

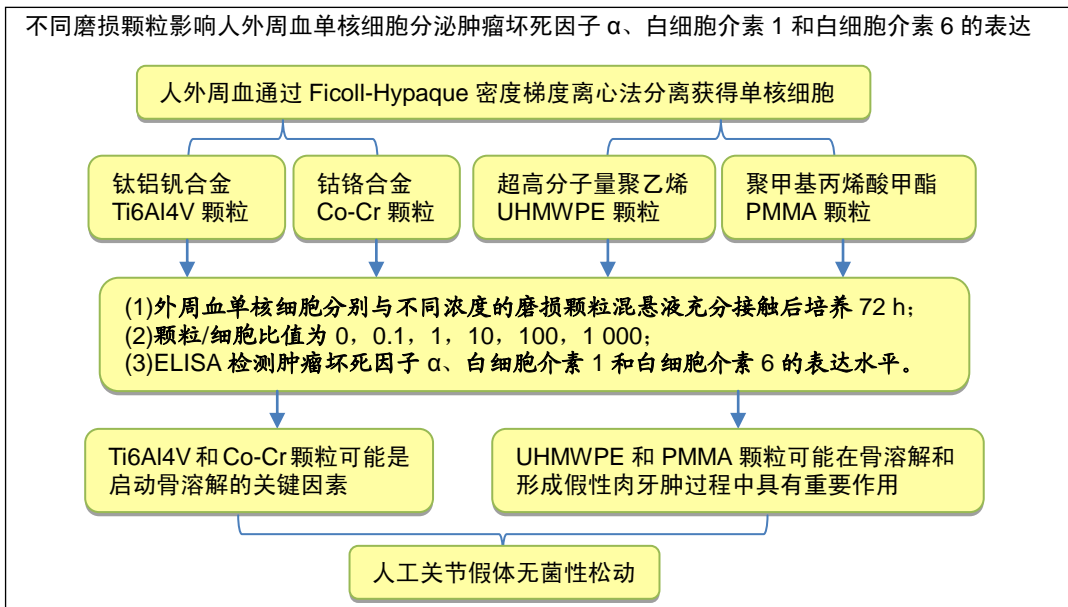
不同磨损颗粒对外周培养人外周血单核细胞的影响

李朋, 杨淑野, 张 锴, 贾 龙, 杜刚强, 刘 栋, 张新军, 张德刚, 王志刚(滨州医学院附属医院创伤骨科, 山东省滨州市 256600)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1572

ORCID: 0000-0002-3112-0473(张锴)

文章快速阅读:



李朋, 男, 1988 年生, 山东省庆云县人, 汉族, 2015 年滨州医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事人工关节无菌性松动发生机制和 Ilizarov 牵张成骨技术修复重建骨与软组织损伤研究。

并列第一作者: 杨淑野, 1981 年生, 山东省沂南县人, 汉族, 2015 年山东大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事四肢骨折、骨盆及髌骨骨折治疗, 擅长复杂四肢骨折及小儿骨折临床研究。

通讯作者: 张锴, 博士, 主任医师, 研究生导师, 滨州医学院附属医院创伤骨科, 山东省滨州市 256600

文献标识码:A

稿件接受: 2018-10-28



Li Peng, Master, Physician, Department of Trauma Orthopedics, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Yang Shuye, MD, Attending physician, Department of Trauma Orthopedics, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Li Peng and Yang Shuye contributed equally to this work.

Corresponding author: Zhang Kai, MD, Chief physician, Master's supervisor, Department of Trauma Orthopedics, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, Shandong Province, China

文题释义:

假体无菌性松动: 临床常常表现为假体关节置换后出现肢体活动时疼痛伴有功能障碍, 可排除感染性松动可能, 往往需要翻修手术治疗。作为关节置换后中远期最常见最严重的并发症之一, 其原因主要与假体各组件磨损产生的颗粒、机体免疫功能、生物力学、细胞因子、手术技术、假体设计理念和术后功能锻炼等多种因素有关。

磨损颗粒: 假体关节置换后由于长期反复活动磨损产生的大小不一形态各异的颗粒统称为磨损颗粒。目前关节假体主要涉及到的生物材料主要有钛铝钒合金(Ti6Al4V)、钴铬合金(Co-Cr)、不锈钢(含 Ni)等金属材料; 超高分子量聚乙烯(UHMWPE)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)等高分子有机材料; 氧化铝(Al_2O_3)、氧化锆(ZrO_2)等陶瓷材料, 大量研究发现各种生物材料颗粒的体积、浓度、形态、生物学活性等因素与诱发无菌性松动反应存在着密切关系。

