

## · 基础研究 ·

## 人参皂甙 Rg1 与钛微粒对大鼠颅骨成骨细胞的影响

林煜<sup>1</sup>, 张怡元<sup>1</sup>, 冯尔宥<sup>1</sup>, 吴银生<sup>2</sup>, 林燕萍<sup>2</sup>

(1. 厦门大学附属福州第二医院, 福建 福州 350007;

2. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350108)

**摘 要** 目的:探讨人参皂甙 Rg1 与钛微粒对大鼠颅骨成骨细胞的影响,为人工关节假体松动的防治提供新思路。方法:收集、纯化新生 SD 大鼠颅骨成骨细胞,筛选钛微粒,配制钛微粒浸提液,进行内毒素检测后,将培养的第 3 代成骨细胞以  $1 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的密度传代接种于 5 组培养液中,即正常组(含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基)、钛微粒组(体积比为 0.1% 的钛微粒混悬液 + 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基)、钛 + 高 Rg1 组(体积比为 0.1% 的钛微粒混悬液 + 终浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$  的人参皂甙 Rg1 + 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基)、钛 + 中 Rg1 组(体积比为 0.1% 的钛微粒混悬液 + 终浓度为  $50 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$  的人参皂甙 Rg1 + 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基)、钛 + 低 Rg1 组(体积比为 0.1% 的钛微粒混悬液 + 终浓度为  $25 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$  的人参皂甙 Rg1 + 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基)。连续培养 24 h 后,观察成骨细胞形态;采用酶联免疫吸附法检测细胞培养液中前列腺素 E2、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 6、白细胞介素 1 及白细胞介素 1 受体拮抗剂的浓度;采用实时荧光定量法检测成骨细胞中环氧化酶 2mRNA、肿瘤坏死因子  $\alpha$ mRNA 的表达;采用 Western Blotting 法检测成骨细胞中环氧化酶 2 蛋白的表达。结果:5 组成骨细胞培养液前列腺素 E2 光密度值的差异有统计学意义( $F=244.895, P=0.000$ );钛微粒组、钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组均高于正常组[(53.362  $\pm$  0.307), (41.048  $\pm$  0.431), (38.998  $\pm$  0.234), (31.687  $\pm$  0.466),  $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ];钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组、钛 + 低 Rg1 组(32.501  $\pm$  0.124)均低于钛微粒组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ );钛 + 低 Rg1 组低于钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组( $P=0.000, P=0.000$ );钛 + 高 Rg1 组高于钛 + 中 Rg1 组( $P=0.000$ );正常组与钛 + 低 Rg1 组比较,差异无统计学意义( $P=0.168$ )。5 组成骨细胞培养液肿瘤坏死因子  $\alpha$  光密度值的差异有统计学意义( $F=72.340, P=0.000$ );钛微粒组、钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组、钛 + 低 Rg1 组均高于正常组[(50.121  $\pm$  0.532), (49.675  $\pm$  0.336), (46.431  $\pm$  0.245), (42.521  $\pm$  0.513), (40.055  $\pm$  0.471),  $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.001$ ];钛 + 中 Rg1 组、钛 + 低 Rg1 组低于钛微粒组( $P=0.000, P=0.000$ );钛 + 低 Rg1 组低于钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组( $P=0.000, P=0.000$ );钛 + 高 Rg1 组高于钛 + 中 Rg1 组( $P=0.000$ );钛微粒组与钛 + 高 Rg1 组比较,差异无统计学意义( $P=0.230$ )。5 组成骨细胞培养液白细胞介素 6 光密度值的差异有统计学意义( $F=80.449, P=0.000$ );钛微粒组、钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组、钛 + 低 Rg1 组均高于正常组[(80.537  $\pm$  0.883), (70.975  $\pm$  0.945), (68.154  $\pm$  0.745), (63.335  $\pm$  0.845), (57.550  $\pm$  0.610),  $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ];钛 + 高、中、低 Rg1 组均低于钛微粒组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ );钛 + 低 Rg1 组低于钛 + 高、中 Rg1 组( $P=0.001, P=0.000$ );钛 + 高 Rg1 组高于钛 + 中 Rg1 组( $P=0.039$ )。5 组成骨细胞培养液白细胞介素 1 光密度值的差异有统计学意义( $F=38.483, P=0.000$ );钛微粒组、钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组、钛 + 低 Rg1 组均高于正常组[(83.106  $\pm$  4.413), (59.506  $\pm$  1.294), (56.881  $\pm$  3.561), (45.081  $\pm$  3.459), (37.579  $\pm$  3.526),  $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ];钛 + 高、中、低 Rg1 组均低于钛微粒组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ),钛 + 低 Rg1 组低于钛 + 高、中 Rg1 组( $P=0.000, P=0.000$ ),钛 + 中 Rg1 组与钛 + 高 Rg1 组相比,差异无统计学意义( $P=0.187$ )。5 组成骨细胞培养液白细胞介素 1 受体拮抗剂光密度值的差异有统计学意义( $F=492.724, P=0.000$ );钛微粒组、钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组、钛 + 低 Rg1 组均低于正常组[(64.111  $\pm$  1.364), (116.351  $\pm$  5.432), (229.768  $\pm$  3.545), (207.203  $\pm$  2.436), (268.019  $\pm$  3.871),  $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ];钛 + 高、中、低 Rg1 组均高于钛微粒组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ),钛 + 中 Rg1 组高于钛 + 高、低 Rg1 组( $P=0.000, P=0.000$ ),钛 + 高 Rg1 组低于钛 + 低 Rg1 组( $P=0.000$ )。5 组成骨细胞中  $\beta$ -actin、环氧化酶 2、肿瘤坏死因子  $\alpha$  荧光定量 RT-PCR 部分扩增曲线和各基因的溶解曲线表现为单一的溶解峰,均为特异性扩增。5 组成骨细胞环氧化酶 2mRNA 表达的差异有统计学意义( $F=886.930, P=0.000$ );与钛微粒组相比,钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组、钛 + 低 Rg1 组及正常组环氧化酶 2mRNA 的表达较弱[(0.734  $\pm$  0.065), (0.621  $\pm$  0.032), (0.517  $\pm$  0.042), (0.386  $\pm$  0.015),  $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ];钛 + 高、中、

