

· 论 著 ·

细胞外信号调控激酶信号通路在钛颗粒诱导 假体周围骨溶解的实验研究

刘子歌¹, 张晨¹, 宋国瑞¹, 李燕², 刘心蕊³, 陈德胜⁴

1. 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏 银川 750004;
2. 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏 银川 750004;
3. 生育力保持教育部重点实验室 宁夏生殖与遗传重点实验室, 宁夏 银川 750004;
4. 宁夏医科大学总医院骨一科, 宁夏 银川 750004

摘要: **目的** 探讨细胞外信号调控激酶(ERK)信号通路在钛颗粒诱导的小鼠气囊植骨模型中炎症骨溶解的作用。**方法** 选取 45 只雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠制备气囊植骨模型,将制备好背部气囊并植入供体小鼠颅骨骨片的 45 只小鼠随机分为三组(每组 15 只):空白对照组(气囊内注入 PBS,腹腔注射生理盐水)、模型组(气囊内注射钛颗粒悬液,腹腔注射生理盐水)和钛颗粒 + ERK 抑制剂组(气囊内注射钛颗粒悬液,腹腔注射 ERK 抑制剂 PD98059),2 周后麻醉处死小鼠取出植入的颅骨及气囊壁组织。观察并评估植入颅骨的形态和颅骨中破骨细胞的形成情况;检测一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、核因子- κ B 受体活化因子(RANK)和核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)的表达量。**结果** 与空白对照组比较,模型组植入气囊的颅骨骨块破坏严重,破骨阳性细胞显著增多,NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等相关细胞因子的水平均显著增加($P < 0.05$),RANK、RANKL mRNA 的相对表达量显著提高($P < 0.05$);与模型组比较,钛颗粒 + ERK 抑制剂组植入颅骨破坏程度减轻,破骨阳性细胞显著减少,NO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平均显著降低($P < 0.05$),RANK、RANKL mRNA 的相对表达量显著降低($P < 0.05$)。**结论** ERK 信号通路抑制剂 PD98059 能显著减轻磨损颗粒诱导的炎症骨溶解,该作用可能是通过对 RANK/RANKL 信号通路的调节而实现。

关键词: 磨损颗粒; 细胞外信号调控激酶信号通路; 骨溶解; 无菌性松动

中图分类号: R 318.17 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2020)09-1153-06

Experimental study of ERK signaling pathway in periprosthetic osteolysis induced by titanium particles

LIU Zi-ge*, ZHANG Chen, SONG Guo-rui, LI Yan, LIU Xin-rui, CHEN De-sheng

* School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

Corresponding author: CHEN De-sheng, E-mail: charles_cds@163.com

Abstract: Objective To investigate the role of extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling pathway in inflammatory osteolysis induced by titanium particles in mice. **Methods** After preparing the back air sac and implanting the donor mouse skull slices successfully, forty-five female SPF BALB/c mice were randomly divided into three groups ($n = 15$, each): blank control group (PBS was injected into air sac, normal saline was injected intraperitoneally), model group (titanium particle suspension was injected into air sac, normal saline was injected intraperitoneally) and titanium particle + ERK inhibitor group (titanium particle suspension was injected into air sac and titanium particle suspension was injected intraperitoneally) (intraperitoneal injection of ERK inhibitor PD98059). Two weeks later, the mice were killed under anesthesia and the implanted skull and air sac wall tissue were removed. The morphology of implanted skull and the formation of osteoclasts were observed and evaluated. The expression of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, NF- κ B receptor activator factor (RANK) and RANK ligand (RANKL) were detected. **Results**

Compared with the blank control group, in the model group, the bone fragments implanted with air sac were seriously damaged, osteoclast positive cells were significantly increased, the levels of NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 were significantly

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2020.09.001

基金项目: 国家自然科学基金(81560364, 81760405, 81760395); 宁夏自然科学基金重点项目(2018AAC02013); 宁夏回族自治区人事厅留学基金资助(2017659); 宁夏医科大学校级课题重点项目(XZ2018014)

通信作者: 陈德胜, E-mail: charles_cds@163.com

increased ($P < 0.05$), and the relative expression of RANK and RANKL mRNA was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, in the titanium particles + ERK inhibitor group, the damage degree of bone destruction was alleviated, osteoclast positive cells were reduced, the levels of NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 were significantly decreased ($P < 0.05$), and the relative expressions of rank and RANKL mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** PD98059, an ERK signaling pathway inhibitor, could significantly reduce the inflammatory osteolysis induced by wear particles, which may be achieved by regulating the RANK/RANKL signaling pathway.

