

## 基础医学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000669

## p38 MAPK 在钛颗粒诱导的破骨细胞形成中的作用

李浩, 汪洋, 张然熙, 刘扬, 邓忠良  
(重庆医科大学附属第二医院骨科, 重庆 400010)

**【摘要】目的:**探讨 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)在钛颗粒诱导的破骨细胞形成中的作用。**方法:**提取小鼠骨髓细胞,接种于 24 孔板后分为 3 组:①空白对照组;②核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)组;每孔加入 50 ng/ml RANKL;③钛颗粒+RANKL 组;每孔加入 0.01%钛颗粒悬液(0.1 mg/ml)及 RANKL 50 ng/ml,抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色鉴定和计数破骨细胞。Western blot 检测 p38、磷酸化 p38 的表达水平,通过腺病毒介导的 p38 siRNA 沉默 p38 的表达后,观察破骨细胞数目及相关蛋白 RANK 的变化情况。**结果:**各组破骨细胞计数结果分别为:空白对照组  $2.0 \pm 0.8$ , RANKL 组  $62.8 \pm 5.6$ , 钛颗粒+RANKL 组  $93.0 \pm 8.8$  ( $F=235.193, P=0.000$ )。RANKL 组高于空白对照组 ( $P=0.000$ ), 钛颗粒+RANKL 组明显高于 RANKL 组 ( $P=0.000$ )。Western blot 结果显示钛颗粒能明显提高 p38 的磷酸化水平(p-p38/p38 相对值:空白对照组  $0.29 \pm 0.05$ , RANKL 组  $0.64 \pm 0.05$ , 钛颗粒+RANKL 组  $0.87 \pm 0.05$ ,  $F=106.491, P=0.000$ , 钛颗粒+RANKL 组高于空白对照组和 RANKL 组  $P_1=0.000, P_2=0.001$ )。转染腺病毒介导的 p38 siRNA 后, Ad-sip38 干扰组 RANK 蛋白的表达水平低于对照组和 Ad-RFP 组, 破骨细胞数目也明显低于对照组和 Ad-RFP 组(破骨细胞计数:对照组  $99.8 \pm 13.5$ , Ad-RFP 组  $95.8 \pm 7.1$ , Ad-sip38 组  $3.8 \pm 2.5$ ,  $F=148.654, P=0.000$ , 对照组与 Ad-RFP 组无明显差异  $P=0.541$ , Ad-sip38 处理组与对照组和空白病毒组比较均  $P=0.000$ )。**结论:**p38 MAPK 在钛颗粒诱导的破骨细胞形成中起重要的作用。

**【关键词】**钛颗粒; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 破骨细胞; siRNA**【中图分类号】**R318.08**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2015-01-25

## Effects of p38 MAPK on titanium particle-induced osteoclast formation

Li Hao, Wang Yang, Zhang Ranxi, Liu Yang, Deng Zhongliang

(Department of Orthopaedic Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effects of p38 mitogen-activated protein kinase on titanium (Ti) particle-induced osteoclast formation. **Methods:** Bone marrow cells were collected from the femur and tibiae of 4-6 week-old BALB/C mice and were divided into three groups: ①control group; ②receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) treated group; ③Ti particle and RANKL treated group. The numbers of osteoclasts were measured by the tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. The expression and phosphorylation level of p38 protein were determined by Western blot. Then an adenovirus-mediated RNA interference targeting p38 was employed to knock down the expression of p38 and the numbers of osteoclasts were determined by TRAP staining; the expression of osteoclast specific gene RANK was detected using Western blot. **Results:** TRAP staining showed that the numbers of osteoclasts were significantly higher in Ti particle treated group than in control group with the same concentration of RANKL (blank group:  $2.0 \pm 0.8$ , RANKL group:  $62.8 \pm 5.6$ , Ti particle + RANKL group:  $93.0 \pm 8.8$ ,  $F=235.193, P=0.000$ ) (RANKL group vs. blank group,  $P=0.000$ ; Ti particle+RANKL group vs. RANKL group,  $P=0.000$ ). The relative phosphorylation level of p38 was significantly improved in Ti particle and RANKL treated group compared with that in control group and RANKL treated group (blank group:  $0.29 \pm 0.05$ , RANKL group:  $0.64 \pm 0.05$ , Ti particle+RANKL group:  $0.87 \pm 0.05$ ,  $F=106.491, P=0.000$ ) (Ti particle+RANKL group vs. blank group and RANKL group,  $P_1=0.000, P_2=0.001$ ). After being treated with adenovirus-mediated p38 siRNA (Ad-sip38), the number of osteoclasts and the protein level of RANK were remarkably decreased (TRAP positive cells: control group:  $99.8 \pm 13.5$ , Ad-RFP group:  $95.8 \pm 7.1$ , Ad-sip38 group:  $3.8 \pm 2.5$ ) (control group vs. Ad-RFP group,  $P=0.541$ ; Ad-sip38 group vs. control group and Ad-RFP group,  $P_1=0.000, P_2=0.000$ ). **Conclusion:** p38 MAPK plays an important role in the osteoclast formation induced by Ti particle.

