

利塞膦酸钠对绝经后骨质疏松患者外周血单核细胞的影响

李裕明 张众志 王琳芳 陈璐璐

摘要: **目的** 观察利塞膦酸钠对绝经后骨质疏松症患者外周血单核细胞(PBMC)分泌肿瘤坏死因子(TNF- α),白细胞介素 1(IL-1),白细胞介素-6(IL-6)水平及 PBMC 细胞数目的影响。**方法** 采用双盲法将 54 名绝经后骨质疏松妇女随机分为治疗组和对照组,所有患者在用药前和用药后 6 月进行外周血单核细胞(PBMC)培养,并以放射免疫方法(RIA)检测培养上清中 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平,计录 PBMC 细胞数目改变。**结果** 利塞膦酸钠治疗组服药 6 月后,PBMC 培养上清中 TNF- α 、IL-1 水平较治疗前有所下降,IL-6 较前增加,与对照组无统计学差异,PBMC 细胞数目也无明显改变($P > 0.05$)。**结论** 利塞膦酸钠作为一种骨吸收抑制剂,口服治疗对 PBMC 分泌细胞因子(IL-1、IL-6 和 TNF- α)及细胞数目并无明显影响,这些结果提示利塞膦酸钠并未通过影响 PBMC 参与骨代谢调节。

关键词: 利塞膦酸钠; 绝经后骨质疏松; 外周血单核细胞; 细胞因子

Influence on human peripheral blood mononuclear cells after oral administration of residronate sodium in postmenopausal women with osteoporosis LI Yuming, ZHANG Zhongzhi, WANG Linfang, et al. Department of Endocrinology, Tongji Medical College Union Hospital, Wuhan 430022, China

Abstract: **Objective** To assess the influence on human peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) after oral administration of residronate sodium for treatment of postmenopausal women with osteoporosis. **Methods** A randomized, double blind study was conducted among 54 postmenopausal women with osteoporosis. The concentration of cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α) in PBMC culture medium were determined, and the amount of PBMC also analyzed before and 6 months after the administration of residronate sodium. **Results** No significant difference was found in cytokine concentration between residronate and placebo group 6 months after oral administration and the amount of PBMC ($P > 0.05$). **Conclusions** No evidence was shown in this study that residronate sodium takes part in bone metabolism by affecting PBMC.

Key words: Residronate sodium; Osteoporosis; Mononuclear cell; Cytokine

双膦酸盐作为骨吸收抑制剂广泛应用各种代谢性骨病,如 Paget's 病、骨质疏松症及高钙血症等。本研究观察经利塞膦酸钠治疗绝经后骨质疏松症(OP)患者外周血单核细胞分泌细胞因子(IL-1, IL-6 和 TNF- α)及细胞数目的改变,探讨利塞膦酸钠治疗绝经后骨质症过程中,外周血单核细胞是否受到药物影响而参与骨代谢的调节。

1 材料和方法

1.1 研究对象

符合下列标准且知情同意者参加本研究:年龄 45 ~ 72 岁且绝经 1 年以上妇女 54 人,平均年龄 58.26 ± 6.14 岁,无器质性疾病及烟酒嗜好,排除其它骨代谢性疾病以及未服用过影响骨代谢的药物,其中腰椎(L₂₋₄)的骨密度(BMD)在本地区健康女性骨量峰值的 -2.5 标准差以下。采用随机双盲对照试验,治疗组 28 人、对照组 26 人。

1.2 药品及用法

利塞膦酸钠(residronate,批号:2002 HL 0192),每片含利塞膦酸钠 5 mg;安慰剂的外形、色泽与治疗药相同,均由河南天方药业股份有限公司提供。钙剂:由惠氏-百宫制药有限公司生产的钙尔奇 D(CaltrateD),每片含元素钙 600 mg,维生素 D 125 IU。服药:骨密度测定 2 w 内开始用药,晨起空腹口服利

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院内分泌科

通讯作者:李裕明,Email:liyuming@medmail.com.cn

塞磷酸钠或安慰剂 1 片,30 min 后方可进餐。所有受试者,傍晚加服钙尔奇 D 1 片。

1.3 细胞培养和细胞因子测定

所有受试者均在用药前和实验 6 个月行外周血单核细胞(PBMC)分离及取培养上清液,方法与步骤相同。取受试者空腹静脉血 5 ml 抗凝,严格无菌操作,Ficoll 分离液(上海试剂二厂)梯度离心法分离外周血单核细胞(PBMC),以 Hank's 液洗涤 3 次,10% 小牛血清(FCS)的 RPMI 1640 完全培养液配成 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液,吸入 24 孔培养板,加入中浓度 $100 \mu\text{g/ml}$ PHA-P(美国 Serva 公司)置于 37°C ,5% CO_2 孵箱中培养 72 h,收集上清液装入冻存管 -70°C 保存。采用放免法(RIA)集中测定上清中 TNF- α , IL-1、IL-6 含量,细胞因子水平变化百分比按(试验后-试验前)/试验前 $\times 100\%$ 计算。

