

- osteoprotegerin [J]. *Biomaterials* 2004, 25(4): 565—573.
- [8] Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis [J]. *J Orthop Res* 2003, 21(1): 73—80.
- [9] Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system [J]. *Endocrinology* 2001, 142(12): 5050—5055.
- [10] Vandooren B, Cantaert T, Noordenbos T, et al. The abundant synovial expression of the RANK/RANKL/Osteoprotegerin system in peripheral spondylarthritis is partially disconnected from inflammation [J]. *Arthritis Rheum* 2008, 58(3): 641—644.
- 收稿日期: 2008—08—27 修回日期: 2008—10—08
本文编辑: 李 昕

不同大小超高分子聚乙烯颗粒对兔膝关节周围组织巨噬细胞及炎症因子表达的影响^{*}

任天成, 刘 林, 许 铁, 秦宏敏^{*}

(徐州医学院附属医院急救中心, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨不同大小超高分子聚乙烯(UHMWPE)颗粒对兔膝关节周围组织巨噬细胞及炎症因子表达的影响。方法 实验组:将3种大小(平均直径)为1.33、5.92、58.87 μm 的UHMWPE颗粒用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)配成0.1 g/L混悬液注入日本大耳白兔右侧膝关节腔。对照组:不植入UHMWPE颗粒,其余条件均与实验组相同。分别于第8、16、24周取膝关节周围组织,进行病理组织学检查,ELISA法检测标本组织中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 的变化。结果 与对照组相比,1.33 μm 组、5.92 μm 组可见吞噬UHMWPE颗粒的巨噬细胞,58.87 μm 组可见大量巨噬细胞与多核巨细胞包绕UHMWPE颗粒。实验组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达与对照组比较均升高($P < 0.05$),而1.33 μm 、5.92 μm 2组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达高于58.87 μm 组($P < 0.05$)。结论 不同大小的UHMWPE颗粒都会激活巨噬细胞并刺激其释放炎症因子,在其他条件相同的情况下,小颗粒的刺激作用比大颗粒更强。

关键词:关节假体材料;超高分子聚乙烯颗粒;巨噬细胞;炎症因子

中图分类号: R687.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000—2065(2008)10—0639—05

The effect of worn particles of ultrahigh molecular weight polyethylene on the macrophages and their expression of inflammatory cytokine of peripheral tissues in rabbit knee joints

REN Tiancheng, LIU Lin, XU Tie, QIN Hongmin^{*}

(Emergency Center, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of UHMWPE particles of varied sizes on macrophages and their inflammatory cytokine expression in peripheral tissues of rabbit knee joints. Methods 60 Japanese white rabbits were divided into 4 groups at random and were injected with UHMWPE particles of three diameters (1.33 μm , 5.92 μm and 58.87 μm , respectively) at 0.1 g/L concentration into the knee joint capsules. At the 8th week, 16th week and 24th week after particle injection, assessment of histological examination and determination of the three cytokines—IL-1 β , IL-6 and TNF- α were performed respectively. Results Optical microscopy indicated that there were a lot of UHMWPE particles in peripheral tissue of the capsule. 1.33 μm and 5.92 μm foreign-body particles were phagocytosed by the neighboring macrophages and 58.87 μm particles were surrounded by multinucleated giant cells, fibroblasts, etc. All the rabbits injected with UHMWPE particles had enhanced the cytokine expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α regardless of particle sizes when compared with control animals injected with sterile phosphate buffered saline ($P < 0.05$). UHMWPE particles of 1.33 μm and 5.92 μm in size provoked macrophages to release IL-1 β , IL-6 and TNF- α higher than 58.87 μm particles ($P < 0.05$). Conclusion UHMWPE particles of each size are capable of activating

^{*} 基金项目:国家自然科学基金重点项目(50535050)

^{*} 通信作者: E-mail: qin hongmin07@yahoo.com.cn

macrophages and inducing inflammatory cytokine release while small particles ($1.33\ \mu\text{m}$ and $5.92\ \mu\text{m}$) seem to provoke a stronger inflammatory response than larger particles ($58.87\ \mu\text{m}$) under the conditions with equal particle volumes

Key words: materials for joint prosthesis; ultrahigh molecular weight polyethylene particles; macrophage; cytokine

