

双酸酸蚀钛表面复合含钙纳米薄片膜层对成骨细胞行为的影响

周 晓^{1,2}, 邵水易¹, 明盼盼¹, 张松梅³, 邱 憬^{1*}

(¹南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室,南京医科大学附属口腔医院种植科,江苏 南京 210029;²芜湖市口腔医院综合科,安徽 芜湖 241000;³上海市口腔医学重点实验室,上海 200011)

[摘要] 目的:制备含钙纳米薄片膜层修饰的双酸酸蚀钛表面并评价其对成骨细胞行为的影响。方法:通过双酸酸蚀和氢氧化钙/双氧水混合溶液水热处理,制备2种含钙纳米薄片膜层修饰的双酸酸蚀钛表面(1 h、6 h处理组)。以大颗粒喷砂酸蚀(SLA)钛表面为对照组,2种含钙纳米薄片膜层修饰的双酸酸蚀钛表面为实验组,观察分析不同钛表面的微形貌和表面元素组成;将MC3T3-E1成骨细胞接种于各组试件表面,研究不同钛表面对成骨细胞生物学行为的影响。结果:在双酸酸蚀钛表面制备形成2种形貌均一的纳米薄片膜层结构,均含有微量钙元素。相比于SLA钛表面,2种新型钛表面均有利于MC3T3-E1成骨细胞的黏附和增殖,显著增强成骨细胞的碱性磷酸酶活性,并上调成骨相关基因的表达。其中,1 h处理组性能更优。结论:双酸酸蚀钛表面复合含钙纳米薄片膜层能有效促进成骨细胞的黏附、增殖和分化。

[关键词] 钛;酸蚀;钙;纳米薄片;成骨细胞

[中图分类号] R783.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)10-1251-06

doi:10.7655/NYDXBNS20171005

In vitro study of osteoblast behaviors on the double acid etching titanium surface modified with calcium-containing nanoflakes

Zhou Xiao^{1,2}, Shao Shuiyi¹, Ming Panpan¹, Zhang Songmei³, Qiu Jing^{1*}

(¹Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, Department of Oral Implantology, Affiliated Hospital of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of General Dentistry, Wuhu Stomatological Hospital, Wuhu 241000; ³Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare the double acid etching titanium surface modified with calcium-containing nanoflakes and evaluate its effects on osteoblast behaviors *in vitro*. **Methods:** Through double acid-etching and hydrothermal treatment with a mixed solution of Ca(OH)₂/H₂O₂, two different calcium-containing nanoflakes (the 1 h and the 6 h treatment groups) were synthesized on the double acid etching titanium surfaces. The sandblasting with large grit and acid etching (SLA) titanium surface was used as the control group, and two double acid etching titanium surfaces modified with different calcium-containing nanoflakes were used as two experiment groups. The micro-topography and surface elemental compositions of different titanium surfaces were observed and analyzed. MC3T3-E1 cells were seeded on samples of the three groups to investigate osteoblast behaviors on different titanium surfaces. **Results:** Two uniform nanoflake-like structures containing trace calcium were prepared on double acid etching titanium surfaces. Compared with the SLA titanium surface, two modified titanium surfaces significantly up-regulated the adhesion, proliferation, ALP activity and expressions of osteogenic-related genes of MC3T3-E1 cells, especially the 1 h treatment group. **Conclusion:** The double acid etching titanium surface modified with calcium-containing nanoflakes could promote the adhesion, proliferation and differentiation of osteoblasts.

[Key words] titanium; acid-etching; calcium; nanoflakes; osteoblast

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(10): 1251-1256]

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81472928);江苏省卫生计生委面上科研课题(H201641);江苏省青年医学人才项目(QN-RC2016850);江苏省“六大人才高峰”资助项目(2014-WSW-035);东南大学-南京医科大学合作基金(2242017K3DN14);江苏高校优势学科建设工程资助项目(2014-37)

