

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.05.009

P60PLAD 蛋白对超高分子量聚乙烯(UHMWPE)颗粒诱导的小鼠颅盖骨骨溶解模型以及小鼠卵巢切除骨质疏松模型的影响*

闫 昭 朱锦宇 吴海宁 孙孟帅 朱庆生[△] 曹晓瑞[△]

(第四军医大学西京医院全军骨科研究所 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 构建 UHMWPE 颗粒诱导的小鼠颅盖骨骨溶解模型以及小鼠卵巢切除骨质疏松模型, 通过动物模型证实 P60PLAD 蛋白在体内具有破骨细胞抑制特性和骨保护作用。**方法:** 用 8 周 C57BL/6 雄性小鼠实验。在小鼠颅盖骨沿正中中线做一矢状切口, 暴露 0.5 cm×0.5 cm 范围, 保证骨膜完整性, 将直径在 0.1-10 μm 的超高分子量聚乙烯 (Ultra High Molecular Weight Polyethylene) 颗粒 20 μg 均匀撒在骨膜, 构建小鼠颅盖骨骨溶解模型, 在局部注射 PBS 或者 P60PLAD 蛋白溶液。2 周后处死, 将颅骨分离进行 Micro-CT 检查比较骨溶解区域变化。手术切除 10 周雌性小鼠卵巢构建小鼠去卵巢骨质疏松模型, 腹腔注射 PBS 或 P60PLAD 蛋白溶液。12 周后处死后分离股骨, 经 4% 多聚甲醛固定后行 Micro-CT 检查比较骨密度等参数。**结果:** 超高分子量聚乙烯 (Ultra High Molecular Weight Polyethylene) 颗粒诱导的骨溶解模型中, 加入 P60PLAD 蛋白后, 颅骨局部骨溶解区域较对照组减少, 骨量相关参数与对照组相比有统计学意义。在小鼠卵巢切除骨质疏松模型中, 注射了 P60PLAD 蛋白的实验组, 其骨密度 (BMD) 等与骨量相关参数较对照组有明显增加。**结论:** P60PLAD 蛋白可有效抑制 UHMWPE 颗粒诱导的小鼠颅盖骨骨吸收模型局部的骨吸收, 抑制局部破骨细胞的骨吸收作用, 并可以部分逆转小鼠卵巢切除骨质疏松模型的骨质疏松, 提高骨密度, 在破骨细胞抑制活性和骨保护方面具有良好临床应用前景。

关键词: P60PLAD 蛋白; 破骨细胞; 骨吸收; 骨溶解

中图分类号: R-33; R68 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)05-839-05

Effects of P60PLAD on Ultra High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE)-induced Osteolysis and OVX-induced Osteoporosis in Mice*

YAN Zhao, ZHU Jin-yu, WU Hai-ning, SUN Meng-shuai, ZHU Qing-sheng[△], CAO Xiao-rui[△]

(PLA Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To establish UHMWPE particle-induced calvarial osteolysis murine model and ovariectomized mouse model, and observe the effects of P60PLAD on osteoclastogenesis, differentiation of osteoclast and bone resorption, as well as the bone protection property. **Methods:** 8-week C57BL/6 male mice were utilized to establish the model. A 0.5 cm×0.5 cm area of calvarial bone was exposed by making a midline sagittal incision over the calvaria, leaving the periosteum intact. Distribute 20 μg UHMWPE particles the diameter of which ranged from 0.1 to 10 μm over the the intact periosteum to establish the UHMWPE particle-induced calvarial osteolysis murine model. Mice were provided PBS or p60PLAD solution after surgery locally. After 2 weeks, all mice were sacrificed and skulls were separated to undergo Micro-CT to observe the changes in osteolysis area. Ovariectomy was performed on 10-week-old female C57BL/6 mice to establish the ovariectomized mouse model. All mice were intraperitoneally injected with PBS or P60PLAD solution for 12 weeks. After 12 weeks, all mice were sacrificed and femora were separated and fixed in 4% paraformaldehyde for Micro-CT. **Results:** There was significant difference in the bone resorption pits between P60PLAD protein group and the control group. When P60PLAD solution was used, area of bone resorption greatly decreased in comparison with the control group. Bone mass quantified analysis confirmed the bone protection effect in P60PLAD group. For the OVX mouse model, BMD and other parameters indicating bone quantity and quality increased greatly in P60PLAD group compared with the control group. **Conclusion:** P60PLAD protein could efficiently suppress the UHMWPE-induced osteolysis as well as the osteoclastic bone resorption in murine model. P60PLAD treatment significantly alleviated osteoporosis in OVX mouse model. On the basis of our previous research work, P60PLAD had a good prospect of clinical application in the respects of suppressing osteoclastic bone resorption and bone protection in the near future.

