中国骨质疏松杂志 2011年6月第17卷第6期 Chin J Osteoporos, June 2011, Vol 17, No. 6
Published online www.wanfangdate.com.cn doi:10.3969/j.issn.1006-7108.2011.06.008

·论著·

PMMA骨水泥颗粒对大鼠巨噬细胞SOCS1及SOCS3基因表达的影响

张勇 曾晖 熊昇 陶可 桂先革 康斌 辛风

中图分类号：R36 文献标识码：A 文章编号：1006-7108(2011)06-0498-05

摘要：目的 观察PMMA骨水泥颗粒对体外培养的巨噬细胞SOCS1及SOCS3基因表达的影响。**方法** 大鼠腹腔灌洗液筛选法培养巨噬细胞，CD68单抗免疫细胞化学法鉴定细胞纯度和活性，实时荧光定量PCR(Real-time PCR)方法检测巨噬细胞SOCS1及SOCS3基因的表达量，分别观察不同浓度PMMA骨水泥颗粒及一定浓度的骨水泥颗粒作用不同时间对巨噬细胞SOCS1及SOCS3基因表达的影响。**结果** PMMA骨水泥颗粒促进了体外培养的巨噬细胞SOCS1及SOCS3基因的表达，并表现出一定的浓度及时间相关性；颗粒浓度在0.25 mg/mL时SOCS1及SOCS3基因表达量明显升高($P<0.05$)；当颗粒作用时间在24 h左右时SOCS1及SOCS3基因表达升高最显著($P<0.05$)。**结论** PMMA骨水泥颗粒能够促进巨噬细胞SOCS1及SOCS3基因的表达。

关键词： 无菌性松动；骨水泥颗粒；SOCS1；SOCS3；基因表达

The effect of PMMA bone cement particles on the expression of SOCS1 and SOCS3 genes in rat macrophages

ZHANG Yong, ZENG Hui, XIONG Ao, et al. Department of Orthopedic Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036; *Medical College of Shantou University, Shantou* 515041, China

Corresponding author: ZENG Hui, Email: zenghui_36@163.com

Abstract: Objective To observe the effect of PMMA bone cement particles on the expressions of SOCS1 and SOCS3 genes by rat macrophages in vitro. **Methods** Macrophages were obtained from the peritoneal of rats and cultured. Cell purity was identified with immunocytochemistry using monoclonal antibody against CD68. Real-time PCR method was used to detect the expression levels of SOCS1 and SOCS3 genes. The effects of PMMA bone cement particles on the expression of SOCS1 and SOCS3 genes were observed at different concentrations and time. **Results** PMMA bone cement particles increased the expression of SOCS1 and SOCS3 in cultured macrophages, with a certain time- and dose-dependent fashion. The expression of SOCS1 and SOCS3 increased significantly at a concentration of 0.25 mg/ml of PMMA ($P<0.05$), and elevated the most significantly in cultures at 24h ($P<0.05$). **Conclusion** PMMA bone cement particles can stimulate the expression of SOCS1 and SOCS3 in macrophages.

Key words: Aseptic loosening; PMMA bone cement particles; SOCS1; SOCS3; Gene expression

细胞因子信号传导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)家族是一类由细胞产生并反馈性阻断细胞因子信号传导过程的负性调节因子，在人体免疫调节和多种炎性疾病过程中参与调节多种细胞因子的反应，已有学者通过基因缺陷小鼠模型研究发现SOCS1和SOCS3能够通过阻断某些细胞因子的信号传导来促进破骨细胞的形成，进而加速炎性骨质破坏过程[1]。

人工关节置换术是治疗各种终末期关节疾病和老年股骨颈骨折的一种有效的外科手段，而人工假体发生无菌性松动是导致人工关节晚期失败的主要原因之一，机体对假体磨损颗粒所产生的生物学反应，继之出现假体周围破骨细胞性骨溶解，现已被公

作者单位：518036 深圳，北京大学深圳医院骨关节科(张勇、曾晖、熊昇、陶可、桂先革、康斌、辛风)；汕头大学医学院(张勇、陶可、桂先革)

通讯作者：曾晖，Email：zenghui_36@163.com

万方数据

认为无菌性松动发生过程中的重要环节。聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)骨水泥在人工关节置换术后由于各种原因会产生磨损颗粒,其磨损颗粒被巨噬细胞吞噬后能够影响多种细胞因子的正常表达。本实验观察了骨水泥颗粒被大鼠腹腔巨噬细胞吞噬后对其SOCS1及SOCS3基因表达的影响,以探讨骨水泥颗粒是否对破骨细胞的形成有影响,以及是否具有浓度及时间相关性。