*通信作者(Corresponding author),E-mail: qiuqing@njmu.edu.cn

纯钛种植体广泛应用于牙列缺损和牙列缺失的种植修复,大大改善了患者的生活质量。目前,临床常用的种植体系统如 Straumann、3i、Nobel Biocare 等,分别通过大颗粒喷砂酸蚀(SLA)、双重酸蚀、微弧氧化等技术构建表面微米级形貌,促进成骨细胞的黏附、增殖和分化,增加种植体-骨的接触面积和机械嵌合力。然而,纯钛本身缺乏骨诱导性能,与周围骨组织之间无法形成有力的化学结合^[1],在植入后需要较长时间形成理想的骨结合。

针对这一点,国内外学者对钛种植体的表面处理进行了大量研究^[2-5],期望通过合适的处理方法,提高种植体植入后的成骨速度,增加骨结合强度,缩短治疗周期。天然骨组织结构表现为微米级骨单元和纳米级无机矿物质晶体形成的复合形貌^[6]。因此,模拟天然骨组织的构造,在钛种植体表面形成兼有微米级、纳米级结构的复合形貌逐渐成为该领域的研究热点。另一方面,在钛种植体表面引入微量生物活性元素是促进种植体形成骨结合的有效途径。Cheng 等^[7]研究发现,将钙离子注入 SLA 处理的钛表面,能促进更多的成骨细胞优先黏附,并进一步扩散增殖,加速成骨细胞的成熟和矿化。

如何将上述 2 种途径有效结合,在钛表面构建微-纳米级复合形貌的同时引入生物活性元素,目前仍鲜有报道。因此,本研究拟采用双酸酸蚀和水热处理技术,制备含钙纳米薄片膜层修饰的双酸酸蚀钛表面,并通过体外细胞实验评价该新型钛表面的成骨活性。

1 材料与方法

1.1 材料

纯钛片(99.5%,Alfa Aesar 公司,美国),SiC 砂纸(鹰牌,天津南景磨料磨具有限公司),MC3T3-E1 细胞系(中国科学院上海细胞库),胎牛血清、 α -MEM 培养基、青霉素/链霉素双抗溶液(Gibco 公司,美国),Triton X-100(Solarbio 公司,北京),胰蛋白酶(Sigma 公司,美国),鬼笔环肽(Cytoskeleton 公司,美国),4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,上海碧云天公司),RIPA 裂解液、DEPC 水(北京雷根公司),TRIzol(Invitrogen,美国),CCK-8 试剂盒(合肥 Biosharp 公司),碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(南京建成生物公司),BCA 蛋白定量试剂盒(南京凯基生物公司),RT-PCR 逆转录试剂盒及引物(TaKaRa 公司,日本),扫描电子显微镜(1530VP,LEO,德国),X 线能量色散谱仪(Oxford 公司,英国),细胞恒温培养箱(Thermo 公司,美

国),激光共聚焦显微镜(LSM710,Zeiss 公司,德国),微孔板分光光度计(MD 公司,美国),紫外/可见光分光光度计(GE 公司,美国),基因扩增仪(Eppendorf 公司,德国),核酸蛋白检测仪(GE 公司,美国),荧光定量 PCR 仪(7300,ABI 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 试件制备

纯钛试件制备:制备两种规格的纯钛试件(4 mm×4 mm,Φ15 mm),采用 600#、800#、1200#、1500# 金相砂纸逐级打磨抛光,依次置于双蒸水、无水乙醇、双蒸水中超声清洗,50℃干燥,按 1:2 数量比例随机分为对照组和实验组备用。

对照组:纯钛试件经大颗粒金刚砂喷砂处理(压力 0.4 MPa),依次双蒸水、无水乙醇、双蒸水超声清洗,干燥,经 HF/HNO₃ 混合酸酸蚀 10 min,冲洗,干燥,然后置于 80℃的 HCl/H₂SO₄ 混合酸中酸蚀 30 min,冲洗,干燥,备用,完成大颗粒喷砂酸蚀(SLA)钛表面试件的制备,作为对照组,高温高压灭菌后备用。

实验组:纯钛试件经 0.4% HF 常温酸蚀 30 min,依次双蒸水、无水乙醇超声清洗,干燥,再置于 80℃的 HCl/H₂SO₄ 混合酸中酸蚀 1 h,依次双蒸水、无水乙醇超声清洗,干燥,然后置于 H₂O₂/Ca(OH)₂ 混合液中,70℃水浴处理 1 h 和 6 h,双蒸水淋洗,干燥,450℃煅烧 60 min,冷却后获得 2 组实验组:1 h 处理组(DA-1)、6 h 处理组(DA-6),高温高压灭菌后备用。