Key words: P60PLAD protein; Osteoclast; Bone resorption; Osteolysis

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)05-839-05

* 基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2014JQ4142)

作者简介: 闫昭(1989-), 硕士研究生, 主要研究方向: 人工关节置换, 电话: 18235616130, E-mail: yanzhaoii@163.com

[△] 通讯作者: 朱庆生, 博士, 主任医师, 教授, 主要研究方向: 人工关节置换, E-mail: zhuqsh@fmmu.edu.cn

曹晓瑞, 博士, 主治医师, 讲师, 主要研究方向: 人工关节置换, E-mail: caoxr528@sohu.com

(收稿日期: 2016-09-23 接受日期: 2016-10-20)

前言

全关节置换术可以帮助类风湿关节炎、骨关节炎等晚期骨关节病患者改善生活质量,提高运动能力,减轻局部症状,是主要的治疗手段之一。但是,与之相伴的人工关节假体周围骨溶解是全关节置换术失败的最重要的原因之一^[1]。近年来使用较多的 UHMWPE 假体颗粒是造成骨溶解的重要原因之一,其机制与磨损颗粒引起局部无菌性炎症密切相关。人体对于直径范围在 0.21-7.1 μm 的颗粒反应最为敏感,在生物活性磨损颗粒刺激下,巨噬细胞被激活,TNF- α 、IL-6 等炎症因子分泌增多^[2]。有证据表明^[3],在 M-CSF 的影响下,TNF- α 可以直接诱导单核巨噬细胞分化为破骨细胞,介导骨吸收作用。TNF- α 等炎症因子的产生可以刺激 NF- κB 受体激活蛋白配体 (RANKL) 的产生,通过 RANK 通路促进破骨细胞的合成、分化。此外,TNF- α 还可以抑制成骨细胞,通过减少骨生成,增加骨吸收最终造成骨溶解^[4]。可以说 TNF- α 在 UHMWPE 颗粒诱导的骨溶解的发生过程中,起到了重要的作用。骨质疏松是以骨代谢异常,骨强度下降伴随骨折风险增加为特点的一类骨代谢相关疾病,多见于绝经后妇女。由于雌激素缺乏,骨吸收与骨形成失衡,造成骨量下降,骨脆性增加,骨折风险加大^[5]。有研究表明,停经 15-20 年的女性骨量丢失达到全身的 30%,导致患者生活质量下降。骨质疏松骨代谢失衡的主要原因是多种促炎因子所介导的破骨细胞形成增加,而 TNF- α 是其中主要的因子^[7]。因此,治疗假体周围骨溶解和骨质疏松的关键就在于抑制以 TNF- α 为代表的炎症因子在体内发挥作用。

研究证实,拮抗 TNF- α 相关的信号通路可以抑制破骨细胞的形成,从而减弱骨吸收作用,达到治疗相关疾病的目的^[2]。但是,针对 TNF- α 的治疗同时会引起免疫系统的并发症,同时其高昂的价格也限制了在临床上的普及^[8]。P60PLAD 蛋白是近年来发现的一种新型 TNFR1 装配阻断剂,是一种小分子量结构域蛋白,可以选择性地结合 TNFR1,特异性地抑制破骨细胞而不影响免疫系统,因此疗效与 TNF- α 抗体相当且副作用少。并且由于其分子量小,易于生产,具有广阔的应用前景。已有将其应用于类风湿关节炎小鼠模型的报道^[9]。我们前期工作中依据 GENE BANK 中人 P60PLAD 氨基酸序列制备可溶性 GST-P60PLAD (GST 标签的存在不但增加了蛋白的水溶性,而且可以利用此标签与 GST 亲和层析柱结合进行纯化)融合蛋白,经纯化后使其达到药用纯度^[10]。前期研究中已经证实 P60PLAD 可以在 TNF- α 及 M-CSF 诱导的破骨细胞培养体系中抑制破骨细胞的形成、分化及骨吸收,并且其抑制作用是通过竞争性抑制 TNF- α 受体发挥作用^[11]。为进一步了解 P60PLAD 蛋白在体内模型中对骨代谢的影响,我们通过建立小鼠超高分子量聚乙烯(Ultra High Molecular Weight Polyethylene, UHMWPE)颗粒诱导的小鼠颅骨骨溶解模型以及去卵巢(OVX)小鼠骨质疏松模型这两种较为成熟的动物模型,模拟体内的病理变化过程,并通过施加新型 TNF 受体拮抗剂 P60PLAD 蛋白,探索此蛋白在体内模型对骨代谢疾病的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

