

# 雷尼酸锶对钛颗粒诱导炎性骨溶解的抑制作用

朱世军 徐耀增 崔京福 邵洪国 朱锋 耿德春

**【摘要】 目的** 观察雷尼酸锶(strontium ranelate, SR)对磨损颗粒诱导炎性骨溶解的影响。**方法** 30 只雄性 C57BL/J6 小鼠,随机分为空白组、对照组和药物组,每组 10 只。采用钛(Ti)颗粒诱导的小鼠颅骨溶解模型,药物组建模当日经灌胃予 SR[600 mg/(kg·d)],空白组和对照组不予处理;持续至建模后 10 d,处死取材。HE 染色观察颅骨溶解程度及骨膜厚度;抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色检测成熟破骨细胞;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1 $\beta$  和 IL-6 表达水平。**结果** HE 染色结果,对照组骨膜明显增厚,颅骨溶解区域广;图像分析软件测量结果,对照组骨膜厚度( $0.27 \pm 0.04$ ) mm,骨溶解率为  $0.47 \pm 0.11$ ,与药物组[( $0.11 \pm 0.02$ ) mm,  $0.18 \pm 0.05$ ]比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); TRAP 染色结果,对照组颅骨大片紫红色区域,SR 治疗后明显减少;ELISA 检测结果,SR 加入后, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的表达量分别为[( $145.6 \pm 14.2$ ) ng/L、( $130.2 \pm 8.2$ ) ng/L 和 ( $137.6 \pm 8.2$ )  $\mu$ g/L],与对照组[( $210.2 \pm 8.9$ ) ng/L、( $159.6 \pm 9.7$ ) ng/L、( $170.8 \pm 9.5$ )  $\mu$ g/L]比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** SR 能够减轻 Ti 颗粒引起的炎症反应、减少炎症因子分泌,抑制骨溶解。

**【关键词】** 炎症;骨质溶解;锶;钛;破骨细胞

**Inhibitory effects of strontium ranelate on titanium particle-induced inflammatory osteolysis.** ZHU Shijun, XU Yaozeng, CUI Jingfu, SHAO Hongguo, ZHU Feng, GENG Dechun. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: GENG Dechun, E-mail: szgengdc@163.com.

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of strontium ranelate (SR) on titanium (Ti) particles-induced inflammatory osteolysis through restraining osteoclastogenesis in a murine osteolysis model. **Methods** Thirty male C57BL/J6 mice, 8-10 weeks old, were enrolled in the study. All experimental animals were randomly divided into three groups: blank group, Ti group, SR group. SR [600 mg/(kg·d)] was administrated to mice when the Ti particles were implanted and maintained until the mice were sacrificed. The calvaria were collected 10 days after Ti implantation for histological and molecular analyses. HE staining was used to count the bone resorption area and the periosteum thickness of calvaria by using computerized image analysis system. Tartrate-resistant acid-phosphatase (TRAP) staining was done to determine the number of osteoclast-like cells. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-6 were examined by enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). **Results** The quantitative image analysis of histological sections revealed that the bone resorption area and the periosteum thickness of calvaria were remarkably different among the three groups ( $P < 0.05$ ). TRAP staining showed that SR could significantly decrease the number of TRAP positive cells in calvaria as compared with Ti group ( $P < 0.05$ ). The results of ELISA suggested that SR could significantly reduce the protein level of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 induced by Ti particles in a murine osteolysis model. **Conclusion** This study provides evidence that SR can markedly inhibit Ti-particle-induced inflammatory osteolysis, and could be developed as a potential compound for the prevention and treatment of osteolysis and subsequent aseptic loosening after total joint replacement.

**【Key words】** Inflammation; Osteolysis; Strontium; Titanium; Osteoclasts

doi:10.3969/j.issn.1674-8573.2014.02.001

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101399, 81272018, 81372018, 81101370, 81301559);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)

作者单位:215006 江苏苏州,苏州大学附属第一医院骨科  
通信作者:耿德春, E-mail: szgengdc@163.com

人工假体无菌性松动(aseptic loosening, AL)是导致关节翻修术的首要原因,多数学者认为磨损颗粒诱导炎症反应是引起 AL 的主要原因<sup>[1-3]</sup>。目前,AL 尚无有效的预防与治疗方法。如能用药物预防和治疗人工关节 AL,不仅可延长人工关节的使用寿命、避免翻修手术,而且可为患者减轻痛苦、

节约费用,具有巨大的社会效益和经济效益。

雷尼酸锶(strontium ranelate, SR)是一种有效的抗骨质疏松药物,临床研究证明,SR 能显著降低绝经后妇女的椎体骨折及髌部骨折的发生<sup>[4]</sup>。Bonnelye 等<sup>[5]</sup>研究发现,SR 能够促进骨量形成,抑制骨吸收。但是 SR 对磨损颗粒诱导炎性骨溶解的作用尚不清楚。本研究旨在探讨 SR 对钛(Ti)颗粒诱导炎性骨溶解的作用及机制。