摘要

背景: 人工关节置换后正常的行走活动会产生大量的钛铝钒合金(Titanium 6 Aluminium 4 Vanadium, Ti6Al4V)、聚甲基丙烯酸甲酯(Polymethylmethacrylate, PMMA)、超高分子量聚乙烯(Ultra-High-Molecular-Weight-Polyethylene, UHMWPE)、钴铬合金(Chromium-Cobalt Alloy, Co-Cr)等磨损颗粒, 激活单核细胞释放大量的炎症细胞因子和趋化因子, 诱发骨溶解和形成假性肉芽肿等一系列生物学级联反应, 最终导致假体发生无菌性松动。

目的: 探讨 Ti6Al4V、PMMA、UHMWPE 和 Co-Cr 颗粒对外周培养人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 和白细胞介素 6 的影响及诱导骨溶解引起无菌性松动的作用机制。

方法: 将人外周血单核细胞分别与不同浓度的 Ti6Al4V、PMMA、UHMWPE 和 Co-Cr 颗粒进行共培养, 72 h 后提取细胞上清液, 用 ELISA 法检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 和白细胞介素 6 的表达水平, 观察各种颗粒浓度和理化性质对外周血单核细胞活性的影响。

结果与结论: ①各组人外周血单核细胞存活率均大于 95%, 仅有 Co-Cr 组颗粒/细胞比值为 1 000 时单核细胞存活率降至 87%; ②当颗粒/细胞比值为 10, 100, 1 000 时, 活化的单核细胞分泌肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 和白细胞介素 6 的水平与原始幼稚单核细胞(颗粒/细胞比值为 0 时)相比显著增高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); ③Ti6Al4V 组、PMMA 组和 UHMWPE 组中随颗粒浓度增加, 单核细胞分泌肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 和白细胞介素 6 出现不同程度的增强。Co-Cr 组中当颗粒/细胞比值达到 1 000 时却出现肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 和白细胞介素 6 的表达水平降低; ④在骨溶解过程中 Ti6Al4V 颗粒的功能生物学活性最强, 其次是 Co-Cr 和 PMMA 颗粒, UHMWPE 颗粒最低弱; Ti6Al4V、PMMA、UHMWPE 和 Co-Cr 颗粒在骨溶解过程中对外周血单核细胞的影响存在剂量依赖性。

关键词:

人工关节置换; 无菌性松动; 骨溶解; 磨损颗粒; 单核细胞; 细胞因子; 国家自然科学基金

主题词:

关节成形术, 置换; 颗粒物; 单核细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1; 白细胞介素 6; 组织工程

中图分类号: R459.9

基金资助:

国家自然科学基金(81241061), 项目负责人: 张镔; 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0023), 项目负责人: 杨淑野

缩略语:

钛铝钒合金: Titanium 6 Aluminium 4 Vanadium, Ti6Al4V; 聚甲基丙烯酸甲酯: Polymethylmethacrylate, PMMA; 超高分子量聚乙烯: Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylene, UHMWPE; 钴铬合金: Chromium-Cobalt Alloy, Co-Cr

Influence of different wear particles on human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*

Li Peng, Yang Shuye, Zhang Kai, Jia Long, Du Gangqiang, Liu Dong, Zhang Xinjun, Zhang Degang, Wang Zhigang (Department of Trauma Orthopedics, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: After artificial joint replacement, daily activities lead to the production of a large number of titanium 6 aluminium 4 vanadium (Ti6Al4V), polymethylmethacrylate (PMMA), ultra-high-molecular-weight-polyethylene (UHMWPE) and chromium-cobalt alloy (Co-Cr) particles, activating monocytes to release a large number of inflammatory cytokines and chemokines, including a series of biological cascade reactions, such as inducing bone dissolution and forming pseudo-granuloma, and eventually leading to aseptic loosening of the prosthesis.

OBJECTIVE: To investigate the effect of Ti6Al4V, PMMA, UHMWPE and Co-Cr particles on tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6 in the human peripheral blood monocytes cultured *in vitro* and to explore the underlying mechanism of aseptic loosening of the prosthesis by inducing bone dissolution.