在造成人工关节 (artificial joint) 无菌性松动的诸多因素中, 超高分子聚乙烯 (ultrahigh molecular weight polyethylene UHMWPE) 磨损颗粒引起的生物学反应正日益受到重视。磨损颗粒被局部的吞噬细胞, 特别是巨噬细胞吞噬后, 激活吞噬细胞并释放一系列炎症因子, 如白细胞介素 (IL)- 1β 、IL-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 和前列腺素 E_2 (PGE $_2$) 等, 这些炎症因子又作用于破骨细胞, 导致骨质溶解、人工关节假体松动。国内体外实验也证实, UHMWPE 颗粒与巨噬细胞相互作用, 能够刺激巨噬细胞的吞噬作用, 引起炎症因子的释放并激活破骨细胞^[1-3]。影响 UHMWPE 颗粒生物活性的因素有很多, 颗粒大小被认为是其中最重要的因素。但不同大小的 UHMWPE 颗粒作用有何不同目前尚不十分清楚。为此, 我们建立不同大小 UHMWPE 颗粒引起兔膝关节周围组织生物学反应的动物模型, 并进行观察, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物及材料 日本大耳白兔 60 只, 5~7 月龄, 雌雄各半, 体重 $2.5\sim 3.0\ \text{kg}$ 由徐州医学院实验动物中心提供。UHMWPE 颗粒由中国矿业大学材料研究院提供, 经扫描电镜 (SEM) 检测其形状为球形, 直径分别为 $(1.33\pm 0.08)\ \mu\text{m}$ 、 $(5.92\pm 0.13)\ \mu\text{m}$ 、 $(58.87\pm 0.31)\ \mu\text{m}$ 。按随机原则将实验动物分为 4 组: $1.33\ \mu\text{m}$ 组、 $5.92\ \mu\text{m}$ 组、 $58.87\ \mu\text{m}$ 组及对照组, 每组 15 只。每组分别于第 8、16、24 周 3 个时间点, 每一个时间点每组取实验动物 5 只进行实验。

1.2 实验方法 参阅有关文献^[4], 将 UHMWPE 颗粒用无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 按照 $0.1\ \text{g/L}$ 的浓度配成混悬液。2.5% 戊巴比妥钠溶液 $25\ \text{mg/kg}$ 耳缘静脉麻醉成功后, 均选择右侧膝关节, 局部备皮、消毒, 推开髌骨, 将 UHMWPE 颗粒混悬液 $2\ \text{ml}$ 注入膝关节腔内, 注入后再次局部消毒并按压 $5\ \text{min}$ 以防外溢。对照组注入等量的无菌 PBS 盐水。整个过

程严格遵循无菌操作。术毕将兔单笼饲养, 不制动。

1.3 标本采集与观察指标 术后观察实验动物一般情况、下肢活动及注射部位皮肤的情况。分别于第 8、16、24 周用空气栓塞法处死动物, 立即取膝关节周围组织, 置于 10% 中性甲醛溶液 ($\text{pH}\ 7.2\sim 7.4$), 常温下固定 24 h 石蜡切片, 苏木精-伊红常规染色, 光镜下观察兔膝关节周围组织对 UHMWPE 颗粒产生的反应。所有实验动物取标本的部位均一致。

在相同时间取部分膝关节周围组织 $3\ \text{g}$ 组织剪将其剪碎, 加生理盐水 $3\ \text{ml}$ 用匀浆器充分匀浆, 取匀浆液 $2\ \text{ml}$ 以 $8\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $10\ \text{min}$ 留取上清液 $1.0\ \text{ml}$ 于 -80°C 下保存。ELISA 法检测标本组织中细胞因子 IL- 1β 、IL-6、TNF- α 水平。试剂盒购自碧云天生物工程公司 (进口分装), 严格按照试剂盒说明书步骤进行操作。

1.4 统计学处理 数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件处理。组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较应用 q 检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理组织学改变 小颗粒组 ($1.33\ \mu\text{m}$ 组与 $5.92\ \mu\text{m}$ 组): 第 8 周, 可发现有巨噬细胞吞噬 UHMWPE 颗粒的现象; 第 16 周这种吞噬作用更加明显; 第 24 周仍可见吞噬 UHMWPE 颗粒的巨噬细胞大量存在 (图 1、2)。 $58.87\ \mu\text{m}$ 组: 第 8 周, 实验侧关节囊及其周围组织切片可见大量乳白色 UHMWPE 颗粒被巨噬细胞、多核巨细胞、成纤维细胞所包绕, 多核巨细胞数量最多, 淋巴细胞极少, 未见中性粒细胞, 外层有纤维组织增生; 第 16 周这种包裹现象更加明显; 第 24 周包裹进一步增厚, 细胞数增多, 形成囊肿样结构 (图 3)。注入 UHMWPE 颗粒后第 8、16、24 周, 对照组相应时点关节囊及周围组织均未见到 UHMWPE 颗粒、巨噬细胞、多核巨细胞和包裹现象 (图 4)。

