

IL-6R 抗体调节 PMMA 骨水泥介导的滑膜成纤维细胞 MMPs 和血管化因子 mRNA 表达

陶可 曾晖 熊界 唐新宇 张勇 康斌 辛风 桂先革

中图分类号: R329.28 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)06-0477-07

摘要: 目的 探讨 IL-6R 抗体对 PMMA 骨水泥介导的滑膜成纤维细胞 MMP-1 和 MMP-3、VEGF 和 PDGF mRNA 表达的调节。方法 从全髋关节置换术中获取滑膜组织消化并传代培养。倒置相差显微镜对滑膜细胞进行形态学观察,免疫细胞化学(SABC法)染色对滑膜成纤维细胞进行鉴定。根据加入不同培养物,实验分为3组:PMMA组:75 μg/mL PMMA 骨水泥颗粒;IL-6R 抗体组:10 ng/mL IL-6R 抗体 + 75 μg/mL PMMA 骨水泥颗粒;空白对照组。采用细胞计数试剂盒-8(Cell Counting Kit-8, CCK-8)检测 IL-6R 抗体对滑膜成纤维细胞增殖活力影响;实时荧光定量 PCR(real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)检测 MMP-1、MMP-3、VEGF 和 PDGF mRNA 表达。结果 原代滑膜细胞贴壁后,初期为短梭形。连续3次传代后,95%以上细胞为长梭形成纤维细胞样细胞。SABC法染色检测结果显示:上述成纤维样细胞抗 CD68 抗体阴性,抗 vimentin 抗体呈棕黄色,为阳性反应。CCK-8 检测显示:与 PMMA 组和空白对照组相比,IL-6R 抗体组吸光度(A)值明显降低($P < 0.01$);而空白对照组与 PMMA 组间吸光度(A)值无统计学差异($P > 0.05$)。FQ-PCR 检测发现:与 PMMA 组和空白对照组相比,IL-6R 抗体组中 MMP-1 和 MMP-3、VEGF 和 PDGF mRNA 的表达明显受到抑制($P < 0.01$);PMMA 组中 MMP-1 和 MMP-3、VEGF 和 PDGF 表达较空白对照组升高($P < 0.05$)。结论 IL-6R 抗体能显著抑制滑膜成纤维细胞 MMP-1 和 MMP-3、VEGF 和 PDGF mRNA 的表达,为生物制剂预防和治疗假体无菌性松动提供分子生物学的理论依据。

关键词: IL-6R 抗体; 聚甲基丙烯酸甲酯; 骨水泥; 滑膜成纤维细胞; 基质金属蛋白酶-1; 基质金属蛋白酶-3; 血管内皮生长因子; 血小板衍生生长因子

Regulation of IL-6R antibody on PMMA bone cement mediated mRNA expression of MMPs and vascular factors by synovial fibroblasts TAO Ke, ZENG Hui, XIONG Ao, et al. Department of Orthopedics, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036; Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Corresponding author: ZENG Hui, Email: zenghui_36@163.com

Abstract: Objective To investigate the PMMA bone cement-mediated expression of MMP-1, MMP-3, VEGF, and PDGF mRNA in synovial fibroblasts regulated by IL-6R antibody. **Methods** The synovial tissue obtained from total hip arthroplasty was digested and subcultured. Phase-contrast microscope was employed to observe the synovial cells and immunocytochemistry (SABC method) staining was used to identify synovial fibroblasts. The experiment was divided into 3 groups according to the different supplement in cultures: PMMA group (75 μg/ml PMMA bone cement particles); IL-6R antibody group (10 ng/ml IL-6R antibody and 75 μg/ml PMMA bone cement particles); and the control group. Cell proliferation activity regulated by IL-6R antibody or PMMA was measured by using a cell counting kit-8 (CCK-8). FQ-PCR was used to detect the mRNA expressions of MMP-1, MMP-3, VEGF, and PDGF. **Results** The primary synovial cells showed a short spindle shape after adhesion. After 3 consecutive passages, more than 95% of the cells became fibroblast-like cells with a long spindle shape. SABC staining showed that the anti-CD68

作者单位: 518036 深圳,北京大学深圳医院骨关节科(陶可、曾晖、熊界、唐新宇、张勇、康斌、辛风、桂先革); 汕头大学医学院(陶可、张勇、桂先革)