METHODS: Human peripheral blood mononuclear cells were cultured with Ti6Al4V, PMMA, UHMWPE and Co-Cr particles at different concentrations. After 72 hours of culture, ELISA technique was utilized to quantify the secretion of different cytokines includes tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6. We observed the influence of different wear particle concentrations and particle properties on the viability of human peripheral blood mononuclear cells.

RESULTS AND CONCLUSION: Cell viability exceeded 95% for all groups, except for 87% in the Co-Cr group when the particle/cell ratio was 1 000. Compared with the naive mononuclear cells (particle/cell ratio of 0), the expression of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6 in the activated mononuclear cells increased significantly when the particle/cell ratio was 10, 100 and 1 000 ($P < 0.05$). Ti6Al4V, PMMA and UHMWPE particles stimulated human mononuclear cells to overexpress tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6, which were positively correlated with the concentration of particles. However, when the Co-Cr particle/cells ratio was 1 000, the expression levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6 were decreased. During the osteolysis reaction, Ti6Al4V particles had strongest biological activity, followed by Co-Cr and PMMA particles, and the biological activity of UHMWPE particles was lowest. Ti6Al4V, PMMA, UHMWPE and Co-Cr particles showed dose-dependent effects on the human peripheral blood mononuclear factors during the osteolysis.

Subject headings: Arthroplasty, Replacement; Particulate Matter; Monocytes; Tumor Necrosis Factor-alpha; Interleukin-1; Interleukin-6; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81241061 (to ZK); Shandong Provincial Medical and Health Technology Development Project, No. 2016WS0023 (to YSY)

0 引言 Introduction

人工关节置换可以有效解除骨关节炎晚期患者的病痛,重建关节肿瘤和关节内严重骨折患者的肢体功能,使他们恢复正常的生活,被称为世纪性手术^[1]。目前全世界每年有超过100万例患者接受人工关节置换,但是因为无菌性松动导致关节置换后返修率达到了同期关节置换手术的20%^[2]。由于手术技术的提高和假体设计工艺的更新,感染和假体周围骨折及关节脱位等近期并发症明显降低,然而随着时间的推移,假体磨损、骨溶解和无菌性假体松动等远期并发症却成为影响关节置换后使用寿命和长远疗效的主要因素^[3-4]。研究发现宿主机体对人工假体磨损颗粒产生的慢性无菌性炎症反应和磨损颗粒诱发骨溶解吸收导致的无菌性松动是假体翻修最常见的原因^[5-7]。文献研究表明关节置换后正常的行走活动会产生大量的钛铝钒合金(Titanium 6 Aluminium 4 Vanadium, Ti6Al4V)、聚甲基丙烯酸甲酯(Polymethylmethacrylate, PMMA)、超高分子量聚乙烯(Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylene, UHMWPE)、钴铬合金(Chromium-Cobalt Alloy, Co-Cr)等磨损颗粒,并且通过激活单核细胞诱发骨溶解生物学级联反应,在假体无菌性松动的发病过程中具有重要的作用^[8-9]。

目前关于各种生物材料对单核巨噬细胞生物学特性的影响机制尚不完全清楚。任何一种生物材料的磨损颗粒对宿主机体来说作为异物都能引起细胞无菌性炎症反应,但是究竟哪一种生物材料的磨损颗粒在人工关节假体周围骨质溶解反应中具有最大程度的决定性作用仍存争议。根据文献报道和作者以往的研究经验证实肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1和白细胞介素6在骨溶解过程中存在高水平表达^[10-11]。此研究旨在通过观察Ti6Al4V、PMMA、UHMWPE和Co-Cr颗粒对体外培养人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1和白细胞介素6的影响,探讨磨损颗粒诱导骨溶解引起无菌性松动的作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 临床细胞学体外实验研究。

1.2 时间及地点 实验于2013年10月至2014年12月在滨州医学院医学实验室完成。

1.3 材料 RPMI-1640细胞培养液(美国Sigma公司);胎牛血清(杭州四季青);ELISA试剂盒(美国BD公司);人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司);锥虫蓝染液(武汉博士德);内毒素检测试剂盒(美国Lonza Kinetic-QCL公

司); Ti6Al4V颗粒平均直径2.3 μm(0.1-68 μm); PMMA颗粒平均直径4.0 μm(0.1-10 μm); UHMWPE颗粒平均直径为3.6 μm(2.0-23 μm); Co-Cr颗粒平均直径5.7 μm(1-20 μm)。上述4种颗粒由杨上游教授馈赠。