## 材料与方 法

### 一、纯钛颗粒

Ti 颗粒购于美国 Johnson Matthey 公司(Catalog # 00681, Ward Hill, MA),93%的颗粒直径 < 20  $\mu\text{m}$ 。Ti 颗粒在温箱里 180  $^{\circ}\text{C}$  下干燥 6 h,然后浸浴于 75%的乙醇中过夜。用磷酸盐缓冲液冲洗 3 遍,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用<sup>[2,3]</sup>。

### 二、实验对象

30 只雄性 C57BL/J6 小鼠(苏州大学实验动物中心提供),体重 19~22 g,鼠龄 8~10 周龄;随机分成空白组、对照组和药物组,每组 10 只,SPF 级实验房饲养,房内室温(23  $\pm$  1)  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度为 56%,间隔照明,定期通风,紫外线消毒。

### 三、小鼠骨溶解模型制作

采用小鼠颅骨骨溶解模型<sup>[6]</sup>,实验小鼠用 40 g/L 水合氯醛 500 mg/kg 腹腔内注射麻醉。颅顶皮肤去毛、安尔碘消毒 3 遍后,在颅顶处作一约 1 cm 正中矢状切口,暴露 1.0 cm  $\times$  1.0 cm 骨膜,植入准备好的钛颗粒(15 mg/只),空白组除外。皮肤以 4-0 缝线缝合。所有手术均在同一天完成,手术期间使用无菌润滑眼药膏保护小鼠眼睛。

### 四、给药及取材

建模当日起,药物组每天以 600 mg/kg SR(Les Laboratoires Servier Industrie, Gidy, 法国)剂量灌胃<sup>[7]</sup>。常规饲养,持续至建模后 10 d,空白组和对照组不予处理。小鼠建模 10 d 后过量麻醉处死,将颅骨取出,剔除颅底附着软组织。每组中再随机分为两组,5 个颅骨以 10%的甲醛固定,10%的 EDTA 脱钙;5 个颅骨放于 6 孔板中,以 2 mL DMEM 培养基浸泡 24 h<sup>[8]</sup>。

### 五、组织学观察

小鼠颅骨脱钙 4 周后,用石蜡包埋、5  $\mu\text{m}$  厚切片,HE 染色,观察颅骨溶解程度及颅骨骨膜厚度,图像分析软件(Paint. NET)测量骨膜厚度及骨溶解面积;采用抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant

acid phosphatase, TRAP)染色检测成熟的破骨细胞。

六、酶联免疫吸附试验(ELISA)检测炎性因子肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1 $\beta$  和 IL-6

收集浸泡颅骨 24 h 后的 DMEM 培养液,4  $^{\circ}\text{C}$  条件下,以 3 000 r/min 离心培养液 5 min,取上清 100  $\mu\text{L}$  加入到包被有抗 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的单克隆抗体的 96 孔板(eBioscience 公司)中,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 90 min,再加入 100  $\mu\text{L}$  酶标二抗,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h;0.01 TBS 洗涤 3 次,加入 200  $\mu\text{L}$  底物溶液于 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min,终止反应,450 nm 测定吸光度 A 值。根据标准品 A 值得出目标因子浓度。

### 七、统计学分析

应用 SPSS 11.0 统计软件分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA 检验),分析前数据均进行方差齐性检验。差异具有统计学意义阈值为  $P < 0.05$ 。

## 结 果

### 一、实验动物一般情况

各组动物均在 40~70 min 内苏醒,可在笼内自由活动,正常进食,精神状态无明显变化。切口无炎性反应,均为一期愈合。实验过程中无动物意外死亡。

### 二、组织学观察

HE 染色结果显示对照组颅骨骨膜内大量细胞浸润,且多为炎性细胞,成纤维细胞较少,骨膜明显增厚,颅骨表面溶解区域深度大、范围广;药物组及空白组骨膜内细胞较少,多为成纤维细胞,炎性细胞较少,骨膜较薄;药物组颅骨表面溶解面积明显减少,空白组未见明显骨溶解(图 1)。

Paint. NET 软件测量结果表明对照组颅骨骨膜厚度为(0.27  $\pm$  0.04) mm。空白组、药物组骨膜厚度分别为(0.06  $\pm$  0.01) mm、(0.11  $\pm$  0.02) mm,与对照组相比,差异均有统计学意义(图 2,  $P < 0.05$ )。对照组颅骨骨溶解率(颅骨骨溶解面积/颅骨面积)为 0.47  $\pm$  0.11,药物组为 0.18  $\pm$  0.05,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