Key words: Wear particles; Extracellular signal regulated kinase signaling pathway; Osteolysis; Aseptic loosening

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81560364, 81760405, 81760395); Key Project of Ningxia Natural Science Foundation (2018AACC02013); Supported by the Overseas Study Fund of Ningxia Personnel Department (2017659); Key Project of Ningxia Medical University (XZ2018014)

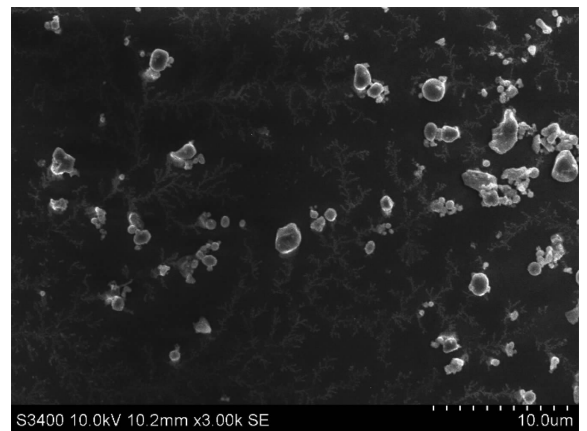
人工关节置换术是上世纪以来外科手术中最具革命性的突破之一, 其对患者关节重建和恢复运动功能有深远影响。有 15% 的患者会因为术后假体发生无菌性松动导致关节失去功能, 这不仅给患者带来巨大的痛苦, 同时家庭也要承受很大的经济负担。虽然现代技术在生物材料和假体设计上取得了重大进步, 但是由磨损颗粒引起的假体松动导致的人工关节无菌性松动仍然是最常见且难以克服的问题^[1]。人工关节无菌性松动的机制研究一直是国内外骨科学研究关注的热点和难点, 但迄今尚未取得重大突破。因此, 深入探讨人工关节无菌性松动的发病机制并且寻求适当有效的治疗方法依然是目前医学界关注的问题。细胞外信号调控激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 是一种细胞信号转导分子, 是将信号从表面受体传导至细胞核的关键因子。磷酸化激活的 ERK 由胞质转位到核内, 进而介导促炎症细胞因子的表达、白细胞黏附等多种生物学反应, 有研究显示 ERK 可能在炎性骨溶解中发挥重要作用^[2-3]。假体周围骨溶解可以通过激活核因子- κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK) 和核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 信号通路启动^[4]。然而, ERK 与 RANK/RANKL 生物信号在炎症性破骨细胞形成过程中的关系尚未完全清楚。本研究旨在通过小鼠体内实验来观察 ERK 抑制剂 PD98059 通过下调 RANK/RANKL 在小鼠溶骨模型中改善钛颗粒诱导的炎性骨溶解的影响, 以期为临床预防和治疗人工关节无菌性松动提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠, 8~10 周龄, 体质量为 (22 \pm 3) g, 健康状况良好, 购于宁夏医科大学实验动物中心; 纳米级钛颗粒 (美国 Alfa Aesar 公司); ERK 信号通路抑制剂: D98059 (美国 MCE 公司); 内毒素检测鲎试剂盒 (厦门市鲎试剂

实验厂); 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (南京建成生物); 白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α ELISA 试剂盒 (北京博奥森生物); 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 免疫组化染色试剂盒 (西安润德生物技术); Prime Script RT reagent Kit Perfect Real Time RNA 反转录试剂盒、Ultra SYBR One Step RNA PCR Kit 荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 Takara 生物); 组织包埋机、全自动轮转切片机等病理设备 (德国 Leica 公司); H-7650 透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); IX71 光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 BIO Rad 公司)。