1.2.2 钛表面微形貌观察和表面元素分析

采用扫描电子显微镜(SEM)观察 3 组钛片的表面微形貌;通过 X 线能量色散光谱仪(EDX)分析 3 组钛片表面的元素组成。由于试件在检测前需喷金处理且检测时试件表面易出现碳污染^[8],EDX 分析时滤去 Au 和 C 元素峰。

1.2.3 细胞培养

将小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞体外复苏后,加入改良型 α -MEM 培养基(含 10%胎牛血清、100 U/mL 青-链霉素),在 37℃、95%相对湿度、5% CO₂ 恒温培养箱中静置培养,每 2~3 d 换液。通过倒置相差显微镜观察细胞生长情况,待细胞密度达 80%后传代。选用第 3~6 代细胞进行细胞学实验。

1.2.4 钛表面 MC3T3-E1 细胞黏附形态观察

将 MC3T3-E1 细胞(5×10³ 个/孔)接种于 96 孔板中的各组试件表面。培养 8 h 后,4%多聚甲醛室温固定 10 min,经鬼笔环肽染色 30 min,DAPI 染色 30 s。采用激光共聚焦显微镜(CLSM)观察各组试件表面 MC3T3-E1 细胞的黏附铺展形态。

1.2.5 钛表面 MC3T3-E1 细胞增殖活性检测

将 MC3T3-E1 细胞(3×10^3 个/孔)接种于 96 孔板中的各组试件表面,分别培养 1、3、6 d 后,吸弃原培养基,每孔加入 200 μ L 含 10% CCK-8 液的培养基,继续 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,采用微孔板分光光度计测定各孔吸光度值($\lambda = 450$ nm),吸光度值越高代表细胞增殖活性越高,每组检测 3 个样本。

1.2.6 钛表面 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性检测

将 3 组试件浸泡于含成骨诱导液的 α -MEM 培养基中,将 MC3T3-E1 细胞接种于各组试件表面,分别培养 7、14 d,弃培养基,PBS 清洗 2 遍,每孔加入 200 μ L RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,收集破碎细胞,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。按照 ALP 检测试剂盒及 BCA 蛋白定量试剂盒说明,测定 ALP 值和蛋白含量,计算各组试件表面 MC3T3-E1 细胞的 ALP 活性,每组检测 3 个样本。

1.2.7 Real-time PCR 检测成骨相关基因表达

将 3 组试件浸泡于含成骨诱导液的 α -MEM 培养基中,将 MC3T3-E1 细胞接种于各组试件表面,分别培养 7 d,弃培养基,PBS 清洗 2 遍,加 TRIzol 裂解;收集裂解液后氯仿混匀,室温放置 3 min;4 $^{\circ}$ C 下,12 000 r/min 离心 15 min;转移上层液相并加等量异丙醇混匀,冰上放置 10 min,离心 10 min;沉淀物加 DEPC 水配置的 75% 乙醇,适度震荡后,离心 5 min,弃上清液,室温晾干 10 min;加 DEPC 水溶解,测 RNA 纯度及浓度;采用基因扩增逆转录反应合成相应 cDNA,配制实时定量 PCR 反应体系,real-time PCR 检测各组试件表面 MC3T3-E1 细胞成骨相关基因 ALP、骨桥蛋白(OPN)的表达,每组检测 3 个样本。

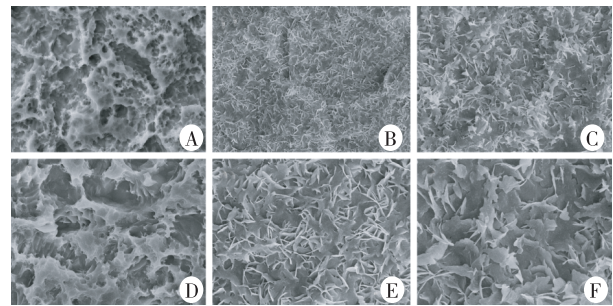
1.3 统计学方法

所有结果均采用 SPSS22.0 统计软件进行统计学分析,计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 钛表面微形貌 SEM 观察

