

ERK 信号通路对不同浓度钛合金颗粒诱导成骨细胞 RANKL 和 OPG 表达的影响

金清¹, 谢守祥², 许铁³, 孙虹², 严庄²

1. 南京医科大学附属淮安第一医院手术麻醉科, 江苏 淮安 223300;

2. 南京医科大学附属淮安第一医院急诊科, 江苏 淮安 223300;

3. 徐州医科大学附属医院急救中心, 江苏 徐州 221002

摘要: **目的** 探讨不同浓度钛合金颗粒对小鼠成骨细胞核因子- κ B 受体活化因子配基 (RANKL) 及骨保护素 (OPG) 表达的影响, 以及细胞外信号调控激酶 1/2 (ERK1/2) 信号通路在其中的作用。 **方法** 体外培养小鼠成骨细胞, 按照培养基中是否加用 ERK1/2 特异性抑制剂 (PD98059), 将成骨细胞分为无 PD98059 干预组和 PD98059 干预组两个大组, 每组又分为空白对照组, 钛合金颗粒干预 A 组 (0.01 g/L)、B 组 (0.1 g/L) 和 C 组 (1.0 g/L), 每组 6 个样本。分别在培养第 24 h 和 48 h 两个时间点, 收集各组细胞, 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测成骨细胞内 RANKL 和 OPG mRNA 的相对表达量。 **结果** RT-PCR 结果显示, 与不同浓度钛颗粒共培养 24 h、48 h 后, 各组成骨细胞均有 RANKL、OPG mRNA 的表达; 在各时间点 A 组、B 组和 C 组成骨细胞 RANKL 和 OPG mRNA 相对表达量以及 RANKL/OPG mRNA 比值均较对照组显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。PD98059 干预组成骨细胞 RANKL、OPG mRNA 相对表达量以及 RANKL/OPG mRNA 比值均低于无 PD98059 干预组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。 **结论** 不同浓度钛合金颗粒可促进成骨细胞 RANKL mRNA、OPG mRNA 的表达, 尤其是 RANKL mRNA 的表达, 同时也能上调 RANKL/OPG 的比值。ERK 信号通路抑制剂 PD98059 可一定程度抑制 OPG 的表达, 尤其是 RANKL 的表达, 提示 ERK1/2 信号通路可能参与调节钛合金颗粒诱导的成骨细胞 RANKL、OPG 的表达。

关键词: 成骨细胞; 钛合金颗粒; 核因子- κ B 受体活化因子配基; 骨保护素; 细胞外信号调控激酶 1/2 信号通路
中图分类号: R 318.17 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)12-1614-05

Effect of ERK1/2 signaling pathway on the expressions of RANKL and OPG in osteoblasts induced by different concentrations of titanium alloy particles in mice

JIN Qing*, XIE Shou-xiang, XU Tie, SUN Hong, YAN Zhuang

* Department of Operating and Anaesthesia, Huaian First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Huaian, Jiangsu 223300, China

Corresponding author: XIE Shou-xiang, E-mail: 402569219@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effects of different concentrations of titanium alloy particles on the expressions of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) in mouse osteoblasts and the role of extracellular signal-regulated kinase-1 and-2 (ERK1/2) signaling pathway. **Methods** The mouse osteoblasts were cultured in vitro. According to whether the PD98059, an ERK1/2 inhibitor to be added in medium, the osteoblasts were divided into no PD98059 intervention group and PD98059 intervention group, and both of them were re-divided into blank control group, intervention groups of different concentrations of titanium alloy particles: group A (0.01 g/L), group B (0.1 g/L) and group C (1.0 g/L). Six samples were taken in each group. The cells of each group were collected at the time points of 24-hour and 48-hour after culture, and the expressions of RANKL mRNA and OPG mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** RT-PCR showed that the expressions of RANKL mRNA and OPG mRNA were found in osteoblasts of all groups after co-culture with different concentrations of titanium particles for 24 hours and 48 hours, and the expressions of RANKL mRNA and OPG mRNA in osteoblasts and the ratio of RANKL mRNA to OPG mRNA at each time point increased significantly in groups A, B, C compared with blank control