1.4 实验方法

1.4.1 标本收集及外周血单核细胞分离培养 选择15名健康志愿者(男7名、女8名), 年龄55-65岁, 平均62.6岁, 分别采集外周循环血40 mL。采用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法分离获取人外周血单核细胞, 将获取的细胞在高倍显微镜下进行计数, 细胞浓度要求达到 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。将细胞转移到6孔培养板中于37 °C, 体积分数为5%CO₂细胞孵育箱中培养4-6 h, 去除培养液, 得到贴壁生长的单核细胞, 发现细胞贴壁率达98%, 再加入含有体积分数为10%胎牛血清的RPMI-1640细胞培养液, 置于孵育箱中培养备用。

1.4.2 颗粒混悬液的制备 分别把4种颗粒用体积分数为75%医用乙醇消毒后放入带盖通气玻璃培养皿中, 无菌敷料包裹后置于40 °C恒温鼓风干燥箱内处理3 h, 再用含体积分数为10%胎牛血清的RPMI-1640细胞培养液制成混悬液, 计数并将颗粒混悬液浓度调整为 $5 \times 10^{12} \text{ L}^{-1}$ 。通过使用内毒素检测试剂盒测定无内毒素残留, 排除内毒素干扰。

1.4.3 四种颗粒分别与人外周血单核细胞共培养 根据添加颗粒种类不同分为4组: Ti6Al4V组、PMMA组、UHMWPE组、Co-Cr组。将培养备用的人外周血单核细胞接种于6孔细胞培养板中, 每孔细胞数量要求为 5×10^6 个。根据设定的每孔颗粒/细胞比值为0, 0.1, 1, 10, 100, 1 000, 分别加入相应浓度的Ti6Al4V、PMMA、UHMWPE和Co-Cr颗粒混悬液, 轻轻晃动6孔细胞培养板使颗粒与人外周血单核细胞充分接触, 放置于37 °C、体积分数为5%CO₂的恒温细胞培养箱中培养72 h。为确保颗粒与外周血单核细胞

都有充分接触的机会, 细胞培养孵化期间每隔8 h轻轻摇晃6孔细胞培养板, 共计晃动8次。培养72 h后获取上清液, 进行ELISA检测肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6的表达水平。采用锥虫蓝染液检测外周血单核细胞存活率。

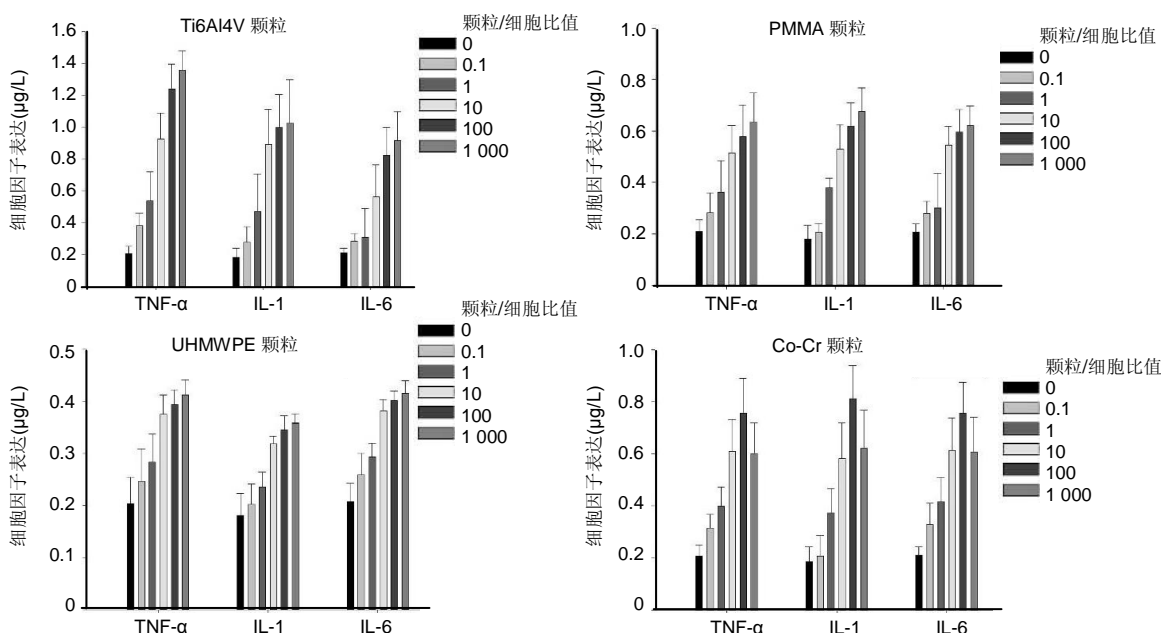
1.5 主要观察指标 Ti6Al4V、PMMA、UHMWPE和Co-Cr颗粒影响外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6的表达水平。