SEM 低倍观察显示:SLA 组表面为微米级凹坑状结构;DA-1、DA-6 组均呈现微米级凹坑布满纳米薄片结构。SEM 高倍观察显示:SLA 组表面布满微米级小凹坑,直径 1~2 μ m;DA-1 组表面纳米薄片尺寸较小,排列致密;DA-6 组表面纳米薄片尺寸较大,排列疏松(图 1)。



A, D: SLA 组; B, E: DA-1 组; C, F: DA-6 组; A, B, C: $\times 2000$; D, E, F: $\times 5000$ 。

图 1 钛表面微形貌扫描电镜观察

Figure 1 Scanning electron microscopy images of different titanium surfaces

2.2 钛表面元素分析

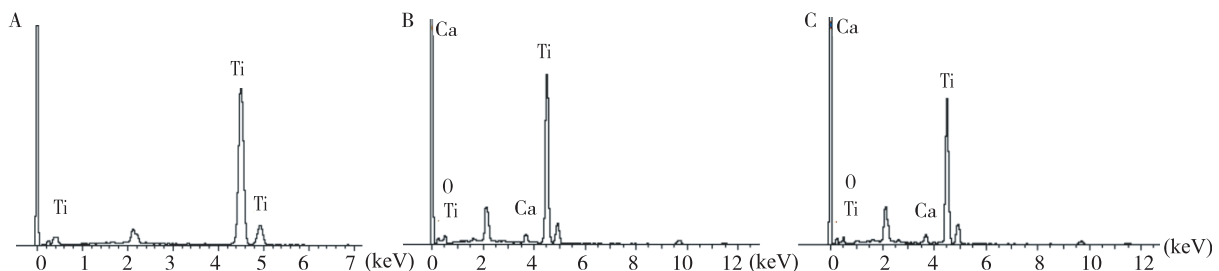
EDX 分析显示:SLA 组表面仅存在钛(Ti)元素可探测,DA-1、DA-6 组表面不仅有钛(Ti)元素,还含有微量钙(Ca)和氧(O)元素。EDX 分析图谱见图 2。

2.3 钛表面 MC3T3-E1 细胞的黏附形态

CLSM 低倍观察显示:SLA 组表面细胞黏附铺展不全,铺展面积较小;DA-1、DA-6 组表面细胞铺展完全,铺展面积较大。CLSM 高倍观察显示:SLA 组表面细胞形态不规则;DA-1、DA-6 组表面细胞伪足延伸充分,胞浆内见丝状细胞骨架(图 3)。

2.4 钛表面 MC3T3-E1 细胞的增殖活性

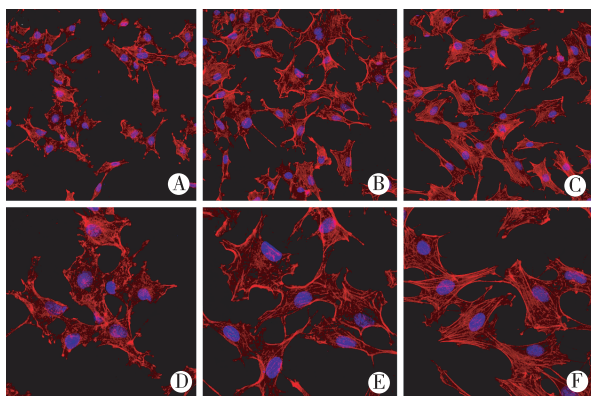
MC3T3-E1 细胞接种后第 1 天,3 组试件表面细胞的增殖活性无明显差异;第 3、6 天,DA-1 组增殖



A: SLA 组; B: DA-1 组; C: DA-6 组。

图 2 各组钛表面元素 EDX 分析图谱

Figure 2 EDX survey spectra of different titanium surfaces



A, D; SLA 组; B, E; DA-1 组; C, F; DA-6 组; A, B, C; ×200; D, E, F; ×400。

图 3 钛表面 MC3T3-E1 细胞孵育 8 h 后黏附形态荧光图像

Figure 3 Fluorescence images of MC3T3-E1 cells spreading on different titanium substrates after 8 h of incubation

