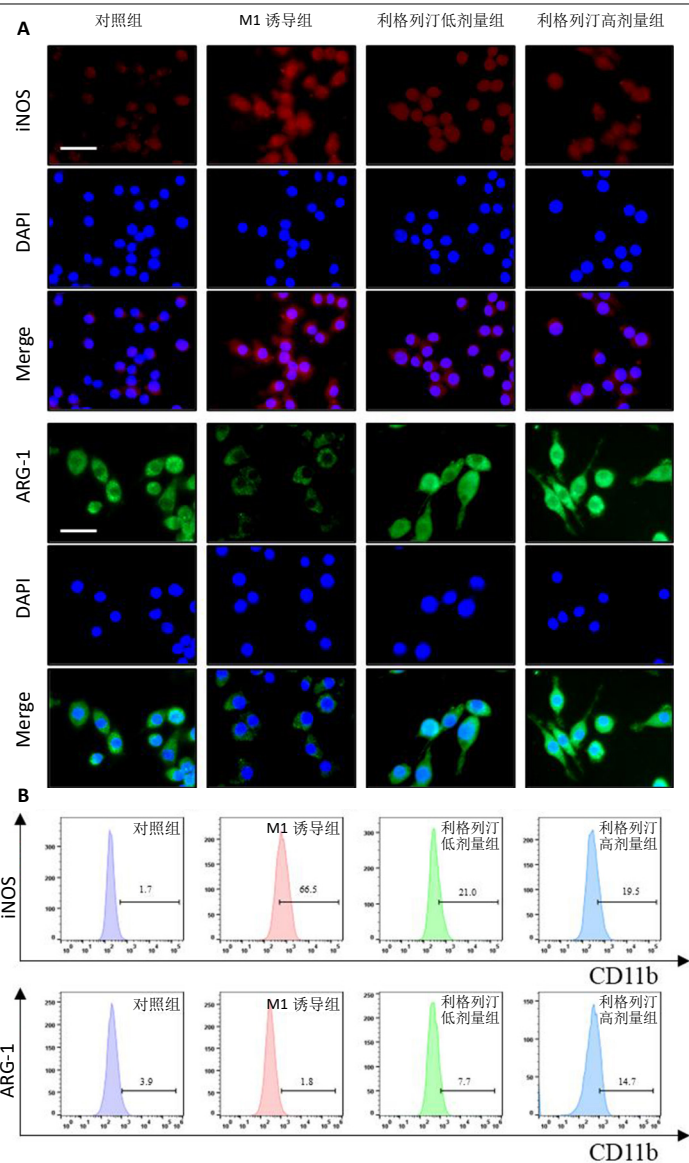
图注：图 A 为利格列汀的分子结构式；B 为 0–400 nmol/L 利格列汀干预 RAW264.7 细胞 24、72 h 后的 CCK-8 检测吸光度值；C 为 0–400 nmol/L 利格列汀干预 RAW264.7 细胞 24、72 h 后的活 / 死细胞染色结果，标尺 = 100 μ m。n=3。

图 1 | 不同浓度利格列汀对 RAW264.7 细胞增殖的影响及细胞毒性作用
Figure 1 | Effects of different concentrations of linagliptin on the proliferation of RAW264.7 cells and the cytotoxic effect