group (all $P < 0.01$). The expressions of RANKL mRNA and OPG mRNA in osteoblasts and the ratio of RANKL mRNA to OPG mRNA in PD98059 intervention group were all lower than those in no PD98059 intervention group ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion** Titanium alloy particles of different concentrations can promote the expressions of RANKL mRNA and OPG mRNA in osteoblasts, especially the expression of RANKL mRNA and can also up-regulate the ratio of RANKL mRNA to OPG mRNA. ERK signaling pathway inhibitor PD98059 can inhibit the expressions of RANKL mRNA and OPG mRNA to some extent, especially the expression of RANKL mRNA. It is suggested that ERK1/2 signaling pathway is involved in regulating the expressions of RANKL and OPG in osteoblasts induced by titanium alloy particles.

Key words: Osteoblast; Titanium alloy particles; Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; Osteoprotegerin; Extracellular signal-regulated kinase1/2 signaling pathway

钛合金是假体或者人工关节常用的金属材料,在人工关节翻修手术中可见到大量的钛或钛合金磨损颗粒^[1]。而这些磨损颗粒所诱导的生物学反应被认为是导致无菌性松动的重要原因^[2-3]。细胞外信号调控激酶(extracellular signal-regulated kinase-1 and-2, ERK1/2)信号通路是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路的一种,它调控多种细胞生物学过程,包括细胞增殖、分化和凋亡等。有研究发现,ERK 信号通路对成骨细胞骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和细胞核因子(NF)- κ B 受体活化因子配基(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)的表达起重要作用^[4-5]。而成骨细胞产生的 RANKL 和 OPG 在调节破骨细胞活性、参与骨溶解中起着重要的作用,且研究表明 RANKL/OPG 的比例协调是维持局部骨代谢平衡的关键^[6]。

本实验通过钛合金颗粒与成骨细胞共培养,探讨不同浓度钛合金颗粒对体外培养的小鼠成骨细胞 RANKL、OPG 表达的影响,进一步探索假体周围骨溶解机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 DMEM(美国 Gibco 公司),胎牛血清(四季青公司),Total RNA Isolation system 试剂盒(美国 Promega 公司),RT Access system 试剂盒、DNA Marker(天根生化科技),PD98059(中国碧云天),钛合金颗粒(主要成分为 Ti6Al4V),小鼠成骨细胞 3T3-MC 购自中国科学院北京细胞生物所。

1.2 实验方法

1.2.1 成骨细胞的培养 小鼠成骨细胞常规培养于含 10% 胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、 1×10^5 U/L 链霉素的 DMEM 培养基中(培养条件为 37 °C, CO₂ 浓度为 5%),定期观察细胞生长情况,待细胞铺满瓶底后用 0.25% 胰酶消化,进行 1:3 传代培养。选用第 3 至 5 代小鼠成骨细胞接种于培养瓶中,培养 24 h 成

骨细胞完全贴壁后作为研究用的成骨细胞。

1.2.2 实验分组 按照是否加用 ERK1/2 抑制剂(PD98059),将成骨细胞分为无 PD98059 干预组和 PD98059 干预组两个大组,每组又分为空白对照组,钛合金颗粒干预 A 组(0.01 g/L)、B 组(0.1 g/L)和 C 组(1.0 g/L),再分为 24 h 和 48 h 两个时间点,每组 6 个样本。分别在培养第 24 h 和 48 h 两个时间点,收集各组细胞和培养基上清液,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测成骨细胞内 RANKL mRNA 及 OPG mRNA。

1.3 钛合金颗粒去内毒素处理 将 500 mg 钛合金颗粒(直径 $< 10 \mu\text{m}$)高温高压灭菌后悬浮于 50 ml 75% 的乙醇中,水平摇床 200 rpm 振荡 24 h,离心后更换 75% 的乙醇继续振荡 24 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,再用 100% 乙醇浸泡过夜,紫外线下干燥后,用培养基配置成 1 g/L 浓度备用。

1.4 RT-PCR 法检测 RANKL 和 OPG mRNA 的表达

1.4.1 总 RNA 提取 按上述细胞分组,用 PBS 洗涤 3 次,采用 Total RNA Isolation System(总 RNA 纯化系统)试剂盒于 24 h、48 h 提取成骨细胞总的 RNA,取出 2 μl 经核酸测定仪测定 RNA 纯度和浓度。