**【Key words】**Ti particle; p38 mitogen-activated protein kinase; osteoclast formation; siRNA

作者介绍: 李浩, Email: haolee1987@163.com,

研究方向: 骨代谢。

通信作者: 邓忠良, Email: zhongliang.deng@yahoo.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150617.2241.009.html>

(2015-06-17)

无菌性松动是人工关节置换术最常见的并发症,也是制约人工关节使用寿命的主要原因<sup>[1-2]</sup>。研究表明假体长期磨损产生的颗粒是导致人工关节置换术后关节无菌性松动的主要原因。磨损颗粒导致假体周围组织或细胞产生一系列的生物反应,最终促进破骨细胞的分化成熟<sup>[3-5]</sup>。成熟破骨细胞导致假体周围的骨质溶解,从而引起人工关节的无菌性松动。

p38 MAPK 属于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)家族,是核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)/RANK/TRAF6 的下游信号通路,其激活主要是依靠 p38 的磷酸化,在破骨细胞分化成熟中有重要作用。因此本实验利用 Western blot 检测 p38 及其磷酸化蛋白的表达水平,并通过 siRNA 沉默 p38 的表达,探讨 p38 MAPK 信号通路在钛颗粒诱导的破骨细胞形成中的作用,为防止人工关节置换后的假体无菌性松动提供新的治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

4~6 周 BALB/C 小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供,设施使用许可 SYXK(渝)2012-0001, RANKL 和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)购自 prospec 公司,  $\alpha$ -MEM 培养基购自 hyclone 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司,抗酒石酸酸性磷酸酶 TRAP 染色试剂盒购自 sigma 公司,兔来源的 p38 及 p-p38 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司,腺病毒介导的 p38 siRNA(adenovirus-mediated p38 siRNA, Ad-sip38)和空载病毒(adenovirus containing RFP, Ad-RFP)授权汉恒生物公司构建。钛颗粒购自 Alfa Aesa 公司,直径 1~20  $\mu$ m,经 10  $\mu$ m 滤过膜过滤后,筛选颗粒平均直径为 5  $\mu$ m 左右<sup>[6]</sup>,用 70% 的乙醇溶液反复清洗 48 h 后, PBS 清洗掉酒精,高压蒸汽灭菌,无菌 PBS 重悬配制成 1% (10 mg/ml) 的储存液 4  $^{\circ}$ C 存放。

### 1.2 实验方法

1.2.1 小鼠破骨细胞培养 BALB/C 小鼠颈椎脱臼处死, 75% 酒精浸泡 5 min 后, 无菌条件下钝性分离小鼠双侧股骨和胫骨, PBS 清洗后剪断两侧的骨髓端, 无菌注射器吸取  $\alpha$ -MEM 培养基反复冲洗骨髓腔至发白, 收集冲洗液以 1 000 r/min 速度离心 5 min, 重悬细胞后接种于 T25 培养皿中, 在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h 后, PBS 清洗 3 次去除未贴壁细胞, 收集贴壁细胞以 800 r/min 的速度离心 5 min, 将获得的细胞在 30 ng/ml M-CSF 和 50 ng/ml RANKL 共刺

激下培养 3~4 d 得到骨髓巨细胞后, 以  $1.5 \times 10^6$  的密度接种于 24 孔板内, 分为空白对照组、RANKL 组和钛颗粒+RANKL 组, 在相应的培养孔中分别加入 0.01% 钛颗粒悬液 (0.1 mg/ml) 及 RANKL 50 ng/ml, 细胞培养箱中培养 5~6 d, 隔天换液 1 次。

1.2.2 TRAP 染色及破骨细胞计数 取出 24 孔板, PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 37  $^{\circ}$ C 预热去离子水洗涤 3 次, 按照说明书配制 TRAP 染色液, 每孔加入 300~400  $\mu$ l 染色液, 37  $^{\circ}$ C 恒温水浴箱中避光孵育 60 min, 用去离子水彻底清洗, 晾干后镜下观察。TRAP 染色阳性的含 3 个或 3 个以上细胞核的巨细胞计数为破骨细胞, 分别计数各处理组成熟破骨细胞数, 实验重复 4 次。4 次实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示

