

重楼皂苷 I 通过抑制自噬减轻磷酸三钙磨损颗粒诱导成骨细胞损伤的实验研究

董凡赫, 寿今豪, 陈宇峰, 张慧婷, 楼云玮, 杨子健, 张 云*

绍兴文理学院医学院 生理学教研室, 浙江 绍兴 312000

摘要: **目的** 观察重楼皂苷 I (PPI) 对磷酸三钙 (TCP) 磨损颗粒诱导的成骨细胞损伤的影响, 并探讨其调控机制。方法 通过消化法从 SD 大鼠颅骨中获得原代成骨细胞, 应用碱性磷酸酶 (ALP) 染色鉴定成骨细胞。TCP 磨损颗粒 (0.1 mg/mL) 与成骨细胞共孵育 48 h 制备成骨细胞损伤模型, 实验随机分为对照组、模型组和 PPI (30、100 μ g/mL) 组。CCK-8 和化学比色法分别测定成骨细胞活力和上清液中乳酸脱氢酶 (LDH) 水平; 实时荧光定量 PCR 法检测成骨细胞中 ALP、I 型胶原 (Collagen I) 和 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2) mRNA 水平; Annexin-V/PI 染色经流式细胞术定量分析成骨细胞凋亡情况; 应用茜素红 S 染色观察成骨细胞矿化结节形成; Western blotting 法检测成骨细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、Atg5、p62 和微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC-3) 蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 模型组成骨细胞活性降低, 特征蛋白 ALP、Collagen I、RUNX2 mRNA 水平及矿化结节形成显著减少, LDH 释放量、细胞凋亡和 Bax、cleaved Caspase-3、Atg5 和 LC-3 等蛋白表达及 LC-3II/LC-3I 值明显增加, 而 Bcl-2 和 p62 蛋白表达显著减少; 与模型组比较, PPI 各组成骨细胞活性升高, ALP、Collagen I 和 RUNX2 mRNA 水平和矿化结节形成明显增加, LDH 释放和细胞凋亡显著减少, Bax、cleaved Caspase-3、Atg5 和 LC-3 蛋白表达及 LC-3II/LC-3I 值也明显减少, 而 Bcl-2 和 p62 蛋白表达显著增加。**结论** PPI 可通过抑制自噬的活化而减轻 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞损伤。

关键词: 重楼皂苷 I; 磷酸三钙磨损颗粒; 成骨细胞; 凋亡; 自噬

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)09-2501-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.027

Polyphyllin I alleviates osteoblasts injuries induced by TCP wear particles *in vitro* via inhibition of autophagy

DONG Fan-he, SHOU Jin-hao, CHEN Yu-feng, ZHANG Hui-ting, LOU Yun-wei, YANG Zi-jian, ZHANG Yun
Department of Physiology, College of Medicine, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China

Abstract: Objective To observe the effect of polyphyllin I (PPI) on osteoblasts injuries induced by tricalcium phosphate (TCP) wear particles *in vitro*, and explain its regulation mechanisms. **Methods** Primary osteoblasts obtained from the calvaria of neonatal SD rat by the series of digestion were identified with ALP staining. The osteoblasts were treated with TCP wear particles (TCP, 0.1 mg/mL) for 48 h to establish an *in vitro* injuries model of the calvarial osteoblasts. The experiment was randomly divided into control group, model (TCP, 0.1 mg/mL) group, PPI (30 μ g/mL) group and PPI (100 μ g/mL) group. CCK-8 and chemical colorimetry were used to examine cell viability and lactic dehydrogenase (LDH) content in culture media; Real-time PCR was performed to detect mRNA levels of ALP, Collagen I and RUNX2 in osteoblasts; The flow cytometry was used to examine apoptosis of osteoblasts using Annexin V/PI double staining; When the osteoblasts were treated for 14 d, mineral nodules formation was observed with alizarin S staining; Western blot was applied to examine proteins expression of Bax, Bcl-2, cleaved Caspase-3, Atg5, p62, and microtubule associated protein 1 light chain3 (LC-3). **Results** Compared with control group, model group showed that the cell viability of osteoblasts, mRNA levels of ALP, Collagen I and RUNX2, and mineral nodules formation were significantly decreased; LDH content, percentage of apoptosis and proteins expression of Bax, cleaved Caspase-3, Atg5, LC-3 and the ratio of LC-3II/LC-3I were obviously increased in calvarial osteoblasts, whereas proteins expression of Bcl-2 and p62 was remarkably decreased. Compared with model group, PPI groups

收稿日期: 2019-11-01

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY17H060007)

作者简介: 董凡赫, 男, 本科, 从事假体周围骨溶解的研究及干预。E-mail: 806020138@qq.com

*通信作者 张 云, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事骨吸收相关疾病的研究及干预。Tel: (0575)88345698 E-mail: zhangyunbme@126.com

indicated that cell viability of osteoblasts, mRNA levels of ALP, Collagen I and RUNX2, and mineral nodules formation were dramatically increased; LDH content, percentage of apoptosis, protein expressions of Bax, cleaved Caspase-3, Atg5, and LC-3 and the ratio of LC-3II/LC-3I were obviously decreased, but Bcl-2 and p62 expression were obviously increased. **Conclusion** PPI alleviates osteoblasts injuries induced by TCP wear particles via inhibition of autophagy.