通讯作者:林煜 E-mail:liny980945@163.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173282);福建省科技厅重点项目(2009Y0028);教育部博士点基金项目(200803930001)

低 Rg1 组的表达均较正常组强 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); 钛 + 低 Rg1 组较钛 + 高、中 Rg1 组弱 ( $P=0.000, P=0.000$ ), 钛 + 中 Rg1 组较钛 + 高 Rg1 组弱 ( $P=0.000$ )。5 组成骨细胞肿瘤坏死因子  $\alpha$ mRNA 表达的差异有统计学意义 ( $F=1635.878, P=0.000$ ); 与钛微粒组 ( $1.000 \pm 0.000$ ) 相比, 钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组、钛 + 低 Rg1 组及正常组肿瘤坏死因子  $\alpha$ mRNA 的表达较弱 [ $(0.823 \pm 0.078), (0.764 \pm 0.107), (0.543 \pm 0.042), (0.399 \pm 0.047), P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ]; 钛 + 高、中、低 Rg1 组均较正常组强 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); 钛 + 低 Rg1 组较钛 + 高、中 Rg1 组弱 ( $P=0.000, P=0.000$ ); 钛 + 高 Rg1 与钛 + 中 Rg1 组比较, 差异无统计学意义 ( $P=0.057$ )。5 组成骨细胞中环氧化酶 2 蛋白表达的差异有统计学意义 ( $F=886.930, P=0.000$ ); 与钛微粒组 ( $0.854 \pm 0.067$ ) 相比, 钛 + 高 Rg1 组、钛 + 中 Rg1 组、钛 + 低 Rg1 组及正常组环氧化酶 2 蛋白的表达较弱 [ $(0.774 \pm 0.045), (0.634 \pm 0.054), (0.433 \pm 0.032), (0.304 \pm 0.058), P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ]; 钛 + 高、中、低 Rg1 组均较正常组强 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); 钛 + 高 Rg1 组较钛 + 中 Rg1 组、钛 + 低 Rg1 组强 ( $P=0.010, P=0.000$ ); 钛 + 中 Rg1 组较钛 + 低 Rg1 组强 ( $P=0.002$ )。结论: 成骨细胞与钛微粒共培养后, 钛微粒能促进成骨细胞分泌炎症因子, 人参皂甙 Rg1 干预可减弱钛微粒对成骨细胞的刺激、抑制炎症因子的表达, 这可能是人参皂甙 Rg1 抑制假体周围骨吸收, 防治人工关节假体松动的作用机制。但人参皂甙 Rg1 对成骨细胞产生影响的具体作用机制及药物剂量效应关系还有待进一步研究。

**关键词** 成骨细胞 细胞培养技术 人参皂甙 细胞因子类 环氧化酶 2 钛 人工关节

**Effect of Ginsenoside Rg1 and titanium particles on rat cranioaural osteoblasts** LIN Yu<sup>\*</sup>, ZHANG Yi-yuan, FENG Er-you, WU Yin-sheng, LIN Yan-ping. <sup>\*</sup> The second hospital of Fuzhou affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, China

**ABSTRACT Objective:** To observe the effect of ginsenoside Rg1 and titanium (Ti) particles on rat cranioaural osteoblasts, so as to provide new preventive treatment of joint prosthesis loosening. **Methods:** The cranioaural osteoblasts were collected from the newborn SD rats and were purified. The Ti particles were screened and the leaching liquor of Ti were prepared. After the endotoxin detection, the third-generation osteoblasts were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (normal group), DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.1% (volume ratio) Ti particles suspension (Ti particles group), DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.1% Ti particles suspension and Ginsenoside Rg1 with final concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$  (Ti + high Rg1 group), DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.1% Ti particles suspension and Ginsenoside Rg1 with final concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$  (Ti + middle Rg1 group), DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.1% Ti particles suspension and Ginsenoside Rg1 with final concentration of 25  $\mu\text{g/mL}$  (Ti + low Rg1 group), one hundred thousand osteoblasts in one milliliter of culture solutions. The osteoblasts were cultured for 24 hours continuously and then the shape of them were observed. The concentration of prostaglandin E2 (PGE-2), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1) and interleukin 1 receptor antagonist protein (IL-1ra) in the culture solution were detected through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA in the osteoblasts were detected through real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, and the expression of COX-2 protein in the osteoblasts were detected through Western Blotting. **Results:** There were statistical differences in the optical density (OD) values of PGE-2 among the 5 groups ( $F=244.895, P=0.000$ ). The OD values of PGE-2 were higher in Ti particles group ( $53.362 \pm 0.307$ ), Ti + high Rg1 group ( $41.048 \pm 0.431$ ) and Ti + middle Rg1 group ( $38.998 \pm 0.234$ ) compared to normal group ( $31.687 \pm 0.466$ ), there were statistical differences between them ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of PGE-2 were lower in Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group ( $32.501 \pm 0.124$ ) compared to Titanium particles group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of PGE-2 were lower in Ti + low Rg1 group compared to Ti + high Rg1 group and Ti + middle Rg1 group respectively ( $P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of PGE-2 were higher in Ti + high Rg1 group compared to Ti + middle Rg1 group ( $P=0.000$ ). There were no statistical differences in the OD values of PGE-2 between normal group and Ti + low Rg1 group ( $P=0.168$ ). There were statistical differences in the OD values of TNF- $\alpha$  among the 5 groups ( $F=72.340, P=0.000$ ). The OD values of TNF- $\alpha$  were higher in Ti particles group, Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group compared to normal group ( $50.121 \pm 0.532, 49.675 \pm 0.336, 46.431 \pm 0.245, 42.521 \pm 0.513, 40.055 \pm 0.471, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.001$ ). The OD values of TNF- $\alpha$  were lower in Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group compared to Ti particles group ( $P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of TNF- $\alpha$  were lower in Ti + low Rg1 group compared to Ti + high Rg1 group and Ti + middle Rg1 group respectively ( $P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of TNF- $\alpha$  were higher in Ti + high Rg1 group compared to Ti + middle Rg1 group ( $P=0.000$ ). There were no statistical differences in the OD values of TNF- $\alpha$  between Ti particles group and Ti + high

