

淫羊藿总黄酮对人工关节磨损微粒引起单核细胞分泌溶骨性因子的影响

李杰, 周冰, 郭开今

(徐州医学院附属医院骨科, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨淫羊藿总黄酮防治人工关节松动的可行性。方法 采集 30 例人体外周血, 分离单核细胞, 分组培养。实验分 4 组: A 组(对照组), 仅单核细胞; B 组, 单核细胞及超高分子聚乙烯微粒; C 组, 单核细胞、超高分子聚乙烯微粒及帕米磷酸钠(10 mg/L); D 组, 单核细胞、超高分子聚乙烯微粒及淫羊藿总黄酮(10 mg/L)。培养 48 h 后, 检测细胞上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)和白细胞介素-6(IL-6)的含量。结果 B 组分别明显高于 A、C、D 组($P < 0.01$); D 组与 C 组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 淫羊藿总黄酮可有效抑制由于超高分子聚乙烯微粒刺激单核细胞而分泌的溶骨性因子 TNF- α 、IL-1 和 IL-6。淫羊藿总黄酮的效果与帕米磷酸钠相似, 它有望成为将来防治人工关节无菌性松动的一种很有潜力的药物。

关键词:淫羊藿总黄酮; 二磷酸盐; 人工关节; 假体松动; 骨溶解

中图分类号: R687.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2007)05-0314-03

Effect of total flavones of Epimedium on the secretion of osteolytic factors from human monocytes induced by wear particles

LI Jie ZHOU Bing GUO Kai-jin

(Department of Orthopedics Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College Xuzhou Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To explore the rationale of using total flavones of Epimedium (TFE) to prevent and treat aseptic loosening of prosthesis. Methods Blood samples obtained from 30 healthy human donors were processed to get the monocytes to perform the present experiment in 4 groups. Group A: containing monocytes only; Group B: monocytes + ultrahigh molecular weight polyethylene (UHMW PE) debris; Group C: monocytes + UHMW PE debris + pamidronate (10 mg/L); Group D: monocytes + UHMW PE debris + TFE (10 mg/L). After 48 hours of incubation, the mixtures were tested for osteolytic factors including TNF- α , IL-1 and IL-6. Results The levels of these factors were much higher in group B than in the other 3 groups. There was no significant difference between group C and group D ($P > 0.05$). Conclusion TFE can effectively inhibit the UHMW PE-stimulated secretions of TNF- α , IL-1 and IL-6 by monocytes. It is quite likely for RFE to become a potential therapeutic candidate for the treatment and prevention of aseptic loosening.

Key words: TFE; bisphosphonate; prosthesis; prosthesis failure; osteolysis

人工关节磨损微粒能刺激溶骨性因子的分泌而引起假体周围骨溶解, 最终导致人工关节无菌性松动^[1~3]。本实验采用人工关节松动的体外生物学模型研究淫羊藿总黄酮对溶骨性因子分泌的影响, 并与已用于临床研究防治人工关节松动的二磷酸盐类药物比较, 探讨淫羊藿总黄酮防治人工关节松动的可行性。

1 资料和方法

1.1 样本采集 30 例健康献血者。其中男 15 例, 女 15 例, 年龄 40~67 岁, 平均 52.8 岁。每例采集

外周血 10 ml 肝素抗凝。

1.2 主要试剂 四川产巫山淫羊藿, 上海市医药工业研究院提取纯度为 60% 以上淫羊藿总黄酮; 二磷酸盐类药物帕米磷酸钠(商品名为阿可达, 瑞士诺华有限公司制造), 超高分子聚乙烯微粒(美国 Zimmer 公司制造, 微粒直径为 2~3 μm), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 放射免疫药盒(北京东亚免疫技术研究所), 白细胞介素-1(IL-1)和 IL-6 酶联免疫药盒(德国 Diaclone 公司), 小牛血清(特级, 杭州四季青)。

1.3 实验方法 无菌采集外周血以 Hank's 液稀释 1 倍。分层液梯度离心法分离出单核细胞。洗涤 3

次,加含 10%小牛血清的 RPMI/1640培养液制成细胞悬液,细胞计数,调整细胞数至 4×10^8 /L 锥虫蓝排除法检测细胞活力均大于 95%。4孔培养板中滴加细胞悬液,每孔加 3 ml 置 37℃、5% CO₂ 恒温恒湿培养箱培养 4 h 使细胞贴壁,洗去非贴壁细胞,留下单核细胞。每板第 1孔内加入含 10%的小牛血清的 RPMI/1640培养液 3 ml 其余 3孔加入浓度为 10^{12} 个 /L 的超高分子聚乙烯微粒悬液 3 ml 并于第 3孔加入帕米磷酸钠使其浓度为 10 mg/L 于第 4孔加入淫羊藿总黄酮使其浓度为 10 mg/L。即第 1孔为仅有单核细胞的对照组(A组),第 2孔为单核细胞+微粒组(B组),第 3孔位单核细胞+微粒+帕米磷酸钠 10 mg/L(C组),第 4孔为单核细胞+微粒+淫羊藿总黄酮 10 mg/L(D组)。各组同条件培养 48 h 取上清液,分别测定上清液中的 TNF- α 、IL-1和 IL-6的含量。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用 SPSS11.0软件包行方差分析和 q检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