1 材料和方法

1.1 实验动物及材料

清洁级6~8w SD大鼠(中山大学实验动物中心),DMEM培养液(美国Gibco),胎牛血清(中国四季清),兔抗鼠CD68抗体(美国NeoMarkers),Trizol Reagent(美国Invitrogen),逆转录试剂盒(中国Bioteke),SYBR Green实时荧光定量PCR试剂盒(美国Invitrogen),PMMA骨水泥粉末(Howmedica Osteonics Corporation, America),ABI 7000实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司),倒置荧光相差显微镜(日本OLYMPUS),透射电镜(德国LEICA),凝胶成像系统Dolphin-DOC(美国Wealtec),PCR热循环仪(美国Eppendorf)。

1.2 方法

1.2.1 骨水泥颗粒的制备及实验分组:骨水泥颗粒经透射电镜测直径,直径范围约在0.3~1.1μm内,颗粒经γ射线灭菌,75%酒精浸泡48 h,PBS液洗涤3次,离心后用DMEM液稀释至实验所需浓度制成混悬液(用时摇匀)。实验按加入骨水泥颗粒浓度分为空白对照组和4个实验组,颗粒浓度分别依次为0、0.05、0.25、1.25、2.50 mg/mL;取一定浓度的骨水泥颗粒加入到巨噬细胞的培养体系中,按颗粒作用时间的长短分为空白组及12、24、72 h 3个实验组。

1.2.2 巨噬细胞的分离、培养及鉴定:颈椎离断术处死大鼠,75%的酒精浸泡5 min,无菌条件下打开腹腔,PBS液进行灌洗,灌洗液1500 r/min离心7 min,弃上清后加入含10%胎牛血清的DMEM培养液,充分混匀细胞后用细胞计数板计数细胞,调整细胞浓度到1×10^6个/mL,以3 mL/孔接种到6孔板中,6 h后换液洗除未贴壁细胞,以CD68单抗免疫细胞化学法(SABC法)确定巨噬细胞纯度及活性,镜下计数有活性的CD68阳性细胞占总细胞的90%以上。

1.2.3 巨噬细胞总RNA的提取:4℃PBS液洗涤细胞3次,6孔板内每孔加入1 mL Trizol裂解细胞,按照说明书的步骤分别以氯仿、异丙醇和75%乙醇提取细胞内总RNA;提取的RNA进行1.5%的琼脂糖凝胶电泳,电泳结果通过凝胶图像分析系统对条带进行分析,结果显示RNA无降解;经紫外分光光度计测定OD值及RNA浓度,各组260/280nm的OD比值均在1.7~2.0之间,RNA浓度在0.5~0.9μg/μL之间。

1.2.4 cDNA的制备:根据各样本组RNA测定浓度调整逆转录反应体系中各组RNA的加样量,使得各组RNA加样量均为2.0μg,逆转录具体操作按照试剂盒说明书进行操作合成cDNA。

1.2.5 引物的设计及合成:使用Primer Premier 5.0专用软件设计目的基因及内参的引物序列,具体序列见表1。所用引物均由上海生物工程公司设计合成:

表1 扩增片段所用引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度
SOCS1	上游:5'-CCAGCTGGCAGCCGACAATG-3',	81bp
	下游:5'-GACGAAGACGAGGACGAGGATG-3'	
SOCS3	上游:5'-GGAGAGCGGATTCTACTGGAGTG-3',	164bp
	下游:5'-ACTGGATGCGTAGGTTCTTGGTC-3',	
GAPDH	上游:5'- CAAGTTCAACGGCACAGTCAAGG -3'	123bp
	下游:5'- ACATACTCAGCACCAGCATCACC -3',	

1.2.6 Real-time PCR反应:Real-time PCR扩增反应在实时定量PCR仪(ABI 7000)上进行。每个PCR管内加入2×SuperMix(SYBR Green) 10μL,cDNA 1μL,上、下游引物(10μmol/L)各0.4μL,ROX 0.4μL,余使用灭菌双蒸水补足,使反应总体积为20μL。反应条件设置为:50℃ 2 min,95℃ 2 min,95℃ 15s,56℃ 30s,72℃ 30s,共计40个循环。

1.2.7 统计学处理:采用SPSS13.0统计软件包进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间数据比较采用单因素方差分析进行统计学分析,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

将骨水泥颗粒加入巨噬细胞的培养体系内,12 h后镜下观察发现空白对照组巨噬细胞有较多伪足出现(图1),实验组巨噬细胞亦有大量伪足出现,且大部分细胞内含有骨水泥颗粒,数量不等,一般含3~6个颗粒(图2)。

