

绝经后骨质疏松症与血清 IL-6, TNF- α 浓度关系的临床研究

周丕琪 沈霖 杜靖远 杨艳萍 谢晶 高兰 刘保平

【摘要】 目的 研究绝经后骨质疏松症与血清 IL-6 及 TNF- α 浓度关系。**方法** 选择绝经后骨质疏松患者 30 例,采用 Elisa 检测其血清中 IL-6, TNF- α 水平,并与正常青年妇女对照。**结果** 绝经后骨质疏松症患者 IL-6, TNF- α 水平较正常组明显升高(P 均 < 0.01)。且与骨密度呈负相关。**结论** 绝经后雌激素减少,导致末梢血单核细胞产生的 IL-6 及 TNF- α 等细胞因子过量,而 IL-6 及 TNF- α 过量分泌会刺激破骨细胞性骨吸收活性,导致骨质疏松症的发生。

【关键词】 绝经后骨质疏松症; 白细胞介素 6; 肿瘤坏死因子

Relationship between postmenopausal osteoporosis and serum IL-6 and TNF- α levels ZHOU Piqui, SHEN Lin, DU Jingyuan, et al. Xiehe Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022, China

【Abstract】 Objective To study the relationship between postmenopausal osteoporosis and serum IL-6 and TNF- α levels. **Methods** Serum IL-6 and TNF- α levels in 30 patients with postmenopausal osteoporosis were measured by ELISA, and compared with those in 30 healthy women. **Results** The serum IL-6 and TNF- α levels in the patients were significantly higher than those in the healthy women ($P < 0.01$). At the same time, the serum IL-6 and TNF- α levels were negatively correlated with bone mineral density. **Conclusion** Postmenopausal diminution of estrogen may bring about excessive secretion of IL-6 and TNF- α by peripheral blood mononuclear leucocytes while IL-6 and TNF- α stimulate osteoclastic bone resorption.

【Key words】 Postmenopausal osteoporosis; Interleukin 6; Tumor necrosis factor

骨质疏松症是一种老年性常见疾病,尤以绝经后妇女为甚,其所引起的驼背畸形,全身骨痛以及骨质疏松性骨折,已经严重影响了中老年妇女的正常生活和身体健康。研究表明,随着妇女绝经后雌激素水平降低,导致一系列细胞因子如白细胞介素 1 (IL-1),白细胞介素 6 (IL-6),肿瘤坏死因子 (TNF) 等在体内分泌增多,由此推测,雌激素减少后出现的骨吸收增强最先是 IL-6 启动的。由 IL-6 诱导的破骨活性增强,溶骨所释放的产物激活巨噬细胞产生更多的细胞因子包括 TNF,后者反过来增加和扩大溶骨的应答。因此 IL-6 及 TNF- α 近年来被认为是病理条件下调节骨吸收的重要因子,它们与雌激素的关系更是研究的热点。为此本研究采用酶联免疫检测法,对 30 例临床确诊为骨质疏松症的绝经后妇女血清中 IL-6 及 TNF- α 水平进行检测,并与正常青年妇女对照,以探讨绝经后骨质疏松症与血清 IL-6 及 TNF- α 水平的关系。

临床资料

1. 病例选择

本组 30 例绝经后妇女均在临床上确诊为骨质疏松症,病例选择参照“骨质疏松症综合分析诊断评分指标”^[1]。评分均 ≥ 6 分。患者年龄最大为 59 岁,最小为 52 岁,绝经时间最长为 10 年,最短为 5 年。30 例青年妇女临床诊断排除骨质疏松症,年龄最大 33 岁,最小 28 岁。以上对象均排除患有慢性肝、肾、胃肠疾病和各种内分泌疾病,免疫系统疾病,白血病,骨髓瘤,淋巴瘤;也排除了患有精神病,老年性痴呆,神经官能症;过度嗜烟 (≥ 20 支/日) 或过度饮酒 (> 70 ml/d) 者不入选。一般情况见表 1。

表 1 绝经后骨质疏松症妇女与正常妇女一般情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄 (岁)	绝经年龄 (年)
绝经后骨质疏松组	30	54.13 $\pm$ 5.964	8.137 $\pm$ 2.728
正常青年妇女组	30	30.14 $\pm$ 2.92	—

2. 实验材料及仪器

(1) 标本收集:抽取检测对象的静脉血 2 ml,置无菌带塞试管中离心 ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min) 分离出

基金项目:卫生部科学基金资助项目 (96-1-153)

作者单位:430022 武汉,同济医科大学附属协和医院骨科研究室

血清,标本放置于低温冰箱(-30°C)中保存,避免反复冻融,待标本收集齐后统一测试。

(2)试剂:夹心法 Elisa 检测 IL-6 试剂盒由北京邦定生物医学公司提供,批号为 971027,敏感性可达 $100\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。人肿瘤坏死因子酶联免疫检测盒由北京邦定生物医学公司提供,批号为 970921,灵敏度可达 $100\sim 600\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。抗 TNF- α 抗体包被酶联板由军事医学科学院四环医学高技术开发部生产。