1.6 统计学分析 独立重复实验3次。实验结果采用SPSS 16.0 统计软件包进行处理。正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数比较采用t 检验。组内比较采用单因素方差分析(ANOVA), 组间比较采用SNK-q检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 外周血单核细胞存活率 人外周血单核细胞与Ti6Al4V、PMMA、UHMWPE和Co-Cr颗粒不同浓度混悬液共培养时存活率均大于95%, 仅有Co-Cr组颗粒/细胞比值为1 000时外周血单核细胞的存活率降至87%, 证实Ti6Al4V、PMMA、UHMWPE和Co-Cr颗粒均可激活外周血单核细胞, 促使其分泌不同水平的肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6等骨溶解相关细胞因子。

2.2 各组外周血单核细胞中肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6的水平 各组内比较结果显示Ti6Al4V组、PMMA组和UHMWPE组中伴随颗粒浓度的增加, 人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6会出现不同程度的增强, 存在正相关关系; 但是Co-Cr组中当颗粒/细胞比值达到1 000时却出现肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6表达水平降低, 见表1-4和图1。



图注: TNF-α: 肿瘤坏死因子α; IL-1: 白细胞介素1; IL-6: 白细胞介素6; Ti6Al4V: 钛铝钒合金; PMMA: 聚甲基丙烯酸甲酯; UHMWPE: 超高分子量聚乙烯; Co-Cr: 钴铬合金。

图1 各组组内比较4种颗粒对人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6的影响

Figure 1 Effects of four kinds of wear particles on the secretion of tumor necrosis factor-α, interleukin-1 and interleukin-6 in human peripheral blood mononuclear cells in each group

表 1 钛铝钒合金(Ti6Al4V)颗粒对人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6的影响 (x̄±s, n=18, μg/L)

Table 1 Effect of titanium 6 aluminium 4 vanadium particles on the secretion of tumor necrosis factor-α, interleukin-1 and interleukin-6 in human peripheral blood mononuclear cells

颗粒/细胞比值	肿瘤坏死因子α	白细胞介素1	白细胞介素6
0	0.206±0.048	0.185±0.057	0.213±0.029
0.1	0.382±0.079	0.279±0.096	0.285±0.048
1	0.538±0.083	0.472±0.236	0.312±0.181
10	0.924±0.163	0.892±0.216	0.564±0.198
100	1.239±0.154	0.997±0.207	0.823±0.175
1 000	1.357±0.121	1.025±0.271	0.915±0.182

表注: 伴随着 Ti6Al4V 颗粒浓度增加, 人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6出现不同程度增加, 存在正相关关系($F=5.276$, $P < 0.01$)。

表 3 超高分子量聚乙烯(UHMWPE)颗粒对人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6的影响(x̄±s, n=18, μg/L)

Table 3 Effect of ultra-high-molecular-weight-polyethylene particles on the secretion of tumor necrosis factor-α, interleukin-1 and interleukin-6 in human peripheral blood mononuclear cells

颗粒/细胞比值	肿瘤坏死因子α	白细胞介素1	白细胞介素6
0	0.203±0.051	0.181±0.042	0.207±0.035
0.1	0.246±0.063	0.202±0.039	0.259±0.041
1	0.283±0.054	0.236±0.028	0.293±0.026
10	0.375±0.037	0.318±0.015	0.382±0.021
100	0.394±0.028	0.345±0.027	0.401±0.019
1 000	0.412±0.029	0.358±0.018	0.415±0.024

表注: 伴随着 UHMWPE 颗粒浓度增加, 人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6出现不同程度增加, 存在正相关关系($F=2.618$, $P < 0.05$)。

当颗粒/细胞比值10, 100或1 000时, 活化的单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6的水平与原始幼稚的单核细胞(颗粒/细胞比值为0时)相比, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