Key words: polyphyllin I; TCP wear particles; osteoblasts; apoptosis; autophagy

聚乙烯 (PE)、金属钛 (Ti) 和磷酸三钙 (TCP) 人工关节假体植入体内后经过长期磨损、碰撞会产生大量的 PE、Ti 和 TCP 等磨损颗粒, 这些微米粒径的颗粒可抑制成骨细胞的增殖与分化及新骨形成^[1-2]。此外, 这些磨损颗粒还能诱导成骨细胞凋亡, 释放白细胞介素-6 (IL-6)、IL-18 和前列腺素 E₂ (PGE₂) 等炎症因子^[3-6], 后者可促进破骨细胞分化及假体周围骨吸收^[7-8]。以上研究结果表明, 磨损颗粒可抑制成骨细胞活性, 并诱导其凋亡及功能损伤, 导致假体周围的骨吸收大于骨形成, 最终造成假体周围骨溶解及关节晚期松动。而抑制磨损颗粒诱导的成骨细胞损伤及凋亡可阻止假体周围骨溶解及关节松动。

重楼又名七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith, 为百合科植物。文献报道重楼具有消肿止痛、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化和抗炎作用^[9-11], 同时对蛇虫咬伤、跌打损伤、惊风抽搐等也有显著疗效。重楼皂苷 I (polyphyllin I, PPI) 是从重楼干燥根茎中提取出来的甾体皂苷类化合物。吴志等^[12]研究显示 PPI 可促进大鼠颅骨成骨细胞增殖和分化, 增加成骨碱性磷酸酶 (ALP) 活性和骨保护素 (OPG) 水平, 促进成骨细胞活性。但是, PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞损伤的影响及机制目前尚不明确。本研究应用 TCP 磨损颗粒诱导成骨细胞损伤体外实验模型, 观察 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞损伤的影响, 阐明自噬参与调控机制, 为 PPI 防治假体周围骨溶解和关节松动提供一种新的方法和新的治疗靶点。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 1 日龄 SD 大鼠, 购于浙江省军事医学科学院实验动物中心, 实验动物许可证号 SCXK (浙) 2014-0001, 合格证号 1712060013。

1.2 药品与试剂

TCP 磨损颗粒由浙江大学化学系馈赠; PPI (批号 B21668, 质量分数≥98%) 购自上海源叶生物有限公司; 低糖 DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒、BCA 试剂盒、

RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒和乳酸脱氢酶 (LDH) 释放检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; 茜素红 S 染液购自 Solarbio Life Sciences 公司; AnnexinV/PI 凋亡检测试剂盒、TRIzol 和超敏 ECL 化学发光检测试剂盒购于杭州联科生物技术有限公司; ALP、Runt 相关转录因子 2 (RUNX2)、I 型胶原 (Collagen I)、GADPH 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; 兔抗 Bax 抗体、兔抗 Bcl-2 抗体、兔抗 cleaved Caspase-3 抗体、兔抗 Atg5 抗体、兔抗微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC-3) 抗体、兔抗 p62 抗体及小鼠抗 β -actin 抗体等均购于美国 Cell Signaling 公司; PVDF 膜购于美国 Millipore 公司。

1.3 仪器

JEM-2010 透射电子显微镜 (TEM, 日本电子株式会社); Zetasizer Nano ZS90 激光动态光散射 (DLS) 分析仪 (英国马尔文公司); AB104S 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); 5430R 台式高速冷冻离心机 (美国 Eppendorf 公司); Elx800 全波长酶标仪 (美国 BioTek 公司); IX70 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 蛋白垂直系统 (美国 Bio-Rad 公司); 转膜仪和凝胶成像分析系统 (北京六一仪器厂); Applied Biosystems7500 实时荧光定量 PCR (美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 TCP 磨损颗粒形态观察与粒径分析

采用悬滴法制备样品, TEM (200 kV 加速电压) 观察 TCP 磨损颗粒形态。称取一定量的 TCP 磨损颗粒粉末, 溶于 PBS (pH 7.4) 中制成 TCP 磨损颗粒溶液 (1 mg/mL), 将该溶液用移液器注入到 U 型毛细管样品池内, 应用 DLS 分析仪检测 TCP 磨损颗粒的粒径分布。

2.2 TCP 磨损颗粒的准备

将 TCP 磨损颗粒置于 70%乙醇溶液, 室温震荡浸泡 48 h 后去除乙醇。干燥后用取 30 mg 玻璃纸分装, 将颗粒置于 250 °C 恒温箱中 3 h。采用鲎试剂法检测 TCP 磨损颗粒表面内毒素含量小于该试剂盒的最低检测线, 即排除内毒素污染。

2.3 成骨细胞的分离、培养与鉴定

取 1 日龄 SD 大鼠断头处死, 剥离颅盖骨置于 PBS 液中, 去除软组织, PBS 冲洗 2 次后剪碎; 经 0.25% 胰蛋白酶消化 15 min, II 型胶原酶 (1 mg/mL) 置于 37 °C 继续消化 90 min 后转入离心管。离心 (1 000 r/min, 10 min) 后, 倾去上清液获取成骨细胞, 应用 ALP 染色鉴定成骨细胞^[13]。