通讯作者: 曾晖, Email: zenghui_36@163.com

antibody was negative and anti-vimentin antibody was positive in fibroblast-like cells. CCK-8 test demonstrated that the absorbance value (A) was significantly lower in IL-6R antibody group than that in PMMA group and control group ($P < 0.01$). The A value was not statistically different between the control group and PMMA group ($P > 0.05$). FQ-PCR measurement showed that mRNA expressions of MMP-1, MMP-3, VEGF, and PDGF in IL-6R antibody group were significantly inhibited than those in PMMA group and control group ($P < 0.01$). The mRNA expressions of MMP-1, MMP-3, VEGF, and PDGF in PMMA group were higher than those in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** IL-6R antibody could significantly inhibit the mRNA expressions of MMP-1, MMP-3, VEGF, and PDGF in synovial fibroblasts. This may provide theoretical basis of molecular biology for the prevention and treatment of aseptic loosening of the prosthesis.

Key words: IL-6R antibody; PMMA; Bone cement; Synovial fibroblasts; MMP-1; MMP-3; VEGF; PDGF

大量的体内外研究证实,人工关节磨损产生的颗粒是引起无菌性松动的主要原因。在全髋关节置换术后无菌性松动病例中,可发现在磨损颗粒与骨组织界面之间或假体与骨组织之间,始终存在纤维组织样界膜,而占界膜组织 15% ~ 30% 的成纤维细胞及其表达的众多致炎性因子在假体无菌性松动过程中的作用近年来备受关注^[1,2]。目前,对人工关节无菌性松动的具体发病过程尚不完全清楚^[3],如何避免假体无菌性松动及其带来的二次翻修术成为摆在广大骨科临床工作者面前的重要课题。

白细胞介素-6 受体抗体 (anti-interleukin-6 receptor antibody) 是白细胞介素-6 受体 (interleukin-6 receptor, IL-6R) 的特异性抗体,通过识别结合膜结合型 IL-6R (membrane-bound IL-6R, mIL-6R) 和可溶性 IL-6R (soluble IL-6R, sIL-6R) 阻断 IL-6 (interleukin-6) 的信号转导级联放大作用;抑制核因子- κ B 受体激活因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 等的表达;同时,部分拮抗 IL-1、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等促发的生物学效应^[4-6]。因而,IL-6R 抗体具有重要的抑制炎症反应的作用。

本研究将 IL-6R 抗体、聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA) 骨水泥加入滑膜成纤维细胞培养体系,通过比较观察基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 和 MMP-3、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) mRNA 的表达,探讨使用生物制剂预防与治疗人工关节假体骨溶解和无菌性松动理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器:倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司)、高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)、PCR 热循环仪 (德国 Eppendorf 公司)、凝胶成像系统 Dolphin-DOC (美国 Wealtec 公司)、ABI Prism 7000 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)、Microplate reader 680 型酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Rad 公司)、Tecna G2 F20 型透射电镜 (荷兰 Philips 公司)。

1.1.2 主要试剂:DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司)、胎牛血清 (美国 Gibco 公司)、0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA (美国 Gibco 公司)、磷酸缓冲液 (PBS) (美国 Gibco 公司)、II 型胶原酶 (美国 Sigma 公司)、小鼠抗人 CD68 (美国 Thermo 公司)、小鼠抗人 vimentin 蛋白 (武汉博士德公司)、即用型免疫组化超敏试剂盒 (福州迈新公司)、PMMA 骨水泥 (美国 Howmedica Osteonics 公司)、鼠抗人 IL-6R 抗体 (美国 Invitrogen 公司)、台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒 (上海碧云天公司)、CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 试剂盒 (上海碧云天公司)、Trizol (美国 Invitrogen 公司)、反转录试剂盒 (北京百泰克公司)、荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)、6 × DNA loading buffer (北京百泰克公司)、DNA Marker (北京天根公司)。

1.2 方法

1.2.1 滑膜成纤维细胞分离、培养与鉴定:滑膜组织取自于北京大学深圳医院骨关节科 5 位全髋关节置换术患者 (其中男性 2 名,女性 3 名,平均年龄 55.8 岁)。患者均知情同意。