Rg1 group ( $P=0.230$ ). There were statistical differences in the OD values of IL-6 among the 5 groups ( $F=80.449, P=0.000$ ). The OD values of IL-6 were higher in Ti particles group, Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group compared to normal group ( $(80.537 \pm 0.883), (70.975 \pm 0.945), (68.154 \pm 0.745), (63.335 \pm 0.845), (57.550 \pm 0.610), P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of IL-6 were lower in Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group compared to Ti particles group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of IL-6 were lower in Ti + low Rg1 group compared to Ti + high Rg1 group and Ti + middle Rg1 group respectively ( $P=0.001, P=0.000$ ). The OD values of IL-6 were higher in Ti + high Rg1 group compared to Ti + middle Rg1 group ( $P=0.039$ ). There were statistical difference in the OD values of IL-1 among the 5 groups ( $F=38.483, P=0.000$ ). The OD values of IL-1 were higher in Ti particles group, Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group compared to normal group ( $(83.106 \pm 4.413), (59.506 \pm 1.294), (56.881 \pm 3.561), (45.081 \pm 3.459), (37.579 \pm 3.526), P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of IL-1 were lower in Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group compared to Ti particles group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of IL-1 were lower in Ti + low Rg1 group compared to Ti + high Rg1 group and Ti + middle Rg1 group respectively ( $P=0.000, P=0.000$ ). There were no statistical differences in the OD values of IL-1 between Ti + middle Rg1 group and Ti + high Rg1 group ( $P=0.187$ ). There were statistical differences in the OD values of IL-1ra among the 5 groups ( $F=492.724, P=0.000$ ). The OD values of IL-1ra were lower in Ti particles group, Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group compared to normal group ( $(64.111 \pm 1.364), (116.351 \pm 5.432), (229.768 \pm 3.545), (207.203 \pm 2.436), (268.019 \pm 3.871), P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of IL-1ra were higher in Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group compared to Ti particles group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of IL-1ra were higher in Ti + middle Rg1 group compared to Ti + high Rg1 group and Ti + low Rg1 group respectively ( $P=0.000, P=0.000$ ). The OD values of IL-1ra were lower in Ti + high Rg1 group compared to Ti + low Rg1 group ( $P=0.000$ ). The amplification curve of  $\beta$ -actin, COX-2 and TNF- $\alpha$  in fluorescent quantitation RT-PCR were shown as specific amplification and the genetic-solubility curve were shown as single peak. There were statistical differences in the expression of COX-2 mRNA among the 5 groups ( $F=886.930, P=0.000$ ). Compared to Ti particles group, the expression of COX-2 mRNA were weaker in Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group, Ti + low Rg1 group and normal group ( $(0.734 \pm 0.065), (0.621 \pm 0.032), (0.517 \pm 0.042), (0.386 \pm 0.015), P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The expression of COX-2 mRNA were stronger in Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group, Ti + low Rg1 group compared to normal group respectively ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The expression of COX-2 mRNA were weaker in Ti + low Rg1 group compared to Ti + high Rg1 group and Ti + middle Rg1 group respectively ( $P=0.000, P=0.000$ ). The expression of COX-2 mRNA were weaker in Ti + middle Rg1 group compared to Ti + high Rg1 group ( $P=0.000$ ). There were statistical differences in the expression of TNF- $\alpha$  mRNA among the 5 groups ( $F=1\,635.878, P=0.000$ ). Compared to Ti particles group ( $1.000 \pm 0.000$ ), the expression of TNF- $\alpha$  mRNA were weaker in Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group, Ti + low Rg1 group and normal group ( $(0.823 \pm 0.078), (0.764 \pm 0.107), (0.543 \pm 0.042), (0.399 \pm 0.047), P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The expression of TNF- $\alpha$  mRNA were stronger in Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group, Ti + low Rg1 group compared to normal group respectively ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The expression of TNF- $\alpha$  mRNA were weaker in Ti + low Rg1 group compared to Ti + high Rg1 group and Ti + middle Rg1 group respectively ( $P=0.000, P=0.000$ ). There were no statistical differences in the expression of TNF- $\alpha$  mRNA between Ti + high Rg1 group and Ti + middle Rg1 group ( $P=0.057$ ). There were statistical differences in the expression of COX-2 protein among the 5 groups ( $F=886.930, P=0.000$ ). Compared to Ti particles group ( $0.854 \pm 0.067$ ), the expression of COX-2 protein were weaker in Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group, Ti + low Rg1 group and normal group ( $(0.774 \pm 0.045), (0.634 \pm 0.054), (0.433 \pm 0.032), (0.304 \pm 0.058), P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). Compared to Ti + high Rg1 group, Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group respectively, the expression of COX-2 protein was weaker in normal group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). The expression of COX-2 protein were stronger in Ti + high Rg1 group compared to Ti + middle Rg1 group and Ti + low Rg1 group respectively ( $P=0.010, P=0.000$ ). Ti + middle Rg1 group surpassed Ti + low Rg1 group ( $P=0.002$ ). **Conclusion:** After co-cultured with Ti particles, the osteoblasts can secrete more inflammatory factors promoted by Ti particles. Ginsenoside Rg1 can weaken the impact of Ti particles on osteoblasts and suppress the expression of inflammation factors, which may be considered as the mechanism of action for ginsenoside Rg1 to suppress bone resorption around the prosthesis and to prevent joint prosthesis loosening. However, further studies are needed to define the concrete mechanisms of influence of ginsenoside Rg1 on the osteoblasts and to demonstrate the concrete dose-effect relationship.