2.4 CCK-8 法确定 PPI 给药质量浓度

取 3~5 代成骨细胞 (1×10^3 个/mL) 接种于 96 孔培养板中培养 24 h, 加入 PPI (1、3、10、30、100 μ g/mL) 孵育 48 h 后, 加入 CCK-8 (20 μ L/孔) 温室避光孵育 1 h, 充分振摇后, 置于酶标仪测定 490 nm 处吸光度 (A) 值, 筛选出 PPI 的毒性剂量, 并确定其最佳干预质量浓度。

2.5 TCP 磨损颗粒诱导成骨细胞损伤模型制备

取 3~5 代成骨细胞 (1×10^3 个/mL) 接种于 96 孔、24 孔或 6 孔培养板中孵育 24 h 后, 倾去培养基, 加入 TCP 磨损颗粒 (0.1 mg/mL) 继续共孵育 48 h 制备成骨细胞体外损伤模型。

2.6 倒置显微镜观察成骨细胞形态改变

取 3~5 代成骨细胞 (1×10^3 个/mL) 接种于 96 孔培养板中培养 24 h, 对照组每孔加入常规培养基继续培养 48 h。模型组每孔加入 TCP 磨损颗粒 (0.1 mg/mL) 后继续培养 48 h。PPI 组每孔加入含有 PPI (30、100 μ g/mL) 的培养基预孵育 4 h 后, 加入 TCP 磨损颗粒 (0.1 mg/mL) 继续培养 48 h。PBS 清洗后置于倒置显微镜下观察成骨细胞形态变化。

2.7 CCK-8 法检测成骨细胞活性

细胞接种、分组及处理同“2.6”项。然后加入 CCK-8 (20 μ L/孔), 室温避光孵育 1 h 后测定 490 nm 处 A 值, 计算 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导损伤的成骨细胞活性的影响。

2.8 化学比色法检测上清液中 LDH 水平

取 3~5 代成骨细胞 (1×10^3 个/mL) 接种于 6 孔培养板中常规培养 24 h, 分组及处理同“2.6”项。收集上清液, 应用 LDH 试剂盒检测上清液中 LDH 水平。

2.9 流式细胞术检测成骨细胞凋亡

取 3~5 代成骨细胞 (1×10^3 个/mL) 接种于 24 孔培养板中培养 24 h, 分组及处理同“2.6”项。通过消化获取成骨细胞, 经 1 000 r/min 离心 10 min 去除培养基, PBS 清洗 2 次。然后加入 5 μ L Annexin V-FITC/10 μ L 碘化丙啶 (PI), 避光 37 °C 温育 15

min。最后加入 PBS (200 μ L) 并混匀后上流式细胞仪检测各组成骨细胞凋亡情况。FITC 的激发波长为 488 nm, 检测发射波长为 575 nm。

2.10 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测

取 3~5 代成骨细胞 (1×10^3 个/mL) 接种于 24 孔培养板中培养 24 h, 分组及处理同“2.6”项。利用 TRIzol 法提取总 RNA, 反转录后应用 Applied Biosystem™ SYBR™ 试剂盒进行 qRT-PCR 检测。设置程序: 95 °C、5 min 预变性, 95 °C、30 s 变性, 56 °C、30 s 退火, 72 °C、40 s 延伸, 45 个循环, 37 °C、30 s。导出扩增曲线, 记录 C_t 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 测定 mRNA 相对表达水平, 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Sequence of qRT-PCR primers

基因	序列 (5'→3')
ALP	正向: CCTAGACACAAGCACTCCCACTA 反向: GTCAGTCAGGTTGTTCCGATTC
Collagen I	正向: AGGGCTCCAACGAGATCGAGATCCG 反向: TACAGGAAGCAGACAGGGCCAACGTCG
RUNX2	正向: TCTGACTGGAAGAGCGGAGAG 反向: GAGTGGGGAACACACAGGTCT
GADPH	正向: CGGCAAGTTCACGCGCACAGTCAAGG 反向: ACGACATACTCAGCACCAGCATCACC

2.11 茜素红 S 染色观察矿化结节形成

取 3~5 代成骨细胞 (1×10^3 个/mL) 接种于 35 mm 培养皿中培养 24 h, 采用 PPI (30、100 μ g/mL) 预孵育 4 h 后, 加入 TCP 磨损颗粒 (0.1 mg/mL) 分别继续孵育 14 d, 隔日换药 1 次。14 d 后取出培养皿经 PBS 清洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛固定 10 min。弃固定液, PBS 清洗 3 次后与 0.1% 茜素红 S 染色液 37 °C 水浴 30 min, PBS 清洗后置于显微镜下观察矿化结节形成情况。对橘红染色且边界较清晰, 短径大于 100 μ m 的结节进行计数, 比较各组矿化结节形成。

2.12 Western blotting 检测蛋白表达

取 3~5 代成骨细胞 (1×10^3 个/mL) 接种于 24 孔培养板中培养 24 h, 分组及处理同“2.6”项。去除上清液后每孔加入 RIPA 裂解液 (80 μ L) 冰上裂解 30 min。经 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 利用 BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度。蛋白煮沸 10 min, 冷却后每孔加入 30 μ g 蛋白, 12% SDS-PAGE 分离蛋白, 电泳完成后将蛋白转移到 PVDF 膜上,

