

· 基础研究 ·

阿伦膦酸钠防治人工关节松动的实验研究

陈明, 郑琼, 方真华, 勘武生

(华中科技大学同济医学院附属普爱医院骨科, 湖北 武汉 430033)

【摘要】 目的:评价二膦酸盐阿伦膦酸钠在防治人工关节松动中的作用。**方法:**36 只 SD 大鼠右膝置入自制人工关节假体, 建立人工关节松动的动物模型, 分成 3 组: 阴性对照组, 阳性对照组和实验组。阴性对照组关节腔内注射磷酸缓冲液与鼠血清混合液, 阳性对照组关节腔内注射 10^{10} /ml 关节磨屑(超高分子聚乙烯颗粒), 实验组关节腔内注射 10^{10} /ml 关节磨屑同时用阿伦膦酸钠灌胃(每日 1 mg/kg)。术后 12 周, 处死各组动物行组织切片对比观察假体周围骨溶解情况。体外分离培养人外周血单个核细胞并分成 5 组, A 组为单核细胞组, B 组为单核细胞和关节磨屑混合培养组, C 组为单核细胞和关节磨屑混合培养加入 10^{-4} mol/L 阿伦膦酸钠, D 组单核细胞和关节磨屑混合培养加入 10^{-5} mol/L 阿伦膦酸钠, E 组为单核细胞和关节磨屑混合培养加入 10^{-6} mol/L 阿伦膦酸钠, 检测各组单个核细胞分泌溶骨因子的情况。**结果:**关节磨屑可引起假体周围骨溶解, 刺激单个核细胞分泌溶骨因子, 阿伦膦酸钠可阻止这种作用。**结论:**阿伦膦酸钠可有效防止关节磨屑诱导的人工关节松动, 有望用于临床。

【关键词】 阿伦膦酸盐; 人工关节; 骨质溶解; 动物实验

Experiment study of alendronate in the prevention and treatment of aseptic loosening of prosthesis CHEN Ming, ZHENG Qiong, FANG Zhen-hua, KAN Wu-sheng. Department of Orthopaedics, Puai Hospital of Wuhan, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430033, Hubei, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of alendronate on the prevention and treatment of aseptic loosening of prosthesis. **Methods:** A rat model of particle-induced osteolysis was used. Thirty-xis SD rats were divided into three groups: negative control group, positive control group and experiment group. Alendronate was administered by ig in experiment group. Positive control group and experiment group received intro-articular injections of ultrahigh molecular weight polyethylene (UHMWPE) particles at 4, 6, 8, 10 weeks postoperatively. Negative control group was received injection with mixture solution of mouse serum and PBS only. All animals were sacrificed at 12 weeks after operation for histologic examination. In vitro human peripheral blood mononuclear (PBMC) were separated and cultured and divided into five groups as group A: PBMC group, group B: PBMC and particles, group C: PBMC and particles with 10^{-4} mol/L alendronate, group D: PBMC and particles with 10^{-5} mol/L alendronate, group E: PBMC and particles with 10^{-6} mol/L alendronate. The production of IL-1 β , IL-6, TNF- α in each group were tested. **Results:** Alendronate could prevent particle-induced osteolysis. The production of IL-1 β , IL-6, TNF- α was inhibited when alendronate was used. **Conclusion:** Alendronate can inhibit bone absorptive factors expression induced by wear particles and may be used in the prevention and treatment of aseptic loosening of prosthesis.

Key words Alendronate; Joint prosthesis; Osteolysis; Animal experimentation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(5):365-367 www.zggszz.com

当前, 人工关节无菌性松动导致的人工关节置换术后失败愈来愈引起矫形外科医生的关注。据估计, 50% 的全髋关节置换术患者 15 年后会发生人工关节松动。虽然手术技术、假体设计工艺的提高, 以及更耐磨材料的使用, 已有效降低了人工关节松动的发生率, 但这些并未从根本上解决问题。已有研究发现, 阿伦膦酸钠能抑制破骨细胞性骨吸收^[1-2], 而关节松动同假体周围骨吸收密切相关。因此, 本实验通过建立人工

关节无菌松动动物模型, 观察阿伦膦酸钠对关节假体周围骨吸收的影响, 以及其对关节磨屑刺激单核细胞分泌溶骨因子的作用, 探讨该药防治人工关节无菌性松动的可能性。

1 材料与方法

1.1 建立模型与分组 参照 Allen 模型并加以改进^[3]。SD 成年大鼠(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)36 只, 雌雄各半。关节假体由不锈钢克氏针制成(长 10 mm, 直径 1.3 mm), 使用前高压蒸气消毒, 关节磨屑颗粒为超高分子量聚乙烯颗粒(UHMWPE)(Zimmer 公司提供), 平均直径 2 μ m, 使用前环氧乙烷消毒。关节注射颗粒悬液用 1:50 SD 大鼠血清与 PBS 将关节磨屑配成 10^{10} /ml 颗粒悬液。实验动物用 3%