1.2 钛颗粒的准备 用扫描电镜观察钛颗粒, 以确定用于实验钛颗粒的直径与大小。见图 1。然后将钛颗粒 180 $^{\circ}$ C 焙烤 6 h, 向钛颗粒中加入体积分数 75% 乙醇, 水平摇床晃动 12 h, 离心后收集钛颗粒并加入 PBS 并进行高温高压再次灭菌。将高压灭菌后的钛颗粒用 PBS 重悬至浓度为 300 mg/ml。采用鲎试剂盒进行内毒素检测, 确保内毒素含量 < 0.1 EU/ml (EU 为 endotoxin unit 的缩略形式), 方可用于细胞实验。用于实验的钛颗粒终质量浓度为 0.1 mg/ml。



注: 扫描电镜观察见钛颗粒大小不一, 形态不规则, 钛颗粒直径 $< 20 \mu\text{m}$ 。

图 1 电镜下钛颗粒的大小与形状 ($\times 3000$)

1.3 实验动物的造模及分组 所有实验动物均在宁夏医科大学实验动物中心 SPF 级动物房饲养, 每笼 5

只。小鼠进行 1 周的适应性饲养后正式进行实验。采用 Geng 等人的方法制备小鼠气囊植骨模型。小鼠行腹腔麻醉,麻醉成功后,使用一次性注射器在其背部缓慢推入 2 ml 无菌空气形成气囊;在接下来的 6 d 中,每天定时向气囊中推入 0.5 ml 无菌空气,直至第 7 天气囊形成;另选小鼠注射足量麻醉剂处死后,及时取出其颅骨骨片,剔除多余的软组织。切开气囊,植入供体小鼠的颅骨骨片,并仔细缝合切口。术后腹腔注射青霉素预防感染。手术中所用的器械,均经过灭菌处理,整个操作过程严格遵守无菌原则。

将上述已制备好气囊并在气囊中植骨的 45 只小鼠随机分为三组,每组 15 只。(1)空白对照组(Sham):植入骨片后立即将 0.1 ml PBS 注入小鼠气囊。腹腔注射 0.1 ml 生理盐水,1 次/d。(2)模型组(Vehicle):植骨后小鼠气囊内立即注射 0.1 ml 处理好的钛颗粒悬液。腹腔注射 0.1 ml 生理盐水,1 次/d。(3)钛颗粒 + ERK 抑制剂组(ERK):植骨后小鼠气囊内立即注射 0.1 ml 处理好的钛颗粒悬液。腹腔注射 10 mg/kg ERK 抑制剂 PD98059,1 次/d。第 14 天后足量麻醉剂处死小鼠,收集标本并进行相关检测。

1.4 主要观察指标

1.4.1 HE 染色观察植入颅骨的基本形态 取出气囊中植入的颅骨,4% 多聚甲醛固定 48 h。12% EDTA 脱钙 2 周。经脱水、石蜡包埋,切成厚度为 3 μm 切片,捞片,置于烤箱中烘烤 3 h 后进行染色。镜下观察植入颅骨的基本形态。

1.4.2 TRAP 免疫组化染色观察破骨细胞 颅骨进行切片后,脱蜡脱水后自然晾干。严格按照说明书逐步完成染色,封片,置于光镜下观察,并用 Image Pro-Plus 6.0 软件统计阳性细胞数。

1.4.3 检测小鼠静脉血液中 NO 含量 用眼球采血法,无菌 EP 管收集,离心分离出血清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。NO 含量采用比色法试剂盒测量,血清可以直接测量,严格按照试剂盒内说明书进行检测。

1.4.4 ELISA 试剂盒检测颅骨和包裹在周围囊壁组织中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平 每组随机挑选 3 只小鼠,取出植入颅骨及其囊壁组织,置于 6 孔板中,每孔加入 2 ml DMEM 培养基培养 24 h,离心后收集上清,严格按照 ELISA 试剂盒的操作说明书进行上述炎症因子的检测。