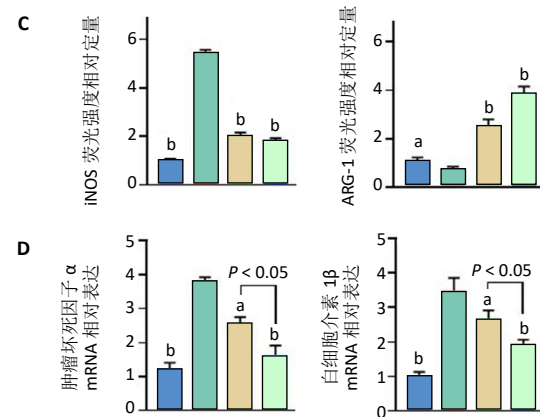
活化或促进成骨细胞分化，以推动骨重塑^[24–26]，但效果往往有限。

利格列汀属于二肽基肽酶 4 抑制剂，是一种常见的治疗糖尿病药物。最初有研究表明，糖尿病患者发生脆性骨折的风险会增加，即便是在骨密度正常的情况下^[27]，在经过特定的口服抗糖尿病药物治疗后，如西格列汀、格列美脲和胰岛素，糖尿病患者的骨折风险明显降低^[28–30]，这提示了糖尿病药物可能参与了骨免疫微环境和骨稳态的维持。进一步研究发现，利格列汀可以通过抑制二肽基肽酶 4，调节 M1/M2 巨噬细胞极化，从而减轻肥胖相关炎症和胰岛素抵抗^[31]，提示利格列汀可以通过调节巨噬细胞极化改善局部免疫微环境。此外，利格列汀也可以阻碍脂多糖诱导的体内破骨细胞形成和骨吸收^[32]。

鉴于无菌性假体松动的病理生理，即骨免疫微环境紊乱和破骨细胞过度活化，此次研究假设利格列汀可以

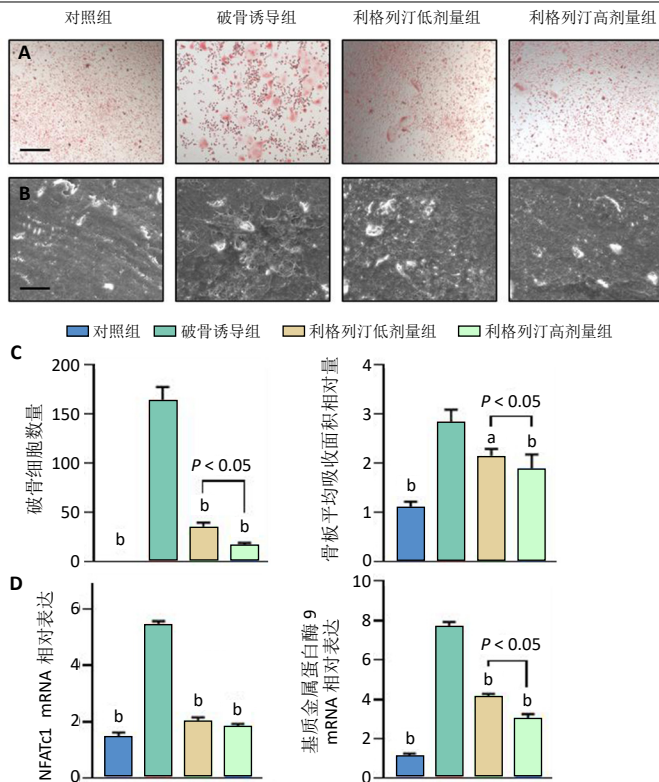


图注：A 为各组极化指标的免疫荧光图片，标尺 = 30 μ m；B 为各组极化标志蛋白及炎症因子流式细胞术的相对定量；C 为各组极化标志蛋白免疫荧光的相对定量；D 为各组炎症因子的基因转录水平。与 M1 诱导组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。n=3。iNOS：诱导型一氧化氮合酶；ARG-1：精氨酸酶 1。



图注：A 为各组极化指标的免疫荧光图片，标尺 = 30 μ m；B 为各组极化标志蛋白及炎症因子流式细胞术的相对定量；C 为各组极化标志蛋白免疫荧光的相对定量；D 为各组炎症因子的基因转录水平。与 M1 诱导组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。n=3。iNOS：诱导型一氧化氮合酶；ARG-1：精氨酸酶 1。

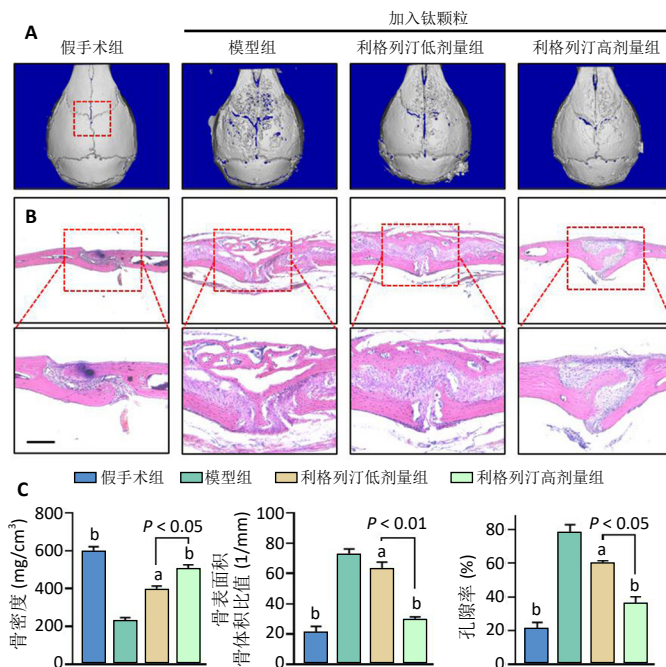
图 2 | 利格列汀调控巨噬细胞极化和炎症因子的表达
Figure 2 | Linagliptin regulates macrophage polarization and expression of inflammatory factors



