

• 基础研究 •

唑来膦酸钠防治假体周围骨溶解的实验研究

吴凤晴¹, 叶健¹, 吴连国²

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第二医院骨科, 浙江 杭州 310005)

【摘要】 目的: 观察唑来膦酸钠对磨损颗粒诱导的大鼠假体周围骨溶解的影响及其作用机制。方法: 选用 30 只成年雄性 SD 大鼠, 体重 250~300 g, 随机分 3 组, 每组 10 只, 分别为空白对照组、模型对照组和唑来膦酸钠组。空白对照组不作任何处理; 模型对照组及唑来膦酸钠组行右侧股骨植入聚乙烯颗粒和钛棒制备聚乙烯颗粒诱导假体周围骨溶解大鼠模型, 术后唑来膦酸钠组每周皮下注射唑来膦酸钠 0.1 mg/kg, 连续用药 8 周后取血、处死并采集右侧股骨标本。测定各组股骨骨密度(BMD)、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及血清 TRAP5b、CTX- I 的含量。结果: 与模型对照组比较: 唑来膦酸钠组大鼠股骨骨密度增高, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量均下降; 唑来膦酸钠组大鼠血清 TRAP5b、CTX- I 水平降低。结论: 唑来膦酸钠能够有效抑制聚乙烯颗粒诱导的大鼠假体周围骨溶解, 可能是通过抑制破骨细胞的活性及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等细胞因子的表达实现, 为临床防治人工关节假体周围骨溶解提供理论基础。

【关键词】 大鼠; 唑来膦酸钠; 聚乙烯颗粒; 破骨细胞; 骨溶解

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.10.013

Inhibitory effect of zoledronate sodium on periprosthetic osteolysis induced by polyethylene particles WU Feng-qing, YE Jian, and WU Lian-guo*. *Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect and mechanism of zoledronate sodium on periprosthetic osteolysis in rat induced by polyethylene particles. **Methods:** Total 30 adult male SD rats, weighting from 250 to 300 g, were selected and randomly divided into three groups: blank control group, model control group and zoledronate sodium group respectively, 10 animals for each group. No treatment was performed in the blank control group. In model control group and zoledronate sodium group, the model of periprosthetic osteolysis in rats were made by implanting polyethylene particles and titanium rods into their right femurs. After operation, rats in zoledronate sodium group were administered with zoledronate sodium (0.1 mg/kg each week) through subcutaneous injection for 8 weeks, then the blood was obtained and all experimental animals were sacrificed to get the right femur specimens. The femur BMD, IL-1 β , IL-6, TNF- α , serum TRAP5b and CTX- I were detected. **Results:** Compared with the model control group, the femur BMD was increased, while IL-1 β , IL-6 and TNF- α were all decreased in zoledronate sodium group; the serum TRAP5b and CTX- I level were both reduced in zoledronate sodium group. **Conclusion:** The zoledronate sodium could effectively inhibit periprosthetic osteolysis in rats induced by polyethylene particles, which might be realized by inhibiting the activity of osteoclasts and the expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α . It provides a new method to treat periprosthetic osteolysis of the artificial joint prosthesis.

KEYWORDS Rat; Zoledronate sodium; Polyethylene particle; Osteoclast; Osteolysis

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(10): 936-939 www.zggszz.com

人工关节置换术后假体周围骨溶解的主要生物学机制是磨损颗粒直接刺激或通过诱发炎症反应促进破骨细胞活化, 实现假体周围骨吸收、骨溶解、骨密度下降^[1]。目前无法完全避免磨损颗粒的产生, 除

通过翻修手术进行干预外, 尚缺乏其他有效防治手段。临床上用唑来膦酸钠(zoledronate sodium, ZOL)注射液治疗骨质疏松症、骨转移肿瘤等获得了良好的疗效^[2-3], 但 ZOL 能否抑制假体周围骨溶解的进程及通过何种机制尚不清楚。本研究通过检测 ZOL 对大鼠破骨细胞活化标志物及炎症因子水平的影响, 探讨 ZOL 干预骨溶解的作用机制和效应环节。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与材料