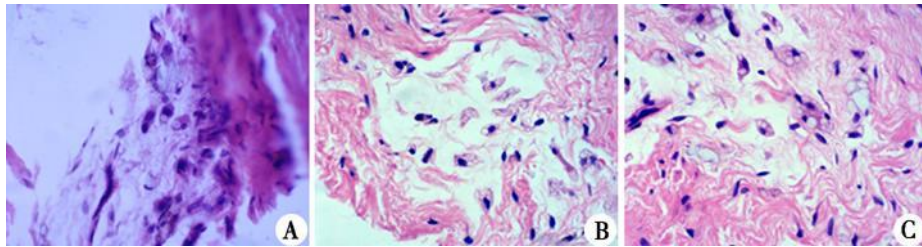


图 1 1.33 μm 组不同时间的病理组织学改变 (苏木精-伊红染色, $\times 400$)

A. 第 8 周; B. 第 16 周; C. 第 24 周

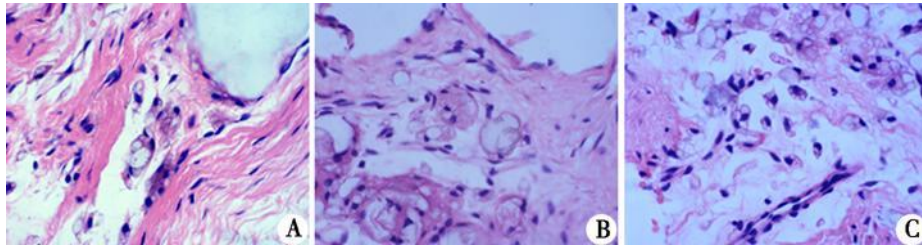


图 2 5.92 μm 组不同时间的病理组织学改变 (苏木精-伊红染色, $\times 400$)

A. 第 8 周; B. 第 16 周; C. 第 24 周

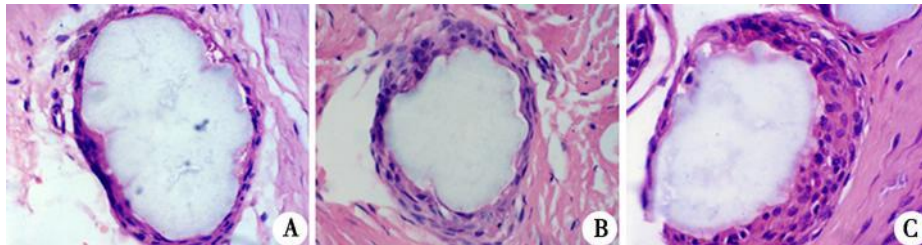


图 3 58.87 μm 组不同时间的病理组织学改变 (苏木精-伊红染色, $\times 400$)

A. 第 8 周; B. 第 16 周; C. 第 24 周

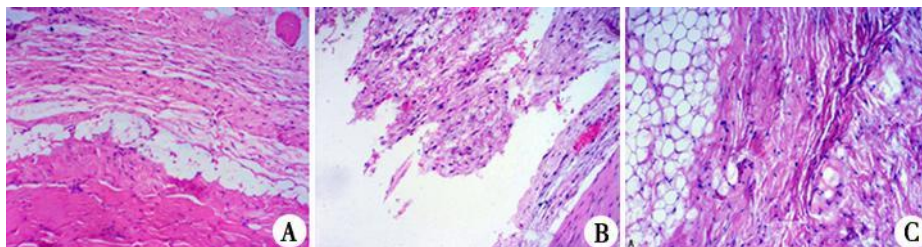


图 4 对照组不同时间的病理组织学改变 (苏木精-伊红染色, $\times 400$)