当颗粒/细胞比值为10时, PMMA组和Co-Cr组中肿瘤坏死因子α和白细胞介素1表达水平明显低于Ti6Al4V组, 但是均高于UHMWPE组; 除了PMMA组与Co-Cr组相比较外, 其余各组之间肿瘤坏死因子α和白细胞介素1表达水平差异均有显著性意义($P < 0.05$)。Ti6Al4V组、PMMA组和Co-Cr组中白细胞介素6表达水平均高于UHMWPE组, 差异均有显著性意义($P < 0.05$); Ti6Al4V组、PMMA组和Co-Cr组中任意两组相比较, 白细胞介素6表达水平差异无显著性意义($P > 0.05$)。

当颗粒/细胞比值为100时, Co-Cr组中肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6表达水平均明显低于Ti6Al4V组, PMMA组中肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6表达水平均低于Co-Cr组, 但仍高于UHMWPE组。各组肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6表达水平相比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

当颗粒/细胞比值为1 000时, PMMA组和Co-Cr组中肿

表 2 聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)颗粒对人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6的影响 (x̄±s, n=18, μg/L)

Table 2 Effect of polymethylmethacrylate particles on the secretion of tumor necrosis factor-α, interleukin-1 and interleukin-6 in human peripheral blood mononuclear cells

颗粒/细胞比值	肿瘤坏死因子α	白细胞介素1	白细胞介素6
0	0.210±0.045	0.181±0.052	0.207±0.031
0.1	0.281±0.078	0.206±0.034	0.279±0.048
1	0.361±0.124	0.379±0.037	0.302±0.133
10	0.514±0.107	0.529±0.097	0.546±0.072
100	0.578±0.123	0.620±0.089	0.595±0.089
1 000	0.634±0.115	0.675±0.092	0.621±0.077

表注: 伴随着 PMMA 颗粒浓度增加, 人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6出现不同程度增加, 存在正相关关系($F=4.192$, $P < 0.01$)。

表 4 钴铬合金(Co-Cr)颗粒对人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6的影响 (x̄±s, n=18, μg/L)

Table 4 Effect of chromium-cobalt alloy particles on the secretion of tumor necrosis factor-α, interleukin-1 and interleukin-6 in human peripheral blood mononuclear cells

颗粒/细胞比值	肿瘤坏死因子α	白细胞介素1	白细胞介素6
0	0.207±0.044	0.186±0.056	0.211±0.032
0.1	0.315±0.052	0.208±0.078	0.328±0.083
1	0.398±0.076	0.374±0.093	0.416±0.095
10	0.609±0.124	0.583±0.135	0.614±0.125
100	0.756±0.135	0.812±0.127	0.756±0.118
1 000	0.601±0.117	0.621±0.147	0.607±0.134

表注: 伴随着 Co-Cr 颗粒浓度增加, 人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6出现不同程度增加, 存在正相关关系($F=3.984$, $P < 0.01$)。

瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6表达水平均明显低于Ti6Al4V组, 但是均高于UHMWPE组; 除了PMMA组和Co-Cr组相比较外, 其余各组间肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6表达水平差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

总体来讲, 在骨溶解反应的初始阶段中Ti6Al4V颗粒的功能生物学活性最强, 其次是Co-Cr和PMMA颗粒, UHMWPE颗粒最弱, 见表5-7和图2。

表 5 当颗粒/细胞比值为 10 时不同颗粒对人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子α、白细胞介素1和白细胞介素6的影响(x̄±s, n=12, μg/L)

Table 5 Effects of different wear particles on the secretion of tumor necrosis factor-α, interleukin-1 and interleukin-6 in human peripheral blood mononuclear cells when the particle/cell ratio was 10

组别	肿瘤坏死因子α	白细胞介素1	白细胞介素6
Ti6Al4V 组	0.924±0.163 ^{bc}	0.892±0.216 ^{bc}	0.564±0.198 ^c
PMMA 组	0.514±0.107 ^{ac}	0.529±0.097 ^{ac}	0.546±0.072 ^c
UHMWPE 组	0.375±0.037 ^{ab}	0.318±0.015 ^{ab}	0.382±0.021 ^{ab}
Co-Cr 组	0.609±0.124 ^{ac}	0.583±0.135 ^{ac}	0.614±0.125 ^c