高密度聚乙烯颗粒: 美国 SHAMROCK 公司(颗粒平均直径 4~6 μ m, 品名 S-393)。钛棒: 浙江科惠

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(编号: 20133322120004); 浙江省医药卫生科技计划项目(编号: 2013KYA143); 浙江省自然科学基金资助项目(编号: LY12H27013)
Fund program: Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20133322120004)
通讯作者: 吴连国 E-mail: mdwu8535@126.com
Corresponding author: WU Lian-guo E-mail: mdwu8535@126.com

医疗器械公司, 钉身长 1.5 cm, 直径 1.2 mm, Ti-6Al-4V 太空级。10%水合氯醛: 浙江省中医院制剂室。青霉素: 华北制药(国药准字 H13020657)。庆大霉素: 浙江瑞新药业(国药准字 H33020800)。10%甲醛溶液: 浙江衢州巨化试剂有限公司(许可证号 XK13-201-00088 II)。胎牛血清 FBS: 上海微科生化试剂有限公司。大鼠 TRACP5b、CTX-I、IL-1 β 、IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒: 上海西唐生物科技有限公司。唑来磷酸钠: 杭州默沙东制药有限公司。

1.2 实验仪器

生物显微镜: 奥林帕斯 CX-21, 日本。离心机: 上海安亭科学仪器厂(TGL-168)。系列可调节移液器: 德国 Eppendorf 公司。超净工作台: SW-CJ-1F, 苏州安泰空气技术有限公司。多功能酶标仪: 美国 Molecular Devices 公司。OSTEOCORE 双能 X 线骨密度仪: 法国 Medilink 公司。

1.3 高密度聚乙烯颗粒悬液配制

室温称取高密度聚乙烯颗粒, 加入 95%乙醇浸泡消毒后, 离心、去上清, 超净台风干。溶于 2%胎牛血清 DMEM, 然后与 17.5%已灭菌包装电泳凝胶混合、搅拌、再称重、去皮。聚乙烯颗粒终浓度为 10 mg/ml。在该凝胶中聚乙烯颗粒数量大约为 1.9×10^8 /ml。

1.4 实验分组和处理

选用成年 SD 大白鼠 30 只, 雄性, 体重 250~300 g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供(来源: 中科院上海实验动物中心/上海斯莱克实验动物有限公司), 动物合格证号: SCXK(沪)2007-0005。随机分成 3 组, 即空白对照组、模型对照组和唑来磷酸钠组, 每组 10 只。所有大白鼠在同一条件下饲养, 喂食普通颗粒饲料。

空白对照组: 不做任何处理。

模型对照组: 实验动物用 10%的水合氯醛按 0.03 ml/kg 腹腔注射麻醉, 麻醉完成后, 将大鼠固定在动物手术台上, 剃毛备皮, 常规消毒, 铺无菌单。于右侧髌旁内侧入路, 切开皮肤、皮下组织、深筋膜和关节囊, 逐层分离显露膝关节, 髌骨前外侧脱位, 屈曲膝关节暴露股骨髁, 从股骨髁间窝钻孔至股骨髓腔, 低速电钻平行股骨长轴方向于股骨髁间窝钻孔至股骨髓腔钻一骨隧道(直径 1.5 mm, 深度为 15 mm)。骨隧道内植入高密度聚乙烯颗粒凝胶, 每侧 100 μ l, 再植入钛棒, 然后骨蜡封闭骨隧道, 术后伤口以庆大霉素冲洗, 逐层缝合。术后给予青霉素 2 万 U/100 g 肌注, 每日 1 次, 连续 3 d。每日予以 PVP 碘伤口消毒, 连续 3 d。

唑来磷酸钠组: 造模同模型对照组, 术后予皮下注射唑来磷酸钠 0.1 mg/kg, 每周 1 次, 连续给药

8 周, 共 8 次。

1.5 标本制备

造模 8 周后, 麻醉下于下腔静脉取血 3 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 分离血清, 置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏待测。取血完成后处死所有实验动物, 解剖右侧股骨, 剔净周围软组织, 用浸透生理盐水的纱布包好, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱内保存待测。静脉血作分子水平检测, 股骨作影像学及分子学水平观察检测。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 骨密度检测 测试前将股骨从 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中取出, 放置至股骨温度和室温相同, 采用双能 X 线骨密度仪扫描整个股骨骨密度, 记录大鼠股骨骨密度数据。