万方数据

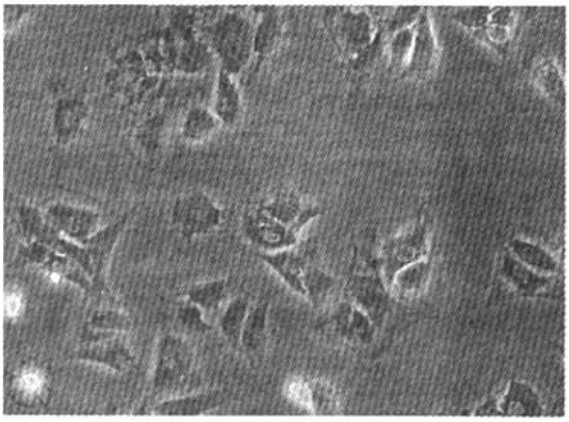

图 1 未加入骨水泥颗粒的巨噬细胞(200 ×)

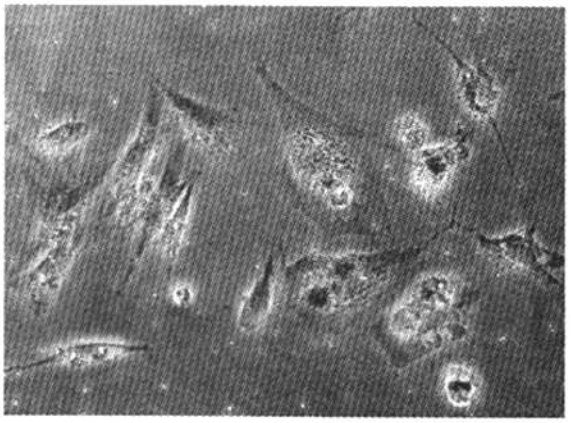

图 2 吞噬骨水泥颗粒的巨噬细胞(200 ×)

2.2 巨噬细胞内 SOCS1 和 SOCS3 基因的表达量

SOCS1、SOCS3 及 GAPDH 的 Real-time PCR 扩增曲线和溶解曲线说明采用的 Real-time PCR 反应体系和条件符合定量 PCR 的要求,各基因的溶解曲线均表现为单一的波峰,为特异性扩增。Real-time PCR 定量反应完成后,由获取的 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分别计算目的基因 SOCS1 和 SOCS3 在不同分组条件下的 mRNA 表达量,并绘制直方图。结果显示:骨水泥颗粒对 SOCS1 和 SOCS3 基因表达的影响表现出一定的浓度和时间依赖性,随着骨水泥颗粒浓度的升高以及作用时间的延长,SOCS1 和 SOCS3 的表达量首先呈逐渐上升趋势,升高到一定程度后逐渐下降;采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析后发现,各骨水泥浓度组与空白组相比差异均有统计学意义($P<0.05$),当颗粒浓度达到 0.25 mg/mL 时,SOCS1 和 SOCS3 基因的表达量(0.024 ± 0.003, 0.033 ± 0.004)较空白组(0.012 ± 0.002, 0.012 ± 0.001)升高最明显($P<0.01$),其余各组与 0.25 mg/mL 组相比表达量虽有所减弱,但仍高于空白组($P<0.05$)(如图 3);各时间组与空白组相比差异均有高度的统计学意义($P<0.01$),颗粒作用 24 h 时 SOCS1 和 SOCS3 基因的表达量(0.0161 ± 0.0023, 0.0123 ± 0.0011)较空白组(0.0016 ± 0.0006, 0.0025 ± 0.0001)升高最显著,其余两组与 24 h 组相比虽有所降低,但仍亦高于空白组(如图 4)。

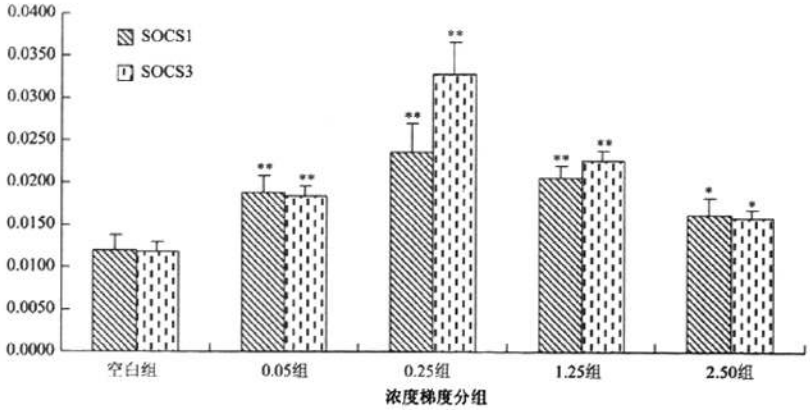

图 3 不同浓度骨水泥颗粒对 SOCS1 和 SOCS3 基因表达的影响(单位:mg/mL)