雄性 8 周 C57BL/6 小鼠以及雌性 10 周 C57BL/6 小鼠(购买自第四军医大学实验动物中心); α -MEM 培养液(美国 Sigma 公司);胎牛血清(美国 GIBCO 公司);内毒素检测试剂盒、TRAP 染色试剂盒(美国 Sigma 公司)。

1.2 P60PLAD 蛋白的准备

在使用前将根据我们前期的实验制备的 GST-P60PLAD 蛋白干粉溶于 1 $\times$ PBS 缓冲液^[10],浓度为 100 μM ,经规格为 0.22 μm 的滤器过滤消毒之后,置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 UHMWPE 颗粒准备

UHMWPE 颗粒由中国矿业大学摩擦学与可靠性工程研究所刘洪涛教授提供,平均颗粒直径小于 1 μm ,具有生物活性。将此颗粒用 75%酒精冲洗 3 次,在室温晾干之后使用内毒素检测试剂盒进行检测,证实无内毒素。紫外线隔夜照射消毒,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 UHMWPE 颗粒诱导的小鼠颅骨骨溶解模型构建

UHMWPE 颗粒诱导的小鼠颅骨骨溶解模型用来检验蛋白在体内对 UHMWPE 颗粒诱导的骨溶解的作用。所有动物实验和相关操作流程受到第四军医大学西京医院实验动物伦理委员会的监督和审查,并且通过批准(审批号 20161003)。9 只雄性 C57BL/6 小鼠被随机分为三组:正常组、对照组和实验组,每组 3 只。小鼠用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(50 mg/kg)后俯卧位固定于台上,在颅骨矢状中线切开 5 mm 切口,显露颅骨 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 骨膜范围,正常组不做任何处理,缝合关闭切口;对照组在颅骨冠状缝和矢状缝交点的周围均匀涂抹 20 μg UHMWPE 颗粒,缝合关闭切口后注射 PBS;实验组处理与对照组相同,在缝合后局部注射 P60PLAD 蛋白溶液。手术后,实验组每天向手术部位注射 100 μg P60PLAD 蛋白,对照组每天在同一部位注射等量 PBS。20 天后,将小鼠过量麻醉处死,取枕骨大孔,耳廓,眼眶沿线将颅盖骨分离,进行 Micro-CT 及相关检测。

1.5 去卵巢骨质疏松小鼠模型构建

取 9 只 10 周龄 C57BL/6 雌性小鼠随机分为 3 组,分别为正常组,对照组,实验组,每组 3 只,用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(50 mg/kg)后俯卧位固定于台上,在小鼠肋骨下缘下 1 cm 与距脊柱 1 cm 交界处切 1 cm 双侧纵形切口。正常组不作处理,关上切口;对照组与实验组寻找到卵巢后结扎进行卵巢切除术,缝合关闭切口。术后,实验组每周三次腹腔注射蛋白,每次 100 μg ,对照组注射等体积 PBS 溶液。12 周后,将小鼠过量麻醉处死,分离股骨,用 4%多聚甲醛固定后进行 Micro-CT 相关检测。

1.6 Micro-CT 分析

将标本用 4%多聚甲醛固定之后送第四军医大学西京医院全军骨科研究所进行 micro-CT 扫描 (eXplore Locus SP; GE Healthcare, Madison, WI)。扫描协议为:球管电压为 80 kV,电流为 80 mA,旋转角度为 360 $^{\circ}$,旋转角度增量为 0.4 $^{\circ}$,分辨率为 14 μm ,曝光时间为 3000 ms,扫描结束后使用图像分析软件 MicroView ABA 进行分析,首先进行三维重建,之后选取冠状缝与矢状缝交点为中心的 5 $\times$ 5 $\times$ 5 mm³ 立方体形区域作为目标区域 (Region of Interest, ROI),对骨矿物质密度 (Bone

Mineral Density, BMD), 骨矿含量 (Bone mineral Content, BMC), 骨体积分数(BV/TV), 骨小梁厚度(Tb.Th), 骨小梁数量(Tb.N)等参数进行分析。

1.7 统计学处理

所有计量数据使用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示, SPSS11.0 软件对对照组与实验组进行 t 检验。 $P \leq 0.05$ 认为差异具有显著性, 推断结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 P60PLAD 对 UHMWPE 颗粒诱导的小鼠颅骨骨溶解模型的影响

小鼠颅骨用来进行 Micro-CT 检测以对局部骨质情况进行

定性定量分析, 如图 1 所示, 颅骨正中矢状线周围低信号区域为骨吸收区域。可以明显看到, 对照组经过 UHMWPE 颗粒处理后局部骨吸收区域面积显著增加, 而实验组经 P60PLAD 蛋白处理之后, 骨吸收区域面积明显下降。