(3)主要仪器:美国 Hologic 2000 PLUS 型双能 X 线骨密度仪。美国 ELX800 酶联检测仪。

3. 检测方法

(1)IL-6 检测操作步骤:①包被:将稀释好的包被抗体加入 Elisa 板 $100\text{ }\mu\text{l}/\text{孔}$, 4°C 放置 48 h。②加待检标本:洗涤液冲洗 Elisa 板 3 次,加待测样品,阴性对照及倍比稀释的标准品, $100\text{ }\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C , 1 h, 标准品稀释方法:取 rHu IL-6,先用稀释液做 4 倍稀释,再倍比稀释为 9 个浓度: $20\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $10\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $5\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2.5\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1.25\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.625\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.312\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.156\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.078\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。③加酶标抗体:洗板 3 次,加入稀释好的酶标抗体, $100\text{ }\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C , 1 h。④显色:洗板 3 次,加入配好的 ABTS 显色液, $100\text{ }\mu\text{l}/\text{孔}$, 室温或 37°C 显色 15~30 min。⑤ELX800 酶联仪读数测 410 nm 处 OD 值,绘制标准曲线。

(2)TNF- α 检测实验步骤:①TNF 标准品配制:取 TNF 标准品 $10\text{ }\mu\text{l}$ 加样品稀释液 $990\text{ }\mu\text{l}$,即配制成浓度为 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 A 溶液;取 A 溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$ 加样品

稀释液 $900\text{ }\mu\text{l}$,即配制成浓度为 $100\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 B 溶液;取 B 溶液 $200\text{ }\mu\text{l}$ 加样品稀释液 $800\text{ }\mu\text{l}$,即配制成浓度为 $20\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的溶液;依此方法,分别配制浓度 $4\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $800\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $160\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $32\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 标准品溶液。②使用前将板取出至室温后打开。③加 TNF 标准品和样品 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{孔}$,同一样品和标准品要加 2 孔,放湿盒内室温($18\sim 25^{\circ}\text{C}$)2 h。④去掉孔内液体,注满洗板液,3 min 后去掉,共洗 3 次。⑤加稀释好的酶标“兔抗”TNF, $100\text{ }\mu\text{g}/\text{孔}$,湿盒内,室温 1 h。⑥洗板 3 次,每次 3 min。⑦加新配制底物液 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{孔}$,室温反应直至标准曲线明显时终止,约 10~15 min。反应时将板加盖蔽光。⑧加 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{孔}$ 终止液,终止反应。⑨ 450 nm 酶联仪测定结果,将 2 孔 OD 值平均。

(3)骨密度测定:采用美国产 Hologic 2000 PLUS 型双能 X 线骨密度仪测腰椎椎体前后位 BMD。受试者平卧仪器床上,骨密度仪对其腰椎进行测量检查,骨矿含量等参数值由仪器计算机自动打印输出。

结 果

1. 绝经后骨质疏松症妇女组与正常青年妇女组腰椎骨密度比较:BMD 值表示骨矿物密度,T 值表示被测人的骨密度与同性别年轻人对照组之差别,Z 值是表示被测人的骨密度与同性别、同年龄对照组的平均骨密度之差别。绝经组 BMD 值、T 值、Z 值均明显低于正常青年妇女组,两组间差异非常明显(P 均 <0.01),见表 2。

表 2 绝经后骨质疏松组与正常组腰椎骨密度比较($\bar{x}\pm s$)

部位	BMD($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)		T		Z	
	绝经组	正常组	绝经组	正常组	绝经组	正常组
L_1	0.591 ± 0.082	0.734 ± 0.082	-3.02 ± 0.67	-1.21 ± 0.32	-2.42 ± 0.32	-0.82 ± 0.11
L_2	0.665 ± 0.094	0.806 ± 0.124	-2.92 ± 0.53	-0.92 ± 0.17	-2.45 ± 0.35	-0.79 ± 0.10
L_3	0.614 ± 0.087	0.762 ± 0.103	-3.21 ± 0.74	-0.98 ± 0.21	-2.61 ± 0.42	-0.93 ± 0.14
L_4	0.655 ± 0.102	0.793 ± 0.103	-3.34 ± 0.81	-1.03 ± 0.28	-2.67 ± 0.39	-0.97 ± 0.14
L_{1-4}	0.631 ± 0.091	0.774 ± 0.102	-3.07 ± 0.72	-0.94 ± 0.19	-2.38 ± 0.31	-0.87 ± 0.12