注:$n=9$,与空白组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

3 讨论

假体周围无菌性骨溶解过程始于磨损颗粒与应答细胞间的相互作用,磨损颗粒在骨溶解的发生和发展过程中起着关键性作用[2]。无论假体采用何种材质或何种固定方式,材料与骨界面间的微动和

万方数据

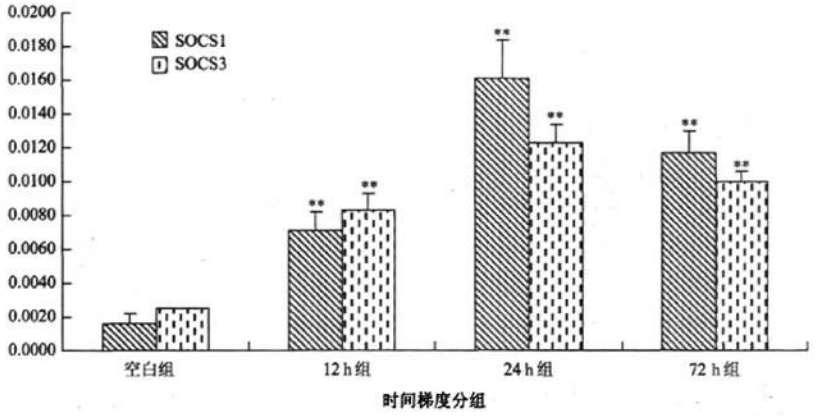

图 4 骨水泥颗粒作用不同时间对 SOCS1 和 SOCS3 基因表达的影响(骨水泥浓度为 0.25 mg/mL)

注:$n=9$,与空白组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

关节摩擦均能产生磨损颗粒;颗粒进入关节间隙时,可在假体关节面上产生三体磨损;假体间相互碰撞亦可产生微粒。PMMA 骨水泥是临床上最为常用的一种黏合剂,在人工关节置换术后由于各种原因会产生磨损颗粒,其磨损颗粒被巨噬细胞吞噬后能够影响多种细胞因子的正常表达。研究发现[3] PMMA 骨水泥颗粒能够直接作用于破骨前体细胞并通过影响核因子 κB 受体激活物配体(RANKL)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表达增强破骨细胞的骨吸收活性。

有大量的证据表明磨损颗粒最重要的靶目标是巨噬细胞。在骨溶解过程中,巨噬细胞对颗粒的反应启动了炎症反应,继而引起破骨细胞过度的募集、产生和激活。巨噬细胞在人工假体无菌性骨溶解的病理过程中起双重作用:一是作为人体防御磨损颗粒的主要细胞,在磨损颗粒的刺激下产生大量的炎性细胞因子对机体起防御作用;二是作为破骨细胞的前体细胞,在多种细胞因子的作用下向成熟的破骨细胞分化,进而引起骨溶解[4]。体内诸多激素和细胞因子可通过影响骨保护素(OPG)或 RANKL 的表达来影响破骨细胞的分化和形成,活化的 T 细胞分泌产生的 IFN-γ 能够对抗 RANKL 的作用,从而维持骨的正常新陈代谢[5];白细胞介素-6(IL-6)有复杂的功能,它既能促进骨质吸收又能抑制骨质吸收,最近的研究显示它能够通过抑制 RANKL 的表达从而抑制巨噬细胞向破骨细胞的分化[6]。

细胞因子信号传导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)家族是一类由细胞产生并反馈性阻断细胞因子信号传导过程的负性调节因子,在人体免疫调节和多种炎性疾病过程中调节多种细胞因子的反应,研究发现在类风湿性关节炎患者外周血和关节内巨噬细胞 SOCS1 和 SOCS3 的表达量明显升高[7]。有学者通过建立 SOCS1 和 SOCS3 基因缺陷小鼠模型发现:SOCS1 能够对抗 IFN-γ 对巨噬细胞向破骨细胞分化的抑制作用,而 SOCS3 能够对抗 IL-6 对巨噬细胞向破骨细胞分化的抑制作用,SOCS1 和 SOCS3 能够通过阻断如 IFN-γ、IL-6 等一些细胞因子的传导来促进破骨细胞的形成,进而加速炎性骨质破坏过程[1]。研究发现[8,9]骨水泥颗粒能够促进破骨细胞前体细胞内 SOCS3 的表达,而且在含有 TGF-β 抗体的环境中 SOCS3 的过度表达能够促进破骨细胞的形成;另外,Zhang 等[10]也发现随着 SOCS3 的表达量明显上升,$CD11^{+}$ 树突状细胞向破骨细胞分化的作用增强,同时骨质破坏程度也越严重。