在对颅骨区域进行 3D 重建之后(如图 1 所示), 我们得到 BMD、BMC、BV/TV 等表示骨质量和数量的参数, 通过对目标区域的比较, 可以发现, 在对照组, 三个参数的值都达到最低, 提示 UHMWPE 颗粒显著增加了骨吸收, 减少了局部骨量; 在实验组, BMD、BMC、BV/TV 与对照组相比都有明显增加。提示 UHMWPE 颗粒可以诱导骨溶解, 而 P60PLAD 蛋白可以显著减少骨吸收, 增加局部骨量, 从而起到骨保护作用。

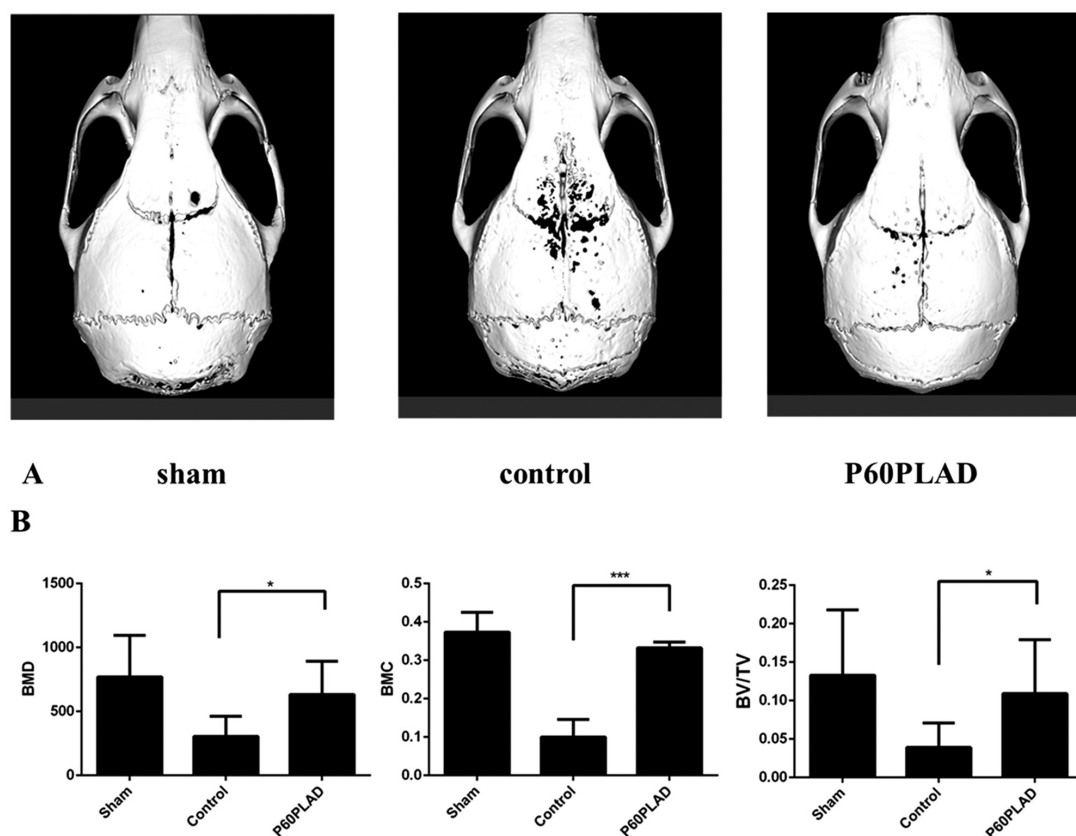


图 1 P60PLAD 对 UHMWPE 颗粒诱导的小鼠颅骨骨溶解模型的影响

(A: 3D 重建颅骨扫描结果比较; B: Micro-CT 参数比较(BMD, BMC, BV/TV) *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; NS, $P > 0.05$)

Fig.1 The effects of P60PLAD on UHMWPE-induced osteolysis

(A: Comparison of 3D reconstruction of the skulls; B: Comparison of Micro-CT parameters(BMD, BMC, BV/TV)

*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; NS, $P > 0.05$

2.2 P60PLAD 对去卵巢骨质疏松小鼠模型的影响

在进行卵巢切除术后 12 周将小鼠处死, 取股骨远端进行 Micro-CT 检测观察小鼠骨量变化情况, 3D 重建股骨远端干骺部可以看到, 正常组远端骨小梁完整, 而在对照组, OVX 小鼠骨小梁结构不完整甚至缺损, 实验组使用 P60PLAD 蛋白 100 μ g 腹腔注射处理 12 周之后, 骨量与对照组比较增多, 骨小梁结构更加完整, 证明 P60PLAD 减少了 OVX 小鼠的骨量丢失, 与正常组相近。图 2 显示了股骨远端松质骨与皮质骨骨量的量化比较, 与正常组相比, 对照组在 BV/TV, Tb.Th (骨小梁厚度), Tb.N (骨小梁数量) 等参数上有明显下降, Tb.Sp (小梁间隙) 方面明显高于正常组。而在实验组, BV/TV, Tb.Th, Tb.N 等