图注：图 A 为各组抗酒石酸酸性磷酸酶染色图像，标尺 = 100 μm；B 为各组骨板吸收坑扫描电子显微镜图像，标尺 = 100 μm；C 为各组抗酒石酸酸性磷酸酶染色破骨细胞数量和骨板平均吸收面积相对量；D 为破骨细胞相关基因的表达。与破骨诱导组相比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。n=3。

图 3 | 利格列汀对破骨细胞活化影响及破骨细胞相关基因表达

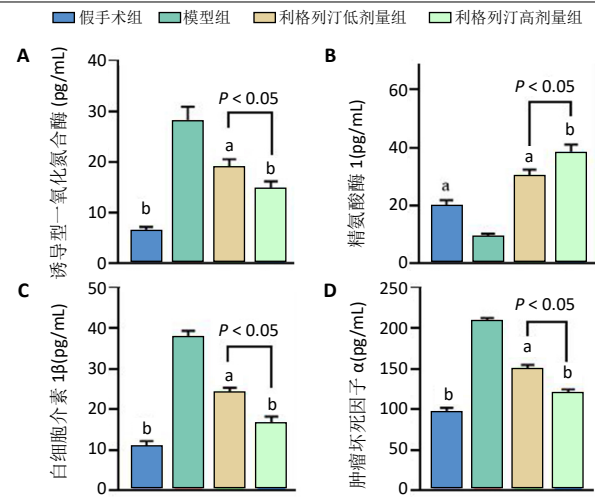
Figure 3 | Effects of linagliptin on osteoclast activation and the expression of osteoclast-related genes



图注：图 A 为各组小鼠 CT 三维重建图像；B 为小鼠颅骨苏木精-伊红染色结果和感兴趣区域放大图，标尺 = 50 μm；C 为骨密度、骨表面积骨体积比值和孔隙率的定量分析结果。与模型组相比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。n=3。

图 4 | 利格列汀对钛颗粒诱导的骨溶解的治疗作用

Figure 4 | Therapeutic effect of linagliptin on titanium particle-induced bone resorption



图注：图 A, B 分别为小鼠血清诱导型一氧化氮合酶、精氨酸酶 1 的 Elisa 检测结果定量分析；C, D 分别为小鼠白细胞介素 1β、血清肿瘤坏死因子 α 的 Elisa 检测结果定量分析。与模型组相比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。n=3。

图 5 | 利格列汀对钛颗粒诱导的炎症免疫调控

Figure 5 | Immunomodulatory effect of linagliptin on titanium particle-induced inflammation

调控巨噬细胞极化，同时抑制破骨细胞形成。研究结果也显示利格列汀能够在体外调控巨噬细胞极化和抑制破骨细胞活化，同时显著减少巨噬细胞炎症因子的表达和释放。在动物模型中，利格列汀干预可以有效缓解钛颗粒植入区域的骨质丢失。这表明利格列汀可能具有潜在的抑制假体周围骨溶解作用从而缓解无菌性假体松动，为临床上寻找新的药物治疗方案提供了新的理论基础和解决思路。