1.4.2 RT-PCR 取一 0.6 ml PCR 管,按下列次序加入以下物质:无核酸酶水 9.5 μl 、模板 1 μl 、上游引物 1 μl 、下游引物 1 μl 、 $2 \times$ 预混液 12.5 μl ,总反应体系为 25 μl 。PCR 反应条件见表 1。

1.4.3 PCR 产物鉴定与分析 取 PCR 扩增产物 6 μl 上样于 2% 琼脂糖凝胶,80 V 电压下电泳 45 min,于紫外线箱中观察并照相记录。实验重复 3 次,用 Image J 图像分析软件对目的基因和参照基因条带进行灰度分析。

1.5 统计学处理 利用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。本实验所得计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多因素方差分析,两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 RANKL、OPG、 β -actin 反应条件

基因	上下游引物	反应条件:			扩增片段长度		
		预变性→变性→退火→延伸共 40 个循环→最终延伸					
RANKL	上游引物:5'-GGGTTCCATAAAAGTCACTCTG-3' 下游引物:5'-GGTTGGACACCTGAATGCTAAT-3'	94 °C、4 min	→94 °C、30 s	→58 °C、30 s	→72 °C、1 min	→72 °C、10 min	356 bp
OPG	上游引物:5'-CTTCTTCAGGTTTGTCTGTTCT-3' 下游引物:5'-AAGTGGGATGTTTTCAAGTGC-3'	94 °C、4 min	→94 °C、30 s	→56 °C、30 s	→72 °C、1 min	→72 °C、10 min	456 bp
β -actin	上游引物:5'-TCATCACTATTGGCAACGAGC-3' 下游引物:5'-AACAGTCCGCCTAGAAGCA-3'	94 °C、4 min	→94 °C、30 s	→52 °C、30 s	→72 °C、1 min	→72 °C、10 min	418 bp

2 结果

2.1 成骨细胞总 RNA 检测 所提取的成骨细胞总 RNA 经核酸测定仪测定各组 RNA 的 D260/D280 \approx 1.98, 说明其纯度较高。

2.2 RANKL mRNA 不同浓度钛合金颗粒与成骨细胞共培养 24 h、48 h 后, 与对照组相比, A 组、B 组和 C 组 RANKL 的条带亮度增强灰度值相对值升高 ($P < 0.01$); 组间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而预先用 PD98059 干预成骨细胞后, 各组 RANKL 的条带灰度值相对值较无 PD98059 干预组降低 ($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

2.3 OPG mRNA 不同浓度钛合金颗粒与成骨细胞共培养 24 h、48 h 后, OPG 的扩增产物电泳结果显示

无 PD98059 干预组及 PD98059 干预组中 A 组、B 组、C 组的 OPG 条带亮度比对照组增强, 灰度值比值比对照组升高 ($P < 0.05$)。A 组、C 组、B 组间两两比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而 PD98059 干预组 OPG mRNA 灰度值较无 PD98059 干预组下降 ($P < 0.05$)。见图 2、表 3。

2.4 RANKL/OPG mRNA 灰度值的比较 如表 4 示, 不同浓度钛合金颗粒与成骨细胞共培养 24 h、48 h 后, 无 PD98059 干预组中 A 组、B 组和 C 组 RANKL/OPG mRNA 灰度值比值较对照组升高 ($P < 0.01$); 组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。给予 PD98059 干预后, 其比值较无抑制剂干预组明显降低 ($P < 0.01$)。见表 4。

表 2 各组 RANKL mRNA 条带灰度值/ β -actin mRNA 灰度值 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

分组	24 h			48 h		
	PD98059(-)	PD98059(+)	P 值	PD98059(-)	PD98059(+)	P 值
对照组	0.365 \pm 0.011	0.261 \pm 0.005	<0.05	0.405 \pm 0.014	0.306 \pm 0.006	<0.05
A 组	0.518 \pm 0.028*	0.371 \pm 0.012*	<0.05	0.730 \pm 0.013*	0.480 \pm 0.023*	<0.05
B 组	0.625 \pm 0.016* Δ	0.376 \pm 0.018* Δ	<0.05	0.844 \pm 0.046* Δ	0.502 \pm 0.017* Δ	<0.05
C 组	0.707 \pm 0.018* Δ &	0.389 \pm 0.007* Δ &	<0.05	0.924 \pm 0.032* Δ &	0.514 \pm 0.024* Δ &	<0.05