参数分别较对照组增加了 69%、35%、93%, 相应的, Tb.Sp 减少了 49%。提示 P60PLAD 可以恢复骨量, 增加骨强度, 减轻去卵巢小鼠模型的骨质疏松。

3 讨论

假体周围骨溶解引起的松动是影响人工关节置换手术效果的主要因素^[12]。当前, 尽管在假体材料以及假体-骨界面的材料研究上有了很大进步, 选择更加多样化, 但是, 随着使用的增加和囊内压的增加, 假体表面磨损颗粒不断产生, 刺激局部产生炎症和骨破坏, 导致的假体松动, 是关节置换术失败的重要原因^[13]。随着人口老龄化加快, 骨质疏松, 特别是老年骨质疏松

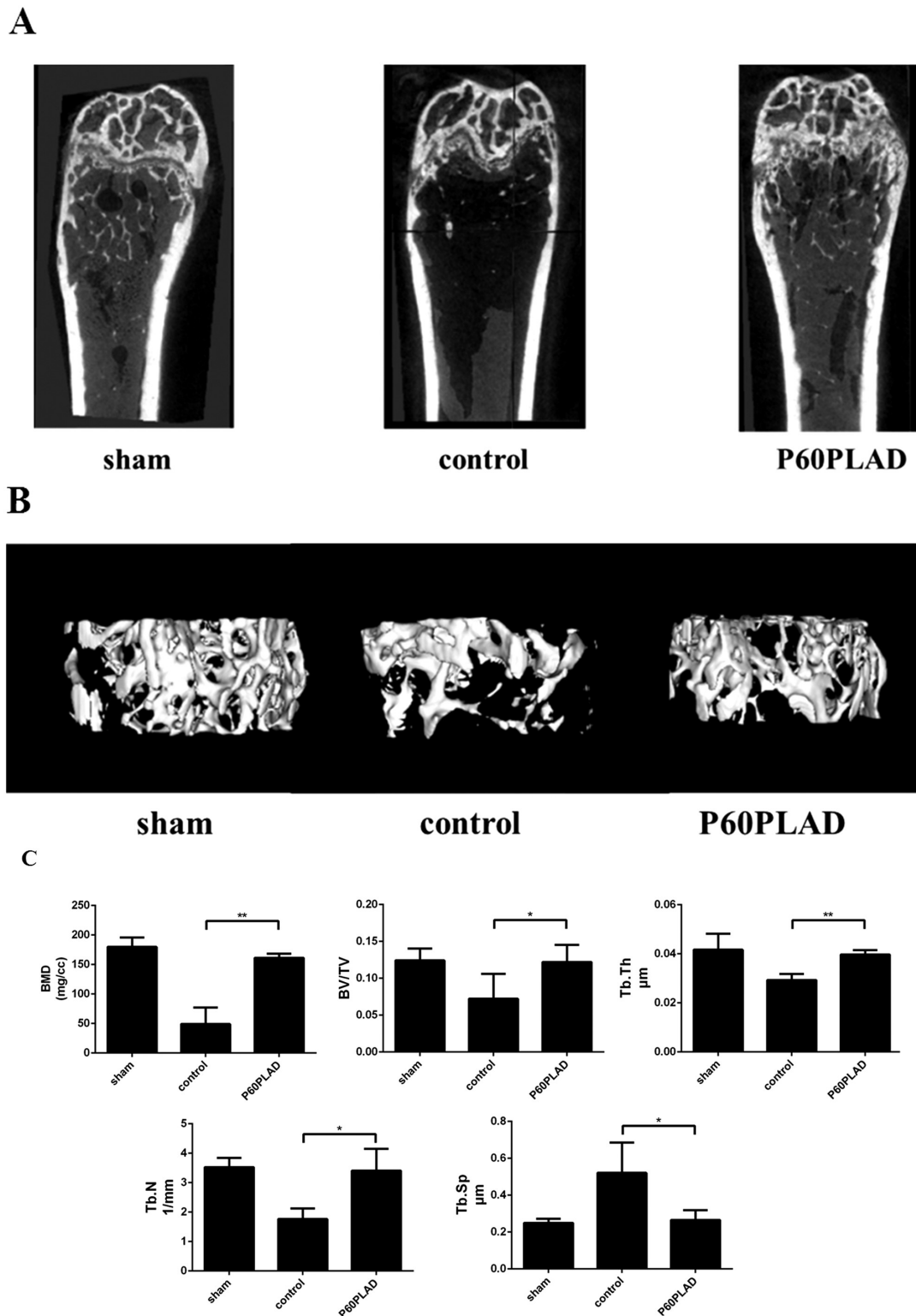


图2 P60PLAD 对去卵巢骨质疏松小鼠模型的影响

A:小鼠股骨远端冠状面扫描比较;B:小鼠股骨远端骨小梁 3D 重建效果比较;C:Micro-CT 参数比较(BMD,BV/TV,Tb.Th,Tb.N,Tb.Sp)