1.4.5 实时荧光定量 PCR 法检测颅骨中 RANKL、RANK 的 mRNA 水平 每组随机挑选 3 只小鼠,取出其植入的颅骨及囊壁组织,剪碎后在液氮作用下充分研磨后加入 TRIzol 1 ml,根据 RNA 提取试剂盒操作

说明书提取 RNA,根据 RNA 反转录试剂盒说明书在 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 的逆转录条件下合成互补 DNA(cDNA),将 cDNA 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;根据荧光定量 PCR 试剂盒说明进行 PCR 扩增,扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预热 2 min,然后在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 15 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,共 40 个循环。每个标本做 3 个复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。所有序列引物见表 1, β -actin 作为内参。

以上所有实验均独立重复 3 次。

表 1 目标基因引物序列

基因	引物序列
RANK	上游 CTG CCT CTG GGA ACG TGA CT
	下游 GCG AGG TCT GGC TGA CAT AC
RANKL	上游 CAG CAT CGC TCT GTT CCT GTA
	下游 CTG CGT TTT CAT GGA GTC TCA
β -actin	上游 AGG GTG TGA TGG TGG GAA TG
	下游 GCT GGG GTG TTG AAG GTC TC

1.5 统计学分析 所有数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组小鼠假体骨溶解和周围破骨细胞形成的变化情况 HE 染色后显示,Sham 组:未见钛颗粒及明显的炎症反应。Vehicle 组:可见气囊炎性反应明显并包裹着大量的钛颗粒,钛颗粒对颅骨表面存在明显侵蚀作用,有大量炎性细胞浸润,植入骨块骨组织破坏严重。与钛颗粒刺激的 Vehicle 组比较,钛颗粒 + ERK 抑制剂组可见气囊组织反应较轻,同时炎症反应及溶骨反应减弱,骨表面粗糙,损伤较轻。见图 2。

免疫组化染色进一步检查各组中 TRAP 阳性细胞的表达情况。Vehicle 组中,骨髓腔以及钛颗粒注射区域有大量 TRAP 表达阳性细胞(红色箭头所指);而在钛颗粒 + ERK 抑制剂组中,情况显著改善。通过 Image Pro-Plus 6.0 软件分析表明,在小鼠气囊植骨模型的 Vehicle 组 TRAP 阳性破骨细胞数目比 Sham 组明显增多($P < 0.05$),但加了 ERK 抑制剂的 ERK 组则有效抑制破骨阳性细胞的形成,显示其比 Vehicle 组明显减少($P < 0.05$)。见图 3。

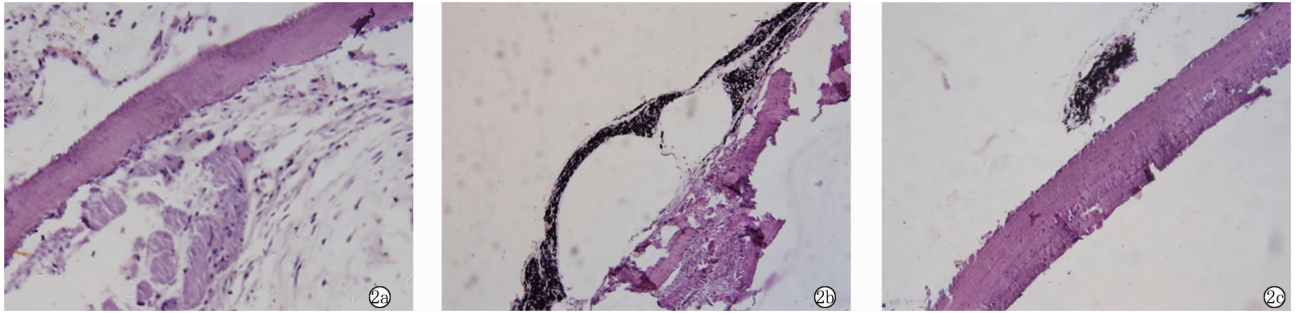
2.2 ERK 信号通路抑制剂可以显著降低钛颗粒诱导的炎性骨溶解 通过测定小鼠静脉血中亚硝酸盐的积累量,评价 ERK 信号通路抑制剂对钛颗粒致炎刺激下小鼠气囊植骨模型中产生 NO 的影响,结果显示,给予钛颗粒的 Vehicle 组导致小鼠静脉血中 NO 含量比 Sham 组显著增高($P < 0.05$);经 ERK 信号通