注:与对照组相比, * $P < 0.01$; 与 A 组相比, $\Delta P < 0.05$; 与 B 组相比, & $P < 0.05$ 。

表 3 各组 OPG mRNA 条带灰度值/ β -actin mRNA 灰度值 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

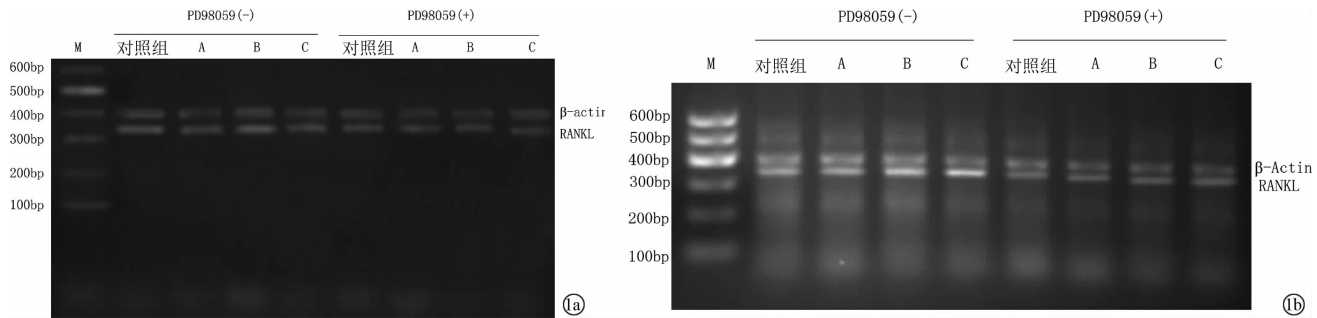
分组	24 h			48 h		
	PD98059(-)	PD98059(+)	P 值	PD98059(-)	PD98059(+)	P 值
对照组	0.369 \pm 0.006	0.356 \pm 0.010	<0.05	0.421 \pm 0.002	0.410 \pm 0.004	<0.05
A 组	0.414 \pm 0.008*	0.397 \pm 0.007*	<0.05	0.489 \pm 0.011*	0.463 \pm 0.011*	<0.05
B 组	0.442 \pm 0.015*	0.410 \pm 0.006*	<0.05	0.515 \pm 0.005*	0.480 \pm 0.014*	<0.05
C 组	0.436 \pm 0.009*	0.404 \pm 0.005*	<0.05	0.501 \pm 0.015*	0.467 \pm 0.011*	<0.05

注:与对照组相比, * $P < 0.01$ 。

表 4 各组 RANKL mRNA 条带灰度值/OPG mRNA 灰度值 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

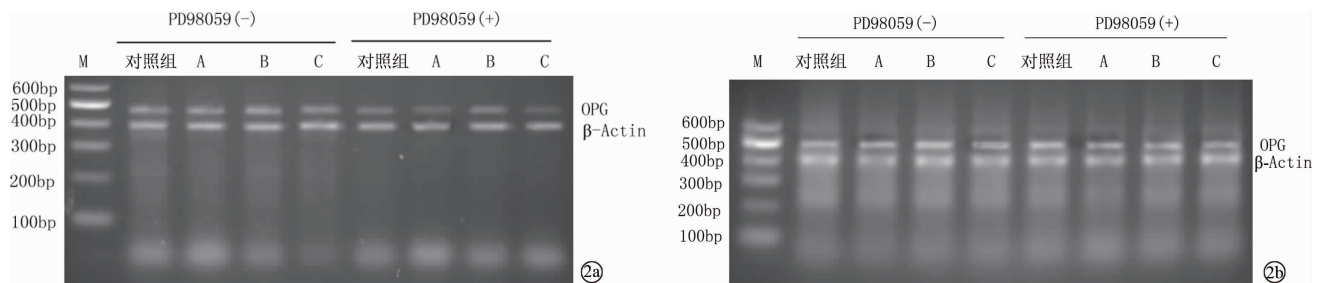
分组	24 h			48 h		
	PD98059(-)	PD98059(+)	P 值	PD98059(-)	PD98059(+)	P 值
对照组	0.990 \pm 0.024	0.732 \pm 0.013	<0.01	0.962 \pm 0.033	0.746 \pm 0.013	<0.01
A 组	1.252 \pm 0.078*	0.934 \pm 0.015*	<0.01	1.493 \pm 0.012*	1.037 \pm 0.050*	<0.01
B 组	1.414 \pm 0.035* Δ	0.918 \pm 0.045* Δ	<0.01	1.640 \pm 0.023* Δ	1.047 \pm 0.058* Δ	<0.01
C 组	1.624 \pm 0.072* Δ &	0.964 \pm 0.029* Δ &	<0.01	1.846 \pm 0.110* Δ &	1.102 \pm 0.076* Δ &	<0.01

