

去势大鼠血清及骨组织中白细胞介素 6 与其骨组织计量学参数变化的关系

蔚 芃 李佛保



目的 利用骨组织计量学方法,从骨吸收与骨形成活动的组织计量学参数的变化情况,了解实验动物血清和骨微环境中 IL-6 与绝经后骨质疏松的关系。**方法** 40 只雌性 4 月龄 SD 大鼠,随机分为实验组和对照组。分别于术后 4、10、16、22 周处死一组大鼠。用 ELISA 方法测得血清和骨组织培养液中 IL-6 的浓度。利用计算机图像分析系统考察不脱钙骨组织切片的 TBV、MTT、FS、RS、LS、和 MAR。**结果** 相关关系分析提示:血中 IL-6 仅与 RS 呈正相关。而骨组织培养液中 IL-6 变化与 RS、FS 呈正相关。与 MTT 和 TBV 呈负相关。依据相关系数的大小,我们发现:骨组织中 IL-6 浓度与骨形态计量学参数的相关程度 $RS > MTT > FS > TBV$ 。**结论** 本研究采用骨组织计量学的方法,在组织学水平上证实了绝经后血清和骨组织中 IL-6 的水平增高,使破骨细胞的骨吸收活动增强,导致了骨质疏松的发生。同时也为利用分子生物学技术,如使用 IL-6 及 IL-6 受体拮抗剂等方法治疗绝经后骨质疏松症提供了研究的方法。

关键词 去势 骨质疏松 白细胞介素 6 骨形态计量学 大鼠

Relationship between IL-6 in serum or bone and bone histomorphometric data in ovariectomized rats

Wei Peng¹ and Li Fobao²

^① Dept. of Orthopedics, Hospital Affiliated to North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

^② Dept. of Orthopedics, First Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, China

Abstract Objective To explore the relation between IL-6 in microenvironment of serum or bone and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rats, we measured the IL-6 levels in serum and bone culture liquid and investigated the changes in bone histomorphometric data. **Methods** Forty female SD rats were randomly divided into 4 groups, each consisting of 5 ovariectomized (OV) and 5 sham-operated as controls. At postoperative weeks 4, 10, 16, 22, the rats of OVX groups and sham-operated groups were sacrificed. The IL-6 levels in serum and bone culture were measured by ELISA. We observed the data of bone histomorphometry including TBV, MTT, FS, RS, LS, and MAR with automatic

本课题为美国中华医学基金会资助

作者单位: 637000 四川南充, 川北医学院附属医院骨科(蔚 芃), 中山医科大学附属第一医院骨科(李佛保)

imaging analysis system. **Results** Correlation analysis showed that in the OVX groups there was positive correlation between serum IL-6 levels and RS. But the levels of IL-6 in the bone were positively correlated with RS and FS, and negatively correlated with TBV and MTT. According to the values of correlation coefficients of OVX groups, the correlation degree between IL-6 levels in bone and data of bone histomorphometry ranked in the following decreasing order; RS > MTT > FS > TBV. **Conclusion** The results of bone histomorphometry demonstrated that the increase of IL-6 levels in serum and bone microenvironment can improve the osteoclastic resorption and enhance the RS. When the RS increased, the FS also increased, but the extent of increase in FS was lower than that in RS, so that part of bone mass was lost in a cycle of bone remodeling. After several cycles, TBV and MTT decreased and osteoporosis occurred.

Key words Ovariectomy Rat IL-6 Bone histomorphometry Osteoporosis

骨质疏松的病理过程是持续性进行性加重过程。近年来细胞因子在骨质疏松中的作用正逐步被研究者们所发现。在骨微环境中多种细胞因子的相对稳定状态被破坏,将影响到骨改建活动的内在平衡,引起骨代谢活动的紊乱,导致骨质疏松的病理过程出现。白细胞介素6 (IL-6)是最近发现与绝经后骨质疏松症发病机制关系密切的细胞因子^[1]。本研究考察了去势SD大鼠在不同时期血清和骨组织的培养液中IL-6浓度的变化,并用计算机图象分析系统对同期不脱钙骨组织切片进行骨形态计量学检查,获得其骨结构、骨形成、骨吸收和骨动力学参数的动态变化情况。运用统计学方法分析,比较和判断其变化及其相关关系。以了解IL-6在骨改建活动中对骨吸收与骨形成动态平衡的影响。