TRAP 染色阳性区域为紫红色,空白组可见点状的阳性改变,且主要集中于髓腔边缘;对照组颅骨溶解侧可见大片紫红色区域,表明颅骨溶解侧有大量的破骨细胞存在;药物组仅在颅骨溶解边缘有少量阳性区域(图 3)。

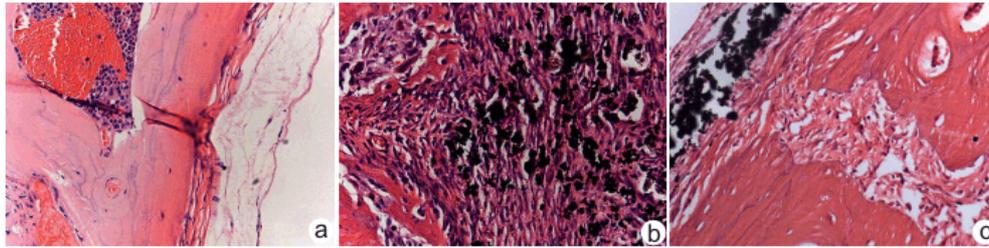


图 1 HE 染色结果( $\times 400$ ) a:空白组;b:对照组;c:药物组。Ti 颗粒加入后,骨膜内可见大量细胞,骨膜明显增厚,颅骨溶解深度大,范围广(b);药物组(c)和空白组(a)细胞较少,骨膜薄,骨溶解程度较轻

### 三、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 含量

ELISA 结果显示,颅骨体外培养 24 h 后,空白组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的含量分别为( $101.2 \pm 7.3$ ) ng/L、( $97.0 \pm 9.9$ ) ng/L 和( $121.4 \pm 9.3$ )  $\mu\text{g/L}$ ,药物组分别为( $145.6 \pm 14.2$ ) ng/L、( $130.2 \pm 8.2$ ) ng/L、( $137.6 \pm 8.2$ )  $\mu\text{g/L}$ ,与对照组[( $210.2 \pm 8.9$ ) ng/L、( $159.6 \pm 9.7$ ) ng/L、( $170.8 \pm 9.5$ )  $\mu\text{g/L}$ ]比较,差异有统计学意义(表 1,  $P < 0.05$ )。

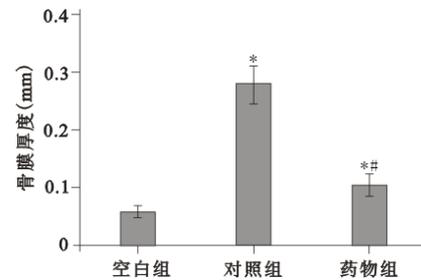


图 2 小鼠颅骨骨膜厚度 Ti 颗粒植入后,小鼠颅骨骨膜厚度明显增加;给药 10 d 后,骨膜厚度减少。\* 与空白组比较,  $P < 0.05$ ; # 与对照组比较,  $P < 0.05$

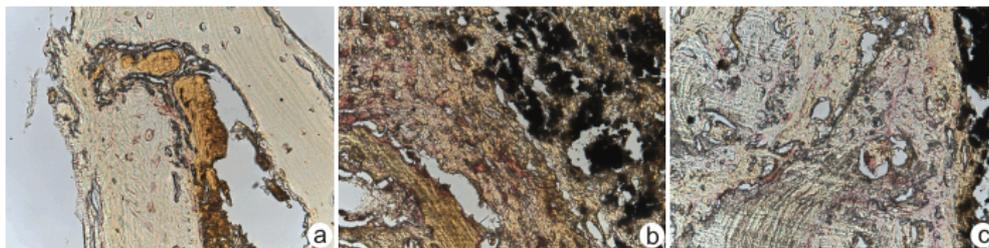


图 3 TRAP 染色结果( $\times 400$ ) a:空白组;b:对照组;c:药物组。空白组仅有少量散在点状的红色区域,且主要集中于髓腔边缘(a);对照组颅骨可见大片紫红色区域(b);药物组仅在在颅骨边缘有少量红色深染区域(c)

表 1 ELISA 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-1 $\beta$ (ng/L)	IL-6 ( $\mu\text{g/L}$ )
空白组	$101.2 \pm 7.3$	$97.0 \pm 9.9$	$121.4 \pm 9.3$
对照组	$210.2 \pm 8.9^*$	$159.6 \pm 9.7^*$	$170.8 \pm 9.5^*$
药物组	$145.6 \pm 14.2^{* \#}$	$130.2 \pm 8.2^{* \#}$	$137.6 \pm 8.2^{\#}$