基金项目: 1. 湖北省卫生厅科技项目(编号 2007-54-Jx3c34); 2. 武汉市科技项目(编号 2005-294-32)

通讯作者: 陈明 Tel: 027-68835008 E-mail: cm19720@163.com

戊巴比妥钠按 40 mg/kg 腹腔麻醉,在大鼠右胫骨平台用 1.2 mm 手摇钻头钻孔,深 10 mm,置入关节假体。术后 4 周,伤口完全愈合后,将动物随机分为 3 组(每组 12 只):阴性对照组,阳性对照组及用药实验组。阳性对照组及用药实验组麻醉下用微量注射器在手术过的关节腔内注入 0.1 ml 颗粒悬液,每 2 周注射 1 次,共 4 次。阴性对照组用大鼠血清与 PBS 混合液注射。实验组同时予阿伦膦酸钠(意大利默沙东公司)每日 1 mg/kg 灌胃。术后 12 周处死动物,取手术侧胫骨标本,细菌培养,常规甲醛固定,EDTA 微波脱钙,取出关节假体。沿胫骨横轴切片,苏木素伊红染色,显微镜下观察假体周围骨吸收以及新骨形成情况。

1.2 单核细胞分离培养与药物干预 无菌采集股骨颈骨折拟行关节置换者外周血,肝素抗凝,0.1 mol/L PBS 稀释 1 倍,将稀释的血清铺在淋巴细胞分离液上,水平离心(2 000 r/min) 20 min,用毛细吸管小心吸出单个核细胞,洗涤,将细胞用含 10%胎牛血清 1640 培养基混悬,调整细胞浓度为 5×10^6 /ml,每孔 1.5 ml 细胞悬液加入 6 孔板,培养过夜后,分为 5 组:A 组(对照组),仅单核细胞;B 组(关节磨屑组),培养细胞中加入超高分子量的聚乙烯颗粒 10^6 /ml;C 组, $B+10^{-4}$ mol/L 阿伦膦

酸钠;D 组, $B+10^{-5}$ mol/L 阿伦膦酸钠;E 组, $B+10^{-6}$ mol/L 阿伦膦酸钠。磨屑和药物均用 1640 培养基配制,37 °C 5%CO₂ 细胞培养箱培养 24 h 后,ELISA 法测上清液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。IL-1 β 、IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物工程技术有限公司。

1.3 观察指标与方法 将各组动物胫骨切片标本,光学显微镜下观察假体周围骨吸收以及新骨形成情况。ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。

1.4 统计学分析 实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析 *q* 检验,检测各组之间骨吸收因子的表达差异有无统计学意义。

2 结果

2.1 各组假体周围骨吸收以及新骨形成情况 所有标本细菌培养结果呈阴性。组织切片:阴性对照组,光镜下可见关节假体周围有一薄层新生骨形成,没有明显的溶骨现象,关节假体与新生骨之间有很薄的纤维组织膜,未见慢性炎性细胞浸润;阳性对照组,溶骨现象明显,新生骨小梁很少、断裂、细小,可见有较多的巨噬细胞、成纤维细胞及异物巨细胞浸润,邻近组织中可见未染色空泡区(聚乙烯颗粒);实验组,可见关节假