1 材料与方法

1.1 动物实验

实验动物分组:40只4月龄雌性SD大鼠,体重 220 ± 15 克,随机分为4组,每组10只鼠,在每组中再分实验组5只,对照组5只。各组动物分笼喂养,自由饮水,室内温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

动物手术:3%戊巴比妥钠腹腔内麻醉。实验组经腹行双侧卵巢切除术,对照组开腹后将卵巢提出腹腔后还纳关腹。按术前分组分笼喂养。

1.2 标本收集与制作 于术后4、10、16、22

周,心脏穿刺抽血处死一组动物,在处死动物前13天和3天分别按 30mg/kg 腹腔注射四环素。

血清标本的收集:心脏穿刺抽血离心,上层血清于 -70°C 保存。

骨组织培养:无菌切取大鼠右侧股骨和胫骨,剪碎为 1mm^3 的碎块、称量2克骨碎块,置入3ml RPMI 1640培养液里,常规条件下培养48小时,培养液离心,上清液 -70°C 储存备用。

不脱钙骨标本制作:大鼠左侧胫骨上端,中性福尔马林固定,乙醇梯度脱水,丙酮脱脂,二甲苯透明。在3:7的甲酯和丁酯混合物中包埋。用Lizte切片机切出 $10\mu\text{m}$ 和 $7\mu\text{m}$ 的切片, $7\mu\text{m}$ 切片1%甲苯胺蓝染色,中性树脂封片。 $10\mu\text{m}$ 切片直接用中性树脂封片。

1.3 IL-6检测

使用鼠IL-6 ELISA试剂盒(美国Genzyme公司产,96KT,灵敏度 $<5\text{pg/ml}$)。按照ELISA检测的标准程序,检测各组血清及骨组织培养液中IL-6的浓度。

1.4 骨组织形态计量学检查

用计算机图像分析系统,对骨生长线下面1mm的范围,选择2~3个视野,检测下述参数。骨小梁体积比(TBV,%)、骨小梁平均厚度(MTT, μm)、骨形成表面(FS,%)、骨吸收表面(RS,%)、四环素标记百分比(LS,%)、骨矿化沉积速率(MAR, $\mu\text{m/d}$)。

1.5 统计分析方法

利用 Windows 95 Spss 统计软件在 IBM586 微机上,对实验结果进行 t 检验、方差分析、相关关系分析。

2 结果

2.1 血清及骨组织培养液中 IL-6 的测定结果 (图 1)

在术后第 4 周实验组无论血清还是骨组织中 IL-6 浓度就大于对照组 ($P < 0.05$),并且在之后的时间内一直保持较高的浓度 ($P < 0.05$)。在实验中我们分别比较实验组和对照组在不同时间内 IL-6 的水平后发现:骨组织培养液中 IL-6 浓度高于血清中 IL-6 的浓度 ($P < 0.001$)。实验组血清和骨组织培养液中 IL-6 浓度的变化无显著性差异。

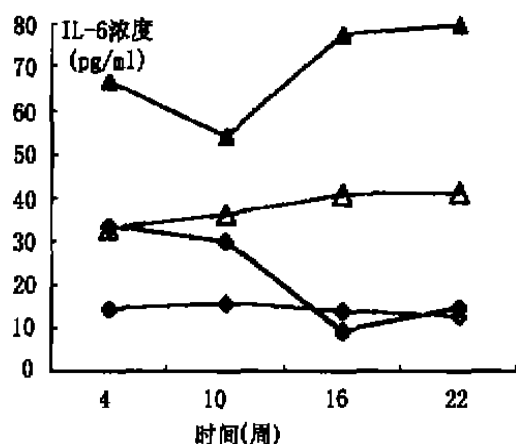


图 1 血清及骨组织培养液中 IL-6 浓度的变化

—◆—OV-Blood; —◇—Sham-Blood;
—▲—OV-Culture; —△—Sham-Culture

2.2 骨组织计量学参数的测量结果

2.2.1 骨小梁体积比的测量 (图 2)