**Key words** Osteoblasts; Cell culture techniques; Ginsenoside; Cytokines; Cyclooxygenase 2; Titanium; Joint prosthesis

人工关节置换能有效地重建病变关节的功能,但随着在体内使用时间的延长,关节假体可因磨损、碰撞或腐蚀产生大量金属微粒<sup>[1-2]</sup>,金属微粒可刺激成骨细胞通过自分泌或旁分泌作用产生炎症因子白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE-2)、环氧酶 2(cyclooxygenase 2, COX-2)等,这些炎症因子使成骨细胞自身功能受限、骨基质合成减少、增殖分化能力减弱,进而可引起假体周围骨质疏松,造成假体松动<sup>[3-5]</sup>。人参皂甙的主要有效成分 Rg1(分子式  $C_{42}H_{72}O_{14}$ )能抑制 COX-2 的表达,减少 IL-1、IL-6 的分泌,抑制炎症反应<sup>[6-8]</sup>。本实验旨在探讨人参皂甙 Rg1 与钛(titanium, Ti)微粒对大鼠颅骨成骨细胞的影响,为关节假体松动的防治提供新思路。

## 1 材料与仪器

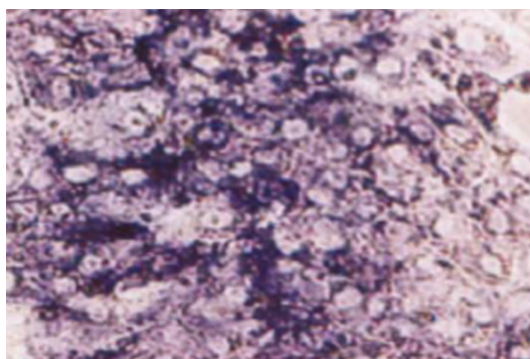
**1.1 实验材料** 人参皂甙 Rg1 单体(纯度 >98%,芜湖武尔塔医药科技有限公司,批号 2008-033);Ti 微粒(北京有色金属公司);鲎试剂(天津一瑞生物工程有限公司);内毒素检测用水、内毒素标准品(中国药物生物制品检定所);PGE-2、TNF- $\alpha$ 、IL-6、白细胞介素 1 受体拮抗剂(interleukin 1 receptor antagonist protein, IL-1ra)、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunoadsorbent assay, ELISA)试剂盒(上海西唐公司);TRIzol<sup>®</sup>试剂、WesternBreeze 免疫检测试剂盒、SYBRa-Premix qPCR SuperMix-UDG(美国 Invitrogen 公司);内参  $\beta$ -actin 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物(博尚生物技术有限公司);反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司);COX-2 抗体(美国 Abcam 公司); $\beta$ -actin 抗体(美国 Cell Signaling 公司);聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)(美国 Amersham 公司)。

**1.2 实验仪器** 9600DNA 扩增仪(美国 PerkinElmer 公司),7500 型实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

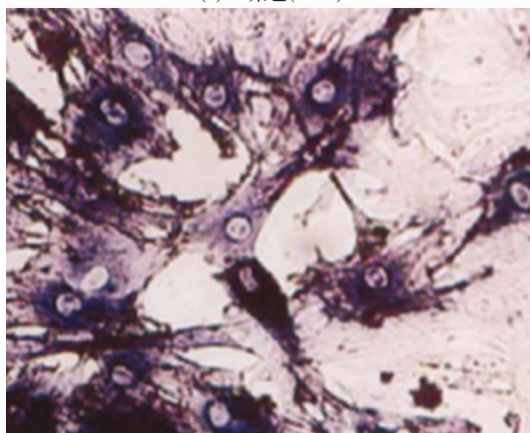
## 2 方法

**2.1 成骨细胞的收集、纯化及鉴定** 新生 SD 大鼠 1 只,由福建医科大学动物房提供,合格证号:SCXK(闽)2004-0002。处死后取出颅骨,刮除骨膜及软组织,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)漂洗 2~3 次。将洗净的颅骨剪成 1 mm × 1 mm × 0.05 mm 大小的碎片,用含 0.1% I 型胶原酶和

0.25% 胰蛋白酶的混合消化液预消化 20 min,弃去消化液,再加入 0.1% I 型胶原酶溶液,37 ℃ 下消化骨片 30 min,每隔 10 min 摇晃 1 min,收集消化液,重复操作 3 次。将收集的消化液以 1 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后(离心半径 25 cm),用完全培养基配制成细胞悬液,移进培养瓶中,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养,次日换液,以后每 2 天换全液 1 次,直至细胞长成融合状态后进行传代。重氮盐法碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)染色见胞浆内含紫蓝色颗粒,鉴定为成骨细胞(图 1)。



(1)AP染色(×100)



(2)AP染色(×200)

图 1 大鼠颅骨成骨细胞 AP 染色结果

**2.2 Ti 微粒混悬液制备** 采用梯度离心法筛选出直径约 1  $\mu$ m 的 Ti 微粒(图 2)。用无水乙醇浸泡 24 h 后,0.25% 硝酸溶液 70 ℃ 浸泡 3 h,再用消毒后的

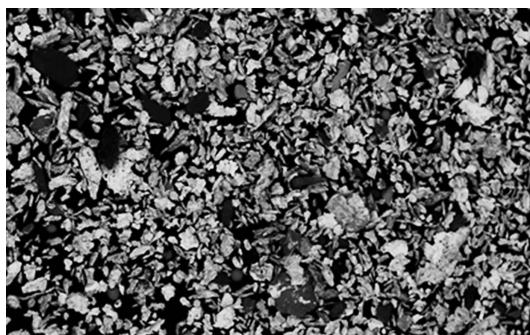


图 2 扫描电镜下的 Ti 微粒(×40)

PBS 反复清洗,然后用 PBS 配制成体积比为 0.1% 的 Ti 混悬液( $4.5 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ),高温消毒后备用。取 5 mL Ti 混悬液,置于 37 °C 水浴箱中温育 24 h 后,1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min(离心半径 25 cm),取上清液(浸提液)作为内毒素检测样品。

