

本文引用:韩俊柱,朱勋兵,武世伍. 辛伐他汀和红霉素对人工关节松动模型小鼠的干预效果[J]. 新乡医学院学报, 2015, 32(2): 115-118.

【基础研究】

辛伐他汀和红霉素对人工关节松动模型小鼠的干预效果

韩俊柱¹, 朱勋兵¹, 武世伍²

(1. 蚌埠医学院第二附属医院骨科, 安徽 蚌埠 233040; 2. 安徽省组织移植重点实验室, 安徽 蚌埠 233030)

摘要： **目的** 通过动物实验模型模拟假体周围骨溶解并行药物干预，探讨辛伐他汀和红霉素防治人工关节无菌性松动的可能性。**方法** 清洁级 8 周龄近交系雌性 *BALB/c* 小鼠 40 只，其中 8 只断颈处死后取出颅骨，将颅骨剪切成 4 mm×3 mm 的骨片备用；另 32 只构建小鼠气囊植骨模型，分为 4 组，每组 8 只。空白对照组小鼠气囊和腹腔内均注入生理盐水；颗粒刺激组小鼠气囊内注入聚乙烯磨损颗粒，腹腔内注入生理盐水；辛伐他汀组小鼠气囊内注入聚乙烯磨损颗粒，腹腔内注入辛伐他汀；红霉素组小鼠气囊内注入聚乙烯磨损颗粒，腹腔内注入红霉素。2 周后处死小鼠，取出颅骨骨片和周围囊壁组织，并对所取标本进行苏木精-伊红染色以检测囊壁炎性细胞渗出数目，进行抗酒石酸酸性磷酸酶染色以观测植入骨与囊壁界面破骨细胞激活情况，酶联免疫吸附测定法检测囊壁和颅骨组织匀浆中白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。**结果** 颗粒刺激组、辛伐他汀组、红霉素组小鼠炎性细胞渗出数目均高于空白对照组($P<0.05$)；辛伐他汀组、红霉素组小鼠炎性细胞渗出数目均少于颗粒刺激组($P<0.05$)；辛伐他汀组小鼠炎性细胞渗出数目与红霉素组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。颗粒刺激组、辛伐他汀组、红霉素组小鼠破骨细胞数目均高于空白对照组($P<0.05$)；辛伐他汀组、红霉素组小鼠破骨细胞数目均少于颗粒刺激组($P<0.05$)；辛伐他汀组小鼠破骨细胞数目与红霉素组小鼠比较差异无统计学意义($P>0.05$)。颗粒刺激组、辛伐他汀组、红霉素组小鼠囊壁与颅骨组织匀浆中 IL-1、TNF- α 水平均高于空白对照组($P<0.05$)；辛伐他汀组、红霉素组小鼠囊壁与颅骨组织匀浆中 IL-1、TNF- α 水平均低于颗粒刺激组($P<0.05$)；红霉素组小鼠囊壁与颅骨组织匀浆中 IL-1 水平低于辛伐他汀组($P<0.05$)，TNF- α 水平高于辛伐他汀组($P<0.05$)。**结论** 辛伐他汀和红霉素均能有效抑制磨损颗粒诱导的骨溶解，有望成为防治人工关节松动的药物。

关键词: 辛伐他汀;红霉素;骨溶解;无菌性松动

中图分类号: R687.4; R965 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2015)02-0115-04

Intervention effect of simvastatin and erythromycin on artificial joint loosening of mice model