TBV 测得值在术后,实验组均低于对照组 ($P < 0.002$)。在术后对照组大鼠 TBV 逐步增加,经方差分析差异有显著性 ($P < 0.05$)。而实验组却逐步下降 ($P < 0.05$)。

2.2.2 骨小梁骨形成表面的测量 (图 2)

FS 在术后第 10 周实验组逐渐高于对照组 ($P < 0.05$)。对照组 FS 从术后第 4 周缓慢下

降,在第 22 周才与第 4 周有差异 ($P < 0.05$),而实验组术后第 4 周至第 10 周上升缓慢,差异无显著 ($P > 0.05$),在第 16 周上升加快并与前两周有显著性差异 ($P < 0.02$)。

2.2.3 骨小梁骨吸收表面的测量 (图 2)

实验组的 RS 从术后第 4 周起一直高于对照组 ($P < 0.02$)。无论实验组还是对照组其 RS 在术后的 22 周内的变化均无显著性意义 ($P > 0.05$)。

2.2.4 四环素标记百分比的测量 (图 2)

实验组的 LS 在术后 4、10、16、22 周中,只有第 16 周与对照组间差异有显著性 ($P < 0.05$),而其余三周其差异无显著性 ($P > 0.05$)。术后 22 周内 LS 在实验组和对照组内各周间无明显变化 ($P > 0.05$)。

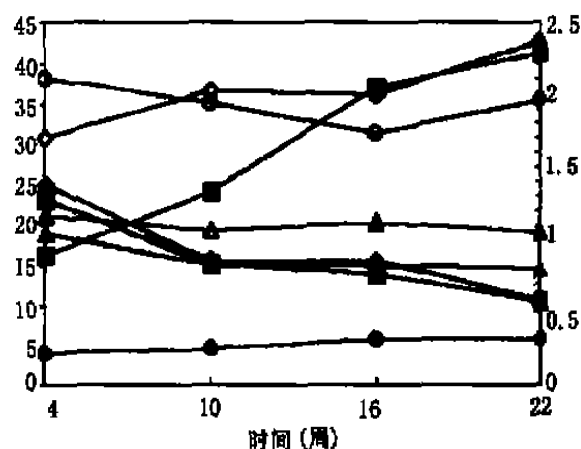


图 2 TBV、RS、LS、FS 的测定结果及变化

—◆—TBV-OV; —◇—TBV-SH; —●—RS-OV; —▲—LS-OV;
—△—LS-SH; —■—FS-OV; —□—FS-SH;
—○—RS-SH

2.2.5 骨小梁平均厚度的测定 (图 3)

MTT 测得值实验组在不同时期内均低于对照组 ($P < 0.002$)。对照组 MTT 在术后逐步上升,第 22 周与第 4 周经方差分析差异有显著性 ($P < 0.05$)。实验组 MTT 于第 4 周开始逐步下降,且各周间差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2.6 骨矿化沉积速率的计算 (图 4)