## 2.3 内毒素检测

**2.3.1 鲎试剂灵敏度复核试验** 将内毒素工作标准品用内毒素检查用水溶解,在旋涡混合器上混合 15 min 后,制备成浓度分别为 0.12 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.06 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.03 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.015 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的稀释液,每稀释一步置旋涡混合器上混合 30 s。每一浓度水平设平行管 4 支,每管加入内毒素工作标准品稀释液 0.1 mL、待复核高灵敏度鲎试剂 0.1 mL。设阴性对照管 4 支,加入鲎试剂 0.1 mL、内毒素检查用水 0.1 mL。封口膜封口后,轻轻摇匀,连同试管架垂直放入(37 ± 1) °C 水浴恒温器中孵育 60 min。反应终点浓度的几何平均值,即为鲎试剂灵敏度的测定值  $\lambda c = \lg - 1(\sum X_s/4)$ 。

**2.3.2 干扰试验** 依据美国药典(United States pharmacopoeia, USP)标准, Ti 微粒内毒素限值取 0.06 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。用内毒素检查用水稀释内毒素标准工作品,制备成最终浓度分别为 0.12 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.06 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.03 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.015 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的内毒素标准对照液,每一浓度水平设 3 支平行管。随机取 3 份 Ti 浸提液,每份 0.1 mL,用内毒素检查用水进行稀释,每份均稀释为 0.12 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.06 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.03 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.015 EU  $\cdot \text{mL}^{-1}$  4 个浓度水平,每一浓度水平设平行管 3 支。将标准对照液反应管与样品稀释液反应管均放入(37 ± 1) °C 水浴恒温器中水浴 60 min,取出后,测定反应终点浓度的几何平均值( $E_t$ )。

**2.3.3 内毒素检测** 根据干扰试验结果,确定样品对鲎试验是否存在干扰,如无干扰,则采用凝胶法进行内毒素检测。取鲎试剂 5 支,其中 3 支作 Ti 浸提液检测管,1 支作阴性对照管,1 支作阳性对照管。阴性对照管加入检查用水 0.2 mL,阳性对照管加入检查用水 0.1 mL、浓度为 2 $\lambda$  的内毒素溶液 0.1 mL, Ti 浸提液检测管加入检查用水 0.1 mL、Ti 浸提液 0.1 mL。封闭管口,摇匀,放入 37 °C 恒温器中孵育 60 min,取出后将反应管缓缓倒转 180°,管内凝胶不变形,不从管壁滑脱者为阳性,记录为(+);凝胶不能保持完整,

并从管壁滑脱者为阴性,记录为(-)。

**2.4 人参皂甙干预** 将培养的第 3 代鼠颅骨成骨细胞以  $1 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的密度分别传代接种于 5 组培养液中,正常组(含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基)、Ti 微粒组(体积比为 0.1% 的 Ti 微粒混悬液 + 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基)、Ti + 高 Rg1 组(体积比为 0.1% 的 Ti 微粒混悬液 + 终浓度为 100  $\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$  的人参皂甙 Rg1 + 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基)、Ti + 中 Rg1 组(体积比为 0.1% 的 Ti 微粒混悬液 + 终浓度为 50  $\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$  的人参皂甙 Rg1 + 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基)、Ti + 低 Rg1 组(体积比为 0.1% 的 Ti 微粒混悬液 + 终浓度为 25  $\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$  的人参皂甙 Rg1 + 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基),连续培养 24 h。

## 2.5 炎症因子检测

**2.5.1 ELISA 法检测细胞培养液中 PGE-2、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1、IL-1ra 的浓度** 人参皂甙干预 24 h 后,在 96 孔板上每组设 2 个重复孔,每孔加入细胞培养液、ELISA 试剂盒内的标准品各 100  $\mu\text{L}$ , 37 °C 温育 30 min 后,先后加入酶标耦合液、底物、终止液各 50  $\mu\text{L}$ ,于 450 nm 波长读取光密度(optical density, OD)值。

**2.5.2 实时荧光定量 SYBR GREEN 法检测成骨细胞中 COX-2 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 的表达** COX-2 引物:上游 5' TCGGTGGAGAGGTGTATCCT3', 下游 5' TGCTGGTTTGAACAGTCG3', 产物长度 227 bp。TNF- $\alpha$  引物:上游 5' CTCAGCCTCTTCTCATTCCT3', 下游 5' CTGCTTGCTGGTTTGCTAC3', 产物长度 207 bp。内参  $\beta$ -actin 引物:上游 5' AGGCTGTGTTGTC-CCTGTA3', 下游 5' ATGTCACGCACGATTTC3', 产物长度 193 bp。采用 Trizol 法分别提取 5 组成骨细胞的总 RNA,加入溴酚蓝进行琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶图像分析系统对条带进行分析。检验 RNA 无降解后,测定 RNA 的吸光度值,计算出 RNA 的浓度,根据浓度计算出体积后取 RNA 500 ng,按试剂盒步骤进行反转录。反转录后在 ABI7500 上按照试剂说明进行 mRNA 扩增,得到扩增曲线与 CT 值。将得到的各组 TNF- $\alpha$ 、COX-2 及  $\beta$ -actin 基因的 CT 值分别代入 3 者各自的标准曲线,换算出 TNF- $\alpha$ 、COX-2 及  $\beta$ -actin 的起始模板量。以  $\beta$ -actin 作为参比基因对所有样品进行 RNA 校正,用 TNF- $\alpha$ 、COX-2 基因的定量结果除以  $\beta$ -actin 定量结果得到校正值,以 Ti 微粒组的校



正值作为“1”,计算出其他各组的相对量,进行组间相对量的比较。

**2.5.3 Western Blotting 法检测成骨细胞中 COX-2 蛋白的表达** 提取成骨细胞的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,以每泳道 30  $\mu\text{g}$  蛋白上样,进行 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后将凝胶上的蛋白转印至 PVDF 膜,用封闭液室温封闭 30 min。将与 COX-2 蛋白融合表达的标签抗体按 1:5 000 比例稀释,封闭膜 1 h。漂洗膜 6 次,1 min 2 次、20 min 2 次、5 min 2 次,每次用洗液 40 mL。用 AP 标记的二抗室温封闭膜 30 min,洗膜 6 次(方法如前)。将 AP 化学发光底物与膜一起在室温下孵育 5 min,暗室中 X 线片曝光、显影。应用 Phoretix 1D 生物电泳图像分析系统分析胶片中的目的条带,计算机自动读取并记录每条条带的 OD 值。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS13.0 统计软件处理数据。5 组细胞培养液中 PGE-2、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1、IL-1raOD 值的比较采用单因素方差分析;5 组成骨细胞间 COX-2 mRNA、TNF- $\alpha$ mRNA 及 COX-2 蛋白表

