

阿仑膦酸钠对假体周围界膜组织分泌 IL-6 影响的实验研究

李前龙 陈超

摘要:目的 观察阿仑膦酸钠对假体周围界膜组织分泌 IL-6 的影响。方法 无菌条件下从股骨分离界膜组织,并将其放入 RPMI 培养液中培养,取 12 孔培养板 3 块,分空白对照组、低浓度固邦组(10%)、高浓度固邦组(20%)培养 72 h,取上清液,酶联法测定 IL-6。结果 与对照组相比,低浓度和高浓度固邦组都能显著抑制界膜组织分泌 IL-6 ($P < 0.01$)。结论 阿仑膦酸钠能显著抑制假体周围界膜组织分泌 IL-6。

关键词: 阿仑膦酸钠; 界膜; 白细胞介素-6

Experimental study of alendronate sodium on IL-6 secretion of periprosthetic interface membranes LI Qianlong, CHEN Chao. Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China

Abstract: **Objective** To explore effect of alendronate sodium on IL-6 secretion of periprosthetic interface membranes. **Methods** Interface membrane dissected aseptically from femurs was cultured in RPMI-1640's medium, three pieces of 12-well culture plate were collected and divided into control group, 10% GuBang group, 20% GuBang group. After incubation of 72h, IL-6 were measured using ELISA kits. **Results** Compared to control, both 10% GuBang group and 20% GuBang group can inhibit IL-6 secretion of periprosthetic interface membranes significantly ($P < 0.01$). **Conclusions** Alendronate sodium can inhibit IL-6 secretion of periprosthetic interface membranes significantly.

Key words: Alendronate sodium; Interface membranes; IL-6

阿仑膦酸钠是第三代含氮二膦酸盐,具有抗骨吸收作用强、副作用小等临床特点。本研究的目的是通过界膜组织培养,评价阿仑膦酸钠对体外培养界膜组织分泌白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂

6 月龄雄性新西兰大白兔 6 只,体重 2.5 ~ 3.0 kg; Hank's 液平衡液, RPMI 1640 培养液, 10% 胎牛血清, IL-6 试剂盒, 阿仑膦酸钠(商品名:固邦, 10 mg × 6 片, 石家庄制药厂制造)。

1.2 界膜组织

患者基本资料:男, 63 岁, 于 2001 年 7 月出现左髋疼痛, CT 检查示:双侧股骨头坏死。2002 年 1 月

29 日行左髋置换术, 术后出现疼痛, 2005 年 7 月 6 日以“左侧全髋置换术后并假体松动”收住, 2005 年 7 月 14 日行左全髋翻修术。

界膜组织提取:提取患髋股骨近端界膜组织 15 g, 低温保存备用。

1.3 方法

1.3.1 固邦含药血清的制备:将 6 只雄性新西兰大白兔随机分为固邦组、对照组, 每组各 3 只。将固邦配制成 0.055 mg/ml 浓度的混悬液(即 10 mg 固邦加入 182 ml 的蒸馏水中), 按兔 0.38 mg/kg 体重/每日用灌胃, 1 次/d, 连续灌胃 7 d, 于最后一次用药后 2 h 行心脏采血, 对照组给予等容积生理盐水灌胃, 采血方法同前。1000 r/min 离心 10 min, 取上清, 56℃水浴 30 min 灭活、抽滤除菌后分装, -20℃保存备用。

1.3.2 体外界膜组织培养:在人工假体周围界膜(15 g)自然解融后, 将界膜组织剪成约 250 mg 的碎块, 计 30 块, 随机分为 3 组:空白对照组、低浓度固邦组(10%)、高浓度固邦组(20%), 每组 10 个样本。

作者单位:523808 东莞, 广东医学院(李前龙); 南方医科大学(陈超)

通讯作者:李前龙, Email: liqianlong2003@163.com

将样本置入培养孔中并加入 RPMI 1640 培养液(含 15% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素),低浓度组和高浓度组分别加入 1.8 ml 和 1.6 ml,空白对照组加入 1.8 ml。然后在低浓度组、高浓度组的培养孔中分别加入 0.2 ml 和 0.4 ml 的固邦含药血清,空白对照组加入 0.2 ml 空白血清。添加血清后在 5% CO₂ 的饱和湿度、37℃ 的条件下培养 72 h。