实验组与对照组间 MAR 无明显差异 ($P > 0.05$)。初步观察发现:实验组的 MAR 从第

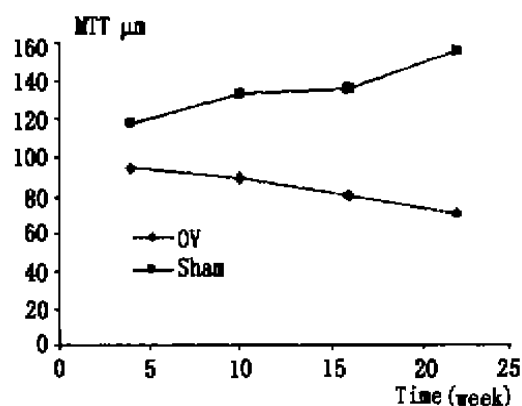


图3 两组 MTT 的变化趋势

4 周慢慢下降至 16 周后再上升,而对照组却是在实验开始时较低然后缓慢上升,但是这种变化经统计学检查不存在显著性意义 ($P > 0.05$)。

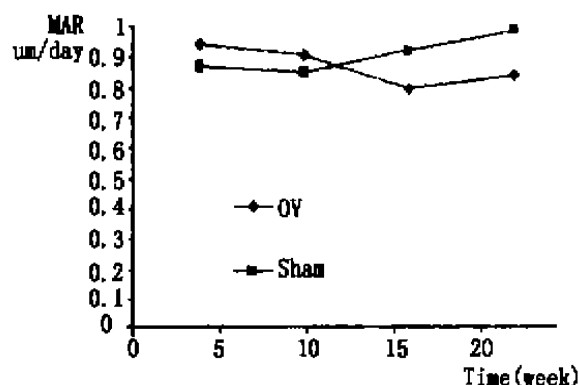


图4 两组 MAR 的变化趋势

2.3 实验组内血清和骨组织中 IL-6 的水平与其骨形态计量学参数间的相关分析

通过计算两者的相关系数后发现:血清中的 IL-6 水平仅与 RS 呈正相关 ($r=0.5279, P=0.017$),而与其它参数间无相关关系。在实验组内骨组织中 IL-6 与其 RS 和 FS 呈正相关 ($r=0.7506, P=0.000$ 和 $r=0.4765, P=0.034$),与 TBV 和 MAR 呈负相关 ($r=-0.4643, P=0.039$ 和 $r=-0.6035, P=0.005$)。与 LS 和 MAR 无相关关系 ($r=0.1002, P=0.647$ 和 $r=-0.2814, P=0.229$)。另外根据其相关系数绝对值的大小,推断骨组织中 IL-6 与各参数间的相关程度依次为:RS>MTT>

FS>TBV。

3 讨论

绝经后骨质疏松是生理性疾病。它表现在女性绝经后的前 10~15 年内,骨量迅速地不可逆地丢失,其主要危害是骨折危险性的增加。该病的危害正为人们所重视。到目前为止虽经过多年的研究,仍未能发现既能增加骨矿密度,又降低骨折发生率且副作用较小的药物。正因这样详细了解绝经后骨质疏松的发病机制,已成为采取更为积极和更为理想的方法,预防和治疗绝经后骨质疏松症的前提。最近,在绝经后骨质疏松发病机制的研究中,IL-6 被认为起了重要作用^[2,4]。

骨组织计量学是新近发展起来的一种骨组织学定量研究方法,它将骨组织切片中二维图象展示的骨组织形态转化为数量资料可以从组织和细胞水平了解骨结构的变化情况^[5]。我们的实验结果提示,正常大鼠随月龄增加,骨髓生长发育而逐步成熟,骨改建速度逐渐减慢。而去势后大鼠骨形成和骨吸收活动均强于正常大鼠。在切除双侧卵巢后第 4 周,RS 和 FS 大于同期的对照组,而在实验组内 RS 大于 FS,提示骨吸收活动大于骨形成活动,而致 TBV 和 MTT 下降,低于同期对照组,出现骨质疏松。

白细胞介素 6 是机体细胞因子网络中一种重要的组成部分,它在机体防御反应机制中起关键作用^[6]。最近 Ohsaki 应用聚合酶链反应、原位杂交、免疫组化技术证实了破骨细胞上有 IL-6R^[7]。目前研究 IL-6 对骨改建的影响,很多是依靠细胞和骨组织的体外培养系统。IL-6 在绝经后体内的变化究竟怎样?我们的结果提示,去势大鼠血清中和骨组织中的 IL-6 水平升高,尤其是骨组织中的 IL-6 水平升高,使骨吸收表面增加,反映了破骨细胞的数量和活性增强,随着骨吸收的增强,机体骨组织中的成骨细胞分泌和合成类骨质的成骨活动亦代偿性增