路抑制剂 PD98059 干预后,其 NO 含量比 Vehicle 组明显回落($P < 0.05$)。见图 4a。

为了进一步验证 ERK 可以调节钛颗粒诱导的炎性骨溶解的作用,应用 ELISA 法来检测 ERK 信号通路抑制剂干预后 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等关键炎性骨溶解细胞因子在颅骨及其囊壁组织中表达的变化。结果符合预期,ELISA 实验结果表明,在钛颗粒的刺激作用下,Vehicle 组中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达水平比 Sham 组显著升高($P < 0.05$);而加了 ERK 抑制剂的 ERK 组中,三者表达水平比 Vehicle 组明显回

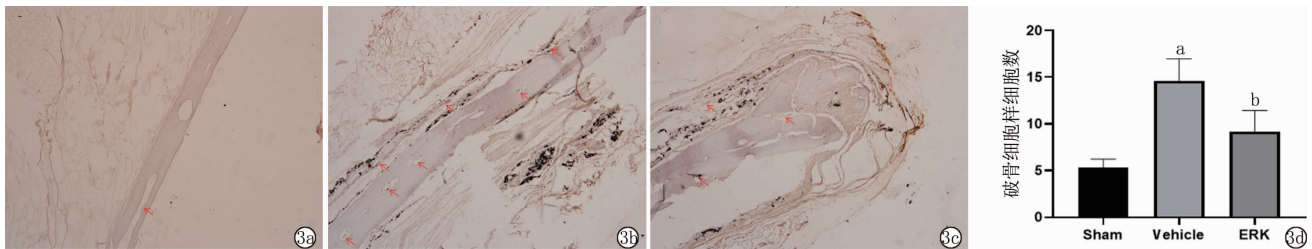
落($P < 0.05$)。见图 4b、4c、4d。

2.3 三组小鼠颅骨中 RANKL、RANK mRNA 水平的变化情况 考虑到 RANK/RANKL 在刺激破骨细胞相关基因的表达和破骨细胞分化过程中起重要作用,因此,继续从转录水平上观察 ERK 信号通路抑制剂对破骨细胞分化的影响。结果显示,与 Sham 组比较,Vehicle 组小鼠颅骨中 RANKL、RANK mRNA 的相对表达量均增加($P < 0.05$),而加了 ERK 抑制剂的 ERK 组中 RANKL、RANK mRNA 的相对表达量比 Vehicle 组明显回落($P < 0.05$)。见图 5。



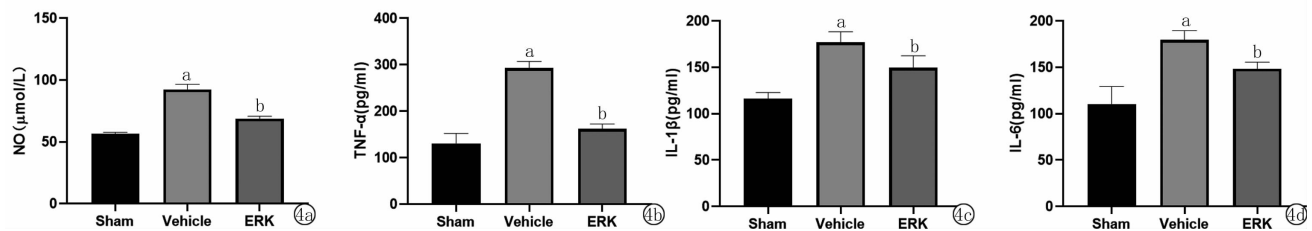
注:2a;Sham 组;2b; Vehicle 组;2c; ERK 组。

图 2 三组植入颅骨 HE 染色结果($\times 20$)