***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05; NS, P>0.05

Fig. 2 The effects of P60PLAD on OVX-induced osteoporosis

A: The distal femoral metaphysis was scanned in a coronal image with micro-CT system; B: The 3D reconstruction of distal femoral trabecular bone structure; C: Comparison of Micro-CT parameters(BMD, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp) ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05; NS, P>0.05

和绝经后骨质疏松对医学和社会的影响越来越深远,给社会带来沉重的经济负担。除了骨质疏松带来的骨量减少与骨强度减弱,骨折风险的增加以及骨折后的运动能力和自理能力的下降极大地降低了患者的生活质量^[4]。有证据表明,在生物活性

磨损颗粒刺激下,巨噬细胞被激活,TNF- α 、IL-6 等炎性因子分泌增多引发的炎性反应是造成假体周围骨溶解的重要原因之一,在 M-CSF 的影响下,TNF- α 可以直接诱导单核巨噬细胞分化为破骨细胞,介导骨吸收作用。此外,TNF- α 等炎性因子的产

生可以刺激 NF- κ B 受体激活蛋白配体(RANKL)的产生,通过 RANK 通路来促进破骨细胞的合成、分化。最终造成骨溶解。骨质疏松骨代谢失衡的主要原因是多种促炎因子所介导的破骨细胞形成增加,而 TNF- α 是其中主要的因子。有研究表明,有研究表明,T 得分小于 2.5 患有骨质疏松的妇女临床表现与其体内 TNF- α 水平相关。动物实验表明,缺少 TNF- α 受体的小鼠在进行卵巢切除手术之后骨量没有明显变化^[7,15]。由 TNF- α 激活的 T 细胞分泌的炎症因子一方面促进骨细胞分泌 NF- κ B 受体激活蛋白配体(RANKL)的产生,另一方面增强破骨细胞对 RANKL 的敏感性,促进其分化。说明 TNF- α 在去卵巢骨质疏松的病理变化中起着重要作用^[16]。因此,通过拮抗剂拮抗 TNF- α 可能是治疗假体周围骨溶解和绝经期后骨质疏松的有效策略。

近年来,许多 TNF- α 抗体如英夫利昔单抗以及可溶性 TNFR 如依那西普被用于许多炎症反应性疾病中并取得了不错的临床效果,但是,带来的一些严重的副作用如感染、淋巴瘤,狼疮性炎症以及结核等也不容忽视,而产生副作用的主要原因就是 TNF- α 单抗或可溶性受体在阻断 TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)的同时影响了 TNFR2 介导的免疫反应^[17,18]。因此,临床治疗中迫切需要更加具有选择性的通过 TNFR1 阻断 TNF- α 通路的药物。研究发现,TNFR 家族成员通过一个富含半胱氨酸的配体结合区域 (PLAD) 结合配体。PLAD,也就是配体组装前结构域 (preligand binding assembly domain, PLAD),是 TNFR 家族胞外一部分保守的区域,是装配 TNFR 使其能与 TNF 结合启动下游通路所必需的。(图 3)由于 TNFR 的装配是受体特异性的,因此 TNFR1 PLAD 不会与 TNFR2 PLAD 交叉作用。这些发现为特异性阻断 TNFR 作用从而发现新的作用靶点提供了理论依据^[19,20]。P60PLAD 是 TNFR1 特异性的,因此可以避免阻断 TNFR2 所带来的副作用。GST-PLAD 混合蛋白是用于一些动物模型的治疗性分子(GST 标签的存在不但增加了蛋白的水溶性,而且可以利用此标签与 GST 亲和层析柱结合进行纯化)。通过给予动物 GST-P60PLAD 混合蛋白和 GST 相对比发现,GST-P60PLAD 作用的发挥与 P60PLAD 有关而与 GST 无关^[21]。Guo-Min Deng 等人发现^[9],P60PLAD 在类风湿性关节炎小鼠模型中表现出了明显的缓解效果,而其治疗效果很可能是由于抑制了 TNF- α 所诱导的 NF- κ B 激活,及其诱导的 RANK 与 RANKL 表达,从而抑制了破骨细胞的分化。此外,P60PLAD 还能显著降低骨组织局部 TNF- α 所诱导的炎症反应,为抑制 TNF- α 通路在相关骨代谢疾病中的异常激活并且避免副反应提供了安全高效的治疗策略。