将获取的滑膜组织去除表面的脂肪、血液和纤

维结缔组织,放入 50 mL 离心管中,用无菌 PBS 反复冲洗 3 次,移至 60 mm 培养皿中,眼科剪剪成 1 mm³ 大小。用酶消化培养法,加入 1 mg/mL II 型胶原酶于 37℃,5% CO₂ 培养箱内消化 4 h,然后 0.25% 胰酶消化 30 min。200 目滤网过滤后离心,加入 10% 胎牛血清 DMEM 8 mL(含 100U/mL 青霉素、链霉素),充分轻柔吹打成单细胞悬液,台盼蓝染色及细胞计数法测定细胞活力,以 1 × 10⁶/mL 分装于两个 25 cm³ 培养瓶内,放入 37℃,5% CO₂ 培养箱内,24 h 后更换 1/2 培养基,以后每 3d 更换 1 次,待细胞汇合 85% 以上按 1:3 比例以 0.25% 胰酶常规消化传代,取第 3~7 代对数增殖期细胞作为实验用细胞。采用倒置相差显微镜对滑膜成纤维细胞进行形态学观察。

将滑膜成纤维细胞以 2 × 10⁵/mL、每孔 2 mL 接种于预置有盖玻片(多聚赖氨酸处理)的 6 孔板中,37℃,5% CO₂ 培养箱内培养 48 h。取出细胞爬片并用 PBS 漂洗,后用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min,采用免疫细胞化学法(SABC)检测 CD68、vimentin 蛋白,DAB 显色,中性树脂封片。

1.2.2 PMMA 骨水泥颗粒的制备:PMMA 骨水泥颗粒经 75% 酒精浸泡 72 h 后,PBS 洗涤 3 次,1500r/m 离心 10 min 后用含 1% FBS 培养基配成实验所需浓度。透射电镜测量骨水泥颗粒直径,直径范围在 0.3~1.1 μm,与从界膜组织提取的磨损颗粒直径(平均大小约为 0.53 ± 0.3 μm)接近^[7]。

1.2.3 实验分组:分 3 组:PMMA 组:75 μg/mL PMMA;IL-6R 抗体组:10 ng/mL IL-6R 抗体 + 75 μg/mL PMMA;空白对照组。

1.2.4 不同分组条件对滑膜成纤维细胞增殖活力影响:采用 CCK-8 试剂盒检测。方法如下:0.25% 胰酶消化贴壁的滑膜成纤维细胞,制成单细胞悬液并调整至 1 × 10⁵/mL,以每孔 100 μL 接种于 96 孔板,每孔设置 3 个复孔;适应性培养 24 h 后,再用 10% FBS 培养基同步化培养 24 h,弃去培养基;设 96 孔板中的第 1 列为调零孔(无细胞,仅加培养基),第 2 列为空白对照孔(所培养的细胞中不加 PMMA 及抗 IL-6R 抗体),第 3 列为实验孔(按照上述分组要求分别加入 PMMA、抗 IL-6R 抗体),于 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养 72 h;72 h 后,向每孔内加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,3 h 后,置于酶标仪 450nm 波长测定每孔吸光度(A)值(以 A 值表示细胞增殖活力),并记录结果;对照孔 A 值为对照孔所测 A 值 - 调零孔所测 A 值;实验孔 A 值为实验孔所

测 A 值 - 调零孔所测 A 值。以上步骤重复 4 次,结果取平均值。

1.2.5 总 RNA 提取及检测:按 1 × 10⁶/孔、每孔 2 mL 接种于 6 孔板,24 h 后弃去培养基,按照上述分组条件要求分别加入 PMMA 和 IL-6R 抗体,培养 72 h 后,Trizol 法提取总 RNA(按照操作说明书),加入 30 μL DEPC 水溶解提取的总 RNA,置于 -80℃ 保存备用。每组实验均重复 9 次。