注:与对照组相比, * $P < 0.01$; 与 A 组相比, $\Delta P < 0.05$; 与 B 组相比, & $P < 0.05$ 。



注:1a:24 h;1b:48 h;M:Marker(100~600 bp);对照组:0 mg/ml;A:0.01 g/L;B:0.1 g/L;C:1.0 g/L。

图1 不同浓度颗粒处理条件下 RANKL、 β -actin 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图



注:1a:24 h;1b:48 h;M:Marker(100~600 bp);对照组:0 mg/ml;A:0.01 g/L;B:0.1 g/L;C:1.0 g/L。

图2 不同浓度颗粒处理条件下 OPG、 β -actin 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

3 讨论

ERK1/2 信号通路为 MAPK 家族中一员,ERK 主要有 ERK1 和 ERK2 两种同工酶,其上游激酶为促丝裂素活化蛋白激酶的激酶(MEK),活化后的 ERK1/2 可进入细胞核,活化转录因子,从而影响靶基因表达,调控细胞增殖和分化。PD98059 为 MEK 特异性抑制剂,它可以透过细胞膜,选择性抑制 MEK1,从而抑制 ERK1/2 信号通路的转导。Lambert 研究表明 ERK 信号通路参与了白细胞介素-1 β (IL-1 β)刺激成骨细胞 OPG 的表达,予 PD98059 干预后,OPG 蛋白水平显著降低^[7]。Persson 研究表明,血管活性肠肽(VIP)通过活化 ERK 信号通路使成骨细胞 RANKL 的表达明显升高,从而调节 RANKL/OPG 比值,在骨改建中发挥重要作用^[8]。笔者前期研究也表明,中等浓度钛合金颗粒可使成骨细胞 RANKL、OPG mRNA 和蛋白水平明显升高,予以 PD98059 阻断 ERK 信号通路后,成骨细胞 RANKL、OPG mRNA 和蛋白水平明显下降^[9],进一步研究表明不同浓度钛合金颗粒可促进成骨细胞 ERK 蛋白磷酸化水平,激活 ERK 信号通路^[10]。Chen 等^[11]研究发现 ERK 信号通路参与了骨髓间充质干细胞的分化和 RANKL/OPG 比值的调节。然而不同浓度钛合金颗粒能否影响成骨细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化水平和 RANKL、OPG mRNA 的表达却不是很清楚。