1.2.3 Western blot 检测 p38 及 p-p38 表达 将培养得到的骨髓巨细胞以  $1.5 \times 10^6$  密度接种于 24 孔板, 分为空白对照组、RANKL 组和钛颗粒+RANKL 组。钛颗粒+RANKL 组加入 0.01% 钛颗粒悬液负荷 12 h 后, 更换培养基, 同时 RANKL 组及钛颗粒+RANKL 组加入 RANKL 处理 15 min 后, 立即用预冷 PBS 洗涤细胞, RIPA 裂解液 (含 PMSF、PIC、NaF) 裂解细胞提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 100  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 经 SDS-PAGE 电泳后, 在 25V, 1.0A 条件下 bio-rad 半干转膜仪转膜 30 min, 将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% BSA 室温封闭 1 h, p38, p-p38 抗体 (1:1 000 稀释) 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗 3 次后, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:1 000 稀释) 室温孵育 1 h, ECL 试剂盒发光显影。Quantity One 软件测定各条带灰度值, 计算 p-p38/p38 相对值。实验重复 3 次。

1.2.4 腺病毒介导的 p38 siRNA 干扰 将骨髓巨细胞以  $1.5 \times 10^6$  密度接种于 24 孔板, 分为 3 组: 对照组、空白病毒组和实验组, 其中空白病毒组和实验组分别预先加入 2  $\mu$ l Ad-RFP 和 2  $\mu$ l Ad-sip38 转染 24 h, 荧光显微镜下观察转染率, 更换新鲜培养基后, 每孔加入 0.01% 钛颗粒和 50 ng/ml RANKL 培养 5~6 d, 隔天换液 1 次。Western blot 检测 p38 和破骨细胞特异蛋白 RANK 的表达水平, TRAP 染色鉴定成熟破骨细胞和计数。

### 1.3 统计学处理

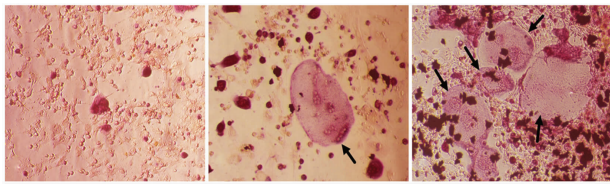
数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行数据处理, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 法, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 TRAP 染色检测钛颗粒对 RANKL 诱导的破骨细胞形成的影响

成熟破骨细胞计数结果分别为: 空白对照组  $2.0 \pm 0.8$ , RANKL 组  $62.8 \pm 5.6$ , 钛颗粒+RANKL 组  $93.0 \pm 8.8$  ( $F=235.193$ ,  $P=0.000$ )。RANKL 组成熟破骨细胞数多于空白组 ( $P=0.000$ ), 钛颗粒+RANKL 组明显高于空白对照组和 RANKL 组 ( $P_1=0.000$ ,  $P_2=0.000$ ), 各组比较差异均具有统计学意义。由此可见,

RANKL对破骨细胞的分化成熟具有重要作用,而钛颗粒能明显促进 RANKL 诱导的破骨细胞形成(图 1)。



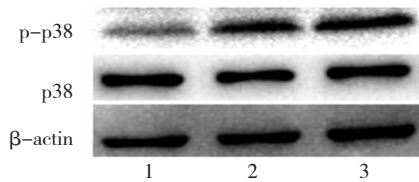
A. 空白对照组 B. RANKL 组 C. 钛颗粒 +RANKL 组

图 1 TRAP 染色观察各组破骨细胞数目(100 ×)

Fig.1 Numbers of osteoclast detected by TRAP staining (100 ×)

### 2.2 Western blot 检测各组 p38 及 p-p38 的表达水平

与空白对照组(0.29 ± 0.05)相比,RANKL 组 p-p38/p38 相对量(0.64 ± 0.05)明显增高(P=0.000),而加入钛颗粒刺激后,p38 的磷酸化水平(0.87 ± 0.05)较单加 RANKL 组进一步提高(P=0.001),差异均具有统计学意义(F=106.491,P=0.000)。表明 p38 MAPK 信号通路参与 RANKL 诱导的破骨细胞形成,而钛颗粒能促进 p38 MAPK 信号通路的激活(图 2)。因此下一步通过沉默 p38 的表达进一步探讨 p38 MAPK 在钛颗粒诱导的破骨细胞形成中的可能作用。