1.4 PBMC 计数

取受试者空腹静脉血 2 ml,由华中科技大学同济医学院附属协和医院生化实验室检测 PBMC 分类计数,记录 0 m 和 6 m 淋巴细胞和单核细胞治疗后变化率(%)。

1.5 统计学方法

所有的统计检验均采用双侧检验,结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, P 值小于或等于 0.05 将被认为所检验的差别有统计意义。采用 wilcoxon 秩和检验对用药 6 个月及用药前的变化进行比较。

表 1 PBMC 分泌细胞因子检测值及细胞计数

组别	IL-1 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (ng/ml)	淋巴细胞 ($\times 10^{-9}/\text{L}$)	单核细胞 ($\times 10^{-9}/\text{L}$)
治疗组					
0 w	111.35 $\pm$ 27.34	93.54 $\pm$ 21.62	1.45 $\pm$ 0.28	3.34 $\pm$ 0.54	0.56 $\pm$ 0.11
6 w	108.48 $\pm$ 24.76	92.52 $\pm$ 26.35	1.41 $\pm$ 0.44	3.36 $\pm$ 0.23	0.54 $\pm$ 0.16
对照组					
0 w	109.63 $\pm$ 31.44	94.33 $\pm$ 18.82	1.43 $\pm$ 0.61	3.35 $\pm$ 0.34	0.55 $\pm$ 0.18
6 w	107.29 $\pm$ 28.52	92.26 $\pm$ 25.84	1.42 $\pm$ 0.48	3.34 $\pm$ 0.42	0.54 $\pm$ 0.25

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 2 PBMC 分泌细胞因子及细胞数的变化率(%)

组别	IL-1	IL-6	TNF- α	淋巴细胞	单核细胞
治疗组	-2.46 $\pm$ 0.81	-1.54 $\pm$ 0.65	-1.94 $\pm$ 0.57	0.81 $\pm$ 0.12	-3.52 $\pm$ 1.08
对照组	-1.58 $\pm$ 0.74	-2.07 $\pm$ 0.73	-0.92 $\pm$ 0.35	-0.56 $\pm$ 0.08	-2.44 $\pm$ 0.45

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2 结果

2.1 如表 1 所示,在 0 w 和药物治疗后 6 w 时治疗组和对照组 PBMC 分泌细胞因子(IL-1、IL-6、TNF- α)及两组 PBMC(淋巴细胞和单核细胞)细胞数目并无显著差异。

2.2 用秩和检验治疗组和对照组检测治疗前后细胞因子和细胞数的变化率改变,结果如表 2,治疗组 IL-1 和 TNF- α 较治疗前呈下降趋势,IL-6 有所升高,但与对照组比较无统计学意义;药物组 PBMC 中淋巴细胞稍有增加,单核细胞较治疗前有所下降,与对照组改变无显著差异性。

3 讨论

绝经后骨质疏松症是一种威胁女性健康的常见病,主要发病机制是雌激素缺乏导致相关细胞因子(如 IL-1、IL-6 和 TNF 等)在骨组织释放增加,促进破骨细胞形成并激活细胞活性,导致骨吸收增强,骨量丢失加快。骨微环境中有大量的细胞因子,它们多由单核-巨噬细胞、成骨细胞、破骨细胞等分泌,对骨吸收和骨形成的调节作用相互交错重叠。有的促进破骨细胞前体增殖分化为成熟的破骨细胞和/或直接刺激成熟的多核破骨细胞功能,使骨吸收增加。相反,也有一些细胞因子抑制破骨细胞成熟,促进其凋亡,从而抑制骨吸收。

体内循环的细胞因子主要由外周血单核细胞(如淋巴细胞,单核细胞等)产生,在免疫系统细胞间起互相联系的介导作用。近年来有研究发现 OP 患者 PBMC 培养上清 IL-1、IL-6、TNF- α 显著高于非 OP 对照组,3 种细胞因子间有明显正相关关系,可认为 PBMC 与 OP 的发生发展有关联^[1],骨转换活跃时 PBMC 分泌细胞因子增加可能与骨基质分解物增加有关^[2],这存在可能 PBMC 通过分泌细胞因子参与骨重塑。体内研究用人工合成 TNF、IL-1 注入体内可促进骨吸收,结果提示机体循环细胞因子对骨组织重建有调节作用^[3]。TNF 和/或 IL-1 也可诱导破骨细胞形成,它们与外周血单核细胞培养,同时加入 M-SGF,可有多核细胞形成,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)染色阳性,细胞可有促进骨吸收陷窝形成作用,这是与 RANK/RANKL 作用不同的破骨细胞形成途径^[4]。