经 10% 脱脂奶粉常温封闭 2 h 后, 分别加入兔抗 Bax 抗体 (1:1 000)、兔抗 Bcl-2 抗体 (1:1 000)、兔抗 cleaved Caspase-3 (1:1 000) 抗体、兔抗 Atg5 抗体 (1:1 000)、兔抗 LC-3 抗体 (1:1 000)、兔抗 p62 抗体 (1:1 000) 和小鼠抗 β -actin 抗体 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜。次日用 TBST 洗涤 3 次后加入 HRP 标记的二抗 (TBST 配制), 室温孵育 2 h, TBST 清洗 3 次后加入 ECL 显色液, 通过凝胶成像系统扫描分析各蛋白表达的变化。

2.13 统计学分析

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, GraphPad Prism 5.0 软件进行分析, 各组采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 并用 Newman-Keuls 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 TCP 磨损颗粒的形态及粒径分析

TEM 观察和 DLS 分析显示, TCP 磨损颗粒形状不规则, 且容易发生凝聚, 其直径数微米不等, 平均粒径为 1.997 μm (图 1)。

3.2 成骨细胞的鉴定与形态观察

ALP 是成骨细胞的标志性酶, 通过对其染色来鉴定成骨细胞。ALP 染色后显微镜下可见成骨细胞

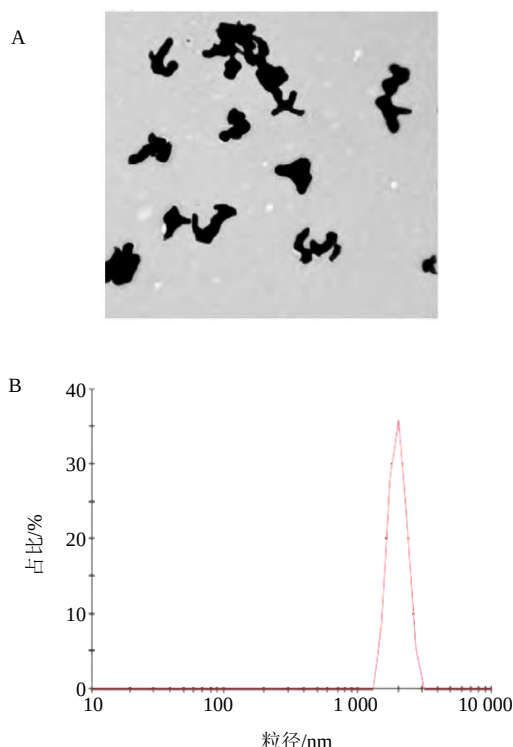


图 1 TCP 磨损颗粒 TEM 观察 (A) 与 DLS 分析 (B)
Fig. 1 TEM of TCP wear particles (A) and DLS assay (B)

多呈多角形或梭形, 细胞核被染成紫蓝色 (图 2)。

3.3 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞形态和活性的影响

如图 3 所示, PPI 质量浓度在 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 可促进成骨细胞增殖, 增加细胞活性, 其中 30、100 $\mu\text{g/mL}$ 对成骨细胞活性影响最为显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。因此, 本研究选取 30、100 $\mu\text{g/mL}$ 为干预剂量, 研究 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞损伤的影响。

细胞活性检测与形态观察发现, 与对照组比较, 模型组成骨细胞活性显著降低, 上清液中 LDH 水平明显升高 ($P < 0.01$, 图 4), 细胞数减少, 形态皱缩明显 (图 5)。与模型组比较, PPI 各组成骨细胞活性均明显升高, LDH 释放量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 且细胞数明显增加, 细胞略有皱缩。其中 PPI 100 $\mu\text{g/mL}$ 组对成骨细胞活性和形态的影响更为显著。

3.4 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞凋亡的影响

与对照组比较, 模型组成骨细胞凋亡显著增加, 其凋亡率为对照组的 6.10 倍 (图 6), 并伴随抗凋亡基因 Bcl-2 表达明显下调, 凋亡相关基因 Bax 显著

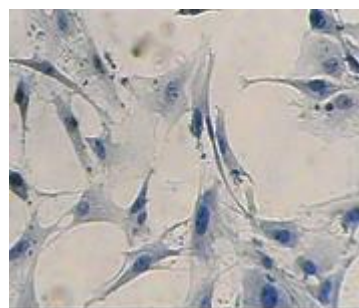


图 2 成骨细胞 ALP 染色 ($\times 200$)
Fig. 2 Calvarial osteoblasts stained with ALP ($\times 200$)