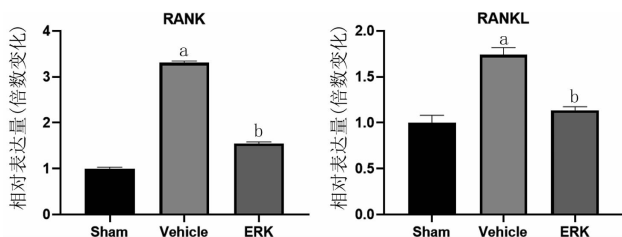
注:3a;Sham 组;3b; Vehicle 组;3c; ERK 组;3d:三组 TRAP 阳性破骨细胞比较(与 Sham 组比较, $^a P < 0.05$;与 Vehicle 组比较, $^b P < 0.05$)。

图 3 三组 TRAP 免疫组化染色结果($\times 20$)



注:4a:小鼠气囊植骨模型静脉血中 NO 的含量;4b、4c、4d 分别为小鼠气囊植骨模型标本培养液中 TNF- α 、IL-1 β 与 IL-6 的含量;与 Sham 组比较, $^a P < 0.05$;与 Vehicle 组比较, $^b P < 0.05$ 。

图 4 ERK 信号通路抑制剂调节骨溶解相关炎症因子



注:与 Sham 组比较, $^a P < 0.05$;与 Vehicle 组比较, $^b P < 0.05$ 。

图 5 三组小鼠颅骨中 RANK 与 RANKL mRNA 的表达情况

3 讨论

假体无菌性松动主要由骨形成与骨吸收之间的不平衡导致,最终引起假体与自身骨之间产生松动,缩短假体的使用寿命^[5]。假体相互摩擦所产生的磨损颗粒在无菌性松动的发生中起到不可忽视的作用。磨损颗粒诱导的骨溶解机制比较复杂,与磨损颗粒的种类、颗粒的大小、颗粒数量甚至植入物的时间等都有关系。但是整个过程可以大致概括成假体周围局

部炎症的诱导、促炎症因子信号的释放、免疫细胞的招募、破骨细胞的成熟和活化^[6]。其所诱导的炎性反应主要是通过磨损颗粒自身刺激巨噬细胞,成纤维细胞,成骨细胞及 T 淋巴细胞等分泌大量的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和前列腺素 E2 (PGE2) 等炎性因子引起。已经有研究表明, TNF- α 和 IL-1 β 在其中起核心作用,是诱导破骨细胞形成的重要介质,已经成为众多预防和治疗磨损颗粒所致炎性骨吸收药物的靶点^[7]。

炎性骨溶解是类风湿性关节炎和多种其他与炎症相关骨疾病的一种常见严重并发症。炎症环境中其可增加细胞因子的产生,加速破骨细胞募集和激活。破骨细胞是由单核巨噬细胞融合而成的多核细胞,受特异性破骨细胞因子 RANKL 和巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 的影响^[8]。RANKL 又名 TNF 相关激活诱导细胞因子 (TRANCE),是一种发现于成骨细胞系间充质细胞表面的膜结合型同源三聚体蛋白,通过识别其受体 RANK,从而激活骨髓巨噬细胞呈现破骨细胞表型而发挥作用。M-CSF 可以抑制成熟破骨细胞的凋亡,刺激破骨细胞的分化和成熟,从而维持其存活^[9]。RANK 是 RANKL 的唯一受体,其为 I 型跨膜蛋白,从属于 TNF 受体家族^[10]。RANKL 与 RANK 结合后,启动 RANKL 信号转导, TNF 受体相关胞浆因子 6 (TRAF6) 是激活破骨细胞成熟与其功能的关键^[11]。由此可见, RANKL 和 RANK 的结合在破骨细胞的形成和分化过程中起到了决定性作用。RANKL 是刺激破骨细胞分化的关键细胞因子,分析 RANK 激活后的细胞内信号具有重要意义。