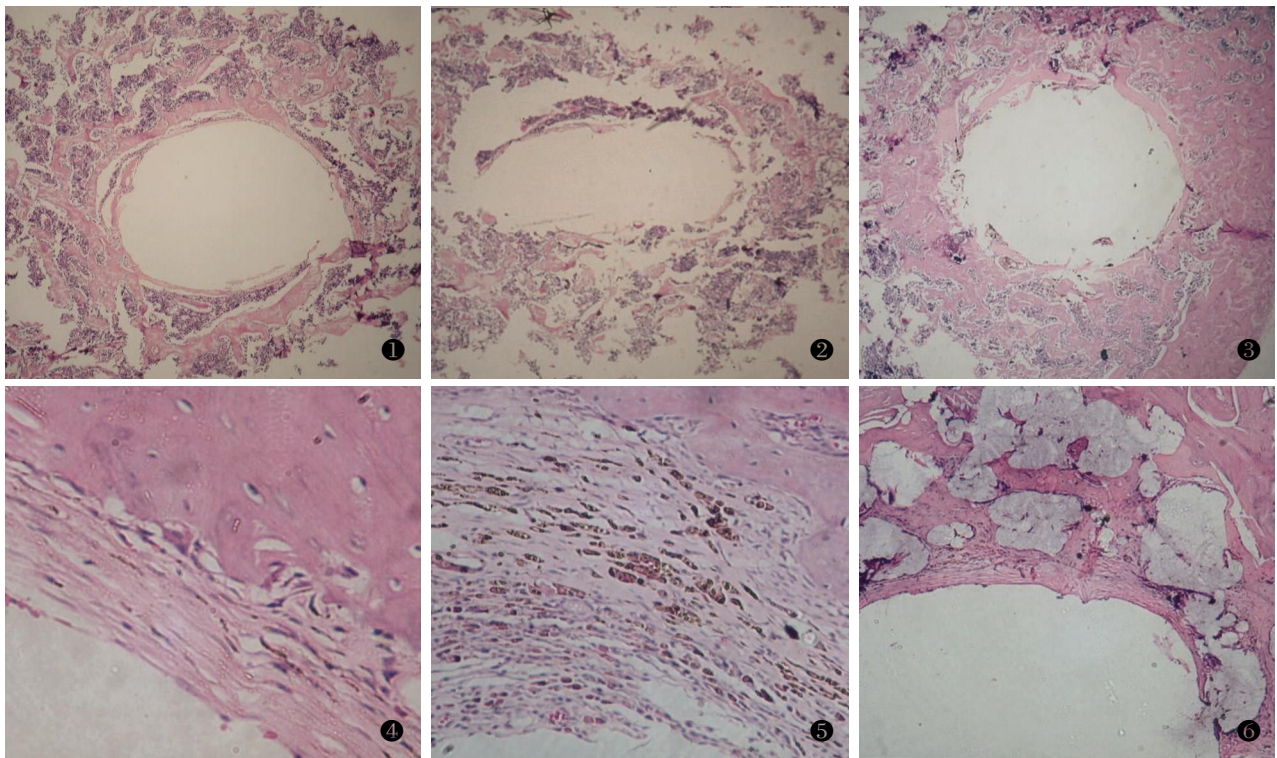


图 1 阴性对照组:假体周围新生骨形成,无明显溶骨(HE 染色 $\times 20$) **图 2** 阳性对照组:假体周围溶骨明显,骨小梁断裂、细小(HE 染色 $\times 20$) **图 3** 实验组:假体周围新生骨明显增多,骨小梁粗大,相互连接成网(HE 染色 $\times 20$) **图 4** 阴性对照组:假体周围假膜排列整齐,很少炎性细胞(HE 染色 $\times 400$) **图 5,6** 阳性对照组:假体周围假膜厚排列紊乱,其中有大量炎性细胞浸润,假体周围骨中可见未染色的空泡区,为聚乙烯颗粒沉积(HE 染色 $\times 400$)

Fig.1 Negative control group: New bone formation could be seen beside prosthesis, no obvious osteolysis. HE staining $\times 20$ **Fig.2** Positive control group: Osteolysis beside prosthesis was obvious, bone trabecula was broken and small. HE staining $\times 20$ **Fig.3** Experiment group: Neocortex beside prosthesis increased remarkably, bone trabecula was big and connected with each other into net. HE staining $\times 20$ **Fig.4** Negative control group: the peri-prosthetic fibrous membranes arranged regularly, few inflammatory cells invaded. HE staining $\times 400$ **Fig.5,6** Positive control group: the peri-prosthetic fibrous membranes false membrane arranged disorderly and filled with many inflammatory cells, non-staining bubble showed polyethylene particles depositing. HE staining $\times 400$

体周围溶骨现象被抑制,有较多的新生骨形成,骨小梁粗大、连接多(见图 1-6)。

2.2 各组细胞培养液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量 5 组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的含量如表 1 所示。方差分析表明 5 组上清液中各因子的含量差异有统计学意义。磨屑组各骨吸收因子含量明显高于对照组 ($P<0.01$),使用阿伦膦酸钠各组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的含量均低于磨屑组 ($P<0.01$)。且随着药物浓度增加,骨吸收因子含量逐渐减少。

表 1 不同浓度阿伦膦酸钠对磨屑诱导 PBMC 分泌骨吸收因子的影响 ($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

Tab.1 Effect of alendronate on bone absorptive factors expression of PBMC induced by wear particles ($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