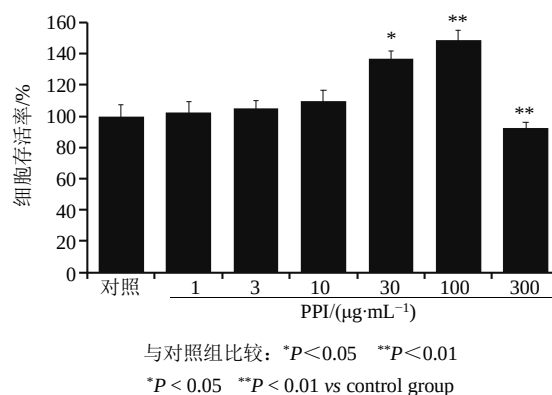
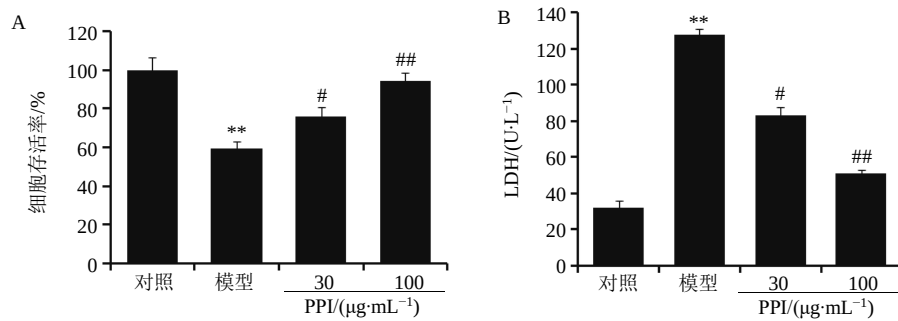


图 3 PPI 对成骨细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 3 Effect of PPI on cell viability of osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同
 ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图 4 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞活性 (A) 和 LDH 释放 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of PPI on cell viability (A) and LDH release (B) of osteoblasts caused by TCP wear particles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

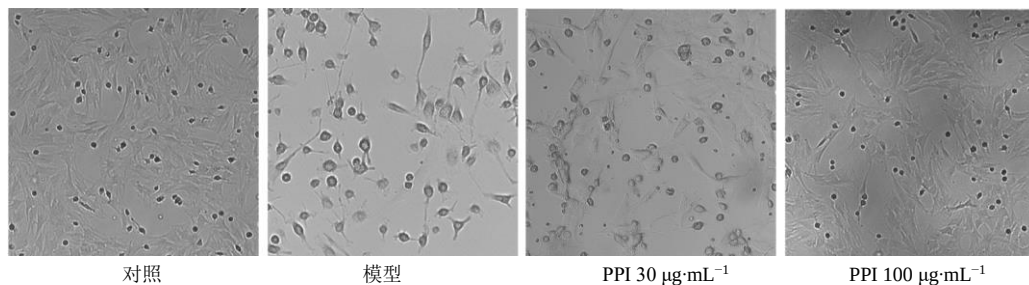


图 5 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞形态的影响

Fig. 5 Effect of PPI on changes in cell morphology caused by TCP wear particles in osteoblasts

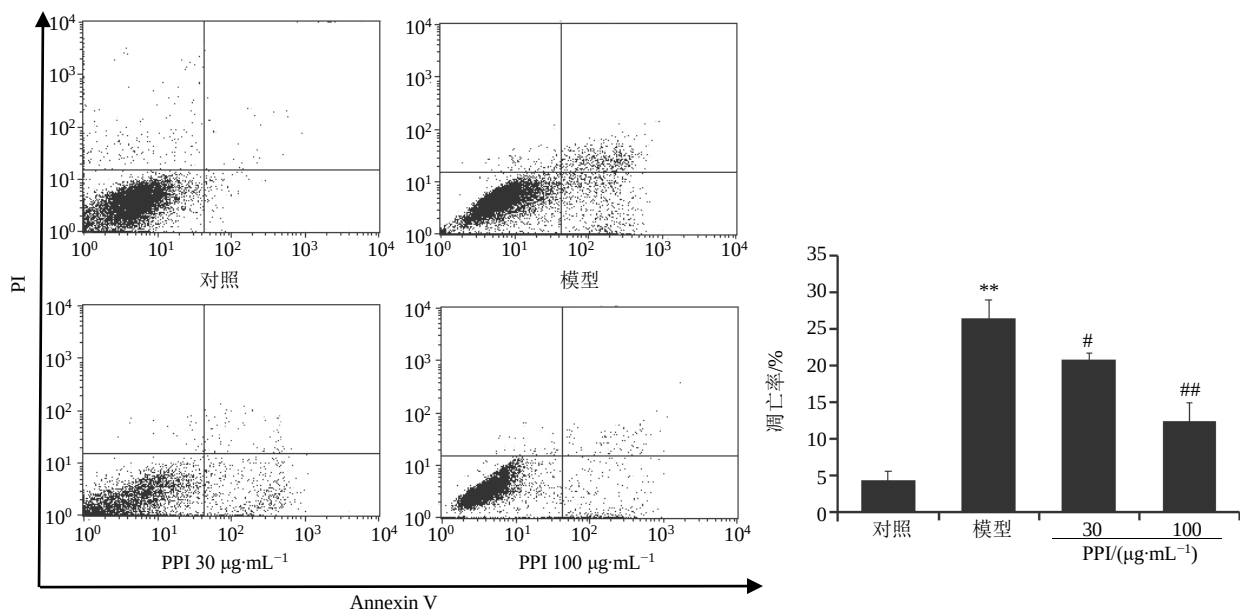


图 6 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 6 Effect of PPI on apoptosis caused by TCP wear particles in osteoblasts ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

上调, Bcl-2/Bax 值降低, 且 Caspase-3 活化明显增加 ($P < 0.01$, 图 7)。与模型组比较, PPI 各组成骨细胞凋亡、Caspase-3 活化减少, Bcl-2/Bax 值明显升高, PPI 30、100 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞凋亡率分别为模型组的 78.89%和 46.85% ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.5 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞功能的影响