ERK 是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族的主要的作用因子,其信号转导通路包括 ERK1 和 ERK2,参与细胞发育、增殖、分化等多种基本的病理生理过程^[12]。PD98059 是一种 MEK 特异性抑制剂,它可以透过细胞膜,选择性抑制 MEK1,从而抑制 ERK 信号通路的转导^[13]。ERK 是 MAPK 家族的主要的作用因子,与 RANK 介导的破骨细胞的激活有紧密联系。ERK 磷酸化后可以诱导 c-fos、TRAP、CTR 等破骨关键基因的表达,促进破骨细胞活化^[14]。ERK 由 Ras-Raf-MEK1/2 途径通过 MEK 介导的双功能苏氨酸和酪氨酸磷酸化激活。ERK 对破骨细胞的形成、生存、分化及刺激骨吸收均有重要作用^[15]。ERK 在成骨细胞中也有调控作用,它不仅影响成骨细胞的增殖,而且对成骨细胞的黏附、伸展、迁移及整合素的表达均有重要意义^[16]。近年来研究表明: MAPK 信号转导通路与骨代谢关系密切^[12,17]; ERK 是多种促增殖信号转导途径的细胞外终点,也是其核

心成分,可以调控破骨细胞的生成活性。

本研究发现,在 ERK 信号通路抑制剂 PD98059 作用下,由钛颗粒诱导的小鼠气囊植骨模型中的炎性骨溶解效应显著降低。HE 和 TRAP 免疫组化染色结果证实,钛颗粒附着区域可见明显的骨质溶解、破骨细胞功能活跃,并且炎性反应明显。而加入 ERK 抑制剂后骨质溶解和炎性反应得到明显改善, TRAP 表达明显降低。TRAP 是破骨细胞关键的标记蛋白之一,它在破骨细胞的分化及成熟阶段中均有大量表达,并在骨吸收中发挥重要作用。TRAP 主要存在于破骨细胞的溶酶体中,参与骨基质的降解,也被释放进入骨吸收陷窝,使骨桥蛋白去磷酸化,促进破骨细胞迁移^[18]。NO 可以调节与介导多种生理病理过程,兼有第二信使功能,在调节炎性骨溶解的过程中也能发挥重要作用。Moore 等^[19]证实诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 特异性抑制剂 L-N6-亚胺乙基-赖氨酸可明显降低小鼠模型滑膜液中的硝酸盐和亚硝酸盐的浓度,并间接抑制蛋白溶解酶的活性,降低 IL-1 β 、PGE2 的表达水平和 MMPs 活性。TNF- α 、IL-1 和 IL-6 是强有力的破骨炎性细胞因子,可诱导破骨细胞分化。TNF- α 可诱导破骨细胞前体细胞上 RANK 的表达,并且可以通过激活 NF- κ B 信号通路,直接诱导破骨细胞前体形成 TRAP 阳性的多核破骨细胞^[20]。IL-1 β 可以增强基质细胞中 RANKL 的表达,通过 p38MAPK 的控制直接刺激破骨细胞前体分化,间接促进 TNF- α 诱导的破骨细胞生成^[21]。而 IL-6 通过诱导成骨细胞和基质细胞中 RANKL 的表达积极参与破骨细胞的形成^[22]。本研究结果证实了 ERK 信号通路抑制剂可以显著降低 NO、TNF- α 、IL-1 和 IL-6 在钛颗粒诱导的小鼠气囊植骨模型中的表达。接着检测了模型中 RANK 和 RANKL mRNA 的表达量,实验结果说明了 ERK 信号通路的转导主要是通过 RANK/RANKL 来调节炎性骨溶解。

综上所述,给予外源性 ERK 信号通路抑制剂 PD98059,能显著抑制钛颗粒诱导的骨溶解,或可对关节置换术后假体周围骨溶解导致的人工关节无菌性松动的预防和治疗、延长人工假体植入机体内的有效寿命提供一种思路。

参考文献

- [1] Zhang YY, Lin Y, Xiao LL, et al. The effects of icariin concentration on osteoclasts bone resorption induced by titanium particles in vitro [J]. Regen Biomater, 2015, 2(3): 197-202.
- [2] Li C, Wu ZX, Yuan GX, et al. Vx-11e protects against titanium-particle-induced osteolysis and osteoclastogenesis by suppressing ERK activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 514(4):

1244 - 1250.