1.2.6 FQ-PCR 检测 MMP-1、MMP-3、VEGF 和 PDGF mRNA 表达:引物合成使用 Primer Premier 5.0 软件,序列见表 1。引物交由上海生工公司合成。

表 1 各目的基因序列及扩增产物、退火温度、循环数

基因名称	引物序列 5'-3'	产物片段 (bp)	退火温度 (℃)	循环次数
MMP-1	正向:GACAAGACCCACACCACAGAGT	223	57	40
	反向:AGTCCCAAGTCGTAGACCAAAAGG			
MMP-3	正向:CTTGCAAAGCACCGTAGGGC	174	58	40
	反向:ATAGTCGGAGAGGAAGTATGTCCG			
PDGF	正向:TGGTCCTGCCAGTAAATGCTCTAAG	138	58	40
	反向:CCTCCCGACCGTCAACTGTG			
VEGF	正向:TGCCCACTGAGCAGTCCAACAT	150	56	40
	反向:GCCCACAGGGATTTCTTGCTTGG			
β-actin	正向:CACCCACACTGTGCCCATCTAC	158	58	40
	反向:TCTCAGGCACGATTCCCG			

cDNA 合成采用逆转录试剂盒,总反应体系为 20 μL:RNA 模板 1 μL,1 μL OligodT(50 μM),1 μL 10 mM dNTP,加 RNase Free dH₂O 至 14 μL,65℃ 加热 5 min 后,置于冰上急冷,短暂离心后,加入以下组分:4 μL 5 × 第一链合成缓冲液,1 μL M-MuL Reverse Transcriptase,1 μL RNase Inhibitor。30℃ 孵育 10 min,42℃ 加热 45 min,95℃ 5 min。置于 -20℃ 保存备用。

FQ-PCR 总反应体系 25 μL:cDNA 模板 1 μL,2 × Platinum SYBR Green qPCR superMix-UDG 12.5 μL,上游引物 0.5 μL,下游引物 0.5 μL,ROX 校正染液 0.5 μL,加灭菌水至 25 μL。按照各目的基因退火温度选择三步法完成扩增,循环数 40。根据溶解曲线判断 FQ-PCR 扩增产物的特异性,以 β-actin 为内参。

1.2.7 统计学处理:实验结果采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据用单因素方差分析(one way ANOVA),两组间比较采用 *q* 检验法,*P* 值 < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 滑膜成纤维细胞形态学及特殊染色结果

倒置相差显微镜对培养细胞进行形态学观察发

现;原代滑膜细胞贴壁后,初期为短梭形,其间夹杂少量多角突起样细胞,部分细胞形成集落样(图1)。用多次差别酶消化法和反复贴壁传代法纯化细胞,经3次连续传代后,95%以上细胞为长梭形成纤维样细胞。传代至第3代时,细胞均为长梭形,有突出的两极,胞浆丰富,胞核明显;局部细胞形成似巢样的排列(图2)。采用免疫细胞化学法(SABC)检测抗CD68抗体、vimentin抗体。结果显示:抗CD68抗体阴性,抗vimentin抗体阳性。证实分离的细胞为滑膜成纤维细胞(图3)。

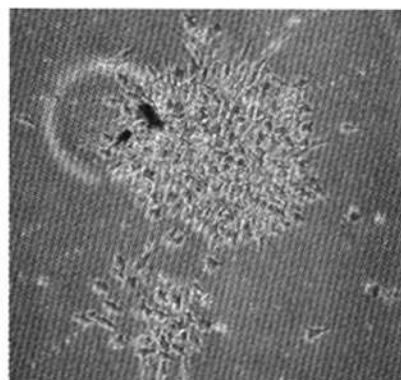


图1 原代滑膜成纤维细胞培养4天时的形态学观察($\times 100$)

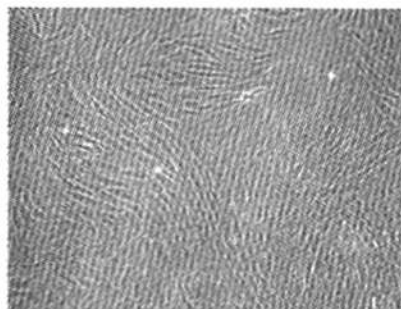


图2 传代3次后的滑膜成纤维细胞形态学观察($\times 200$)

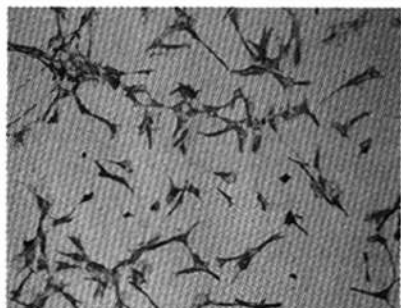


图3 抗vimentin蛋白染色显示细胞浆呈棕黄色,胞核拒染或仅淡染,为阳性反应($\times 200$)