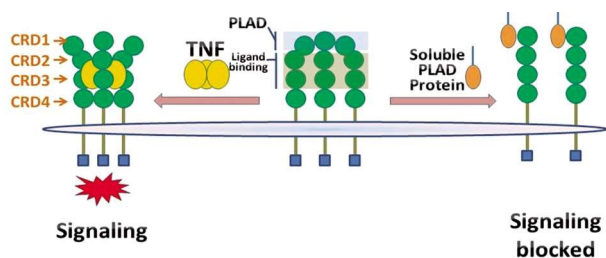


图 3 P60PLAD 蛋白作用机制

Fig. 3 The mechanisms of P60PLAD

本实验通过构建动物模型,用 C57BL/6 小鼠模拟了体内 UHMWPE 颗粒诱导的骨溶解和绝经期后骨质疏松的体内病理过程,并将 P60PLAD 蛋白应用于此动物模型中,探索其对于骨溶解和骨质疏松的治疗作用。通过研究发现:P60PLAD 可以显著抑制 UHMWPE 颗粒诱导的骨溶解,与对照组相比,BMD、BMC、BV/TV 有明显增加,提示 UHMWPE 颗粒可以诱导骨溶解,而 P60PLAD 蛋白可以显著减少骨溶解面积。在 OVX 去卵巢骨质疏松小鼠模型中,而在实验组,BV/TV、Tb.Th、Tb.N 等参数分别较对照组均有明显增加,相应的,Tb.Sp 有显著减少,提示 P60PLAD 可以恢复骨量,增加骨强度,减轻去卵巢小鼠模型的骨质疏松严重程度。结合前期研究,可以认为 P60PLAD 是通过抑制局部炎症反应,抑制破骨细胞的骨吸收作用来实现对骨量的保护。总的来看,P60PLAD 是一种新型的特异性 TNFR1 受体拮抗剂,可以抑制破骨细胞的形成、分化来减少骨吸收,达到骨保护作用,有望在临床上应用于全关节置换术后假体周围骨溶解以及骨质疏松的治疗。

参考文献(References)

- [1] Amstutz H C, Campbell P, Kossovsky N, et al. Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis [J]. Clin Orthop Relat Res, 1992, (276): 7-18
- [2] Beck R T, Illingworth K D, Saleh K J. Review of periprosthetic osteolysis in total joint arthroplasty: an emphasis on host factors and future directions[J]. J Orthop Res, 2012, 30(4): 541-546
- [3] Jiang Y, Jia T, Wooley P H, et al. Current research in the pathogenesis of aseptic implant loosening associated with particulate wear debris [J]. Acta Orthop Belg, 2013, 79(1): 1-9
- [4] 赵玉鸣, 葛立宏, Grigoriadis Agi E. 肿瘤坏死因子 α 对小鼠破骨细胞分化的影响[J]. 北京大学学报(医学版), 2005, 37(4): 433-435
Zhao Yu-ming, Ge Li-hong, Grigoriadis Agi E. Effect of TNF- α on murine osteoclast differentiation [J]. Jouranl of Peking University (Health sciences), 2005, 37(4): 433-435
- [5] Gilbert L C, Chen H, Lu X, et al. Chronic low dose tumor necrosis factor- α (TNF) suppresses early bone accrual in young mice by inhibiting osteoblasts without affecting osteoclasts [J]. Bone, 2013, 56 (1): 174-183
- [6] Golob A L, Laya M B. Osteoporosis: Screening, Prevention, and Management[J]. Medical Clinics of North America, 2015, 99(3): 587-606
- [7] Roggia C, Gao Y, Cenci S, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(24): 13960-13965
- [8] Riolo G, Towheed T E. Anti-tumor necrosis factor inhibitor therapy-induced dermatomyositis and fasciitis [J]. J Rheumatol, 2012, 39 (1): 192-194
- [9] Deng G M, Zheng L, Chan F K, et al. Amelioration of inflammatory arthritis by targeting the pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptors[J]. Nat Med, 2005, 11(10): 1066-1072
- [10] 曹晓瑞, 朱庆生, 张大伟, 等. GST-p60PLAD 融合蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达和纯化 [J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(3): 244-246
Cao Xiao-Rui, Zhu Qing-Sheng, Zhang Da-Wei, et al. Soluble expression and purification of fusion protein GST-p60PLAD in E.coli[J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2007, 28 (3): 244-246

(下转第 855 页)