不同处理组细胞上清液中 TNF- α 、IL-1和 IL-6含量见表 1。B组各因子含量明显高于 A组 ($P < 0.05$), C组和 D组间的各因子含量明显低于 B组 ($P < 0.01$), C组和 D组各因子含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组细胞上清液中 TNF- α 、IL-1和 IL-6含量 (n=30, $\bar{x} \pm s$ $\mu\text{g/L}$)

组别	TNF- α	IL-1	IL-6
A组	0.331 \pm 0.093	0.887 \pm 0.056	3.583 \pm 0.181
B组	0.770 \pm 0.091*	1.479 \pm 0.046*	7.443 \pm 0.138*
C组	0.326 \pm 0.069 ^{##}	0.842 \pm 0.055 ^{##}	4.595 \pm 0.155 ^{##}
D组	0.344 \pm 0.073 ^{##}	0.836 \pm 0.035 ^{##}	4.552 \pm 0.152 ^{##}

和 A组比较: * $P < 0.05$; 和 B组比较: ^{##} $P < 0.01$

3 讨论

迄今为止,不管假体设计得多么完美,所有类型人工关节的承重面都产生磨损颗粒^[4]。聚乙烯微粒占了 70%~90%^[5]。磨损微粒激活巨噬细胞分泌大量溶骨性因子,溶骨性因子刺激破骨细胞,产生骨溶解,最终导致人工关节的无菌性松动, TNF- α 、IL-1和 IL-6是参与其中的主要溶骨性因子^[1~3]。干预这些溶骨性因子以寻求防治关节松动的药物成为当前研究的热点。二磷酸盐类药物因其在防治骨

质疏松和肿瘤性骨溶解方面的成功应用,而被用来治疗关节无菌性松动。实验证明,二磷酸盐类药物能有效抑制溶骨性因子 TNF- α 、IL-1和 IL-6^[6]。临床研究证明,二磷酸盐类药物在防治关节无菌性松动上有不同程度的作用^[7~9],但长期使用二磷酸盐类药物会产生各种严重的毒副作用,如颌骨坏死、胃肠功能紊乱、全身骨软化和加重骨质疏松等。可见二磷酸盐类药物可能在预防关节无菌性松动方面不会表现出广泛的有效性。因此,有必要继续寻找其他的有效药物。

淫羊藿总黄酮是我国传统的补肾壮骨中药淫羊藿的主要成分之一。淫羊藿不但可诱导破骨细胞凋亡,抑制骨吸收,减少骨量丢失^[10],同时可促进体外成骨细胞增殖及分化成熟^[11]。近年来,国外学者先后从豆科植物中提取到了具有抗骨质疏松作用的黄酮类化合物或衍生物^[12~14]。研究表明^[15~17],这些化合物的作用机制主要包括以下几点:①促进成骨细胞增殖,增加骨形成量;②抑制破骨细胞的募集活性,降低骨吸收水平;③作用于骨基质细胞,促进胶原合成和基质的矿化。淫羊藿总黄酮是从淫羊藿植物提取的黄酮类化合物,可能与上述黄酮类化合物有类似的作用机制。人工关节无菌性松动的溶骨机制与骨质疏松的骨量丢失有很大的相似性,用来防治骨质疏松的二磷酸类药物已应用于临床研究防治关节无菌性松动^[7~9]。淫羊藿总黄酮和二磷酸类药物一样在治疗骨质疏松方面的作用已得到充分的肯定,而且淫羊藿来源广泛,价格低廉,制剂方便,副作用少。因此,淫羊藿总黄酮有可能用于防治人工关节无菌性松动。

本试验发现, B组各因子含量明显高于 A组 ($P < 0.05$),说明超高分子聚乙烯微粒可刺激单核细胞分泌溶骨性因子 TNF- α 、IL-1和 IL-6; C组和 D组的各因子含量明显低于 B组 ($P < 0.01$),说明淫羊藿总黄酮和二磷酸盐类药物帕米磷酸钠均可有效抑制溶骨性因子 TNF- α 、IL-1和 IL-6的分泌; C组和 D组各因子含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),提示在一定剂量范围内,淫羊藿总黄酮在抑制溶骨性因子 TNF- α 、IL-1和 IL-6与帕米磷酸钠有相似的作用。因此,淫羊藿总黄酮有望在人工关节松动的防治方面发挥积极作用。

当然,淫羊藿总黄酮抑制单核细胞分泌 TNF- α 、IL-1和 IL-6的深层分子生物学机制是什么?是否可抑制其他溶骨性因子?药物的临床用量多少?是否可以和二磷酸盐类药物临床上交替使用以

减少各自的副作用等一系列问题仍然是我们将继续研究的课题。

参考文献:

[1] Goodman SB. The effects of micromotion and particulate materials on tissue differentiation: Bone chamber studies in rabbits [J]. *Acta Orthop Scand Suppl* 1994, 258(6): 1-43.