HAN Jun-zhu¹, ZHU Xun-bing¹, WU Shi-wu²

(1. Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital, Bengbu Medical College, Bengbu 233040, Anhui Province, China;
2. Anhui Key Laboratory of Tissue Transplantation, Bengbu 233030, Anhui Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of simvastatin and erythromycin in prevention and treatment of aseptic loosening of prosthesis by observing animal models of periprosthetic osteolysis and drug intervention. **Methods** There were 40 clean grade inbred female *BALB/c* mice, eight weeks, in which eight mice were executed and removed skull, and their skulls were cut into 4 mm×3 mm bone grafts. The other 32 mice were built into air pouch bone graft models and divided into four groups: blank control group (saline was injected into the air pouches and peritoneal cavity), polyethylene granules group (wear particles were injected into the air pouches and saline was injected into peritoneal cavity), simvastatin group (wear particles were injected into the air pouches and simvastatin was injected into peritoneal cavity) and erythromycin group (wear particles were injected into the air pouches and erythromycin was injected into peritoneal cavity), 8 mice in each group. These mice were executed after two weeks. Pouch wall tissues and graft bone were collected. Inflammatory cells in the pouch wall tissues were detected by hematoxylin eosin staining. Osteoclasts in the interface between pouch wall and skull tissue were detected by tartaric-resistant staining. Interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the homogenates of pouch wall and skull tissue were detected by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The number of inflammatory cells in polyethylene granules group, simvastatin group and erythromycin group was more than that in blank control group ($P < 0.05$), which in simvastatin group and erythromycin group was less than that in polyethylene granules group ($P < 0.05$). There was no significant difference of inflammatory cells number between simvastatin group and erythromycin group ($P > 0.05$). The number of osteoclasts in poly-

DOI:10.7683/xxvxxxb.2015.02.006

收稿日期:2014-10-20

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(编号:1408085MH207);蚌埠医学院科研基金资助项目(编号:BYKY1380)

作者简介:韩俊柱(1979-),男,安徽蚌埠人,硕士,主治医师,讲师,主要从事人工关节的临床及实验研究。

ethylene granules group, simvastatin group and erythromycin group was more than that in blank control group ($P < 0.05$), which in simvastatin group and erythromycin group was less than polyethylene granules group ($P < 0.05$). There was no significant difference in osteoclasts number between simvastatin group and erythromycin group ($P > 0.05$). The levels of IL-1 and TNF- α in skull tissue homogenate in polyethylene granules group, simvastatin group and erythromycin group were more than those in blank control group ($P < 0.05$), which in simvastatin group and erythromycin group were less than those in polyethylene granules group ($P < 0.05$). IL-1 level in erythromycin group was less than that in simvastatin group ($P < 0.05$). TNF- α level in simvastatin group was less than that in polyethylene granules group ($P < 0.05$). **Conclusion** Both simvastatin and erythromycin can inhibit osteolysis induced by wear particles and may be used in the prevention and treatment of aseptic loosening of prosthesis.

Key words: simvastatin; erythromycin; osteolysis; aseptic loosening

人工关节置换术是治疗严重关节疾病、重塑关节功能的重要手段^[1],但随着关节置换时间的延长,远期出现的假体松动问题逐渐增多,而磨损颗粒诱导的破骨细胞性骨溶解是假体松动的最重要因素^[2]。假体松动常导致关节疼痛和功能障碍,需行人工关节翻修手术,但翻修手术创伤大、难度高,且难以避免因松动而再次翻修的可能。近年来,随着对磨损颗粒引发破骨细胞生成、骨溶解发生机制认识的加深,在人工关节无菌性松动的药物治疗和预防方面取得了可喜成果^[3]。本研究通过动物实验模型观察辛伐他汀和红霉素防治人工关节松动的效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 8 周龄近交系雌性 BALB/c 小鼠 40 只,由中国医学科学院实验动物研究所提供,生产许可证号:SCXK(京)2004-0001。

1.2 主要试剂与仪器 聚乙烯颗粒由中国科学院物理研究所提供,颗粒直径为 8 μm ,经环氧乙烷消毒灭菌后,与 52.63 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化钠溶液混合制成 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的聚乙烯混悬液。辛伐他汀片(杭州默沙东制药有限公司,国药准字 H19990366,每片 20 mg)使用前以蒸馏水配制成 0.02 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 备用;红霉素肠溶片(安徽环球药业股份有限公司生产,国药准字 H34021774,每片 100 mg)使用前以蒸馏水配制成 0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 备用。白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附测定试剂盒购自美国 R&D 公司。倒置荧光显微镜购自上海赖氏电子科技有限公司。