1.6.2 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的检测 取大鼠右侧股骨骨组织样品, 用液氮研磨至粉末, 加入适量 PBS 再置于超声波细胞粉碎仪中粉碎, 离心取上清测蛋白浓度, 将蛋白上清稀释 5 倍后, 采用酶联免疫法(ELISA 法)进行, 操作步骤按试剂盒操作说明, 测得 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量。

1.6.3 TRACP5b 及 CTX-I 的检测 采用酶联免疫法(ELISA)测定, 血清试验前充分混匀, 根据试剂盒说明书步骤操作, 测得大鼠血清 TRACP5b、CTX-I 的含量。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学处理, 各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据比较前先进行方差齐性检验, 各组总的组间差异比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 空白对照组、唑来磷酸钠组分别与模型对照组比较采用 LSD- t 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

在实验过程中, 各组大鼠日常行为无区别, 精神状态良好, 体重逐渐增加, 反应灵敏。术后 1 周后伤口愈合, 整个实验过程中无大鼠死亡。

2.1 骨密度检测结果

与空白对照组比较, 模型对照组大鼠右侧股骨骨密度显著下降, 差异有统计学意义(P < 0.05); 与模型对照组比较, 唑来磷酸钠组大鼠右侧股骨骨密度显著提高(见表 1)。

2.2 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的检测结果

与空白对照组比较, 模型对照组大鼠骨组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著上升, 差异有统计学意义(P < 0.05); 与模型对照组比较, 唑来磷酸钠组大鼠骨组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著下降, 提示唑来磷酸钠能降低大鼠股骨 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平(见表 1)。

表 1 各组大鼠股骨骨密度、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Tab.1 Comparison of level of femur BMD, IL-1β, IL-6 and TNF-α in each group($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	动物数	BMD	IL-1β	IL-6	TNF-α
空白对照组	10	0.169±0.011*	67.22±7.10*	58.92±8.83*	69.88±8.94*
模型对照组	10	0.120±0.006	158.18±12.94	167.28±15.90	172.61±15.68
唑来膦酸钠组	10	0.144±0.009*	125.46±9.28*	132.40±13.67*	131.85±13.34*
F 值	-	75.97	209.45	177.37	159.36
P 值	-	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与模型对照组比较, *P<0.05

Note: Compared to model control group, *P<0.05

2.3 TRACP5b 及 CTX-I 检测结果

与空白对照组比较, 模型对照组大鼠血清 TRACP5b、CTX-I 水平显著上升, 差异有统计学意义(P<0.05); 与模型对照组比较, 唑来膦酸钠组大鼠血清 TRACP5b、CTX-I 水平显著下降, 提示唑来膦酸钠能降低血清 TRACP5b、CTX-I 水平, 即降低破骨细胞活性(见表 2)。

表 2 各组大鼠血清 TRACP5b 和 CTX-I 含量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of level of serum TRACP5b and CTX-I in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TRACP5b(U/L)	CTX-I(pg/ml)
空白对照组	10	1.84±0.36*	132.97±7.11*
模型对照组	10	2.41±0.38	149.77±10.18
唑来膦酸钠组	10	1.92±0.25*	137.73±7.61*
F 值	-	8.37	10.62
P 值	-	0.001	0.000

注:与模型对照组比较, *P<0.05

Note: Compared to model control group, *P<0.05

3 讨论

人工关节置换术后发生的假体周围骨溶解、假体无菌性松动已成为影响假体使用年限的重要原因之一, 除手术翻修外寻找药物进行防治成为目前研究的热点。唑来膦酸钠属于第 3 代双膦酸盐类, 是目前治疗骨过度吸收性疾病的代表药物^[4]。其主要通过抑制破骨细胞性骨吸收、降低骨改建来发挥作用, 也可作用于破骨细胞前体细胞, 抑制其向成熟破骨细胞转化, 其机制可能与破骨细胞成熟过程中所必需的一些因子有关。因假体周围骨溶解与破骨细胞性骨吸收密切相关, 据此推测唑来膦酸钠对其可能也有治疗作用。