- of life after treatment of pelvic sarcomas involving the acetabulum [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88(3): 575-582
- [5] Mayerson JL, Wooldridge AN, Scharschmidt TJ. Pelvic resection: current concepts[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2014, 22(4): 214-222
- [6] Kralovec ME, Houdek MT, Andrews KL, et al. Prosthetic Rehabilitation After Hip Disarticulation or Hemipelvectomy[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2015, 94(12): 1035-1040
- [7] Vukicevic S, Marusic A, Stavljenic A, et al. Holographic analysis of the human pelvis[J]. *Spine (Phila Pa1976)*, 1991, 16(2): 209-214
- [8] Li J, Stewart TD, Jin Z, et al. The influence of size, clearance, cartilage properties, thickness and hemiarthroplasty on the contact mechanic soft he hip joint with biphasic layers [J]. *J Biomech*, 2013, 46(10): 1641-1647
- [9] Li Z, Kimb JE, Davidson JS, et al. Biomechanical response of the pubic symphysis in lateral pelvic impacts:A finite element study [J]. *J Biomech*, 2007, 40(12): 2758-2766
- [10] Li Z, Alonso JE, Kim JE, et al. Three-dimensional finite element models of the human pubic symphysis with viscohyerelastic soft tissue[J]. *Ann Biomed Eng*, 2006, 34(9): 1452-1462
- [11] Dalstra M, Huiskes R. Load transfer across the pelvic bone [J]. *J Biomech*, 1995, 28(6): 715-724
- [12] Dalstra M, Huiskes R, Van Erning L. Development and validation of a three-dimensional finite element model of the pelvic bone [J]. *J Biomech Eng*, 1995, 177(3): 272-278
- [13] Anderson AE, Peters CL, Tuttle BD, et al. Subject-specific finite element model of the pelvis: development, validation and sensitivity studies[J]. *J Biomech Eng*, 2005, 127(3): 364-373
- [14] Phillips AT, Pankaj P, Howie CR, et al. Finite element modelling of the pelvis:inclusion of muscular and ligamentous boundary conditions [J]. *Med Eng Phys*, 2007, 29(7): 739-748
- [15] 康士海,屠重棋,张强,等. 组配式人工半骨盆假体置换后骨盆站立位生物力学有限元分析 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(13): 2300-2304
- Lian Shi-hai, Tu Chong-qi, Zhang Qiang, et al. Biomechanical finite element analysis of the pelvic in a standing position following modular hemipelvic prosthesis replacement [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2012, 16(13): 2300-2304
- [16] 苏汝堃,刘兴漠,邓颖辉,等. 髂骨钉与腰骶椎弓根钉连接技术在腰骶骨盆固定中的生物力学评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(22): 4377-4379
- Su Ru-kun, Liu Xing-mo, Deng Ying-hui, et al. Biomechanical evaluation of connectible skills using iliac screw and lumbar-sacral spine pedicle screw in the fixation between lumbar-sacral spine and pelvis [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2008, 12(22): 4377-4379

(上接第 843 页)

- [11] 曹晓瑞. P60PLAD 蛋白对破骨细胞生成、分化及骨吸收影响的相关研究[D]. 第四军医大学外科学(骨外), 2007
- Cao Xiao-Rui. Effects of P60PLAD on Osteoclastogenesis, Differentiation of Osteoclast and Bone Resorption[D]. Fourth Military Medical University, 2007
- [12] Kim C W, Seo S S, Kim J H, et al. Factors affecting the osteolysis around the components after posterior-stabilized total knee replacement arthroplasty[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2015, 23(6): 1863-1869
- [13] Kandahari A M, Yang X, Laroche K A, et al. A review of UHMWPE wear-induced osteolysis: the role for early detection of the immune response[J]. *Bone Res*, 2016, 4: 16014
- [14] Harslof T, Langdahl B L. New horizons in osteoporosis therapies[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 28: 38-42
- [15] Kotrych D, Dziedzic V, Safranow K, et al. TNF-alpha and IL10 gene polymorphisms in women with postmenopausal osteoporosis[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2016, 199: 92-95
- [16] Qi J, Hu K S, Yang H L. Roles of TNF-alpha, GSK-3beta and RANKL in the occurrence and development of diabetic osteoporosis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 11995-12004
- [17] Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Munoz S, et al. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies: analysis of 233 cases[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2007, 86(4): 242-251
- [18] Pouillon L, Bossuyt P, Peyrin-Biroulet L. Considerations, challenges and future of anti-TNF therapy in treating inflammatory bowel disease[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(10): 1277-1290
- [19] Chan F K, Chun H J, Zheng L, et al. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling[J]. *Science*, 2000, 288(5475): 2351-2354
- [20] Chan F K. The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function [J]. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59 Suppl 1:i50-i53