活性最高, DA-6 组其次, SLA 组最低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

2.5 钛表面 MC3T3-E1 细胞的 ALP 活性

MC3T3-E1 细胞接种 7 d 后, 3 组试件表面细胞的 ALP 活性无明显差异; 14 d 后, DA-1 组的 ALP 活性最高, DA-6 组其次, SLA 组最低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5)。

2.6 成骨相关基因表达

Real-time PCR 检测成骨相关基因表达的结果见图 6。DA-1 和 DA-6 组表面 MC3T3-E1 细胞的 ALP 和 OPN 基因表达均显著高于 SLA 组 ($P < 0.05$); DA-1 的 ALP 基因表达略高于 DA-6 组, 差异无显著性 ($P > 0.05$); DA-1 组的 OPN 基因表达显著高于 DA-6 组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

种植体表面的粗糙微形貌对成骨细胞的早期黏附具有十分重要的意义^[9]。作为代表性的种植体表面处理方法, SLA 可使钛表面形成微米级粗糙形貌, 增大表面积, 促进成骨细胞的黏附、增殖^[10]。若钛表面形成更接近天然骨组织形貌的纳米级微形貌, 则能够模拟适合成骨细胞生长的微环境, 增强蛋白黏附以及成骨细胞的增殖分化, 更好地促进新骨生成^[11-12]。Webster 等^[13]通过对纳米形貌材料表面成骨细胞行为的检测发现, 成骨细胞的增殖能力明显增强。且纳米形貌有利于成骨细胞的早期黏附和生长。本研究通过双酸蚀蚀和水热处理, 在微米级双酸蚀钛表面复合不同尺度的纳米薄片膜层, 形成 2 种微-纳米复合形貌。细胞黏附形态观察显示, 两种新

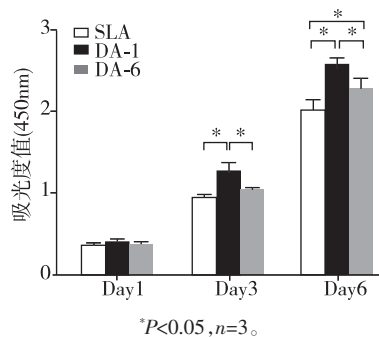


图 4 CCK-8 检测各组钛表面 MC3T3-E1 细胞增殖活性

Figure 4 Cell proliferation of MC3T3-E1 cells on different titanium surfaces measured by CCK-8 assay

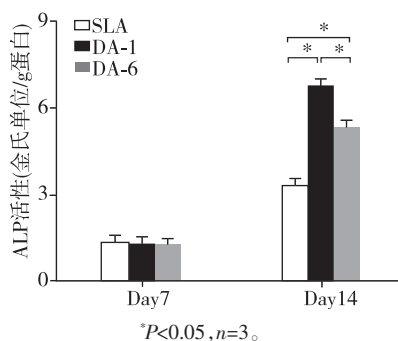


图 5 各组钛表面 MC3T3-E1 细胞培养 7, 14 d 后的 ALP 活性

Figure 5 The alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells on different titanium surfaces after culturing for 7 and 14 days

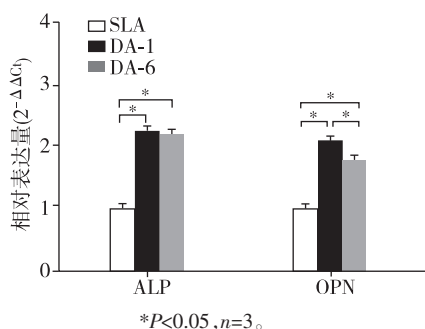


图 6 钛表面 MC3T3-E1 细胞的 ALP 和 OPN 基因相对表达量

Figure 6 Relative gene expression levels of ALP and OPN of MC3T3-E1 cells on different titanium surfaces

型钛表面的成骨细胞在黏附早期即呈梭形变化, 伪足伸展大而长, 多能与相邻细胞相连, 而 SLA 钛表面成骨细胞的黏附形态不规则, 伪足伸展少而短, 相互重叠、凌乱。细胞实验结果进一步显示, 相比于 SLA 钛表面, 2 种新型钛表面均能促进成骨细胞的增殖和分化。因此, 纳米薄片膜层修饰的双酸蚀钛表面有利于成骨细胞的黏附, 进而影响成骨细胞的增殖、分化^[14]。