2.2 CCK-8 试验检测不同分组对 RA 滑膜成纤维细胞增殖活力影响

与 PMMA 组和空白对照组相比,IL-6R 抗体组吸光度(A)值明显降低($P < 0.01$);而空白对照组与 PMMA 组间吸光度(A)值无统计学差异($P > 0.05$)(表2)。

表2 IL-6R 抗体、PMMA 对滑膜成纤维细胞吸光度(A)值(OD)的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	n	吸光度(A)值(OD)
空白对照组	12	0.990 ± 0.054
PMMA 组	12	1.088 ± 0.013
IL-6R 抗体组	12	$0.635 \pm 0.018^{**}$

注:与 PMMA 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.3 总 RNA 提取及检测

紫外分光光度仪测定各组提取的总 RNA 浓度和纯度,并用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示各组 OD 值均在 1.8 ~ 2.0 之间,电泳图条带清晰,表明总 RNA 完整性好。

2.4 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因表达量的变化

FQ-PCR 反应完成后,电脑自动生成目的基因和管家基因样本扩增曲线图及溶解曲线。经溶解曲线测定,得到单峰扩增产物,无明显非特异性扩增产物,特异性好。由获取的 Ct 值,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(目的基因 mRNA 表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta Ct = \Delta E - \Delta C$, $\Delta E = Ct_{\text{样本}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$, $\Delta C = Ct_{\text{对照组}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$)分别计算目的基因 MMP-1、MMP-3、VEGF 与 PDGF 在不同分组条件下的 mRNA 表达量,并绘制直方图(图4)。与 PMMA 组和空白对照组相比,IL-6R 抗体组 MMP-1 和 MMP-3、VEGF 和 PDGF mRNA 的表达明显受到抑制($P < 0.01$);PMMA 组 MMP-1 和 MMP-3、VEGF 和 PDGF 表达较空白对照组升高($P < 0.05$)。

3 讨论

人工关节假体置换术在治疗某些严重关节疾病如老年股骨颈骨折、股骨头缺血性坏死及类风湿关节炎等取得了巨大的成功^[8-10]。但伴随而来的问题是,假体置换术后 10 ~ 15 年约有 10% 的患者会出现假体周围骨溶解及随后发生的假体松动,大部分患者需接受假体翻修术^[11]。研究^[12, 13]发现,无菌性松动是人工关节翻修术最常见的原因,约占引起人工关节假体松动总数的 75%。翻修手术不仅给病人带来二次创伤,而且加重病人的经济负担。因此,如何避免无菌性假体松动及其带来的二次翻修

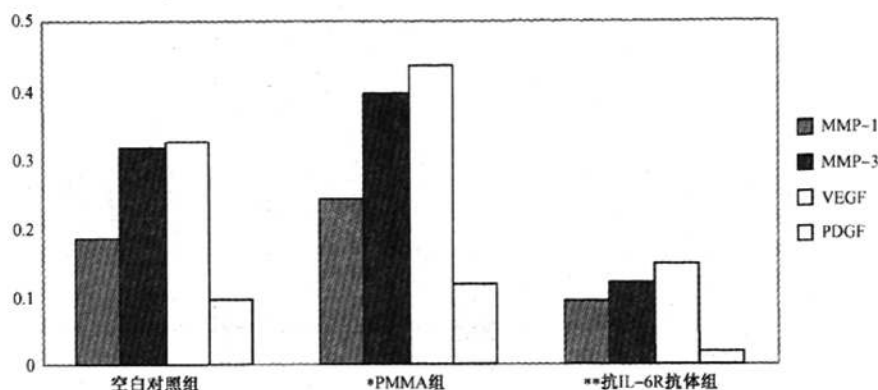


图4 不同分组处理条件下FQ-PCR测得的MMP-1、MMP-3、VEGF与PDGF mRNA表达量($\bar{x} \pm s, n=9$)