1.3.3 IL-6 含量测定:培养 72 h 后,取培养液,用酶联法测定 IL-6。具体检测方法参照说明书进行。

OD 值转换:将 OD 值转换为单位湿重(gww)分泌量(ng)

转换值(ng/gww) = 浓度(ng/ml) × 培养液体积(ml) ÷ 界膜组织湿重(gww)

1.3.4 上述界膜组织标本同时做细菌培养。

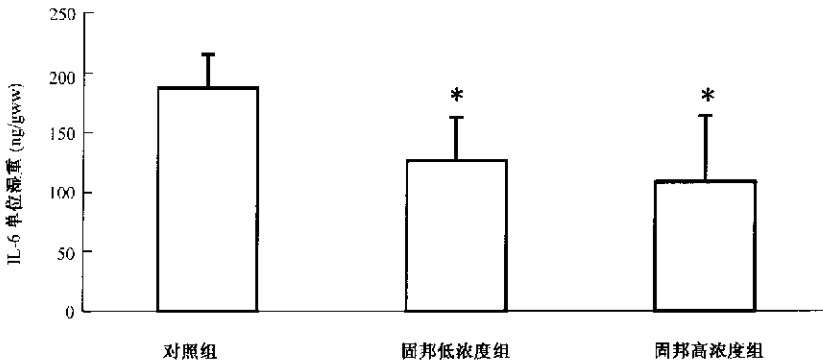
1.3.5 统计学处理:数据应用 SPSS 10.0 统计分析软件,采用单因素方差分析(Oneway ANOVA)统计分析。

2 结果

2.1 固邦对 IL-6 的作用

不同浓度的固邦含药血清和界膜组织共同培养 72 h,应用酶联法检测 IL-6。IL-6 采用 ng(nanogram)计量单位,gww 为湿重,白介素-6 的转换值单位为 ng/gww。

实验结果显示,对照组的界膜组织中 IL-6 的含量较高,IL-6 为 187.73 ± 27.61 ng/gww。固邦低浓度组和固邦高浓度组的界膜组织分泌 IL-6 的量分别为 126.87 ± 37.11 ng/gww、 108.54 ± 55.95 ng/gww。



注:与对照组比较,* $P < 0.01$

图 1 不同浓度的固邦对界膜组织分泌 IL-6 的影响

与对照组相比,固邦浓度为 10% 时界膜组织分泌 IL-6 为 32.42%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。浓度为 20% 时能显著抑制 IL-6 的分泌,为 42.18%,有非常显著的统计学意义($P < 0.01$)。高、低浓度的固邦组的组间比较差异无统计学意义。上述界膜组织同时做细菌培养结果为阴性。

3 讨论

3.1 IL-6 引起假体周围骨丢失的作用机制

白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)是一种具有广泛生物学功能的细胞因子,调节多种细胞的生长和分化。IL-6 在体内通过白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)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产生。其功能是促进破骨细胞生成,与其它骨吸收因子共同作用,促进骨吸收。

IL-6 是对组织损伤或炎症刺激系统反应急性阶段的重要因子之一^[1]。研究表明在假体无菌性松动的患者界膜^[2]和血液中都含有高水平的 IL-6^[3],说明 IL-6 在骨丢失中可能具有重要的作用^[4]。IL-6 是通过磨损颗粒刺激成纤维细胞产生的,其引起假体周围骨丢失的作用机制是通过聚集破骨细胞和通过自分泌机制激活破骨细胞,从而引起破骨细胞性骨吸收^[5]。