与对照组比较, 模型组成骨细胞中 ALP、Collagen I、RUNX2 mRNA 水平明显降低, 矿化结节形成显著减少 ($P < 0.01$), 见表 2 和图 8。与模

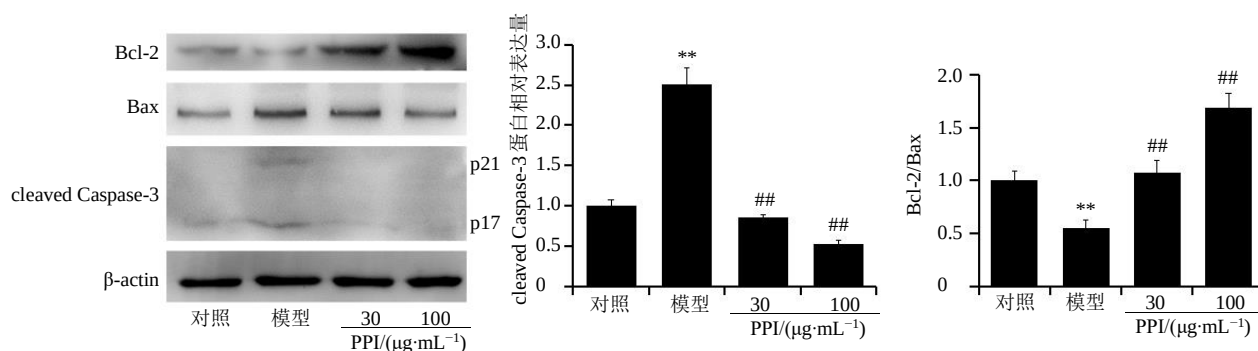


图7 PPI对TCP磨损颗粒诱导的成骨细胞凋亡相关蛋白表达改变的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 7 Effect of PPI on expressions of apoptotic proteins caused by TCP wear particles in osteoblasts ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

表2 PPI对TCP磨损颗粒诱导的成骨细胞ALP、Collagen I、RUNX2 mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of PPI on mRNA expressions of ALP, Collagen I and RUNX2 in osteoblastic induced by TCP wear particles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	mRNA 相对表达量		
		ALP	Collagen I	RUNX2
对照	—	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07
模型	—	0.42 ± 0.03**	0.63 ± 0.04**	0.55 ± 0.05**
PPI	30	0.67 ± 0.07#	0.72 ± 0.06#	0.78 ± 0.04#
	100	0.84 ± 0.06##	0.79 ± 0.07##	0.91 ± 0.03##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

型组比较, PPI各组成骨细胞中上述蛋白的mRNA水平、矿化结节数明显增加($P < 0.05$ 、 0.01), 其中PPI 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制TCP磨损颗粒诱导的成骨细胞功能损伤作用更强。

3.6 PPI对TCP磨损颗粒诱导的成骨细胞自噬的影响

与对照组比较, 模型组成骨细胞中自噬相关蛋白Atg5和LC-3表达水平及LC-3II/LC-3I显著增加, 而p62蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$, 图9)。与模型组比较, PPI各组成骨细胞中Atg5、LC-3及LC-3II/LC-3I水平显著降低, p62表达水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。

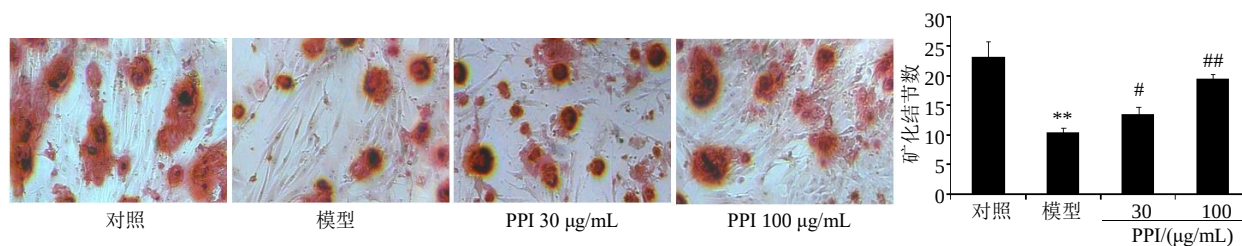


图8 PPI对TCP磨损颗粒诱导的矿化结节的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of PPI on mineralized nodules formation caused by TCP wear particles in osteoblasts ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

TCP由钙和磷组成, 其成分与骨基质的无机成分相似, 是一种具有良好生物相容性的生物活性材料, 目前被普遍用做临床骨缺损修复的人工关节材料。但是, TCP关节假体植入体内后经过长期磨损、碰撞会产生大量的TCP磨损颗粒, 这些颗粒可被假体周围的巨噬细胞、成骨细胞和骨细胞吞噬, 并损伤这些组织细胞, 但其具体的损伤效应和机制目前尚不明确。本研究发现TCP磨损颗粒可抑制体外培养的成骨细胞增殖和分化, 诱导成骨细胞凋亡, 下调成骨细胞特征蛋白ALP、Collagen I、RUNX2

mRNA水平, 减少矿化结节的形成, 这表明TCP磨损颗粒可诱导成骨细胞凋亡及功能损伤, 并抑制成骨细胞的活性, 与Ti、CoCrMo、CoCr、TiAl₆V₄和ZrO₂等磨损颗粒对成骨细胞的影响结果基本一致^[1-6]。此外, 上述磨损颗粒还可诱导成骨细胞释放PGE₂、IL-6和IL-18等因子^[4,6], 促进破骨细胞活化及骨溶解。提示成骨细胞在磨损颗粒诱导假体周围骨溶解中发挥重要的作用, 是防治假体周围骨溶解和关节松动的另一种靶细胞。