有研究表明,材料表面引入活性元素能够影响黏附细胞的生物学活性^[15-16]。作为天然骨组织的主要成分,钙能够促进成骨细胞的增殖和分化^[17-18],因而常被引入钛表面以提升钛的成骨活性。Nayab 等^[19]报道,钛种植体表面注入钙离子能显著上调其与成骨细胞的作用,增强种植体的骨结合能力。本研究的 EDX 分析显示,2 种新型钛表面均含有微量钙元素。细胞实验显示,MC3T3-E1 细胞接种后第 1 天,3 种钛表面细胞的增殖活性无明显差异,第 3、6 天,2 种新型钛表面细胞的增殖活性均显著高于 SLA 钛表面。该现象可能与 2 种新型钛表面含有的钙元素有关,之后的细胞分化实验结果进一步证实了钙对成骨细胞分化的促进作用。

成骨细胞在增殖后开始分化,并产生细胞外基质,基质矿化成熟后形成骨组织。该过程中,ALP 的活性与成骨细胞分化程度密切相关^[20]。本研究中,MC3T3-E1 细胞接种 7 d 后,3 种钛表面细胞的 ALP 活性无明显差异,而 14 d 后,相比于 SLA 钛表面,2 种新型钛表面的成骨细胞均表现出更强的 ALP 活性。由此可见,随着细胞定植时间的延长,2 种新型钛表面能更好地促进成骨细胞分化。成骨相关基因表达的检测结果显示,在 2 种新型钛表面上培养成骨细胞,其成骨相关基因表达均显著高于 SLA 钛表面,在基因水平上验证了双酸酸蚀钛表面复合含钙纳米薄片膜层具有促进成骨细胞分化的能力。2 种新型钛表面中,水处理时间较长的 DA-6 钛表面成骨细胞的增殖和分化能力略逊于 DA-1。究其原因,可能与 DA-6 钛表面的纳米薄片结构较为稀疏,成骨细胞与含钙纳米薄片的接触面积较小有关。

本研究中,水处理在双酸酸蚀钛表面形成纳米薄片膜层的同时引入了钙元素。虽然与 SLA 同为表面粗糙化处理,但该方法制备的含钙微-纳米级复合形貌更加有利于成骨细胞的黏附、增殖和分化。该新型钛表面促进成骨作用的机制及其对体内骨结合的影响,还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

[1] James K, Levene H, Parsons JR, et al. Small changes in polymer chemistry have a large effect on the bone-implant interface: evaluation of a series of degradable tyrosine-derived polycarbonates in bone defects[J]. *Biomaterials*, 1999, 20 (23/24): 2203-2212

[2] Huang Y, He J, Gan L, et al. Osteoconductivity and osteoinductivity of porous hydroxyapatite coatings deposited by liquid precursor plasma spraying: *in vivo*

biological response study [J]. *Biomed Mater*, 2014, 9(6): 065007

[3] Ballo A, Agheli H, Lausmaa J, et al. Nanostructured model implants for *in vivo* studies: influence of well-defined nanotopography on *de novo* bone formation on titanium implants[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6(1): 3415-3428

[4] Wang XX, Hayakawa S, Tsuru K, et al. Bioactive titania-gel layers formed by chemical treatment of Ti substrate with a H₂O₂/HCl solution [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(5):1353-1357

[5] Ding X, Zhou L, Wang J, et al. The effects of hierarchical micro/nanosurfaces decorated with TiO₂ nanotubes on the bioactivity of titanium implants *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015,10: 6955-6973

[6] Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone[J]. *Med Eng Phys*, 1998, 20 (2): 92-102

[7] Cheng M, Qiao Y, Wang Q, et al. Calcium plasma implanted titanium surface with hierarchical microstructure for improving the bone formation [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7 (23): 13053-13061

[8] Liu C, Zhang Y, Wang L, et al. A strontium-modified titanium surface produced by a new method and its biocompatibility *in vitro*[J]. *PLoS One*, 2015, 10 (11): e0140669