A. 第 8 周; B. 第 16 周; C. 第 24 周

2.2 细胞因子表达水平

2.2.1 $\text{IL}-1\beta$ 见表 1。组间比较: 术后第 8、16、24 周, 对照组中 $\text{IL}-1\beta$ 表达极低, 3 个颗粒组与之比较, $\text{IL}-1\beta$ 的表达水平均明显增高 ($P < 0.05$)。1.33 μm 组、5.92 μm 组与 58.87 μm 组比较, $\text{IL}-1\beta$ 的表达水平增高 ($P < 0.05$); 而 1.33 μm 组与 5.92 μm 组比较, $\text{IL}-1\beta$ 的表达稍高, 但没有显著性差异 ($P > 0.05$)。组内比较: 3 个颗粒组随时间延长 $\text{IL}-1\beta$ 表达水平逐渐升高; 第 16、24 周, $\text{IL}-1\beta$

的表达均较第 8 周升高 ($P < 0.05$), 第 24 周较第 16 周升高 ($P < 0.05$)。对照组 $\text{IL}-1\beta$ 的表达略有增加, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2.2 $\text{IL}-6$ 见表 2。组间比较: 术后第 8、16 和 24 周, 1.33 μm 组和 5.92 μm 组 $\text{IL}-6$ 的表达明显高于对照组和 58.87 μm 组 ($P < 0.05$)。而 1.33 μm 组 $\text{IL}-6$ 的表达稍低于 5.92 μm 组, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。58.87 μm 组第 8 周 $\text{IL}-6$ 的表达高于对照组 ($P < 0.05$), 第 16、24 周稍高于对照组,

但无显著性差异 ($P>0.05$)。组内比较: 1.33 μm 组 IL-6 的表达随时间延长逐渐升高, 但无显著性差异 ($P>0.05$)。5.92 μm 组 IL-6 的表达第 16 周稍高于第 8 周和第 24 周, 但无显著性差异 ($P>0.05$), 第 8 周与第 24 周基本相等 ($P>0.05$)。58.87 μm 组的表达第 16 周稍低于第 8 周和第 24 周, 但均无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.2.3 TNF- α 见表 3。组间比较: 术后第 8、16

和 24 周, 3 个颗粒组 TNF- α 的表达均明显高于对照组 ($P<0.05$)。第 8、16 周, 1.33 μm 组、5.92 μm 组与 58.87 μm 组比较, TNF- α 表达明显升高 ($P<0.05$)。第 24 周, 3 个颗粒组之间比较, 无显著性差异 ($P>0.05$)。组内比较: 3 个颗粒组 TNF- α 的表达随时间延长均下降 ($P<0.05$), 对照组在不同时间点未见明显变化 ($P>0.05$)。

表 1 4 组不同时间 IL-1 β 表达水平的比较 ($n=5, \bar{x}\pm s \text{ ng/L}$)

组 别	8 周	16 周	24 周
1.33 μm 组	25.64 $\pm$ 3.97 $^{\Delta}$	38.65 $\pm$ 8.25 $^{\Delta\#}$	50.53 $\pm$ 7.17 $^{\Delta+ \#}$
5.92 μm 组	25.30 $\pm$ 6.15 $^{\Delta}$	31.33 $\pm$ 3.19 $^{\Delta\#}$	46.87 $\pm$ 6.79 $^{\Delta+ \#}$
58.87 μm 组	16.97 $\pm$ 5.28 $^{\#}$	20.96 $\pm$ 3.69 $^{\#}$	31.84 $\pm$ 5.52 $^{\# + \#}$
对照组	9.07 $\pm$ 1.16	11.52 $\pm$ 2.04	17.08 $\pm$ 3.45 $^{\#}$

与对照组比较: $^{\#} P<0.05$; 与 58.87 μm 组比较: $^{\Delta} P<0.05$; 组内与第 8 周比较:

$^{\#} P<0.05$; 与第 16 周比较: $^{+} P<0.05$

表 2 4 组不同时间 IL-6 表达水平的比较 ($n=5, \bar{x}\pm s \text{ ng/L}$)

组 别	8 周	16 周	24 周
1.33 μm 组	46.23 $\pm$ 5.47 $^{\Delta}$	41.21 $\pm$ 9.17 $^{\Delta}$	43.15 $\pm$ 7.68 $^{\Delta}$
5.92 μm 组	47.73 $\pm$ 9.11 $^{\Delta}$	52.46 $\pm$ 12.57 $^{\Delta}$	47.62 $\pm$ 7.99 $^{\Delta}$
58.87 μm 组	28.35 $\pm$ 5.03 $^{\#}$	23.87 $\pm$ 6.38	29.46 $\pm$ 4.99
对照组	13.65 $\pm$ 6.30	12.87 $\pm$ 3.34	13.43 $\pm$ 4.93