3.2 阿仑膦酸钠对界膜分泌 IL-6 的影响及作用机制

阿仑膦酸钠是第三代含氮二膦酸盐,较非含氮二膦酸盐抗骨吸收作用强、副作用小,因此临床应用较多。阿仑膦酸钠进入体内与羟基磷灰石紧密结合,在破骨细胞周围释放并进入破骨细胞内,抑制胆固醇合成过程中甲羟戊酸合成途径,抑制其中间产物——焦磷酸法尼醇/焦磷酸牛二酯(FPP/GGPP)的形成,使细胞内信号传导通路受阻,从而抑制破骨细

胞的分化、增殖、成熟及干扰成熟破骨细胞的功能,并促进其凋亡。Shanbhag 等^[6]及 Millett 等^[7]进行动物实验发现 阿仑膦酸钠可有效预防和治疗由磨损颗粒诱导的假体周围骨丢失。Astrand 等^[8]将阿仑膦酸钠涂布于假体的骨床上,然后植入假体,结果发现其可明显地抑制由压力诱导的假体周围骨丢失。Wilkinson 等^[9]在一组随机、对照双盲实验中发现,在经历了全髋关节置换的病人中,给予口服帕米膦酸盐钠能明显减少假体周围的骨吸收,降低骨转换率。

近来有文献报道二膦酸盐可抑制假体周围组织中 IL-6 的分泌。Giuliani 等在实验中发现,二膦酸盐可明显抑制人成骨样细胞分泌 IL-6。Papadaki 等研究发现,让伴有骨质疏松的特发性中性粒细胞减少症的患者口服阿仑膦酸钠 1 年后,不仅能增加骨密度,而且还能降低血清中 IL-6 水平。在本实验中,我们设计了两个浓度组即固邦低浓度组(10%)和固邦高浓度组(20%),结果显示两组均能明显抑制体外培养界膜组织 IL-6 的分泌($P < 0.01$),且组间差异无统计学意义,这对于指导临床以及避免阿仑膦酸钠的副作用方面提供了实验依据,从而具有一定的临床意义。

阿仑膦酸钠在预防磨损颗粒诱导的假体周围骨丢失过程中,不仅可进入破骨细胞直接抑制破骨细胞内的信号传导,干扰其骨吸收作用,而且可通过抑制界膜组织分泌 IL-6 细胞因子间接地抑制破骨细胞的骨吸收功能,从而在预防磨损颗粒诱导的人工

关节假体周围骨丢失中发挥作用。

【参 考 文 献】

- [1] Kishimoto T ,Akira S ,Taga T. Interleukin-6 and its receptor :a paradigm for cytokines. Science ,1992 ,258 :593-597 .
- [2] Shanbhag AS ,Jacobs JJ ,Black J ,et al. Cellular mediators secreted by interfacial membranes obtained at revision total hip arthroplasty. J Arthroplasty ,1995 ,10 :498-506 .
- [3] Hemigou P ,Intrator L ,Bahrami T ,et al. Interleukin-6 in the blood of patients with total hip arthroplasty without loosening. Clin Orthop ,1999 ,366 :147-154 .
- [4] Vermes C ,Jacobs JJ ,Chandrasekaran R ,et al. The effects of particulate wear debris , cytokines and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. J Bone Joint Surg Am ,2001 ,83 (A) :201-211 .
- [5] Romas E ,Martin TJ. Cytokines in the pathogenesis of osteoporosis. Osteoporos Int ,1997 ,7 :547-553 .
- [6] Shanbhag AS ,Hasselman CT ,Rubash HE ,et al. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. Clin Orthop ,1997 (344) :33-43 .
- [7] Millett PJ ,Allen MJ ,Bostrom MP. Effects of alendronate on particle-induced osteolysis in a rat model. J Bone Joint Surg Am ,2002 ,84 (2) :236-249 .
- [8] Astrand J ,Aspenberg P. Topical ,single dose bisphosphonate treatment reduced bone resorption in a rat model for prosthetic loosening. J Orthop Res ,2004 ,22 (2) :244-249 .
- [9] Wilkinson JM ,Stockley I ,Peel NFA ,et al. Effect of pamidronate in preventing local bone loss after total hip arthroplasty :a randomized , double-blind ,controlled trial. J Bone Miner Res ,2001 ,16 :556-564 .

(收稿日期 :2007-06-28)