达 OD 值的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用  $q$  检验;检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

### 3 结果

**3.1 内毒素检测结果** 实测鲎试剂的灵敏度为 0.06 EU  $\cdot$  mL $^{-1}$ ,在标示值的 0.5 $\lambda$  ~ 2.0 $\lambda$  之间(包括 0.5 $\lambda$  和 2 $\lambda$ )可用于内毒素检测。干扰试验结果为  $E_s = 0.06$ ,位于 0.5 $\lambda$  ~ 2.0 $\lambda$ , $E_t = 0.71 \sim 0.85$ ,位于 0.5 $E_s \sim 2E_s$ ,故认为 Ti 微粒浸提液对鲎试剂与内毒素反应不产生干扰作用。内毒素检查结果显示,Ti 微粒浸提液中内毒素含量  $< 0.06$  EU  $\cdot$  mL $^{-1}$ ,样品内毒素含量符合 USP 标准。

**3.2 成骨细胞形态学观察结果** 倒置相差显微镜下见各组贴壁细胞逐渐展开,呈梭形、三角形或不规则多边形,传 3 代后细胞增殖迅速,细胞胞体膨大,具有数量不等的细长突起,核大,多为圆形或椭圆形,居中或偏于细胞一侧,Ti 微粒周围可见成骨细胞贴附(图 3)。在显微镜下随机选 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,成骨细胞平均纯度为 90.2%,符合培养要求。

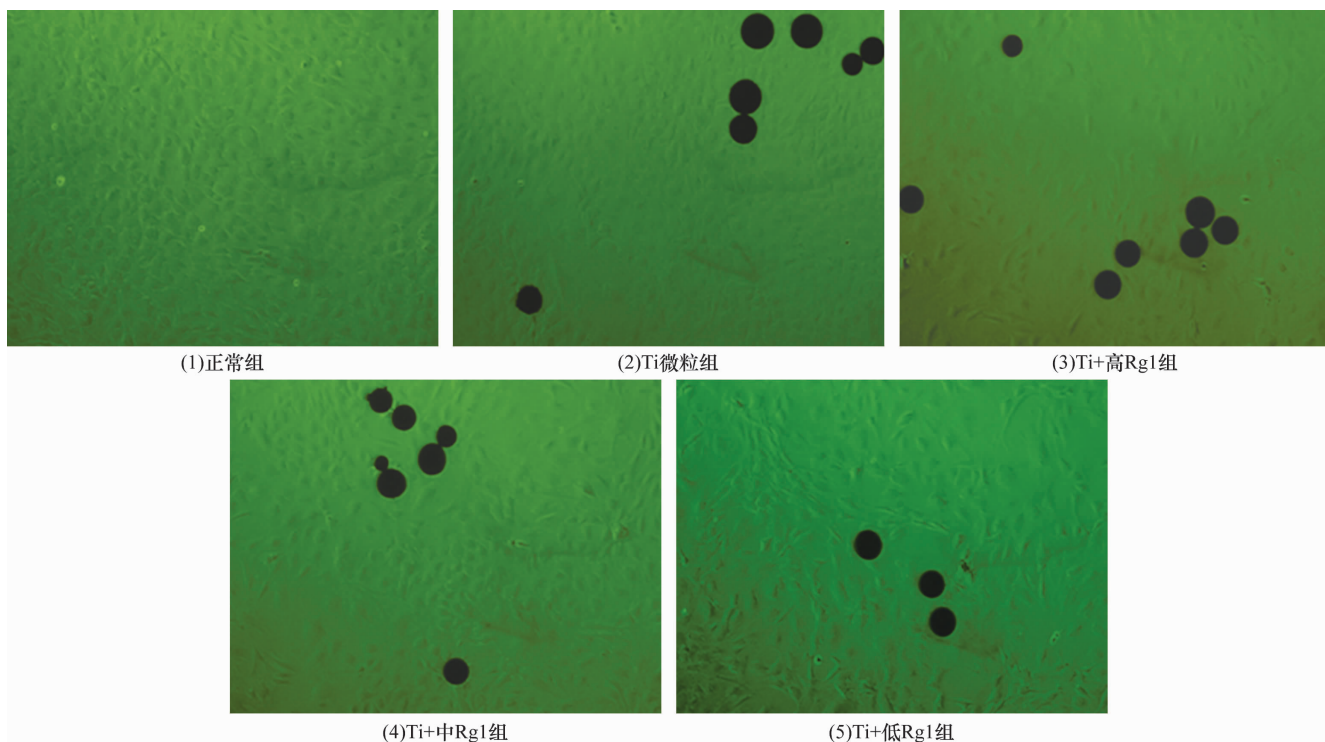


图 3 倒置相差显微镜下各组成骨细胞形态( $\times 100$ )

**3.3 5 组鼠颅骨细胞培养液中 PGE-2、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1、IL-1ra 检测结果** 各组成骨细胞培养液中 PGE-2OD 值的差异有统计学意义( $F = 244.895$ , $P = 0.000$ );Ti 微粒组、Ti + 高 Rgl 组、Ti + 中 Rgl 组均高

于正常组( $P = 0.000$ , $P = 0.000$ , $P = 0.000$ );Ti + 高 Rgl 组、Ti + 中 Rgl 组、Ti + 低 Rgl 组均低于 Ti 微粒组( $P = 0.000$ , $P = 0.000$ , $P = 0.000$ );Ti + 低 Rgl 组低于 Ti + 高 Rgl 组、Ti + 中 Rgl 组( $P = 0.000$ , $P =$