骨密度是骨质量评价的重要指标之一, 能够直接反映骨矿物质丢失情况。近年来大量研究认为^[5], 磨损微粒在机体内会激发一系列炎症反应, 分泌多种生物化学介质如 IL-1、IL-6、TNF-α 等, 这些介质

不仅能通过不同的途径增强破骨细胞性骨吸收, 引起假体周围骨溶解, 还能够直接或间接作用于破骨细胞前体细胞及破骨细胞, 促进其分化增殖, 并发挥骨吸收的作用^[6]。破骨细胞是人体内惟一具有骨吸收和溶解能力的细胞, 破骨细胞活性增强在假体置换后的无菌松动也起重要作用, 磨损颗粒可能通过增加破骨细胞的数量或增强其功能, 引起假体周围过度的骨吸收, 造成局部骨溶解^[7]。骨 I 型胶原 α 链的羧基末端肽 (CTX-I) 和抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP5b) 是公认的破骨细胞活性及骨吸收标志物^[8-9]。用 ELISA 方法测定进入血循环的 CTX-I 和 TRAP5b, 可显示即时破骨细胞活跃程度。

有研究表明^[10-11], 人工关节假体在使用过程中不可避免地要产生聚乙烯磨损颗粒, 当这些颗粒达到一定数量且作用一定时间, 可诱导假体周围界膜的慢性炎症反应并引起成骨细胞凋亡及破骨细胞活化增殖, 促进骨吸收, 从而发生骨溶解。因此本实验通过往大鼠右侧股骨植入聚乙烯颗粒和钛棒制备聚乙烯颗粒诱导假体周围骨溶解大鼠模型, 与空白对照组比较后发现, 大鼠股骨骨密度显著下降, 破骨细胞活化标志物及溶骨性细胞因子水平显著上升, 证实了模型的有效性。

在本实验中, 给唑来膦酸钠组大鼠用药 8 周后, 与模型对照组比较, 其右侧股骨骨密度显著提高, 骨组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平及大鼠血清 TRACP-5b、CTX-I 水平显著下降, 提示唑来膦酸钠能够提高假体周围骨溶解模型大鼠股骨骨密度, 降低股骨骨组织的炎症反应、破骨细胞活性和骨吸收的水平, 证实唑来膦酸钠的药物作用可能是通过抑制 IL-1β、IL-6、TNF-α 等细胞因子的分泌及破骨细胞活性来实现抑制骨吸收。对于唑来膦酸钠的作用机制, 目前认为主要是通过抑制 FPP 合成酶, 阻止小 GTP 酶异戊烯基化, 而这是破骨细胞活化和发挥功能所必需的生化过程^[12]。然而也有大量研究证实唑来膦酸钠能够诱发 TRPV5、NFATc1、CA II、Syk 等基因表达抑制, 这些基因通过调控相关信号通路, 增加炎症因子

的分泌,在抑制破骨细胞的凋亡的同时,促进破骨细胞的增殖和分化^[13-16]。唑来膦酸钠防治假体周围骨溶解的机制与多种基因表达及信号通路的调控有关,其涉及的细胞、生物介质等亦很复杂,有待深入研究。

综上所述,唑来膦酸钠能够通过抑制破骨细胞的活性从而阻碍假体周围骨溶解过程中骨吸收的途径,有可能成为防治假体周围骨溶解的有效药物。但本实验没有做不同用药时间和剂量的比较,随着用药时间和剂量变化,这种抑制作用是否会改变仍需要进一步的研究。

参考文献

[1] Roato I, Caldo D, D'Amico L, et al. Osteoclastogenesis in peripheral blood mononuclear cell cultures of periprosthetic osteolysis patients and the phenotype of T cells localized in periprosthetic tissues[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(29): 7519-7525.