- [3] Wu HB, Hu B, Zhou XP, et al. Artemether attenuates LPS-induced inflammatory bone loss by inhibiting osteoclastogenesis and bone resorption via suppression of MAPK signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):498.
- [4] Tanaka Y, Ohira T. Mechanisms and therapeutic targets for bone damage in rheumatoid arthritis, in particular the RANK-RANKL system[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2018, 40:110 - 119.
- [5] 郑秋坚, 邓展涛. 人工关节无菌性松动的话新说[J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(4):361 - 367.
- [6] Wagner H, Wagner M. Conus hip prosthesis[J]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, 2001, 68(4):213 - 221.
- [7] Amarasekara DS, Yun H, Kim S, et al. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks [J]. *Immune Netw*, 2018, 18(1):e8.
- [8] Tokunaga T, Mokuda S, Kohno H, et al. TGFβ1 regulates human RANKL-induced osteoclastogenesis via suppression of NFATc1 expression[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3):800.
- [9] Lee KH, Kim MY, Ahn H, et al. Blocking of the ubiquitin-proteasome system prevents inflammation-induced bone loss by accelerating M-CSF receptor c-fms degradation in osteoclast differentiation [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):2054.
- [10] van Dam PA, Verhoeven Y, Jacobs J, et al. RANK-RANKL signaling in cancer of the uterine cervix; a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9):2183.
- [11] 孙嗣国. 破骨细胞形成的分子机制及溶骨性病变中破骨细胞的局部调控 [D]. 西安:第四军医大学, 2007.
- [12] 陈德胜, 张先龙. MAPK 信号转导通路与人工关节磨损颗粒诱导骨溶解 [J]. *国际骨科学杂志*, 2012, 33(4):245 - 247.
- [13] 金清, 谢守祥, 许铁, 等. ERK 信号通路对不同浓度钛合金颗粒诱导成骨细胞 RANKL 和 OPG 表达的影响 [J]. *中国临床研究*, 2018, 31(12):1614 - 1618.
- [14] Yin ZQ, Zhu W, Wu Q, et al. Glycyrrhizic acid suppresses osteoclast differentiation and postmenopausal osteoporosis by modulating the NF-κB, ERK, and JNK signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859:172550.
- [15] 李忠浩, 闫亮, 万浪, 等. 1,25 二羟维生素 D3 通过 ERK5 通路调节破骨细胞分化 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26(14):1311 - 1316.
- [16] 袁晓军, 戴闽, 艾江波, 等. ERK 信号通路调节金属离子诱导成骨细胞 RANKL 表达的实验研究 [J]. *骨科*, 2010, 1(1):5 - 8.
- [17] Sun GC, Xing CC, Zeng LT, et al. Flemingia philippinensis flavonoids relieve bone erosion and inflammatory mediators in CIA mice by downregulating NF-κB and MAPK pathways [J]. *Mediat Inflamm*, 2019, 2019:5790291.
- [18] Kittaka M, Mayahara K, Mukai T, et al. Cherubism mice also deficient in c-fos exhibit inflammatory bone destruction executed by macrophages that express MMP14 despite the absence of TRAP + osteoclasts [J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(1):167 - 181.
- [19] Moore WM, Webber RK, Jerome GM, et al. L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase [J]. *J Med Chem*, 1994, 37(23):3886 - 3888.
- [20] Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, et al. IFN-γ directly inhibits TNF-α-induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions [J]. *Immunol Lett*, 2011, 137(1/2):53 - 61.
- [21] Wei S, Kitaura H, Zhou P, et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis [J]. *J Clin Investig*, 2005, 115(2):282 - 290.
- [22] Yoshitake F, Itoh S, Narita H, et al. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(17):11535 - 11540.

收稿日期:2020-02-22 修回日期:2020-04-09 编辑:石嘉莹