本实验结果显示,不同浓度钛合金颗粒均可明显促进成骨细胞 RANKL、OPG mRNA 的表达,尤其是

RANKL mRNA 的表达。这与 Mine 及 Alrabeah 等^[12-13]研究结果较一致。实验中笔者还发现,高浓度钛合金颗粒组 OPG mRNA 表达量较中浓度组有所减少,这可能与高浓度钛合金颗粒抑制成骨细胞增殖活性有关。但 OPG mRNA 表达增加幅度明显小于 RANKL,使 RANKL/OPG 比值明显升高,这样可间接促进 RANKL 与破骨细胞表面的 RANK 结合,激活骨吸收信号的传递,促进破骨细胞分化和增强骨吸收活性并阻止破骨细胞凋亡,导致假体周围溶骨作用增强。各实验组在加入了 PD98059 后,RANKL mRNA 的表达显著降低,虽然在 PD98059 干预后 OPG mRNA 表达亦有所降低,而最终 RANKL/OPG 的比值较抑制剂干预前明显降低,提示钛合金颗粒通过促进成骨细胞 ERK 蛋白磷酸化水平,活化 ERK 信号通路,使得成骨细胞 RANKL 和 OPG 表达升高,从而影响 RANKL/OPG 的比值。实验中笔者还发现,加入 PD98059 后,RANKL 和 OPG mRNA 表达水平并未完全抑制,尤其是 OPG 的表达,这说明尽管 ERK 信号通路在钛合金颗粒刺激成骨细胞 RANKL 及 OPG 的表达中起重要作用,但单独抑制 ERK1/2 信号通路不能完全抑制 RANKL 和 OPG 的表达,提示成骨细胞 RANKL/OPG 的表达可能受多种信号通路调节^[14-15]。

综上所述,本实验提示不同浓度钛合金颗粒可促进成骨细胞 RANKL mRNA、OPG mRNA 的表达,尤其是 RANKL 的表达,同时也能上调 RANKL/OPG 的比值。阻断 ERK1/2 信号通路能抑制 RANKL 和 OPG

的表达,尤其是 RANKL 的表达,使 RANKL/OPG 比值降幅更大,从而抑制破骨细胞的过度活化。ERK1/2 信号通路可能参与了钛合金等磨损颗粒致使假体无菌性松动的生物学过程。

参考文献

- [1] Sydney SE, Pickering SA, Bell CG, et al. Reducing metal debris generation during total knee arthroplasty [J]. *Orthopedics*, 2007, 30(12):999-1000.
- [2] Koulouvaris P, Ly K, Ivashkiv LB, et al. Expression profiling reveals alternative macrophage activation and impaired osteogenesis in periprosthetic osteolysis [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(1):106-116.
- [3] Koseki H, Matsumoto T, Ito S, et al. Analysis of polyethylene particles isolated from periprosthetic tissue of loosened hip arthroplasty and comparison with radiographic appearance [J]. *J Orthop Sci*, 2005, 10(3):284-290.
- [4] Matsushita T, Chan YY, Kawanami A, et al. Extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 play essential roles in osteoblast differentiation and in supporting osteoclastogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(21):5843-5857.
- [5] Chang IC, Tsai CH, Chang YC. Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 95(1):327-332.
- [6] Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, et al. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(12):4768-4776.
- [7] Lambert C, Oury C, Dejardin E, et al. Further insights in the mechanisms of interleukin-1beta stimulation of osteoprotegerin in osteoblast-like cells [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(9):1350-1361.
- [8] Persson E, Lerner UH. The neuropeptide VIP regulates the expression of osteoclastogenic factors in osteoblasts [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(12):3732-3741.
- [9] 谢守祥,许铁,刘林,等. ERK 信号通路对钛合金诱导成骨细胞 RANKL、OPG 表达的作用 [J]. *徐州医学院学报*, 2012, 32(6):363-366.
- [10] 谢守祥,许铁,孙虹,等. 不同浓度钛合金颗粒对小鼠成骨细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化水平的影响 [J]. *徐州医学院学报*, 2017, 37(3):165-168.
- [11] Chen TH, Chen WM, Hsu KH, et al. Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(4):913-918.
- [12] Mine Y, Makihira S, Nikawa H, et al. Impact of titanium ions on osteoblast-, osteoclast- and gingival epithelial-like cells [J]. *J Prosthodont Res*, 2010, 54(1):1-6.
- [13] Alrabeah GO, Brett P, Knowles JC, et al. The effect of metal ions released from different dental implant-abutment couples on osteoblast function and secretion of bone resorbing mediators [J]. *J Dent*, 2017, 66:91-101.
- [14] Jeong HM, Han EH, Jin YH, et al. Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* stimulate osteoblast differentiation via p38 MAPK- and ERK-dependent RUNX2 activation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(12):3362-3368.
- [15] Uchino K, Okamoto K, Sakai E, et al. Dual effects of liquiritigenin on the proliferation of bone cells: promotion of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast differentiation [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(11):1714-1721.

收稿日期:2018-09-06 编辑:王国品