此项研究也存在相应的局限性，骨骼系统涉及多种类型的细胞，包括成骨细胞、破骨细胞、骨免疫细胞和骨神经细胞等，它们共同参与骨骼的生理过程^[33]。在动物实验中，充分利用了 micro-CT 和组织学技术来评估利格列汀对骨骼系统的保护作用；在细胞实验方面，运用了免疫荧光染色技术、流式细胞技术、RT-PCR、抗酒石酸酸性磷酸酶染色和骨板吸收等多种技术手段，阐明了利格列汀促进巨噬细胞 M1 极化、抑制 M2 极化以及抑制破骨细胞功能的作用，但是缺乏对骨骼系统中其他相关细胞的研究。而针对细胞实验，巨噬细胞极化和破骨细胞功能变化的具体机制仍需要做出进一步探究。研究表明，利格列汀抑制脂多糖诱导的人 U937 单核细胞炎症，在通路研究中发现，脂多糖受体 Toll 样受体 4、晚期糖基化终产物受体表达均上调，提示 Toll 样受体 4/核因子 κB 通路是利格列汀的潜在作用靶点^[34]。

利格列汀作为一种潜在的治疗药物，具有调节巨噬细胞极化和抑制破骨细胞活化的作用，有望在未来为治疗无菌性假体松动提供新思路。然而，其在临床应用中的安全性和有效性仍需进一步的研究和验证。