注:与PMMA组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

术一直是困扰广大骨科临床工作者的难题。

大量的体内外研究^[7,12]证实,假体磨损产生的颗粒是引起无菌性松动的主要原因。全髋关节置换术后无菌性松动病例中,可发现在磨损颗粒与骨组织界面之间或假体与骨组织之间,始终存在纤维组织样界膜,研究^[14,15]发现界膜组织主要由巨噬细胞和成纤维细胞构成,而这两种细胞在磨损颗粒介导的骨溶解过程中起重要作用。近年来,在假体无菌性骨溶解过程中,占界膜组织15%~30%的成纤维细胞的作用引起学者们的广泛关注^[1,2]。成纤维细胞吞噬磨损颗粒和在细胞因子、化学因子刺激下能增强多种炎性因子的表达,如IL-6、TNF- α 、MMPs、VEGF、PDGF、RANKL、IL-1 β 等,成纤维细胞及其分泌的炎性因子在假体周围骨与软骨基质破坏、破骨细胞分化成熟、巨噬细胞与淋巴细胞激活、界膜组织血管化及纤维化等方面发挥重要作用,并最终引发假体无菌性松动^[14-16]。

IL-6是一种作用广泛的多效性细胞因子,参与调节免疫反应、骨代谢、急性时相反应以及造血功能等过程。大量研究^[17,18]证实,滑膜成纤维细胞表达的IL-6与其受体IL-6R结合后激活JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription)与Ras-促分裂原活化蛋白激酶(ras mitogen-activated protein kinase, Ras-MAPK)信号通路,增加TNF- α 、IL-1等的表达,而增多的TNF- α 、IL-1等分别再与各自膜受体结合后可以激活NF- κ B信号,形成级联放大作用,进而促进TNF- α 、IL-1自身以及IL-6、MMPs、VEGF、IL-8、环氧合酶-2(COX-2)、血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)等一系列促炎性因子的表达^[19,20]。因此,我们选用IL-6R特异性抗体IL-6R抗体进行实验。

MMPs是一类含锌的肽链内切酶。正常情况下,MMPs主要功能是参与组织重塑,近年的研究发现其还具有调节免疫反应(如影响细胞因子或化学因子信号的传导)^[21]。正常滑膜成纤维细胞合成少量的MMPs,而在假体磨损颗粒的刺激下,滑膜成纤维细胞、巨噬细胞增强MMPs的表达。过量表达的MMPs对骨和软骨基质有强大的降解作用,导致骨与软骨基质的丢失,引发骨与软骨正常结构的严重破坏,因而与假体周围骨溶解、无菌性假体松动有紧密的关系。MMP-1和MMP-3是MMPs家族的典型代表,对骨和软骨等细胞外基质破坏作用最强且最为主要^[21-23]。Ishiguro等^[24]提取人工关节翻修患者界膜组织的RNA,分别检测MMP-1、2、3、9 mRNA表达情况,结果发现MMP-1、3在骨水泥固定的假体松动组织中表达局限性增强。Koreny等^[15]实验发现,在假体磨损颗粒的刺激下,成纤维细胞能分泌大量的MMP-1与MMP-3。

假体周围相对缺氧的微环境、磨损颗粒及其诱导产生的致炎因子联合可刺激滑膜成纤维细胞增殖和VEGF、PDGF持续高表达。Tunyogi-Csapo等^[25]研究证实,无菌性骨溶解和松动的假体界膜组织及周围存在明显的血管肉芽组织的侵袭性生长,而成纤维细胞及其分泌的成纤维细胞源生长因子VEGF和PDGF在界膜组织血管化发生发展过程中起着重要作用。一方面,VEGF和PDGF分别与其受体结合,通过信号转导促进滑膜成纤维细胞增生、血管新生与成熟,并增加血管通透性。另外,VEGF和PDGF趋化并激活单核细胞、淋巴细胞,还能增强炎症介质释放,加重炎症反应。已有的研究^[26]认为,VEGF在新生血管生成早期起作用,而PDGF主要发挥促血管功能成熟。此外,VEGF还能增加破骨