1.3 动物模型制备及分组 取 8 只小鼠断颈处死后取出颅骨剪切成 4 mm \times 3 mm 的骨片备用。另取同系同龄小鼠 32 只,背部备皮消毒,分次皮下注射无菌空气,每次 5 mL,至第 5 天形成气囊,构建出气囊模型;腹腔麻醉后切开气囊,植入颅骨骨片,缝合切口,构建出气囊植骨模型。将气囊植骨模型小鼠分成空白对照组、颗粒刺激组、辛伐他汀组、红霉素组,每组 8 只。空白对照组小鼠气囊内注射 0.5 mL 生理盐水,颗粒刺激组、辛伐他汀组和红霉素组小鼠气囊内分别注射 0.5 mL 的聚乙烯颗粒悬液,辛伐他汀组和红霉素组小鼠同时每日腹腔内分别注射

0.02 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的辛伐他汀混悬液和 0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红霉素混悬液 0.2 mL,空白对照组、颗粒刺激组小鼠同时每日腹腔内注射 0.2 mL 生理盐水。2 周后处死全部小鼠,取出颅骨骨片和周围囊壁组织,进行组织细胞学和分子生物学检测。

1.4 苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色观察囊壁组织炎性细胞 将囊壁组织经体积分数 10% 甲醛溶液固定,经乙二胺四乙酸溶液脱钙,再用石蜡包埋,切片后行 HE 染色,电镜下观察囊壁炎性细胞渗出数目,计数 4 个高倍视野,取平均值。

1.5 抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色法观察植入骨与囊壁界面破骨细胞 将所取的囊壁和颅骨组织行快速冰冻切片,并将切片在丙酮溶液中固定 30 s,再用 pH 5.2 的醋酸盐溶液(含六偶氮化副品红、二甲基甲酰胺、L-酒石酸和底物)温浴 90 min。蒸馏水漂洗切片,晾干,甲基绿复染,蒸馏水漂洗后封片。细胞质染色呈紫色即为 TRAP 阳性破骨细胞,通过 Image Proplus 图像软件(美国 Media Cybernetics 公司)分析紫色细胞质在每个高倍镜视野下所占累计面积,计算总的破骨细胞数量,用以观测植入骨与囊壁界面破骨细胞激活情况。

1.6 酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定 IL-1、TNF- α 水平 将气囊壁和颅骨组织制成匀浆,提取上清液测定 IL-1、TNF- α 水平。实验操作步骤按试剂盒说明书标准流程进行。

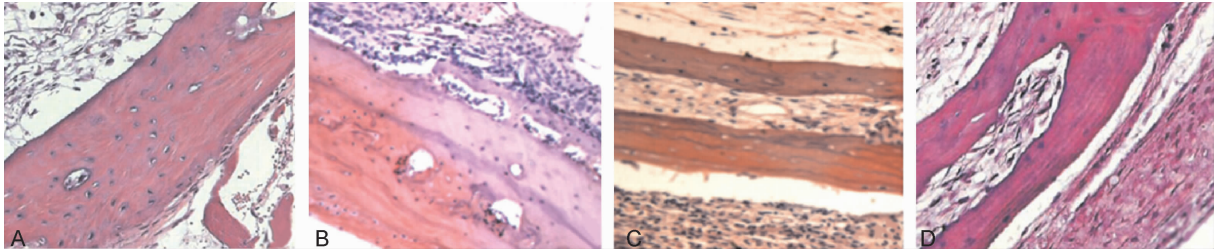
1.7 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠囊壁组织炎性细胞渗出数目比较 空白对照组小鼠镜下蓝黑色细胞核数目较少,炎症反应较轻(图 1A);颗粒刺激组小鼠蓝黑色细胞核数目最多,炎症反应较重(图 1B);辛伐他汀组小鼠蓝黑色细胞核数目介于空白对照组和颗粒刺激组之间(图 1C);红霉素组与辛伐他汀组小鼠蓝黑色细胞核数目相当(图 1D)。空白对照组、颗粒刺激组、辛