[2] Black DM, Reid IR, Boonen S, et al. The effect of 3 versus 6 years of zoledronic acid treatment of osteoporosis: a randomized extension to the HORIZON-Pivotal Fracture Trial (PFT)[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(2): 243-254.

[3] Nishisho T, Hanaoka N, Miyagi R, et al. Local administration of zoledronic acid for giant cell tumor of bone[J]. *Orthopedics*, 2015, 38(1): e25-e30.

[4] Piper PK Jr, Gruntmanis U. Management of osteoporosis in the aging male: focus on zoledronic acid[J]. *Clin Interv Aging*, 2009, 4: 289-303.

[5] Goodman SB, Gibon E, Yao Z. The basic science of periprosthetic osteolysis[J]. *Instr Course Lect*, 2013, 62: 201-206.

[6] García-López S, Villanueva R, Meikle MC. Alterations in the synthesis of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and their downstream targets RANKL and OPG by mouse calvarial osteoblasts in vitro: inhibition of bone resorption by cyclic mechanical strain[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4: 160.

[7] 云帆, 王瑞, 赵建宁. 破骨细胞的骨吸收机制[J]. *中国骨伤*, 2014, 27(6): 529-532.
Yun F, Wang R, Zhao JN. Mechanism of osteoclast in bone resorption [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2014, 27(6): 529-532. Chinese with abstract in English.

[8] Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, et al. Markers of bone turnover for

the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards[J]. *Osteoporosis Int*, 2011, 22(2): 391-420.

[9] Andersson G, Ek-Rylander B, Hollberg K, et al. TRACP as an osteopontin phosphatase [J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(10): 1912-1915.

[10] 戴闽, 程明, 刘虎诚, 等. 不同浓度金属磨损颗粒对破骨细胞体外分化的影响[J]. *中国矫形外科杂志*, 2011, 19(4): 316-319.
Dai M, Cheng M, Liu HC, et al. Different concentrations of metallic wear particles on osteoclast differentiation in vitro [J]. *Zhongguo Jiao Xing Wai Ke Za Zhi*, 2011, 19(4): 316-319. Chinese.

[11] 刘国印, 赵建宁, 王瑞. 磨损微粒诱导细胞凋亡与无菌性松动的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2013, 26(9): 791-796.
Liu GY, Zhao JN, Wang R. Progress on the relationship between wear debris induced apoptosis and aseptic loosening of prosthesis [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2013, 26(9): 791-796. Chinese.

[12] Roelofs AJ, Thompson K, Ebetino FH, et al. Bisphosphonates: molecular mechanisms of action and effects on bone cells, monocytes and macrophages[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(27): 2950-2960.

[13] 林珏杉, 董伟, 张鹏, 等. 唑来膦酸抑制破骨细胞分化中 TRPV5、NFATc1 的表达[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(9): 1254-1258.
Lin JS, Dong W, Zhang P, et al. Zoledronate inhibits TRPV5 and NFATc1 expression during differentiation of osteoclasts [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2014, 34(9): 1254-1258. Chinese.

[14] Cheng B, Li J, Du J, et al. Ginsenoside Rb1 inhibits osteoclastogenesis by modulating NF- κ B and MAPKs pathways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5): 1610-1615.

[15] 王宏利, 李鹏, 刘强, 等. 唑来膦酸对破骨细胞生成及 Syk 基因表达的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(16): 1667-1670.
Wang HL, Li P, Liu Q, et al. Effect of zoledronate acid on osteoclastogenesis and expression of spleen tyrosine kinase in a osteoclast-osteoblast co-culture system in vitro [J]. *Di San Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2013, 35(16): 1667-1670. Chinese.

[16] Nakagawa T, Ohta K, Kubozono K, et al. Zoledronate inhibits receptor activator of nuclear factor kappa -B ligand - induced osteoclast differentiation via suppression of expression of nuclear factor of activated T-cell c1 and carbonic anhydrase 2 [J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(4): 557-565.

(收稿日期: 2015-07-20 本文编辑: 王玉蔓)

广告目次

1. 同息通, 曲安奈德注射液(广东省医药进出口公司珠海公司) (对封 2)
2. 腰痛宁胶囊(颈复康药业) (对中文目次 1)