PPI是从百合科植物的重楼干燥根茎中分离出来的一种皂苷类化合物, 具有促进成骨细胞增殖、

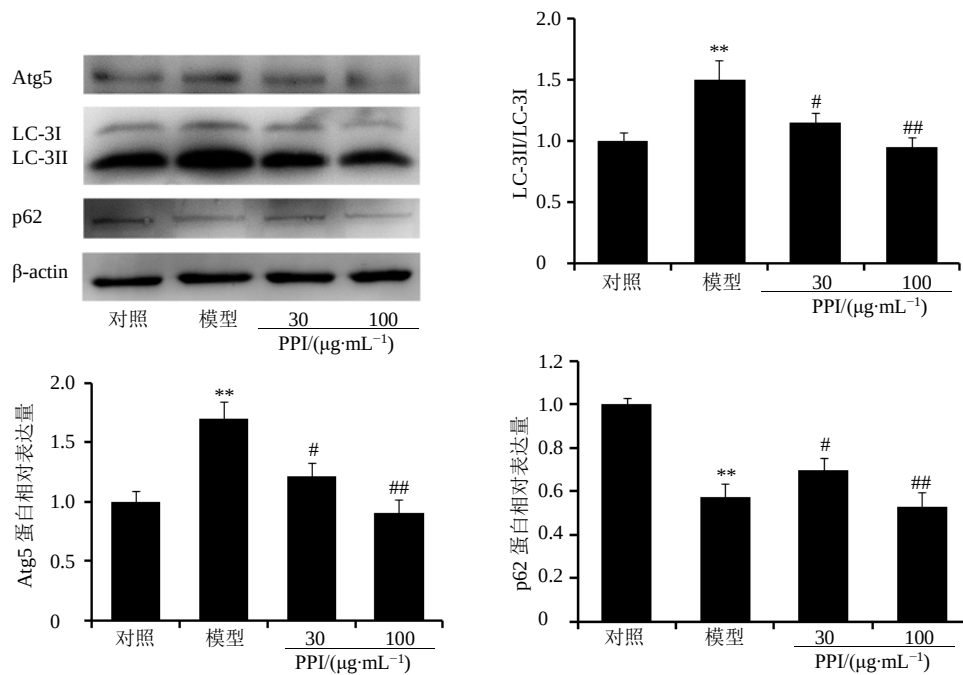


图 9 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞自噬活化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of PPI on activation of autophagy caused by TCP wear particles in osteoblasts ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分化, 诱导成骨细胞的成骨分化作用^[12]。刘永立等^[14]报道重楼总皂苷可通过增强胶原三股螺旋重复蛋白 1 (collagen triple helix repeat containing 1, CTHRC1) 的 mRNA 水平及其蛋白表达, 参与调控骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) 相关信号通路, 加速成骨细胞的增殖分化过程。本研究研究了 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞增殖和分化的影响, 结果表明 PPI 可显著抑制 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞活性的降低、功能的损伤。本研究中 PPI (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 促进成骨细胞增殖、分化作用稍弱于同剂量 PPI 对正常成骨细胞的影响^[12], 其原因可能是 TCP 磨损颗粒对成骨细胞的损伤所致。另外, 本研究还发现 PPI 能显著阻止 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞凋亡, 但是其具体机制目前尚不清楚。

自噬又称 II 型程序化细胞死亡, 以出现自噬体为基本特征^[15]。自噬的发生受自噬标志蛋白 Atg5、p62 和 LC-3 等的严格调控。LC3 是参与自噬调节的关键蛋白, 存在 LC3I 和 LC3II 2 种形式, 自噬发生时 LC3I 的 C 端经过脂化形成 LC3II, 参与自噬体的形成^[16], LC-3II 向 LC-3I 的转化水平可反应自噬水平。p62 是自噬降解的一种选择性底物蛋白, 自噬上游基因的表达增强或者下游降解被阻断均会导致 p62 的聚集, 最终 p62 进入成熟的自噬体内, 并在自噬体内降解。因此, p62 的水平与自噬负相关^[17]。

而 Atg5 则是自噬上游的关键蛋白, Atg5 与 Atg12 结合后与外膜结合, 促进自噬体膜的延伸, 最终形成自噬体^[18]。目前有关自噬与磨损颗粒诱导的成骨细胞凋亡之间的关系研究很少。Wang 等^[19]报道 CoCrMo 颗粒诱导的小鼠颅骨溶解模型中成骨细胞自噬, 增加 LC-3I 向 LC-3II 的转化, 且自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 明显阻止该颗粒诱导的小鼠假体周围骨细胞凋亡。Zhang 等^[20]研究表明 Ti 颗粒可诱导成骨细胞凋亡和自噬, 上调 Beclin-1 和 LC-3 表达, 增加 LC-3II/LC-3I。与之类似, 本研究结果也显示 TCP 磨损颗粒可诱导成骨细胞发生自噬, 显著上调 Atg5 和 LC-3 的表达, LC-3I 向 LC-3II 的转换明显, 并下调 p62 蛋白表达, 与成骨细胞的损伤程度呈正相关。以上研究结果提示自噬参与了磨损颗粒诱导的成骨细胞凋亡, 促进假体周围骨溶解和关节松动。