(转 39 页)

构,参加各种类型的健身活动,使用含Ca、Vit-D的保健品、药品等,也可能是部分老人BMD增高的原因之一。

作者在第一次调查时曾做横截面比较分析(cross-sectional studies, population studies),曾由年龄与BMD的回归方程得出男、女前臂10%,33%部位每10年的BMD下降速率,分别为11.78%、12.68%、7.41%、10.38%,但本次纵向分析(longitudinal studies)的结果却显示这两部位的男、女平均每年的丢失速率分别为2.24%、3.01%、1.46%、1.92%,即纵向分析显示的丢失速率比横截面比较分析时大,Orwoll^[3]也曾介绍过同样的现象。我们认为这两种比较显示出不同的BMD丢失率原因是老年人BMD变化不均衡所致,在一定时期内部分老人BMD或维持不变或有所增高,而大部分老年人则呈下降趋势。采用纵向比较分析,可将BMD下降的老年人区分出来,单独计算这部分老年人的BMD丢失率自然高于横截面分析比较时所得出的BMD丢失率。

参 考 文 献

- 1 沈惠良,雍宜民,周玉芳.北京市老年人腰椎与前臂骨密度的调查及相关分析.中国骨质疏松杂志,1996,2;18.
- 2 Gallacher JC,Goldgar D MoyA. Total bone calcium in normal women: effect of age and menopause status J Bone Miner Res,1987,2;491.
- 3 Orwoll ES,Oviatt SK,McClung MR,et al. The rate of bone mineral loss in normal men and the effects of calcium and cholecalciferol supplementation. Ann Intern Med, 1990,112;29.
- 4 Kanis JA,Adam S. Bone loss in the elderly. Osteoporosis Int,1994,Suppl;1:S59.
- 5 Haddaway MJ,Davie MWJ,McCall IW. Bone mineral density in healthy normal women and reproducibility of measurements in spine and hip using dual energy X-ray absorptiometry. Br J Radiol,1992,65;213.
- 6 Johnston CC,Hui SL,Wiske P,et al. Bone mass and subsequent rates of loss as determinants of osteoporosis. In: Deluca HF,Frost HM,Jee WSS,et al. Osteoporosis: recent advances in pathogenesis and treatment. Baltimore, University Park Press,1981;285~91.

(上接43页)

强,但是由于骨吸收活动增加程度大于形成活动增加程度,使骨小梁上在每一个骨改建周期后所遗留的骨吸收表面始终大于骨形成表面,尽管这种变化是极其缓慢的,但最终仍会导致了骨小梁体积降低和骨小梁平均厚度减少,出现了骨质疏松。

参 考 文 献

- 1 Girasole G,Jilka RL,Passeril G,et al. 17 β -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro. A potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. J Clin Invest,1992,89;883.
- 2 Manolagas SC,Jilka RL. Bone marrow, cytokines and bone remodeling; emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. N Engl Med,1995,332;305.

- 3 Manolagas SC,Bellido T,Jilka RL. New insights into the cellular, biochemical and molecular basis of postmenopausal and real osteoporosis, role of IL-6 and gp130. Int J Immunol,1995,17;109.
- 4 刘祖德. 侯建,戚鸣声. 成骨细胞分泌白细胞介素6及其调控在骨质疏松症中的作用. 中华老年医学杂志,1997,16;24.
- 5 Malluche HH. A new semiautomatic method for quantitation static and dynamic bone histology. Calcif Tissue Int, 1982,31;439.
- 6 Simpson RJ,Moyitz RL,Rubra MR,et al. Murine hybridoma/plasmacytoma growth factor: complete amino acid sequence and relation to human interleukin-6. Eur J Biochem,1988,176;187.
- 7 Ohsaki Y,Takahashi S. Evidence for an autocrine/paracrine role for interleukin-6 in bone resorption by giant cells from giant cell tumor of bone. Endocrinology 1992, 131;2229.