[9] Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, et al. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands [J]. *Biophys J*, 2007, 92(8): 2964-2974

[10] 王程越, 马红梅, 赵宝红, 等. 表面经喷砂和酸蚀及羟基磷灰石涂层的 TA2 纯钛种植体对富血小板血浆体外骨诱导能力的影响[J]. *口腔医学*, 2007, 27 (7): 343-346

[11] Bressan E, Sbricoli L, Guazzo R, et al. Nanostructured surfaces of dental implants[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 1918-1931

[12] Liu H, Webster TJ. Mechanical properties of dispersed ceramic nanoparticles in polymer composites for orthopedic applications [J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, 5 (5): 299-313

[13] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, et al. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics [J]. *Biomaterials*, 2000, 21 (17): 1803-1810

[14] Miyauchi T, Yamada M, Yamamoto A, et al. The enhanced characteristics of osteoblast adhesion to photofunctionalized nanoscale TiO₂ layers on biomaterials surfaces[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(14): 3827-3839

[15] Valerio P, Pereira MM, Goes AM, et al. The effect of

- ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(15): 2941–2948
- [16] Silver IA, Deas J, Erecińska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts *in vitro*: effects of 45S5 bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(2): 175–185
- [17] Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(23): 4847–4855
- [18] Cerrutti M, Sahai N. Silicate biomaterials for orthopaedic and dental implants[J]. *Rev Mineral Geochem*, 2006, 64(1): 283–313
- [19] Nayab SN, Jones FH, Olsen I. Effects of Calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(23): 4717–4727
- [20] Marom R, Shur I, Solomon R, et al. Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells[J]. *J Cell Physiol*, 2005, 202(1): 41–48
- [收稿日期] 2016–12–28

(上接第1242页)

- Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1253–1258
- [2] Lan L, Tao J, Chen AZ, et al. Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR4/NF-kappa B pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(1): 75–80
- [3] Huang J, Huang K, Lan T, et al. Curcumin ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting the activation of the SphK1-S1P signaling pathway[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 365(2): 231–240
- [4] Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, et al. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2[J]. *Nature*, 2010, 465(731): 1084–1088
- [5] 吴虹, 蔡俊杰, 侯敏, 等. 芒柄花黄素对脑缺血再灌注损伤小鼠炎症反应的作用[J]. *四川医学*, 2012, 33(4): 594–595
- [6] Wang Y, Zhu Y, Gao L, et al. Formononetin attenuates IL-1 β -induced apoptosis and NF- κ B activation in INS-1 cells[J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 10052–10064
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91
- [8] Luo Y, Yang YP, Liu J, et al. Neuroprotective effects of madecassoside against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Brain Res*, 2014, 1565: 37–47
- [9] Zhang P, Liu X, Zhu Y, et al. Honokiol inhibits the inflammatory reaction during cerebral ischemia reperfusion by suppressing NF- κ B activation and cytokine production of glial cells[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 534: 123–127
- [10] Sari AN, Korkmaz B, Serin MS, et al. Effects of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, on lipopolysaccharide-induced changes in MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B pathway and circulating miR-150, miR-223, and miR-297 levels in a rat model of septic shock [J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(9): 741–756
- [11] Baker DA, Gilkeson GS. Impact of sphingosine kinase on inflammatory pathways in fibroblast-like synoviocytes[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2011, 10(6): 464–471
- [12] Theiss AL. Sphingosine-1-phosphate: Driver of NF κ B and STAT3 persistent activation in chronic intestinal inflammation and colitis-associated cancer[J]. *JAKSTAT*, 2013, 2(3): e24150
- [13] Sladojevic N, Stamatovic SM, Keep RF, et al. Inhibition of junctional adhesion molecule-A/LFA interaction attenuates leukocyte trafficking and inflammation in brain ischemia/reperfusion injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 67: 57–70
- [14] Liu Z, Li P, Zhao D, et al. Anti-inflammation effects of *Cordyceps sinensis* mycelium in focal cerebral ischemic injury rats[J]. *Inflammation*, 2011, 34(6): 639–644
- [15] Lv M, Zhang D, Dai D, et al. Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate regulates the expression of interleukin-17A in activated microglia in cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(7): 551–562
- [收稿日期] 2016–11–05