与对照组比较: $^{\#} P<0.05$; 与 58.87 μm 组比较: $^{\Delta} P<0.05$

表 3 4 组不同时间 TNF- α 表达水平的比较 ($n=5, \bar{x}\pm s \text{ ng/L}$)

组 别	8 周	16 周	24 周
1.33 μm 组	49.37 $\pm$ 5.96 $^{\Delta}$	44.31 $\pm$ 5.67 $^{\Delta\#}$	26.00 $\pm$ 5.24 $^{+ \#}$
5.92 μm 组	44.11 $\pm$ 5.56 $^{\Delta}$	36.81 $\pm$ 6.82 $^{\Delta\#}$	24.75 $\pm$ 4.19 $^{+ \#}$
58.87 μm 组	29.81 $\pm$ 4.55 $^{\#}$	20.91 $\pm$ 3.26 $^{\#}$	20.53 $\pm$ 2.86 $^{\#}$
对照组	14.68 $\pm$ 1.42	13.28 $\pm$ 2.56	12.67 $\pm$ 2.72

与对照组比较: $^{\#} P<0.05$; 与 58.87 μm 组比较: $^{\Delta} P<0.05$; 组内与第 8 周比较:

$^{\#} P<0.05$; 与第 16 周比较: $^{+} P<0.05$

3 讨 论

巨噬细胞受到 UHMW PE 颗粒刺激后可产生 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子, 这些炎症因子通过促进破骨细胞的形成或激活破骨细胞使关节假体周围骨溶解, 从而引起人工关节松动^[5-6]。影响磨损颗粒诱导骨溶解的因素是多方面的, 包括颗粒的大小、数量、形状、成分及理化性质等。其中颗粒大小被认为是最重要的因素之一^[7]。然而, 不同大小的磨损颗粒引起炎症反应有何不同, 目前还不清楚。为此, 我们选择了有代表意义的 3 种不同大小 UHMW PE 颗粒, 并通过不同时间点病理组织学检查和细胞因子测定来探讨这一问题。

本实验病理组织学检查显示: 小颗粒组 (1.33 μm 组与 5.92 μm 组) 吞噬 UHMW PE 颗粒的巨噬细胞随时间延长而增加; 大颗粒 (58.87 μm 组) 因体积较大无法吞噬, 而在颗粒周围形成由大量多核巨细胞、成纤维细胞等组成的包裹, 并随时间延长包裹明显变厚, 细胞数量显著增加; 而相应的对照组在不同时间点未发现巨噬细胞和多核巨细胞。由此证明注入 UHMW PE 颗粒后, 巨噬细胞与多核巨细胞在磨损颗粒产生的一系列生物学反应并最终导致骨质溶解的过程中起着极其关键的作用。这与 Ingham 等^[8]学者的研究结果是一致的。

我们检测各组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达, 结果发现, 这 3 组不同大小的 UHMW PE 颗粒均可

引起炎症反应。同一时间点比较,小颗粒组炎症因子表达显著高于大颗粒组和对照组,而小颗粒组之间比较未见明显不同。说明小磨损颗粒的生物活性较大颗粒强,但在巨噬细胞吞噬范围内不同大小磨损颗粒作用无显著性差异。

不同时间点比较,各炎症因子的表达存在差异。小颗粒组 $IL-1\beta$ 的表达第 8 周时较低,第 16、24 周时表达增高。提示在 UHMW PE 颗粒介导的慢性炎症过程中, $IL-1\beta$ 主要是在中、晚期发挥作用。 $IL-1\beta$ 是巨噬细胞激活后的常见产物,同时又是巨噬细胞的一个强力趋化剂,可以再次刺激巨噬细胞合成、分泌 $IL-1\beta$,也可以刺激破骨细胞增生,通过成纤维细胞诱导产生基质金属蛋白胶原酶 (MMPs)、PGE₂ 等,加速骨质的吸收,同时抑制成骨细胞合成而减少新骨形成^[9]。

TNF- α 表达在第 8 周时最高,第 16 周下降,第 24 周下降至最低。这可能是由于基因转录早期阶段的正性调节与后期阶段的负反馈所致。UHMW PE 颗粒激活巨噬细胞的核转录因子 NF- κ B 后,迅速产生和分泌大量 TNF- α ,并与巨噬细胞上的 TNF 受体结合,通过自分泌形式诱导大量 TNF- α 产生^[10]。这种作用在开始时表现尤为明显,到后期逐渐减弱。我们的实验结果也提示, TNF- α 主要是在炎症反应早期阶段发挥作用。TNF- α 可以结合到破骨细胞前体细胞的 TNF 受体上,诱导原癌基因 (c-src) 表达,而 c-src 的表达是破骨细胞刷状缘形成和骨吸收的必要条件^[10]。