伐他汀组、红霉素组小鼠囊壁组织炎性细胞渗出数目分别为(5 418.8 ± 389.9)、(8 731.3 ± 121.9)、(6 660.0 ± 74.3)、(6 658.8 ± 63.8) mm⁻²;颗粒刺激组、辛伐他汀组、红霉素组小鼠炎性细胞渗出数目

均高于空白对照组($P < 0.05$);而辛伐他汀组、红霉素组小鼠炎性细胞渗出数目均少于颗粒刺激组($P < 0.05$);辛伐他汀组小鼠炎性细胞渗出数目与红霉素组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



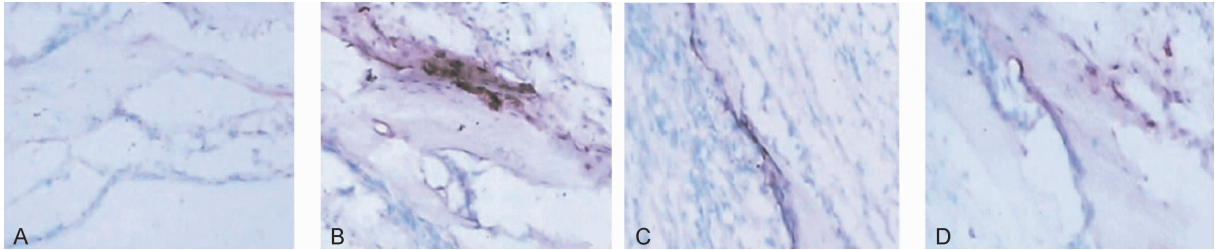
A:空白对照组;B:颗粒刺激组;C:辛伐他汀组;D:红霉素组。

图1 各组小鼠气囊壁炎症反应情况(HE染色, ×200)

Fig.1 Inflammation reaction of mice air-pouch wall in each group(HE staining, ×200)

2.2 各组小鼠植入骨与囊壁界面破骨细胞激活情况比较 植入骨与囊壁交界面(紫色区域)为破骨细胞激活的位置,空白对照组小鼠镜下呈淡蓝色,未见紫色区域(图2A);颗粒刺激组小鼠紫色面积较大,颜色较深(图2B);辛伐他汀组小鼠淡蓝色背景中可见紫色区域,但与颗粒刺激组相比颜色较淡,面积较小(图2C);红霉素组小鼠淡蓝色背景中可见紫色区域,但与颗粒刺激组相比颜色较淡,面积较小,与辛伐他汀组

相比紫色区域面积相当(图2D)。空白对照组、颗粒刺激组、辛伐他汀组、红霉素组小鼠植入骨与囊壁界面破骨细胞数目分别为(752.5 ± 12.8)、(1 801.3 ± 23.0)、(1 275.0 ± 26.7)、(1 227.5 ± 23.8) mm⁻²;颗粒刺激组、辛伐他汀组、红霉素组小鼠破骨细胞数均高于空白对照组($P < 0.05$);辛伐他汀组、红霉素组破骨细胞数目均低于颗粒刺激组($P < 0.05$);辛伐他汀组与红霉素组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:空白对照组;B:颗粒刺激组;C:辛伐他汀组;D:红霉素组。

图2 各组小鼠植入骨与囊壁界面破骨细胞激活情况(TRAP染色, ×200)

Fig.2 Osteoclast activation of interface between air-pouch wall and graft bone in each group(TRAP staining, ×200)

2.3 各组小鼠囊壁与颅骨组织匀浆中 IL-1、TNF-α 水平比较 结果见表1。颗粒刺激组、辛伐他汀组、红霉素组小鼠囊壁与颅骨组织匀浆中 IL-1、TNF-α 水平均高于空白对照组($P < 0.05$);辛伐他汀组、红霉素组小鼠囊壁与颅骨组织匀浆中 IL-1、TNF-α 水平均低于颗粒刺激组($P < 0.05$);红霉素组小鼠囊壁与颅骨组织匀浆中 IL-1 水平低于辛伐他汀组($P < 0.05$), TNF-α 水平高于辛伐他汀组($P < 0.05$)。