PPI 干预可显著减弱 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞自噬, 下调 Atg5 和 LC-3 蛋白表达水平、减少 LC-3I 向 LC-3II 的转换, 并增加 p62 蛋白的表达, 其趋势与 PPI 对成骨细胞形态、活性、分化及凋亡等指标的影响趋势一致, 这提示 PPI 可通过减轻自噬而抑制 TCP 磨损颗粒诱导的成骨细胞凋亡及损伤, 进而阻止假体周围骨溶解和关节松动。但是, PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导体内成骨细胞损伤的影响

以及体外、体内实验结果是否一致还需要利用小鼠假体周围骨溶解模型进一步研究,对比 PPI 对 TCP 磨损颗粒诱导体外、体内成骨细胞损伤效应,并对相关机制进行深入探讨。

参考文献

- [1] Lochner K, Fritsche A, Jonitz A, *et al.* The potential role of human osteoblasts for periprosthetic osteolysis following exposure to wear particles [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28(6): 1055-1063.
- [2] Vermes C, Roebuck K A, Chandrasekaran R, *et al.* Particulate wear debris activates protein tyrosine kinases and nuclear factor kappa Beta, which down-regulates type I collagen synthesis in human osteoblasts [J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(9): 1756-1765.
- [3] Yang F, Tang J, Dai K, *et al.* Metallic wear debris collected from patients induces apoptosis in rat primary osteoblasts via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 1629-1637.
- [4] Klinder A, Seyfarth A, Hansmann D, *et al.* Inflammatory response of human peripheral blood mononuclear cells and osteoblasts incubated with metallic and ceramic submicron particles [J]. *Front Immun*, 2018, 9(1): 831-831.
- [5] Deng Z, Wang Z, Jin J, *et al.* SIRT1 protects osteoblasts against particle-induced inflammatory responses and apoptosis in aseptic prosthesis loosening [J]. *Acta Biomater*, 2017, 49(1): 541-554.
- [6] Costa B C, Alves A C, Toptan F, *et al.* Exposure effects of endotoxin-free titanium-based wear particles to human osteoblasts [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2019, 95(1): 143-152.
- [7] Stea S, Visentin M, Granchi D, *et al.* Cytokines and osteolysis around total hip prostheses [J]. *Cytokine*, 2000, 12(10): 1575-1579.
- [8] Lv S, Zhang Y, Mao H J, *et al.* Inhibition of osteolysis after local administration of osthole in a TCP particles-induced osteolysis model [J]. *Int Orthop*, 2016, 40(7): 1545-1552.
- [9] 洪星辉, 王 靓, 黄金玲, 等. 重楼总皂苷对 LiCl 诱导人胃癌 MKN-45 细胞迁移及侵袭的影响 [J]. *中草药*, 2019, 50(13): 134-139.
- [10] Yu S, Wang L, Cao Z, *et al.* Anticancer effect of polyphyllin in colorectal cancer cells through ROS-dependent autophagy and G2/M arrest mechanisms [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(12): 1489-1492.
- [11] Zhu T, Wu W, Yang S, *et al.* Polyphyllin I inhibits *Propionibacterium acnes*-induced inflammation *in vitro* [J]. *Inflammation*, 2019, 42(1): 35-44.
- [12] 吴 志, 庞 敏, 陈 森, 等. 重楼皂苷 I 对大鼠原代成骨细胞增殖的影响及机制研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2018, 47(12): 1515-1521.
- [13] 孔祥鹤, 牛银波, 王婷梅, 等. 黄芪多糖对大鼠原代成骨细胞的影响及其机制研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 2065-2069.
- [14] 刘永立, 程富礼, 景小博. 重楼皂苷对新生大鼠成骨细胞增殖、分化及 Smurf1、Cthrc1、BMP2 表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(3): 72-76.
- [15] Wang J, Davis S, Zhu M, *et al.* Autophagosome formation: Where the secretory and autophagy pathways meet [J]. *Autophagy*, 2017, 13(5): 973-974.
- [16] 黄亚光, 王金凤, 杜利鹏, 等. 葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3127-3133.
- [17] Liu W J, Ye L, Huang W F, *et al.* p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2016, doi: 10.1186/s11658-016-0031-z.
- [18] Su L Y, Luo R, Liu Q, *et al.* Atg5- and Atg7-dependent autophagy in dopaminergic neurons regulates cellular and behavioral responses to morphine [J]. *Autophagy*, 2017, 13(9): 1496-1511.
- [19] Wang Z, Liu N, Liu K, *et al.* Autophagy mediated CoCrMo particle-induced peri-implant osteolysis by promoting osteoblast apoptosis [J]. *Autophagy*, 2015, 11(12): 2358-2369.
- [20] Zhang Q, Zhang X F. Hyperoside decreases the apoptosis and autophagy rates of osteoblast MC3T3-E1 cells by regulating TNF-like weak inducer of apoptosis and the p38mitogen activated protein kinase pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 41-50.