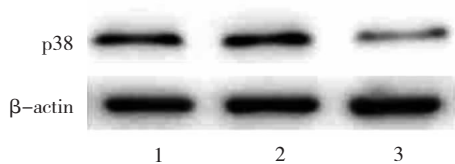
1. 空白对照组;2. RANKL 组;3. 钛颗粒 +RANKL 组

图 2 Western blot 检测各组 p38 及其磷酸化蛋白的表达水平

Fig.2 Protein expression of p38 and p-p38 determined by Western blot

### 2.3 Ad-sip38 干扰后 p38 的表达水平检测

与对照组相比,空白病毒组无明显差异,而 Ad-sip38 转染组 p38 表达水平明显降低,表明腺病毒介导的 p38 siRNA 对 p38 的干扰效果明显,各组 p38 的表达情况见图 3。



1. 对照组;2. 空白病毒组;3. 实验组

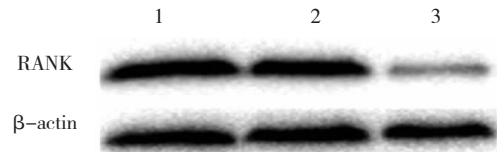
图 3 Western blot 检测干扰后各组细胞 p38 蛋白的表达

Fig.3 Protein expression of p38 measured by Western blot after infection

### 2.4 Ad-sip38 对破骨细胞分化成熟的影响

对照组及空白病毒组可见大量破骨细胞形成,而实验组几乎见不到成熟的破骨细胞。计数破骨细胞:对照组 99.8 ±

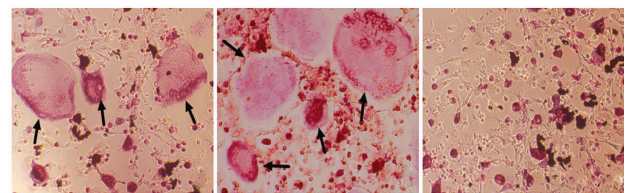
13.5,空白病毒组 95.8 ± 7.1,实验组 3.8 ± 2.5(F=148.654,P=0.000)。对照组与空白病毒组破骨细胞数目无明显差异性(P=0.541),实验组明显低于对照组和空白病毒组,差异具有统计学意义(P<sub>1</sub>=0.000,P<sub>2</sub>=0.000)。Western blot 检测破骨细胞相关蛋白 RANK 的表达情况,结果与 TRAP 染色结果相一致,实验组 RANK 的表达水平较对照组和空白病毒组明显降低(图 4)。结果表明沉默 p38 MAPK 能明显抑制破骨细胞的分化成熟(图 5)。



1. 对照组;2. 空白病毒组;3. 实验组

图 4 Ad-sip38 处理后各组破骨细胞相关蛋白 RANK 的表达

Fig.4 Protein expression of RANK detected by Western blot after infection



A. 对照组 B. 空白病毒组 C. 实验组

图 5 TRAP 染色观察沉默 p38 后各组破骨细胞生长情况及计数(100 ×)

Fig.5 Numbers of osteoclast determined by TRAP staining after infection(100 ×)

## 3 讨论

人工关节置换术作为治疗关节疾病的有效手段被广泛采用,然而,磨损颗粒引起的假体周围骨溶解和无菌性松动仍然是导致手术翻修的主要原因<sup>[7]</sup>。磨损颗粒导致的溶骨主要包括 3 个过程:巨噬细胞吞噬磨损颗粒释放炎症因子,炎症因子诱导破骨细胞形成,破骨细胞溶骨。因此,抑制磨损颗粒导致的破骨细胞形成已成为治疗无菌性松动的主要靶点。研究发现抗骨质疏松药物二磷酸盐能有效抑制磨损颗粒引起的骨溶解<sup>[8-9]</sup>,然而由于生物利用度的限制,目前对颗粒诱导的骨溶解仍然缺乏一种系统性有效的治疗方案。

人工关节磨损颗粒主要包括 UHMWPE 颗粒、钛颗粒及骨水泥颗粒,随着金属-金属假体的流行,

因此目前钛颗粒导致的无菌性松动是研究的主要方向。钛颗粒导致骨溶解及无菌性松动的过程,是一个由多种理化因素及生物因素参与的反应过程,主要有以下几个方面:①假体微动使钛颗粒的数量增加,从而引起假体周围骨重建增加;②钛颗粒可直接促进破骨细胞的活化和聚集;③钛颗粒可引起假体周围免疫反应增强,相关炎症因子分泌增加,促进破骨细胞的形成,同时抑制成骨细胞的功能,从而加速假体周围骨吸收过程<sup>[10]</sup>,最终导致关节的无菌性松动。然而钛颗粒导致假体周围骨质溶解和无菌性松动的具体机制仍未完全明确。