组别 (n=12)	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	125.08 \pm 14.60 ^A	143.19 \pm 19.81 ^A	40.81 \pm 5.63 ^A
磨屑组	1 347.87 \pm 69.47	1 242.83 \pm 60.44	573.21 \pm 22.77
10 ⁻⁴ mol/L	138.92 \pm 15.59 ^A	140.25 \pm 11.16 ^A	51.36 \pm 4.67 ^{AB}
10 ⁻⁵ mol/L	145.09 \pm 15.20 ^A	153.35 \pm 13.06	56.48 \pm 5.33 ^{AB}
10 ⁻⁶ mol/L	153.94 \pm 19.17 ^{AB}	170.02 \pm 15.81 ^{AB}	70.35 \pm 7.14 ^{AB}

注: ^A与磨屑组比, $P<0.01$; ^B与对照组比, $P<0.05$

Note: ^ACompared with particle group, $P<0.01$; ^BCompared with control group, $P<0.05$

3 讨论

1988 年,Howie 第一次成功构建人工关节无菌性松动的动物模型,证实关节磨屑的确可诱导关节假体周围骨吸收。但该模型安置在股骨远端,没有应力负荷的作用。事实上,应力负荷在人工关节无菌性松动的过程中起着十分重要的作用,它影响关节假体周围成骨和破骨细胞的功能,并对关节液产生压力使更多关节磨屑直接进入关节假体与支持骨之间^[4]。因此采用 Allen 改进后的模型,更接近人体人工关节松动的真实情况。

阿伦膦酸钠是二膦酸盐第 3 代产品,同前几代二膦酸盐产品不同,它主要抑制破骨细胞的骨吸收作用,而对成骨细胞的骨形成作用无明显影响^[5]。由于关节磨屑引起人工关节松动是破骨细胞对关节假体周围的支撑骨进行骨吸收的结果,因此推断,阿伦膦酸钠应能阻止这种类型的骨丢失。本研究发现,关节腔注射关节磨屑后引起关节假体周围骨吸收,而使用阿伦膦酸钠能明显抑制这种骨吸收作用,关节假体周围骨量明显增加,从而证实了上述推理。

现已知道,关节磨屑引起人工关节松动主要是磨屑在关节假体周围引起异物炎性反应,单核/巨噬细胞、成纤维细胞和异物巨细胞将其包绕、吞噬,产生前列腺素 E₂(PGE₂)、IL-1、IL-6、TNF- α 等骨吸收因子引起假体周围支撑骨吸收^[6]。这些溶骨因子通过直接或间接途径激活破骨细胞引起假体周围骨吸收^[7]。本实验发现关节磨屑同单核细胞混合培养使培养基中的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量明显升高,加入阿伦膦酸钠后上述各因子水平明显降低,说明阿伦膦酸钠能抑制关节磨屑诱导的溶骨因子表达,这可能就是阿伦膦酸钠能阻止磨屑导致的人工关节松动的一个重要原因。

总之,关节磨屑导致的骨溶解是影响人工关节置换术远期疗效的重要原因,如何阻断这一过程是当前防治人工关节松动研究的重点。本实验初步发现,阿伦膦酸钠能阻止磨屑引起的骨溶解,但这毕竟是在短期的动物实验上得到的结果,阿伦膦酸钠对关节假体周围骨吸收的长期作用到底如何,怎样确定最佳的药物用量等等,都有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Iwase M, Kim KJ, Kobayashi Y, et al. A novel bisphosphonate inhibits inflammatory bone resorption in a rat osteolysis model with continuous infusion of polyethylene particles. J Orthop Res, 2002, 20 (3): 499-505.
- 2 陈明, 夏仁云. 二膦酸盐对关节磨屑刺激单核细胞分泌 IL-1 β 的抑制作用. 中国骨伤, 2004, 17(10): 596-597.
- 3 Allen M, Brett F, Millett P, et al. The effect of particulate polyethylene at a weight-bearing bone-implant interface. A study in rats. J Bone Joint Surg (Br), 1996, 78: 32-37.
- 4 Millett PJ, Allen MJ, Bostrom MP. Effects of alendronate on particle-induced osteolysis in a rat model. J Bone Joint Surg (Am), 2002, 84: 236-249.
- 5 Reddy GT, Kumar TM, Veena. Formulation and evaluation of Alendronate Sodium gel for the treatment of bone resorptive lesions in Periodontitis. Drug Deliv, 2005, 12(4): 217-222.
- 6 Green TR, Fisher J, Matthews JB, et al. Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. J Biomed Mater Res, 2000, 53(5): 490-497.
- 7 Schuh A, Thomas P, Holzwarth U, et al. Bilateral localized osteolysis after cemented total hip replacement. Orthopade, 2004, 33 (6): 727-732.

(收稿日期: 2007-11-28 本文编辑: 王玉蔓)

作者须知

凡投稿本刊的论文,其作者姓名及排序一旦在投稿时确定,在编排过程中不再作改动,特此告知。

《中国骨伤》杂志社