2. 绝经后骨质疏松症妇女与正常青年妇女血清 IL-6 及 TNF- α 水平比较:绝经组血清 IL-6 及 TNF- α 水平均明显高于正常青年妇女组,显示两组间均有明显差异($P<0.01$),见表 3。

表 3 绝经后骨质疏松组与正常组血清 IL-6 及 TNF- α 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	IL-6($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	TNF- α ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$)
绝经组	420.3 ± 87.4	331.7 ± 35.92
正常组	7.2 ± 1.3	83.7 ± 10.4

3. 绝经后骨质疏松症妇女与正常青年妇女血清 IL-6 及 TNF- α 水平与骨密度比较: 绝经后妇女的血清 IL-6 含量为 $(420.3 \pm 87.4) \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$, TNF- α 含量为 $(331.7 \pm 35.92) \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$, 骨密度为 $(0.631 \pm 0.091) \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。统计显示: IL-6 与 BMD 呈负相关 ($r = -0.844$), TNF- α 与 BMD 呈负相关 ($r = -0.850$)。而正常青年妇女血清 IL-6 及 TNF- α 水平与骨密度无明显相关性。

讨 论

正常骨代谢周期, 其骨吸收和骨形成维持在一种动态平衡状态。破骨细胞的骨吸收活动和成骨细胞的骨形成活动相互偶联, 不断进行着骨重建。一旦偶联被打破, 平衡失衡, 破骨细胞的骨吸收活动相对增强或成骨细胞的骨形成活动相对减弱, 骨吸收大于骨形成发生骨质丢失, 导致骨质疏松。

女性绝经后骨质疏松, 多发生在绝经后 5~10 年内。众所周知, 雌激素的缺乏是绝经后骨质疏松症发病中的重要因素。临床上应用雌激素替代疗法能减少骨质疏松的发生。但是雌激素防止骨质疏松的机理一直不很清楚。

目前, 已经证实骨微环境中产生大量的免疫及造血因子, 这些复杂的、作用相互重叠的因子影响骨的形成和吸收^[3], 其中主要包括白细胞介素 1 (IL-1), 白细胞介素 6 (IL-6), 肿瘤坏死因子 (TNF), 巨噬细胞集落刺激因子 (CM-CSF), 颗粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。雌激素调节骨髓细胞, 骨细胞产生细胞因子, 细胞因子调控骨改建的过程。

IL-1 与 TNF 不仅是最强的骨吸收促进剂, 而且抑制骨的形成, IL-1 与 TNF 通过作用于成骨细胞间接激活成熟的破骨细胞, 并抑制破骨细胞的凋亡^[4]。另外, 它们都可通过直接刺激前破骨细胞增殖, 增强基质细胞中前破骨源性细胞的活性来促进破骨细胞的形成^[5]。IL-1, TNF 作为诱导剂, 可调节破骨细胞前体细胞分化为成熟破骨细胞的 IL-6 等因子的分泌。IL-6 促进人和小鼠破骨细胞的早期形成, IL-6 在富含前破骨细胞的胎鼠的掌骨培养中促进骨吸收^[6]。体内外大量实验证实, IL-6 增加破骨细胞形成, 刺激骨吸收。早在 1990 年, Noriyoshi^[7] 研究发现 IL-6 可刺激长时间人骨髓培养中的破骨细胞多样核细胞形成。Roodman 也证实了这一点, 并报道加入 IL-6 抗体可抑制破骨细胞形成吸收陷窝^[8]。用 IL-6 基因缺失的小鼠进行实

验, 切除这些小鼠卵巢后未出现骨量丢失, 而正常小鼠去势后很快出现骨量下降^[9]。这是因为正常小鼠去势后, 雌激素下降, 使 IL-6 的表达增加, 增强骨质吸收。破骨细胞起源于骨髓造血干细胞, 具体地说, 起源于粒细胞/巨噬细胞克隆形成单位 (CFU-GM), 其形成包括由 CFU-GM 经过增殖形成单核破骨细胞前体, 后者融合形成多核巨细胞, 再经过活化后形成成熟的破骨细胞。IL-6 主要作用于破骨细胞形成的早期阶段, 通过增加 CFU-GM 形成、增加破骨细胞早期前体的分裂, 加强破骨细胞骨吸收而在骨质吸收中发挥重要作用。

TNF- α 是一种强有力的骨吸收诱导剂, 可使破骨细胞活性增强, 人类 TNF- α 基因转染的中国田鼠细胞可持续产生 TNF- α , 并使裸鼠破骨细胞的骨吸收作用增强, 出现高钙血症。TNF 可刺激长期人类骨髓培养中的类破骨细胞形成。TNF 可刺激类破骨细胞的前体增生并分化为破骨细胞。RT-PCR 技术研究表明^[10], 绝经后骨质疏松骨折妇女、正常绝经后妇女及绝经后采用雌激素替代疗法妇女 TNF- α mRNA 的表达分别为 63%、60% 和 10%。