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ ;与对照组比较, #  $P < 0.05$

### 讨 论

尽管 AL 的确切机制还不明确,但是磨损颗粒诱导的破骨细胞过度激活是其中的重要原因。磨损颗粒引起的炎症反应以及破骨细胞活化是 AL 发展过程中的两个主要步骤,也是治疗 AL 的两个重要药物靶点<sup>[2]</sup>。本研究结果显示 SR 对 Ti 颗粒引起炎症骨溶解有明显抑制作用,HE 染色结果证实

SR 干预后,小鼠颅骨溶解面积缩小。Saidak 等<sup>[9]</sup>证实 SR 可通过抑制核因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )信号途径降低破骨细胞的活化,抑制骨吸收。TRAP 染色结果证实,Ti 颗粒诱导的颅骨骨溶解,破骨细胞主要位于钛颗粒与骨质接触的界面范围内,给予 SR 后,颅骨溶解区域的破骨细胞的数量明显降低。说明 SR 能够抑制磨损颗粒引起的破骨细胞活化,进而影响炎症骨溶解。

磨损颗粒诱导的骨溶解过程,是一个由炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 介导的生物炎症反应过程<sup>[10]</sup>。研究发现,这些炎症因子存在于关节周围的软组织中,主要由单核-巨噬细胞系统分泌。磨损颗粒刺激单核-巨噬细胞发生反应并分泌多种与骨吸收有关的炎症因子,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等,这些细胞因子进一步作用于巨噬细胞、成骨细胞和破

骨细胞等,使成骨作用减弱,破骨作用增强,引起假体周围骨溶解,最终导致 AL。我们认为,植入 Ti 颗粒小鼠颅骨骨膜显著增厚,炎性细胞明显增多,说明钛颗粒植入后,诱导过度的炎症反应,使得局部炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 大量分泌。近年来研究发现,以炎症因子为作用靶点<sup>[1,6,8,11]</sup>,通过特定的途径影响 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 炎症因子的分泌,减少成熟破骨细胞的生成,能有效抑制磨损颗粒诱导的骨溶解效应。本实验证实,Ti 颗粒明显上调炎症因子表达,加重骨溶解程度,SR 干预后,明显降低颅骨骨膜厚度以及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的含量。同时,Buache 等<sup>[12]</sup>发现 Sr<sup>2+</sup> 能够抑制炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达,这与我们的研究结果相一致。因此,SR 可能通过干扰炎症因子表达进而抑制磨损颗粒诱导的炎性骨溶解。

综上所述,SR 能够明显抑制磨损颗粒诱导的炎性骨溶解,这与 SR 抑制磨损颗粒引起的炎症因子表达、减少磨损颗粒诱导的成熟破骨细胞数量有关。因此,SR 有望成为预防和治疗假体周围无菌性松动的新药。

#### 参 考 文 献

- [1] Shin DK, Kim MH, Lee SH, et al. Inhibitory effects of luteolin on titanium particle-induced osteolysis in a mouse model. *Acta Biomater*, 2012, 8(9):3524-3531.
- [2] 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(8):3216-3221.
- [3] Geng D, Xu Y, Yang H, et al. Protection against titanium particle induced osteolysis by cannabinoid receptor 2 selective antagonist. *Biomaterials*, 2010, 31(8):1996-2000.
- [4] Seeman E, Vellas B, Benhamou C, et al. Strontium ranelate reduces the risk of vertebral and nonvertebral fractures in women eighty years of age and older. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(7):1113-1120.
- [5] Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, et al. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption *in vitro*. *Bone*, 2008, 42(1):129-138.
- [6] Dong L, Wang R, Zhu YA, et al. Antisense oligonucleotide targeting TNF-alpha can suppress Co-Cr-Mo particle-induced osteolysis. *J Orthop Res*, 2008, 26(8):1114-1120.
- [7] Yalin S, Sagir O, Comelekoglu U, et al. Strontium ranelate treatment improves oxidative damage in osteoporotic rat model. *Pharmacol Rep*, 2012, 64(2):396-402.
- [8] 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(7):1926-1934.
- [9] Saidak Z, Marie PJ. Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacol Ther*, 2012, 136(2):216-226.
- [10] Ishiguro N, Kojima T, Ito T, et al. Macrophage activation and migration in interface tissue around loosening total hip arthroplasty components. *J Biomed Mater Res*, 1997, 35(3):399-406.
- [11] Burton L, Paget D, Binder NB, et al. Orthopedic wear debris mediated inflammatory osteolysis is mediated in part by NALP3 inflammasome activation. *J Orthop Res*, 2013, 31(1):73-80.
- [12] Buache E, Velard F, Bauden E, et al. Effect of strontium-substituted biphasic calcium phosphate on inflammatory mediators production by human monocytes. *Acta Biomater*, 2012, 8(8):3113-3119.

收稿日期:2013-12-25