$IL-6$ 在第 8、16、24 周均处于高表达状态,即使在磨损颗粒没有增加的情况下仍然维持在较高水平,这主要是由于磨损颗粒刺激巨噬细胞,导致 $IL-6$ 的大量产生,并再次作用于巨噬细胞本身刺激其产生更多的 $IL-6$ ^[11]。我们的实验结果证明,巨噬细胞在 UHMW PE 颗粒刺激下持续分泌 $IL-6$,在介导慢性炎症反应中长时间发挥作用。

58.87 μ m 的大颗粒不能被巨噬细胞吞噬,但仍然能引起炎症因子的产生。

如前所述,本实验病理学检查可见 UHMW PE 颗粒被大量多核巨细胞、成纤维细胞、内皮细胞等包裹,说明在 UHMW PE 磨损颗粒诱导的炎症反应过程中,除了巨噬细胞外,尚有多种细胞参与。这些细胞可以相互激活、相互作用,使大颗粒在无法被巨噬细胞吞噬的情况下仍然表现出一定的生物活性。

本实验表明:不同大小的 UHMW PE 颗粒植入兔膝关节腔后都可以引起炎症细胞因子的产生,小

颗粒被巨噬细胞吞噬并表现出强烈的生物活性作用,大颗粒被多种细胞包裹并通过细胞间的相互激活、相互作用,释放生物活性物质,而小颗粒诱导炎症细胞因子表达的作用要比大颗粒更强。但是这种作用是如何产生的,作为细胞外信号的 UHMW PE 颗粒如何激活细胞内信号转导系统,进而激活转录因子,启动基因的转录,合成炎症细胞因子,本实验未予研究。在分子信号水平探讨颗粒对巨噬细胞的影响将是我们下一阶段要做的工作。

参考文献:

- [1] Hatton A, Nevelos JE, Matthews JB, et al. Effects of clinically relevant alumina ceramic wear particles on TNF- α production by human peripheral blood mononuclear phagocytes [J]. *Biomaterials* 2003, 24(7): 1193—1204.
- [2] Otto M, Kriegsmann J, Gehke T, et al. Wear particles: key to aseptic prosthetic loosening? [J]. *Pathologie* 2006, 27(6): 447—460.
- [3] 毛远青,朱振安,汤亭亭,等.超高分子量聚乙烯颗粒对巨噬细胞影响的实验研究 [J]. *中华外科杂志*, 2006, 44(12): 852—855.
- [4] Zysk SP, Gebhard HH, Kalteis T, et al. Particles of all sizes provoke inflammatory responses in vivo [J]. *Clin Orthop Relat Res* 2005, (433): 258—264.
- [5] 李杰,周兵,郭开今.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 [J]. *徐州医学院学报*, 2007, 27(5): 314—316.
- [6] Kontinen YT, Xu JW, Waris E, et al. Interleukin-6 in aseptic loosening of total hip replacement prostheses [J]. *Clin Exp Rheumatol* 2002, 20(4): 485—490.
- [7] Wooley PH, Morren R, Andary J, et al. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch [J]. *Biomaterials* 2002, 23(2): 517—526.
- [8] Ingham E, Fisher J. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement [J]. *Biomaterials* 2005, 26(11): 1271—1286.
- [9] Yang S, Wu B, Mayton L, et al. $IL-1Ra$ and $vIL-10$ gene transfer using retroviral vectors ameliorates particle-associated inflammation in the murine air pouch model [J]. *Inflamm Res* 2002, 51(7): 342—350.
- [10] Epstein NJ, Bragg WE, Ma T, et al. UHMW PE wear debris up-regulates mononuclear cell proinflammatory gene expression in a novel murine model of intramedullary particle disease [J]. *Acta Orthop* 2005, 76(3): 412—420.
- [11] Niki Y, Matsumoto H, Suda Y, et al. Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synovocytes and bone marrow macrophages [J]. *Biomaterials* 2003, 24(8): 1447—1457.

收稿日期: 2008-07-02 修回日期: 2008-09-30

本文编辑:李昕