本实验中我们将骨水泥颗粒与巨噬细胞共同培养,结果发现骨水泥颗粒能够明显影响巨噬细胞 SOCS1 和 SOCS3 基因的表达,随着颗粒浓度以及干预时间的变化,其影响程度也有所不同。当颗粒浓度达到 0.25 mg/mL 时 SOCS1 和 SOCS3 的表达升高最明显,提示当假体植入后其周围组织内磨损颗粒达到一定数量时,能最大程度的抑制巨噬细胞内某些细胞因子的信号传导,从而促进破骨细胞的形成,加速骨溶解过程;但随着颗粒浓度的继续升高,SOCS1 和 SOCS3 的表达量反而有所下降(仍高于空白对照组),这可能是由于巨噬细胞吞噬颗粒过多导致细胞凋亡。Petit 等[11]研究发现单核/巨噬细胞凋亡速率与磨损颗粒的大小及浓度有关,颗粒浓度越高细胞凋亡速率越快。此外,当颗粒浓度为 0.25 mg/mL 时,24 h 组的基因表达量均高于其他时间

万方数据

组,原因可能为颗粒作用时间超过 24 h 后可引起细胞对刺激产生"耐受效应",从而引起细胞反应敏感性降低。

无菌性松动导致的假体失败仍然是临床上亟待解决的一项重要课题,在材料学的进步还未能完全消除磨损颗粒之前,磨损颗粒带来的骨溶解等一系列不良生物学反应会始终存在,人工关节假体也仍然面临着由此造成的晚期松动问题。本实验证实了骨水泥颗粒能够促进巨噬细胞 SOCS1 和 SOCS3 的表达,并且具有一定的浓度及时间相关性,能增强二者对某些细胞因子信号传导的抑制作用,从而可能进一步对促进破骨细胞的分化,加速骨溶解的过程产生影响,选择性抑制破骨细胞前体细胞内 SOCS1 和 SOCS3 的表达,可能成为治疗炎性骨质破坏的一种有效治疗策略。本实验为探讨如何防治人工假体发生无菌性松动提供了一定的理论依据,为临床治疗人工关节松动探索新的药物开发思路,然而具体通过何种途径或药物来抑制 SOCS1 和 SOCS3 的表达还有待于进一步深入的研究。

【参考文献】

[1] Ohishi M, Matsumura Y, Aki D, et al. Suppressors of cytokine signaling-1 and -3 regulate osteoclastogenesis in the presence of inflammatory cytokines. J Immunol, 2005, 174(5):3024-3031.

[2] Catelas I, Jacobs JJ. Biologic activity of wear particles. Instr Course Lect, 2010, 59:3-16.

[3] 孙嗣国,范清宇,周勇,等. 骨水泥颗粒促进肿瘤坏死因子-α诱导的破骨细胞形成及其骨吸收活性. 中国矫形外科杂志, 2005;13(13):1003-1006.

[4] Ingham E, Fisher J. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. Biomaterials, 2005, 26(11):1271-1286.

[5] Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. Nature, 2000, 408(6812):600-605.

[6] Yoshitake F, Itoh S, Narita H, et al. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways. J Biol Chem, 2008, 283(17):11535-11540.

[7] Isomäki P, Alanärä T, Isohanni P, et al. The expression of SOCS is altered in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford), 2007, 46(10):1538-1546.

[8] Rakshit DS, Ly K, Sengupta TK, et al. Wear debris inhibition of anti-osteoclastogenic signaling by interleukin-6 and interferon-gamma. Mechanistic insights and implications for periprosthetic osteolysis. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(4):788-799.

[9] Fox SW, Haque SJ, Lovibond AC, et al. The possible role of TGF-beta-induced suppressors of cytokine signaling expression in osteoclast-macrophage lineage commitment *in vitro*. J Immunol, 2003, 170(7):3679-3687.

[10] Zhang X, Alnaeeli M, Singh B, et al. Involvement of SOCS3 in regulation of CD11c + dendritic cell-derived osteoclastogenesis and severe alveolar bone loss. Infect Immun, 2009, 77(5):2000-2009.

[11] Petit A, Catelas I, Antoniou J, et al. Differential apoptotic response of J774 macrophages to alumina and ultra-high-molecular-weight polyethylene particles. J Orthop Res, 2002, 20(1):9-15.

(收稿日期:2010-11-12)

万方数据