0.000);Ti + 高 Rg1 组高于 Ti + 中 Rg1 组 ( $P = 0.000$ );正常组与 Ti + 低 Rg1 组比较,差异无统计学意义 ( $P = 0.168$ )。各组成骨细胞培养液中 TNF- $\alpha$ OD 值的差异有统计学意义 ( $F = 72.340, P = 0.000$ );Ti 微粒组、Ti + 高 Rg1 组、Ti + 中 Rg1 组、Ti + 低 Rg1 组均高于正常组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.001$ );Ti + 中 Rg1 组、Ti + 低 Rg1 组低于 Ti 微粒组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 低 Rg1 组低于 Ti + 高 Rg1 组、Ti + 中 Rg1 组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 高 Rg1 组高于 Ti + 中 Rg1 组 ( $P = 0.000$ );Ti 微粒组与 Ti + 高 Rg1 组比较,差异无统计学意义 ( $P = 0.230$ )。各组成骨细胞培养液中 IL-6OD 值的差异有统计学意义 ( $F = 80.449, P = 0.000$ );Ti 微粒组、Ti + 高 Rg1 组、Ti + 中 Rg1 组、Ti + 低 Rg1 组均高于正常组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 高、中、低 Rg1 组均低于 Ti 微粒组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 低 Rg1 组低于 Ti + 高、中 Rg1

组 ( $P = 0.001, P = 0.000$ );Ti + 高 Rg1 组高于 Ti + 中 Rg1 组 ( $P = 0.039$ )。各组成骨细胞培养液中 IL-1OD 值的差异有统计学意义 ( $F = 38.483, P = 0.000$ );Ti 微粒组、Ti + 高 Rg1 组、Ti + 中 Rg1 组、Ti + 低 Rg1 组均高于正常组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 高、中、低 Rg1 组均低于 Ti 微粒组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ),Ti + 低 Rg1 组低于 Ti + 高、中 Rg1 组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ),Ti + 中 Rg1 组与 Ti + 高 Rg1 组相比,差异无统计学意义 ( $P = 0.187$ )。各组成骨细胞培养液中 IL-1raOD 值的差异有统计学意义 ( $F = 492.724, P = 0.000$ );Ti 微粒组、Ti + 高 Rg1 组、Ti + 中 Rg1 组、Ti + 低 Rg1 组均低于正常组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 高、中、低 Rg1 组均高于 Ti 微粒组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ),Ti + 中 Rg1 组高于 Ti + 高、低 Rg1 组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ),Ti + 高 Rg1 组低于 Ti + 低 Rg1 组 ( $P = 0.000$ )。(表 1)

表 1 5 组鼠颅骨成骨细胞培养液中 PGE-2、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1、IL-1ra 的 OD 值

组别	PGE-2	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1	IL-1ra
正常组	31.687 $\pm$ 0.466	40.055 $\pm$ 0.471	57.550 $\pm$ 0.610	37.579 $\pm$ 3.526	268.019 $\pm$ 3.871
Ti 微粒组	53.362 $\pm$ 0.307	50.121 $\pm$ 0.532	80.537 $\pm$ 0.883	83.106 $\pm$ 4.413	64.111 $\pm$ 1.364
Ti + 高 Rg1 组	41.048 $\pm$ 0.431	49.675 $\pm$ 0.336	70.975 $\pm$ 0.945	59.506 $\pm$ 1.294	116.351 $\pm$ 5.432
Ti + 中 Rg1 组	38.998 $\pm$ 0.234	46.431 $\pm$ 0.245	68.154 $\pm$ 0.745	56.881 $\pm$ 3.561	229.768 $\pm$ 3.545
Ti + 低 Rg1 组	32.501 $\pm$ 0.124	42.521 $\pm$ 0.513	63.335 $\pm$ 0.845	45.081 $\pm$ 3.459	207.203 $\pm$ 2.436

**3.4 5 组鼠颅骨成骨细胞中 COX-2mRNA、TNF- $\alpha$ mRNA 检测结果** 5 组成骨细胞  $\beta$ -actin、COX-2、TNF- $\alpha$  荧光定量 RT-PCR 部分扩增曲线和各基因的溶解曲线表现为单一的溶解峰,均为特异性扩增。5 组成骨细胞 COX-2mRNA 表达的差异有统计学意义 ( $F = 886.930, P = 0.000$ );与 Ti 微粒组相比,Ti + 高 Rg1 组、Ti + 中 Rg1 组、Ti + 低 Rg1 组及正常组 COX-2mRNA 的表达较弱 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 高、中、低 Rg1 组均较正常组强 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 低 Rg1 组较 Ti + 高、中 Rg1 组弱 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ),Ti + 中 Rg1 组较 Ti + 高 Rg1 组弱 ( $P = 0.000$ )。5 组成骨细胞中 TNF- $\alpha$ mRNA 表达的差异有统计学意义 ( $F = 1635.878, P = 0.000$ );与 Ti 微粒组相比,Ti + 高 Rg1 组、Ti + 中 Rg1 组、Ti + 低 Rg1 组及正常组 TNF- $\alpha$ mRNA 的表达较弱 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 高、中、低 Rg1 组均较正常组强 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 低 Rg1 组

较 Ti + 高、中 Rg1 组弱 ( $P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 高 Rg1 与 Ti + 中 Rg1 组比较,差异无统计学意义 ( $P = 0.057$ )。(表 2)

表 2 5 组鼠颅骨成骨细胞中 COX-2mRNA、TNF- $\alpha$ mRNA 的表达

组别	COX-2mRNA	TNF- $\alpha$ mRNA
正常组	0.386 $\pm$ 0.015	0.399 $\pm$ 0.047
Ti 微粒组	1.000 $\pm$ 0.000	1.000 $\pm$ 0.000
Ti + 高 Rg1 组	0.734 $\pm$ 0.065	0.823 $\pm$ 0.078
Ti + 中 Rg1 组	0.621 $\pm$ 0.032	0.764 $\pm$ 0.107
Ti + 低 Rg1 组	0.517 $\pm$ 0.042	0.543 $\pm$ 0.042