[2] 范卫民, 王青, 陶松年, 等. 人工关节松动病因的研究 [J]. *中华骨科杂志*, 1998, 18(9): 518-520.

[3] Dowd JE, Schwendeman L, Macaulay W, et al. Aseptic loosening in uncemented total hip arthroplasty in a canine model [J]. *Clin Orthop Relat Res* 1995, 319(10): 106-121.

[4] Saleh KJ, Thongtrangan I, Schwarz EM. Osteolysis: medical and surgical approaches [J]. *Clin Orthop Relat Res* 2004, 427(10): 138-147.

[5] Bhandari M, Bajammal S, Guyatt GH, et al. Effect of bisphosphonates on periprosthetic bone mineral density after total joint arthroplasty: A meta-analysis [J]. *J Bone Joint Surg Am* 2005, 87(2): 293-301.

[6] Pennanen N, Lapinjoki S, Urtti A, et al. Effect of liposomal and free bisphosphonates on the IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from RAW 264 cells in vitro [J]. *Pharm Res* 1995, 12(6): 916-922.

[7] Nehme A, Maalouf G, Tricoire JL, et al. Effect of alendronate on periprosthetic bone loss after cemented primary total hip arthroplasty: a prospective randomized study [J]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 2003, 89(7): 593-598.

[8] Venesmaa PK, Kröger HP, Miettinen HJ, et al. Alendronate reduces periprosthetic bone loss after uncemented primary total hip arthroplasty: a prospective randomized study [J]. *J Bone Miner Res* 2001, 16(11): 2126-2131.

[9] Wang CJ, Wang JW, Ko JY, et al. Three-year changes in bone

mineral density around the knee after a six-month course of oral alendronate following total knee arthroplasty: A prospective randomized study [J]. *J Bone Joint Surg Am* 2006, 88(2): 267-272.

[10] 郑洪军, 吕振华, 胡有谷, 等. 淫羊藿对体外培养破骨细胞的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(5): 460-461.

[11] 雪原, 王沛, 齐清会, 等. 淫羊藿对成骨细胞 Smad4 mRNA 作用的实验研究 [J]. *中华骨科杂志*, 2005, 25(2): 119-123.

[12] Picherit C, Chanteranne B, Bennetau P, et al. Dose dependent bone sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rat [J]. *Br J Nutr* 2001, 85(3): 307-316.

[13] Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, et al. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women [J]. *Am J Clin Nutr* 2000, 72(3): 844-852.

[14] Scheiber MD, Rebar RW. Isoflavones and postmenopausal bone health: a viable alternative to estrogen therapy? [J]. *Menopause* 1999, 6(3): 233-241.

[15] Picherit C, Coxam V, Bennetau C, et al. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy induced bone loss in rats [J]. *J Nutr* 2000, 130(7): 1675-1681.

[16] Arjandi BH, Bimbaum RS, Juma S, et al. The synthetic phytoestrogen ipriflavone and estrogen prevent bone loss by different mechanisms [J]. *Calcif Tissue Int* 2000, 66(1): 61-65.

[17] Picherit C, Bennetau C, Chanteranne B, et al. Soybean isoflavones dose dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats [J]. *J Nutr* 2001, 131(3): 723-728.

收稿日期: 2006-09-01 修回日期: 2007-04-25

本文编辑: 程春开

1587例硬膜外阻滞药物扩散再认识

徐德朋, 江学成, 张育才, 胡宁利

(解放军第九七医院麻醉科, 江苏 徐州 221004)

摘要:目的 探讨硬膜外阻滞初量在不同穿刺点的扩散情况。方法 1587例硬膜外阻滞病例, 详细记录初量的阻滞节段数, 并根据不同穿刺部位分别计算出阻滞每节段需要量。结果 以穿刺点为界扩散, 在中位穿刺点的向头和尾扩散无差别 ($P > 0.05$), 在低位穿刺点向头扩散明显少于尾扩散 ($P < 0.01$); 总扩散节段数中位穿刺点少于低位; 中位和低位穿刺点阻滞每节段需要量分别为 $(1.42 \pm 0.62) \text{ ml}$ 和 $(1.17 \pm 0.48) \text{ ml}$ ($P < 0.01$), 随穿刺点下移, 节段需要量有减少趋势。结论 中位穿刺点阻滞每节段需要量多于低位穿刺点, 且向头端扩散不明显多于尾端。

关键词: 麻醉; 硬膜外; 初量

中图分类号: R614.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2007)05-0316-04

Research on the spread of local anesthetic in the epidural space of 1587 patients undergoing epidural blockade