IL-6 在体内通过 IL-1、TNF、PTH 等由骨原细胞基质细胞产生, 亦可借助 T 淋巴细胞和细胞粘附作用, 由骨原细胞诱导。其功能是促进破骨细胞生成, 可使 GM-CFU 增生, 与其他骨吸收因子共同作用, 促进骨吸收; IL-6 作为分化诱导因子, 使骨髓细胞分化诱导单核, 巨噬细胞, 并促进巨噬细胞产生 IL-1, 从而加速破骨细胞形成, 促进骨吸收, 由巨细胞瘤而来的破骨细胞样细胞所分泌 IL-6, 具有自分泌性、旁分泌性多样调节作用, 其中有促进破骨细胞活性作用。

TNF 既可由骨原细胞产生, 又可由 IL-6、GM-CSF (粒细胞/单核细胞集落刺激因子) 诱导产生, 在骨髓中, TNF 通过自分泌和旁分泌作用, 作用于骨原细胞巨噬细胞, 即是说 TNF 可诱发骨原细胞产生 IL-1, IL-6, 从骨髓基质细胞产生 IL-11。

绝经后骨质疏松的病因是雌激素减少, 雌激素水平降低, 导致 IL-6 及 TNF 等骨吸收细胞因子产生过量。血清中 IL-6 水平与血清中雌激素水平呈负相关, 已被实验所证实^[11,12], 我们观察也发现绝经后骨质疏松症妇女血清中 IL-6 及 TNF- α 水平不仅明显高于正常青年妇女, 而且与骨密度呈负相关, 从临床上证实了 IL-6 及 TNF- α 参与了绝经后骨

(下转第 8 页)

鼠足肿胀、抑制佐剂性关节炎,对胶原及花生四烯酸造成的小鼠凝集致死也有抑制作用,推测淫羊藿中可能存在抗炎成分并能阻断与花生四烯酸代谢有关的环氧酶^[14],这些很可能与 EKF 影响骨代谢有关。骨形态计量学结果表明,EKF 组 TRS%、TFS% 等较模型组明显降低,TBV% 明显提高,提示其能抑制去卵巢大鼠的骨高转换率。详细的作用机理有待进一步证实。

致谢:本文大鼠骨密度承蒙北京中日友好临床医学研究所秦林林医师协助测定,特此致谢

参 考 文 献

- 1 沈烈行,徐瑞军,房广星.淫羊藿药理作用研究进展.中医药信息,1996,(5):22-23.
- 2 熊跃斌,周楚华.淫羊藿及菟丝子提取物对雄性生殖功能的影响.中国药理学杂志,1994,29(2):89-91.
- 3 李青南,吴铁,谢华,等.淫羊藿提取物对去势大鼠骨代谢的影响.中草药,1993,24(12):637-638,658.
- 4 高子范,杨宗智,马克昌,等.淫羊藿注射液对试管内鸡胚骨生长的促进作用.中西医结合杂志,1985,5:172.
- 5 李青南,廖进民,吴铁,等.淫羊藿提取液防治激素所致大鼠骨质疏松的实验研究.中国药理学杂志,1996,31:467-470.
- 6 刘康,季晖,李绍平,等.三种大鼠骨质疏松模型的比较研究.中国骨质疏松杂志,1998,4(4):13-18.
- 7 章明敏,张乃鑫,谭郁彬,等.周期性给予羟乙酸钠对去势大鼠骨质疏松症治疗作用的比较.中国骨质疏松杂志,1995,1:104-107.
- 8 刘和娣,李恩,佟晓旭.钙剂对实验性骨质疏松大鼠多指标的影响.中国骨质疏松杂志,1997,3(3):61-63,88.
- 9 徐贵发,赵长峰,韩玉荣,佳钙宝及其它钙剂中钙吸收利用率的对比研究.中国骨质疏松杂志,1996,2(4):33-35.
- 10 王天然,邢善田,周金黄.淫羊藿总黄酮促进免疫功能的实验.中成药研究,1987,(2):27-28.
- 11 王一冲,何球藻.柔毛淫羊藿提取液对小鼠免疫反应影响的体内观察.上海免疫学杂志,1986,6:6.
- 12 李柏青,黄谷良,林特夫II,仙灵脾对小鼠迟发性足垫反应的影响.蚌埠医学院学报,1985,10:163.
- 13 朱朝德,徐世明,刘永隆.淫羊藿的研究概况.西北药理学杂志,1990,1(3):41.
- 14 篠原达雄,等.淫羊藿浸膏抗炎作用的药理研究.国外医药植物药分册,1997,12(6):272.