表1 各组小鼠囊壁与颅骨组织匀浆中 IL-1、TNF-α 水平
Tab.1 IL-1 and TNF-α levels of mice air-pouch wall and skull tissue homogenates (x̄ ± s)

组别	n	IL-1/(ng · L ⁻¹)	TNF-α/(ng · L ⁻¹)
空白对照组	8	33.63 ± 1.06	27.88 ± 2.59
颗粒刺激组	8	141.50 ± 4.24 ^a	120.50 ± 4.84 ^a
辛伐他汀组	8	100.75 ± 2.87 ^{ab}	35.88 ± 2.03 ^{ab}
红霉素组	8	39.38 ± 2.72 ^{abc}	58.88 ± 1.73 ^{abc}

注:与空白对照组比较^a $P < 0.05$;与颗粒刺激组比较^b $P < 0.05$;与辛伐他汀组比较^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

无菌松动是人工关节置换术后最常见的中远期并发症^[4],常见原因是假体磨损产生的颗粒诱发假体周围组织细胞产生一系列生物学反应,导致假体周围骨溶解^[5]。磨损颗粒可诱导巨噬细胞释放 IL-1、IL-6、TNF-α 等炎症因子,这些炎症因子能促进破骨细胞分化、成熟,造成假体周围骨溶解,最终导致假体松动。IL-1 通过激活核因子-κB(nuclear factor κB, NF-κB)抑制破骨细胞凋亡,可直接或间接诱导破骨前体细胞增殖、分化以及刺激成熟破骨细胞活性^[3]。TNF-α 是最强的骨吸收促进剂,并可抑制骨形成。TNF-α 作用于成骨细胞,间接激活成熟的破骨细胞,抑制破骨细胞凋亡;还可通过直接刺激前破骨细胞增殖,增强基质细胞中前破骨源性细胞活性来促进破骨细胞形成^[3]。故可通过检测上述炎性

因子水平及破骨细胞数量来观察评估磨损颗粒诱导的骨溶解,并可通过检测药物干预后炎性细胞、破骨细胞数目及炎性因子水平评估某种药物是否具有防治骨溶解作用。气囊动物模型是研究磨损颗粒异物炎症反应的可靠动物模型,磨损颗粒注入囊腔内形成的慢性炎症反应与假体周围磨损颗粒刺激关节滑膜形成的炎症反应在病理组织上很相似^[6]。在气囊内植入骨组织构建气囊植骨模型更为逼真地模拟假体周围骨溶解过程,费用低、周期短、简单易行,为进一步研究药物防治假体周围骨溶解提供了便利。本研究显示,颗粒刺激组囊壁组织炎性细胞渗出数目、植入骨与囊壁界面破骨细胞激活面积、囊壁和颅骨组织匀浆中 IL-1 与 TNF- α 水平均高于空白对照组,提示聚乙烯颗粒能诱导假体周围骨溶解。

他汀类药物即 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMG-CoA) 抑制剂,能通过抑制 HMG-CoA 活性阻断甲羟戊酸途径,从而干扰胆固醇合成,是常用的降血脂药物^[7]。Ahn 等^[8]研究发现,辛伐他汀能抑制人类乳腺癌和多发性骨髓瘤所诱导的破骨细胞形成。王真等^[9]经体外实验证实辛伐他汀可通过抑制外周血单核细胞分泌 TNF- α 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1),从而减少破骨细胞形成,抑制骨溶解。他汀类药物对破骨细胞形成的抑制作用主要通过抑制甲羟戊酸途径实现,他汀类药物可通过抑制巨噬细胞的 HMG-CoA 影响丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路,而阻止 MAPK 通路可显著减少颗粒刺激巨噬细胞产生 TNF- α 及 MCP-1,从而抑制破骨细胞的功能,降低骨吸收^[8]。本研究发现,辛伐他汀组小鼠囊壁组织炎性细胞、囊壁和颅骨组织匀浆中 TNF- α 及植入骨与囊壁界面破骨细胞均少于颗粒刺激组,进一步证实辛伐他汀能通过上述途径减少破骨细胞形成,抑制骨溶解。红霉素是大环内酯类抗生素,具有独立于抗菌作用之外的抗炎作用。Ren 等^[10]的体外实验表明,5 mg \cdot L⁻¹ 红霉素可明显抑制颗粒刺激小鼠 RAW-264.7 巨噬细胞系的 NF- κ B、组织蛋白酶 K、IL-1 和 TNF- α 的相应 mRNA 的表达,并可减少 70% 的多核破骨细胞和 50% TRAP 染色阳性细胞形成。张超等^[11]经在体实验发现红霉素可抑制炎性细胞表达和分泌,抑制炎性因子引起的破骨细胞生成活化。本研究发现,红霉素组小鼠的囊壁组织炎性细胞、囊壁和颅骨组织匀浆中 IL-1 与 TNF- α 及植入骨与囊壁界面破骨细胞均少于颗粒刺激组,进一步证实红霉素能起到抑制炎症反应、防治骨溶解的作用;另外,本研究发现,