细胞前体细胞上 RANK 的表达,有助于破骨细胞的分化和成熟^[27]。

我们的研究发现,与空白对照组相比,PMMA 组 MMP-1、MMP-3、VEGF 与 PDGF 表达上调。这可能是在 PMMA 骨水泥颗粒刺激下,滑膜成纤维细胞产生的 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等致炎性因子,分别通过与各自胞膜上的受体结合后增加 MMP-1、MMP-3、VEGF 和 PDGF 等转录的结果。

MMPs 分解细胞外基质所产生的多肽等小分子有机物为血管化提供必要的物质基础;而血管新生后,带来更多的 MMPs,形成恶性循环^[28]。因此,如何阻断 MMPs、VEGF 和 PDGF 对假体周围骨与软骨基质的破坏作用以及假体周围血管化的形成,成为近年来的研究热点。

IL-6R 抗体是 IL-6R 的特异性抗体,通过识别结合 IL-6R 而直接阻断 IL-6 级联放大作用和部分拮抗 IL-1、TNF- α 等促发的生物学作用,起到抵抗炎症反应、抑制细胞增殖、分化、迁移作用^[4, 29]。Shinriki 等^[30]研究发现,人源性的 IL-6R 抗体能显著抑制横纹肌肉瘤 VEGF mRNA 的表达。Nakahara 等^[31]发现,IL-6R 抗体能使 RA 患者血清中升高的 VEGF 降低至正常水平;在体外,IL-6 与 IL-1 β 均能诱导滑膜成纤维细胞分泌 VEGF,而向滑膜成纤维细胞培养体系加入 IL-6R 抗体后,VEGF 的表达受到抑制,同时 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的合成也明显降低。推断这可能是 IL-6R 抗体有效抑制成纤维细胞产生 VEGF 的机制。最新的研究^[32]结果表明,选择性沉默 VEGF 基因能抑制钛颗粒诱发 BALB/c 小鼠的 TNF- α 、IL-1 β 和 RANKL 表达。

我们的实验结果表明,与空白对照组和 PMMA 组相比,IL-6R 抗体组 MMP-1 和 MMP-3、VEGF 和 PDGF mRNA 的表达显著降低($P < 0.01$)。通过各组间的比较可见,IL-6R 抗体可以有效抑制 MMP-1 和 MMP-3、VEGF 和 PDGF 表达。因而,使用 IL-6R 抗体可以阻断 MMPs 造成的假体周围骨与软骨基质的破坏以及 VEGF 和 PDGF 诱发的假体周围新生血管的形成,对假体无菌性松动可能起到较好的预防和治疗作用。

目前,对 IL-6R 抗体的研究主要集中在类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的治疗方面。Genovese 等^[33]进行的Ⅲ期 TOWARD 临床试验发现,IL-6R 抗体联合任一种改变病情抗风湿药都可以使病人在无明显副反应情况下获得安全有效的关节与全身系统症状的缓解。Smolen 等^[34]对中、重度

活动性 RA 患者使用不同剂量的 IL-6R 抗体治疗期间,病人耐受性良好、仅有较少和较轻微的不良反应,认为 IL-6R 抗体是缓解中、重度活动性 RA 的有效药物。

人工关节无菌性松动的具体发病机制至今尚未完全阐明^[3]。对于那些已经发生无菌性松动但没有必要进行翻修手术者或有关节磨损和骨溶解而尚未发生无菌性松动的患者,使用靶向性强、作用确切、副作用小的生物制剂治疗是未来发展的方向。IL-6R 抗体作为一种新型生物制剂在 RA 治疗方面已经取得肯定的疗效。因此,我们相信深入研究 IL-6R 抗体在人工关节无菌性松动发生过程中的防治作用机制,探索使用 IL-6R 抗体进行假体无菌性松动的合理预防与治疗,保存假体周围骨量,具有重要的指导意义。