M-CSF 和 RANKL 是体外诱导培养破骨细胞必须的两种细胞因子,M-CSF 促进破骨细胞前体细胞的聚集融合,RANKL 调控破骨细胞的分化成熟<sup>[11]</sup>。近年来,越来越多的研究已经证实钛颗粒能够促进破骨细胞形成和骨质溶解<sup>[12-13]</sup>,普遍认为主要的原因是由于巨噬细胞或异物巨细胞受磨损颗粒刺激后分泌一系列与破骨细胞形成相关的炎症因子,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等,这些炎症因子与破骨细胞前体细胞表面的相应受体结合,通过激活细胞内与破骨细胞成熟相关的信号通路,包括 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B、PI3K/Akt 等,同时炎症因子与成纤维细胞表面相应受体相结合,可促进 RANKL 和 M-CSF 的释放,从而导致过量的破骨细胞形成,骨重建的动态平衡被破坏,引起骨质溶解<sup>[13-14]</sup>。Akisue 等<sup>[15]</sup>研究发现 LPS 处理的钛颗粒能促进 THP-1 细胞中 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活。另外,磨损颗粒能够促进趋化因子 MCP-1、MCP-2、IL-8 等的释放,引起局部组织中单核细胞和 T 细胞等浸润增多,进一步促进破骨细胞的分化成熟<sup>[3]</sup>,导致假体无菌性松动。近年来大量研究通过以炎症因子为靶点进行干扰或抑制,能有效抑制磨损颗粒引起的溶骨效应<sup>[16-17]</sup>。

p38 MAPK 是一种酪氨酸磷酸化蛋白激酶,主要介导炎症、凋亡反应和参与 RANKL 诱导的破骨细胞形成。激活的 p38 MAPK 能促进下游活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cell,NFATc)的表达,从而促进破骨细胞前体细胞分化为成熟破骨细胞<sup>[18]</sup>。研究表明 NFATc1 在破骨细胞的分化成熟中有重要作用<sup>[19-20]</sup>。Matsumoto 等<sup>[21]</sup>也通过研究证实 p38 MAPK 参与调控 RANKL 诱导的早期破骨细胞形成。本实验研究结果也证明 RANKL 能够激活

p38 MAPK 信号通路,而钛颗粒能够进一步促进 p38 MAPK 信号通路的激活,从而促进破骨细胞的分化成熟。采用腺病毒介导的 p38 siRNA 特异性沉默 p38 后,破骨细胞的分化成熟明显受到抑制,原因可能与沉默 p38 后,p38 MAPK 信号通路的激活受到抑制,从而导致其下游与破骨细胞分化成熟的相关基因 NFATc1 的表达降低有关。

综上所述,p38 MAPK 参与调控钛颗粒诱导的破骨细胞形成,而抑制 p38 MAPK 信号通路的激活能有效抑制破骨细胞的分化成熟,可能为临床治疗磨损颗粒相关的骨溶解疾病提供一个新的靶点和治疗方向。

## 参 考 文 献

- [1] Keener JD, Callaghan JJ, Goetz DD, et al. Twenty-five-year results after Charnley total hip arthroplasty in patients less than fifty years old: a concise follow-up of a previous report [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85-A(6): 1066-1072.
- [2] Berry DJ, Harnsen WS, Cabanela ME, et al. Twenty-five-year survivorship of two thousand consecutive primary Charnley total hip replacements: factors affecting survivorship of acetabular and femoral components [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2002, 84-A(2): 171-177.
- [3] Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG, et al. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2007 (454): 251-261.
- [4] Pioletti DP, Kottelat A. The influence of wear particles in the expression of osteoclastogenesis factors by osteoblasts [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(27): 5803-5808.
- [5] Ritchlin CT, Schwarz EM, O'Keefe RJ, et al. RANK, RANKL and OPG in inflammatory arthritis and periprosthetic osteolysis [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2004, 4(3): 276-284.
- [6] 李海亚, 查振刚. 磨损颗粒引起人工关节无菌性松动的研究与进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(48): 9059-9063.
- [7] Harris WH. Wear and periprosthetic osteolysis: the problem [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2001(393): 66-70.
- [8] Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(12): 1189-1199.
- [9] 张亮, 陈志荣, 吴兴临, 等. 依那西普对钛颗粒诱导小鼠骨溶解及破骨细胞增殖的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(9): 1601-1604.
- [10] Zreiqat H, Crotti TN, Howlett CR, et al. Prosthetic particles modify the expression of bone-related proteins by human osteoblastic cells in vitro [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(2): 337-346.
- [11] Wang Y, Wu NN, Mu YQ, et al. The effect of adenovirus-mediated