辛伐他汀组小鼠的 TNF- α 低于红霉素组,而 IL-1 高于红霉素组,提示辛伐他汀主要是通过抑制 HMG-CoA 影响 MAPK 信号通路,进而减少 TNF- α 等因子抑制破骨细胞生成,而红霉素抑制骨溶解作用则是部分通过减少 IL-1 激活 NF- κ B 抑制破骨细胞凋亡而实现的。

综上所述,辛伐他汀和红霉素均能抑制破骨细胞生成和骨溶解,前者主要是通过抑制 HMG-CoA 影响 MAPK 信号通路,进而减少 TNF- α 等因子抑制破骨细胞生成;而后者则通过抗炎性细胞激活而抑制破骨细胞生成。此 2 种药物均为临床常用药物,其安全性是有保证的,下一步的研究重点是如何提高假体周围的有效药物浓度、减少药物长期应用的不良反应及联合用药的可行性。

参考文献:

- [1] 刘铭,魏小兰,陈婷梅,等.盐溶法构建磨损颗粒诱导小鼠颅骨溶解模型方法的建立及评价[J].吉林大学学报:医学版,2013,39(5):1041-1044.
- [2] Prissel M A, Roukis T S. Management of extensive tibial osteolysis with the Agility™ total ankle replacement systems using geometric metal-reinforced polymethylmethacrylate cement augmentation. [J]. *J Foot Ankle Surg*, 2014, 53(1): 101-107.
- [3] 倪远镇,黄相杰,姜红江.人工关节假体无菌性松动的机制及药物预防的研究进展[J].中医正骨,2010,22(3):43-45.
- [4] 万睿,李平,周园东,等.纱布纤维可否在小鼠气囊植骨模型中诱发炎性骨溶解的研究[J].中国全科医学,2013,16(7):648-652.
- [5] 刘国印,赵建宁,王瑞.磨损颗粒诱导细胞凋亡与无菌性松动的研究进展[J].中国骨伤,2013,26(9):791-796.
- [6] 漆启华,董谢平,戴闻.磨损颗粒诱导细胞外基质金属蛋白酶诱导因子表达及机制研究[J].中国矫形外科杂志,2014,22(1):70-75.
- [7] 罗利俊,陈玲,苟玉兰,等.中药联合辛伐他汀治疗急性脑梗死的临床疗效[J].新乡医学院学报,2014,31(9):747-750.
- [8] Ahn K S, Sethi G, Chaturvedi M M, et al. Simvastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand through modulation of NF-kappaB pathway [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(8): 1733-1740.
- [9] 王真,高希武,孙克宁,等.辛伐他汀防治人工关节无菌性松动的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2010,24(5):544-547.
- [10] Ren W, Li X H, Chen B D, et al. Erythromycin inhibits wear debris-induced osteoclastogenesis by modulation of murine macrophage NF-kappaB activity [J]. *J Orthop Res*, 2004, 22(1): 21-29.
- [11] 张超,戴冠戎,汤亭亭,等.红霉素抑制磨损颗粒诱发体内骨溶解的研究[J].中国矫形外科杂志,2007,15(14):1100-1103.