双膦酸盐作为一种骨吸收抑制剂广泛应用于各种代谢性骨病,其作用机制主要是在骨组织中聚集,释放后进入破骨细胞,抑制破骨细胞的活性,诱导细胞凋亡^[5]。近年来有研究发现双膦酸盐也作用于成骨细胞,可抑制细胞因子(IL-1、IL-6、TNF- α)释放,缓解 OP 的发展^[6,7]。而双膦酸盐对 PBMC 的作用也引起了许多研究者的注意。破骨细胞与巨噬细胞都来源于单核细胞,可以相信双膦酸盐不仅影响骨代谢,它也可能影响免疫反应。体外研究,双膦酸盐抑制

骨髓造血细胞系中单核-巨噬细胞的增殖,研究者认为类似双膦酸盐作用于破骨细胞机理,单核-巨噬细胞也即前破骨细胞通过胞饮作用选择性摄入双膦酸盐,导致细胞因子产生减少而削弱破骨细胞的形成和活性^[8]。也有不同的研究结果,在培养人 PBMC 中加入 Alendronate (100 μ M) 孵育过夜,可观察到 PBMC 血管外转移增加;并且测定到 CD 14(+) 和 CD 3(+) 细胞表面黏附分子表达增加,细胞分泌的细胞因子(IL-6、TNF- α)也增多;试验中以 pamidronate 比较也可观察到相似改变。这些结果提示双膦酸盐可影响 PBMC 细胞活性及细胞黏附穿透,而 PBMC 的内皮穿透作用是炎症细胞进入组织或单核细胞进入骨内的关键步骤^[9]。在治疗恶性高钙血症时静脉注射较高剂量双膦酸盐时可观察到一过性体温升高和白细胞缺乏,这显示了双膦酸盐对免疫细胞的促转移作用。

本研究采用不同的方式,观察绝经后骨质疏松患者通过口服双膦酸盐(利塞膦酸钠),接受较长的观察疗程(6 月)后, PBMC 是否有细胞数目改变,细胞功能有无影响,分泌细胞因子有否改变。试验结果提示 PBMC 数目和分泌细胞因子无显著改变。出现这种结果可能有几种可能:1,血循环药物浓度不够,药效范围的剂量(如本研究 5 mg/d 利塞膦酸钠),经口服生物利用度较低,且 50% ~ 70% 聚集在骨组织,血循环浓度约 1 μ g/ml,这与体外研究的药物剂量相差较大;2,尽管 PBMC 上有双膦酸盐的作用靶点^[10],可以直接影响 PBMC,但双膦酸盐主要的作用部位还是在于骨组织,可能减少骨微环境 IL-1、IL-6、TNF- α 的浓度,反馈性的刺激 PBMC 产生细胞因子,从而掩盖双膦酸盐对 PBMC 分泌 IL-1、IL-6、TNF α 的抑制。

尽管本研究未发现 PBMC 产生细胞因子有显著改变,但双膦酸盐对 PBMC 肯定存在影响,是否通过产生细胞因子参与骨代谢调节,有待于进一步体内

体外研究证实。

【参 考 文 献】

- [1] 郑少雄,王桂兰,董建军. 绝经后骨质疏松与外周血单核细胞培养上清细胞因子的关系. 中国骨质疏松杂志,2002,3:199-201.
- [2] Pacifici R, Carano A, Santoro SA. Bone matrix constituents stimulate Interleukin-1 release from human blood mononuclear cells. J Clin Invest, 1991, 87(1):221-228.
- [3] Konig A, Muhlbauer RC, Fleisch H. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption *in vivo* as measured by urinary [³H]tetracycline excretion from prelabeled mice. J Bone Miner Res, 1988, 3(6):621-627.
- [4] Kudo O, Fujikawa Y, Itonaga I, et al. Proinflammatory cytokine TNFalpha/IL-1alpha induction of human osteoclast formation. J Pathol, 2002, 198(2):220-227.
- [5] Frith JC, Monkkonen J, Auriola S, et al. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: Evidence for the formation *in vivo* of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. Arthritis Rheum, 2001, 44:2201-2210.
- [6] Olmos JM, De Vega T, Perera L, et al. Etidronate inhibits the production of IL-6 by Osteoblast-like cells. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1999, 21(8):519-522.
- [7] Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, et al. Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. Scand J Rheumatol, 1998, 27:38-41.
- [8] Cecchini MG, Fleisch H. Bisphosphonates *in vitro* specifically inhibit, among the hematopoietic series, the development of the mouse mononuclear phagocyte lineage. J Bone Miner Res, 1990, 5(10):1019-1027.
- [9] Pietschmann P, Stohlawetz P, Brosch S, et al. The effect of alendronate on cytokine production, adhesion molecule expression and transendothelial migration of human peripheral blood mononuclear cells. Calcif Tissue Int, 1998, 63(4):325-330.
- [10] Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, et al. Stimulation of γ δ -T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. Blood, 2000, 96:384-392.

(收稿日期: 2005-05-19)