作者贡献: 第一作者杨鹏进行实验设计及撰写论文, 通讯作者耿德春进行实验审核, 杨鹏、李文豪、吴泽彬共同实施实验, 张巍、李文明、周军评估实验, 周军审核文稿。

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: 文章撰写遵守了《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] KATZ JN, ARANT KR, LOESER RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA*. 2021;325(6):568-578.
- [2] CONNOLLY P, COOMBS S, SCHWARZKOPF R. Mechanical complications after total knee arthroplasty. *Expert Rev Med Devices*. 2023;20(12):1105-1117.
- [3] RODRÍGUEZ-MERCHÁN EC, GÓMEZ-CARDERO P, ENCINAS-ULLÁN CA. Management of bone loss in revision total knee arthroplasty: therapeutic options and results. *EFORT Open Rev*. 2021;6(11):1073-1086.
- [4] 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.
- [5] MAZZELLA FM, ZHANG Y, BAUER TW. Update on the role of pathology and laboratory medicine in diagnosing periprosthetic infection. *Hum Pathol*. 2024;147:5-14.
- [6] MA TL, CHEN JX, KE ZR, et al. Targeting regulation of stem cell exosomes: Exploring novel strategies for aseptic loosening of joint prosthesis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:925841.
- [7] NIRWAN N, VOHORA D. Linagliptin in Combination With Metformin Ameliorates Diabetic Osteoporosis Through Modulating BMP-2 and Sclerostin in the High-Fat Diet Fed C57BL/6 Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:944323.
- [8] LIU J, LIU Z, LU M, et al. The combination of linagliptin and metformin rescues bone loss in type 2 diabetic osteoporosis. *J Drug Target*. 2023;31(6):646-654.
- [9] WANG SC, WANG XY, LIU CT, et al. The Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Linagliptin Ameliorates Endothelial Inflammation and Microvascular Thrombosis in a Sepsis Mouse Model. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):3065.
- [10] SINGH TP, VANGAVETI VN, MALABU UH. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and their potential role in the management of atherosclerosis-A review. *Diabetes Metab Syndr*. 2015;9(4):223-229.
- [11] PUIJK R, SIEREVELT IN, PIJLS BGCW, et al. Increased risk of aseptic loosening for posterior stabilized compared with posterior cruciate-retaining uncemented total knee replacements: a cohort study of 13,667 knees from the Dutch Arthroplasty Registry. *Acta Orthop*. 2023;94:600-606.
- [12] SUN Z, KANG J, YANG S, et al. CD73 inhibits titanium particle-associated aseptic loosening by alternating activation of macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2023;122:110561.
- [13] BAO S, YU D, TANG Z, et al. Conformationally regulated “nanozyme-like” cerium oxide with multiple free radical scavenging activities for osteoimmunology modulation and vascularized osseointegration. *Bioact Mater*. 2023;34:64-79.
- [14] MA T, CHEN S, WANG J, et al. Enhanced Osteolysis Targeted Therapy through Fusion of Exosomes Derived from M2 Macrophages and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Modulating Macrophage Polarization. *Small*. 2024;20(7):e2303506.
- [15] OUYANG Z, XU J, LIU T, et al. STING/TBK1 Regulates Inflammation in Macrophages and Titanium Particles-Induced Osteolysis. *ACS Biomater Sci Eng*. 2023;9(6):3273-3284.
- [16] WANG Z, TAO H, CHU M, et al. Byakangelicol suppresses TiPs-stimulated osteoclastogenesis and bone destruction via COX-2/NF- κ B signaling pathway. *Regen Biomater*. 2023;11:rbad092.
- [17] VASCONCELOS DP, JABANGWE C, LAMGHARI M, et al. The Neuroimmune Interplay in Joint Pain: The Role of Macrophages. *Front Immunol*. 2022;13:812962.
- [18] SONG B, JIANG C, LUO H, et al. Macrophage M1 Plays a Positive Role in Aseptic Inflammation-Related Graft Loosening After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Surgery. *Inflammation*. 2017;40(6):1815-1824.
- [19] LI F, HUANG K, WANG J, et al. A dual functional Ti-Ga alloy: inhibiting biofilm formation and osteoclastogenesis differentiation via disturbing iron metabolism. *Biomater Res*. 2023;27(1):24.
- [20] YU X, WU Q, REN Z, et al. Kaempferol attenuates wear particle-induced inflammatory osteolysis via JNK and p38-MAPK signaling pathways. *J Ethnopharmacol*. 2024;318(Pt B):117019.
- [21] CHAN KL, POLLER WC, SWIRSKI FK, et al. Central regulation of stress-evoked peripheral immune responses. *Nat Rev Neurosci*. 2023;24(10):591-604.
- [22] XIONG Y, MI BB, LIN Z, et al. The role of the immune microenvironment in bone, cartilage, and soft tissue regeneration: from mechanism to therapeutic opportunity. *Mil Med Res*. 2022;9(1):65.
- [23] ZREIQAT H, KUMAR RK, MARKOVIC B, et al. Macrophages at the skeletal tissue-device interface of loosened prosthetic devices express bone-related genes and their products. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65(1):109-117.
- [24] PENG X, LI Y, CHENG C, et al. Research on the inhibition for aseptic loosening of artificial joints by Sr-doped calcium polyphosphate (SCPP) in vivo. *Biomed Mater*. 2021;16(6). doi: 10.1088/1748-605X/ac2492.
- [25] LIU X, DIAO L, ZHANG Y, et al. Piperlongumine Inhibits Titanium Particles-Induced Osteolysis, Osteoclast Formation, and RANKL-Induced Signaling Pathways. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5):2868.
- [26] GU M, PAN B, CHEN W, et al. SPHK Inhibitors and Zoledronic Acid Suppress Osteoclastogenesis and Wear Particle-Induced Osteolysis. *Front Pharmacol*. 2022;12:794429.
- [27] NAPOLI N, CHANDRAN M, PIERROZ DD, et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nature reviews*. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(4):208-219.
- [28] JOSSE RG, MAJUMDAR SR, ZHENG Y, et al. Sitagliptin and risk of fractures in type 2 diabetes: Results from the TECOS trial. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19(1):78-86.
- [29] KOHLER S, KASPERS S, SALSALI A, et al. Analysis of Fractures in Patients With Type 2 Diabetes Treated With Empagliflozin in Pooled Data From Placebo-Controlled Trials and a Head-to-Head Study Versus Glimepiride. *Diabetes Care*. 2018;41(8):1809-1816.
- [30] YUAN S, WAN ZH, CHENG SL, et al. Insulin-like Growth Factor-1, Bone Mineral Density, and Fracture: A Mendelian Randomization Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(4):e1552-e1558.
- [31] ZHUGE F, NI Y, NAGASHIMADA M, et al. DPP-4 Inhibition by Linagliptin Attenuates Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance by Regulating M1/M2 Macrophage Polarization. *Diabetes*. 2016;65(10):2966-2979.
- [32] ISHIDA M, SHEN WR, KIMURA K, et al. DPP-4 inhibitor impedes lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption in vivo. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:242-253.
- [33] OHLENDIECK K, SWANDULLA D. Complexity of skeletal muscle degeneration: multi-systems pathophysiology and organ crosstalk in dystrophinopathy. *Pflugers Arch*. 2021;473(12):1813-1839.
- [34] YAMADERA S, NAKAMURA Y, INAGAKI M, et al. Linagliptin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in human U937 monocytes. *Inflamm Regen*. 2018;38:13.

(责任编辑: WZH, ZN, WL, ZLJ)