【参 考 文 献】

- [1] Mostardi RA, Kovacic MW, Ramsier RD, et al. comparison of the effects of prosthetic and commercially pure metals on retrieved human fibroblasts: the role of surface elemental composition. *Acta Biomater*, 2010, 6(2):702-707.
- [2] Manlapaz M, Maloney WJ, Smith RL. In vitro activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris. *J Orthop Res*, 1996, 14(3):465-472.
- [3] Catelas I, Jacobs JJ. Biologic activity of wear particles. *Instr Course Lect*, 2010, 59:3-16.
- [4] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab, for the treatment of autoimmune diseases. *FEBS Lett*, 2011 Mar 22. [Epub ahead of print].
- [5] Ding C, Jones G. Anti-interleukin-6 receptor antibody treatment in inflammatory autoimmune diseases. *Rev Recent Clin Trials*, 2006, 1(3):193-200.
- [6] Mihara M, Nishimoto N, Ohsugi Y. The therapy of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5(5):683-690.
- [7] Purdue PE, Koulouvaris P, Nestor BJ, et al. The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis. *HSS J*, 2006, 2(2):102-113.
- [8] Davidovitch RI, Jordan CJ, Egol KA, et al. Challenges in the treatment of femoral neck fractures in the nonelderly adult. *J Trauma*, 2010, 68(1):236-242.
- [9] Ng VY, Granger JF, Ellis TJ. Calcium phosphate cement to prevent collapse in avascular necrosis of the femoral head. *Med Hypotheses*, 2010, 74(4):725-726.
- [10] Didomenico LA, Treadwell JR, Cain LZ. Total Ankle Arthroplasty in the Rheumatoid Patient. *Clin Podiatr Med Surg*, 2010, 27(2):295-311.
- [11] Keener JD, Callaghan JJ, Goetz DD, et al. Twenty-five-year results after Charnley total hip arthroplasty in patients less than

- fifty years old: a concise follow-up of a previous report. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85-A(6):1066-1072.
- [12] Goodman SB, Lind M, Song Y, et al. In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris. *Clin Orthop Relat Res*, 1998, (352):25-34.
- [13] Westby MD, Backman CL. Patient and health professional views on rehabilitation practices and outcomes following total hip and knee arthroplasty for osteoarthritis: a focus group study. *BMC Health Serv Res*, 2010, 10(1):119.
- [14] Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2009, 67(2):182-188.
- [15] Koreny T, Tunyogi-Csapó M, Göl I, et al. The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(10):3221-3232.
- [16] Holt G, Murnaghan C, Reilly J, et al. The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*, 2007, 460:240-252.
- [17] Krause A, Scaletta N, Ji JD, et al. Rheumatoid arthritis synovocyte survival is dependent on Stat3. *J Immunol*, 2002, 169(11):6610-6616.
- [18] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 2003, 374(Pt 1):1-20.
- [19] Boyce BF, Yao Z, Xing L. Functions of nuclear factor kappaB in bone. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1192(1):367-375.
- [20] Xu J, Wu HF, Ang ES, et al. NF-kappaB modulators in osteolytic bone diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20(1):7-17.
- [21] Pearce WH, Shively VP. Abdominal aortic aneurysm as a complex multifactorial disease: interactions of polymorphisms of inflammatory genes, features of autoimmunity, and current status of MMPs. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1085:117-132.
- [22] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 2010, 141(1):52-67.
- [23] Fisher JF, Mobashery S. Mechanism-based profiling of MMPs. *Methods Mol Biol*, 2010, 622:471-487.
- [24] Ishiguro N, Ito T, Kurokouchi K, et al. mRNA expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in interface tissue around implants in loosening total hip arthroplasty. *J Biomed Mater Res*, 1996, 32(4):611-617.
- [25] Tunyogi-Csapo M, Koreny T, Vermes C, et al. Role of fibroblasts and fibroblast-derived growth factors in periprosthetic angiogenesis. *J Orthop Res*, 2007, 25(10):1378-1388.
- [26] Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(1):7-16.
- [27] Knowles HJ, Athanasou NA. Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation. *Histol Histopathol*, 2009, 24(3):337-346.
- [28] Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. Mediators of ocular angiogenesis. *J Genet*, 2009, 88(4):495-515.
- [29] Dayer JM, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, 49(1):15-24.
- [30] Shinriki S, Jono H, Ota K, et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17):5426-5434.
- [31] Nakahara H, Song J, Sugimoto M, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(6):1521-1529.
- [32] Zhang W, Peng X, Cheng T, et al. Vascular endothelial growth factor gene silencing suppresses wear debris-induced inflammation. *Int Orthop*, 2011 Apr 8. [Epub ahead of print].
- [33] Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(10):2968-2980.
- [34] Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, et al. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet*, 2008, 371(9617):987-997.

(收稿日期:2010-10-15)