**3.5 5 组鼠颅骨成骨细胞中 COX-2 蛋白检测结果** 5 组成骨细胞 COX-2 蛋白表达的差异有统计学意义 ( $F = 886.930, P = 0.000$ );与 Ti 微粒组 (0.854  $\pm$  0.067) 相比,Ti + 高 Rg1 组、Ti + 中 Rg1 组、Ti + 低 Rg1 组及正常组 COX-2 蛋白的表达较弱 [(0.774  $\pm$  0.045), (0.634  $\pm$  0.054), (0.433  $\pm$  0.032), (0.304  $\pm$  0.058),  $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ];Ti + 高、中、低 Rg1 组均较正常组强 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ );Ti + 高 Rg1 组较 Ti + 中

Rg1 组、Ti + 低 Rg1 组强 ( $P=0.010, P=0.000$ ); Ti + 中 Rg1 组较 Ti + 低 Rg1 组强 ( $P=0.002$ )。(图 4)

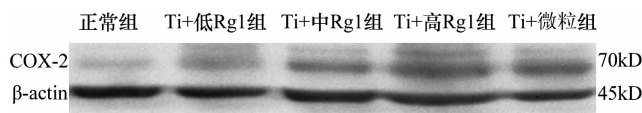


图 4 5 组鼠颅骨成骨细胞中 COX-2 蛋白的表达

## 4 讨论

PGE-2 是一种重要的炎症介质,是 COX-2 诱导下花生四烯酸的代谢产物,成骨细胞在 COX-2 作用下释放 PGE-2,可刺激破骨细胞的成熟和分化,导致溶骨。金属微粒可能先刺激成骨细胞生成 COX-2,进而诱导或促进 PGE-2、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 等细胞因子的产生和释放<sup>[9-10]</sup>。而 IL-1 会促进成骨细胞内 cAMP 合成增加,GTP 酶活性增强,进而诱导成骨细胞产生 PGE2、IL-6、TNF- $\alpha$  等细胞因子<sup>[4,11]</sup>。本实验结果显示,在含有 Ti 微粒的成骨细胞培养液中 COX-2、PGE-2、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 的表达明显增强,证实 Ti 微粒能刺激成骨细胞分泌 PGE-2、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等炎症细胞因子。

IL-1ra 能与 IL-1 受体特异结合,可抑制 IL-1 诱导成骨细胞分泌 PGE2 和组织降解酶类<sup>[12-13]</sup>。本实验结果显示,5 组成骨细胞培养液中 IL-1 的表达以 Ti 微粒组最强,进行人参皂甙 Rg1 干预的 3 组 IL-1OD 值处于正常组和 Ti 微粒组之间,而 IL-1ra 的表达情况则与之相反,提示经人参皂甙 Rg1 干预后,成骨细胞培养液中 IL-1ra 的表达增强,可抑制 IL-1 的生物活性,减少 TNF、PGE-2 等炎症因子的表达。

人参皂甙具有抗炎、抗氧化等作用,其中 Rg1 可抑制 COX-2、PGE-2、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 的表达<sup>[6-8,14-15]</sup>。本实验结果显示,经过 24 h 的培养,含有人参皂甙 Rg1 的成骨细胞培养液中 PGE-2、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 的表达均明显弱于 Ti 微粒组,经人参皂甙 Rg1 干预培养的成骨细胞中 COX-2mRNA、TNF- $\alpha$ mRNA 的表达及 COX-2 蛋白的表达亦弱于 Ti 微粒组,提示人参皂甙 Rg1 可减弱 Ti 微粒对成骨细胞的刺激,抑制炎症因子的表达。浓度为  $50 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$  的人参皂甙 Rg1 可使细胞的形态和恶性特征发生逆转,诱使非正常细胞细胞向正常细胞转化<sup>[16-18]</sup>。本实验选取  $25 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$  3 个浓度的人参皂甙 Rg1 对与 Ti 微粒共培养的鼠颅骨成骨细胞进行干预,结果发现低剂量 Rg1 对炎症因子表达的

抑制作用较高剂量 Rg1 强。

本研究结果表明,成骨细胞与 Ti 微粒共培养后,Ti 微粒能促进成骨细胞分泌炎症因子,人参皂甙 Rg1 干预可减弱 Ti 微粒对成骨细胞的刺激、抑制炎症因子的表达,这可能是人参皂甙 Rg1 抑制假体周围骨吸收,防治人工关节假体松动的作用机制。但人参皂甙 Rg1 对成骨细胞产生影响的具体作用机制及药物剂量效应关系还有待进一步研究。

## 5 参考文献

- [1] Minoda Y, Kobayashi A, Sakawa A, et al. Wear particle analysis of highly crosslinked polyethylene isolated from a failed total hip arthroplasty[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 86(2):501-505.
- [2] Min BW, Song KS, Bae KC, et al. Second-generation cementless total hip arthroplasty in patients with osteonecrosis of the femoral head[J]. J Arthroplasty, 2008, 23(6):902-910.
- [3] Landgraeber S, von Knoch M, L  er F, et al. Extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in aseptic loosening after total hip replacement[J]. Biomaterials, 2008, 29(24-25):3444-3450.
- [4] Schmiedberg SK, Jones LC, Chang DH, et al. Extraction and characterization of metallic wear debris from total joint arthroplasty[J]. Biomed Sci Instrum, 2007, 43:104-109.
- [5] Pioletti DP, Takei H, Kwon SY, et al. The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 46(3):399-407.
- [6] Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins[J]. Curr Med Chem, 2007, 14(2):243-248.
- [7] 胡霞敏, 严常开, 胡先敏. 人参皂甙 Rg1 对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 20(1):192-196.
- [8] Li YN, Wu YL, Jia ZH, et al. Interaction between COX-2 and iNOS aggravates vascular lesion and antagonistic effect of ginsenoside[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 119(2):305-311.
- [9] Dickens DS, Kozielski R, Khan J, et al. Cyclooxygenase-2 expression in pediatric sarcomas[J]. Pediatr Dev Pathol, 2002, 5(4):356-364.
- [10] 韩建国, 王丽, 韩斐斐, 等. 老年牙周病患者牙槽骨吸收与 IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE-2 水平相关性研究[J]. 徐州医学院学报, 2011, 31(6):392-394.