表注: Ti6Al4V: 钛铝钒合金; PMMA: 聚甲基丙烯酸甲酯; UHMWPE: 超高分子量聚乙烯; Co-Cr: 钴铬合金。与 Ti6Al4V 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PMMA 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 UHMWPE 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

表6 当颗粒/细胞比值为100时不同颗粒对人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1和白细胞介素6的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$, $\mu\text{g/L}$)
Table 6 Effects of different wear particles on the secretion of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6 in human peripheral blood mononuclear cells when the particle/cell ratio was 100

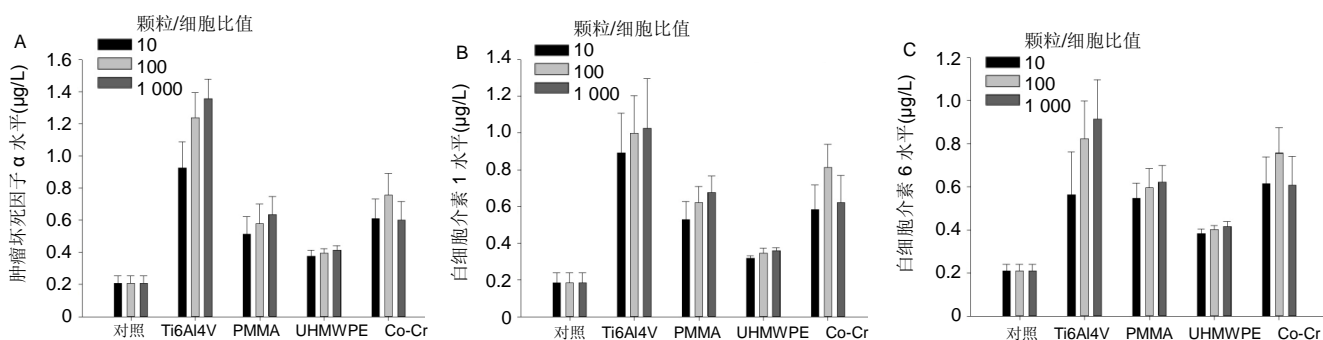
组别	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素1	白细胞介素6
Ti6Al4V组	1.239 \pm 0.154 ^{bc}	0.997 \pm 0.207 ^{bc}	0.823 \pm 0.175 ^{bc}
PMMA组	0.578 \pm 0.123 ^{ac}	0.620 \pm 0.089 ^{ac}	0.595 \pm 0.089 ^{ac}
UHMWPE组	0.394 \pm 0.028 ^{ab}	0.345 \pm 0.027 ^{ab}	0.401 \pm 0.019 ^{ab}
Co-Cr组	0.756 \pm 0.135 ^{abc}	0.812 \pm 0.127 ^{abc}	0.756 \pm 0.118 ^{abc}

表注: Ti6Al4V: 钛铝钒合金; PMMA: 聚甲基丙烯酸甲酯; UHMWPE: 超高分子量聚乙烯; Co-Cr: 钴铬合金。与 Ti6Al4V 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PMMA 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 UHMWPE 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

表7 当颗粒/细胞比值为1000时不同颗粒对人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1和白细胞介素6的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$, $\mu\text{g/L}$)
Table 7 Effects of different wear particles on the secretion of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6 in human peripheral blood mononuclear cells when the particle/cell ratio was 1000

组别	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素1	白细胞介素6
Ti6Al4V组	1.357 \pm 0.121 ^{bc}	1.025 \pm 0.271 ^{bc}	0.915 \pm 0.182 ^{bc}
PMMA组	0.634 \pm 0.115 ^{ac}	0.675 \pm 0.092 ^{ac}	0.621 \pm 0.077 ^{ac}
UHMWPE组	0.412 \pm 0.029 ^{ab}	0.358 \pm 0.018 ^{ab}	0.415 \pm 0.024 ^{ab}
Co-Cr组	0.601 \pm 0.117 ^{ac}	0.621 \pm 0.147 ^{ac}	0.607 \pm 0.134 ^{ac}

表注: Ti6Al4V: 钛铝钒合金; PMMA: 聚甲基丙烯酸甲酯; UHMWPE: 超高分子量聚乙烯; Co-Cr: 钴铬合金。与 Ti6Al4V 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PMMA 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 UHMWPE 组比较, ^c $P < 0.05$ 。



图注: 图中 A-C 分别为肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1和白细胞介素6水平; D 为颗粒/细胞比值为1000时吞噬 Co-Cr 颗粒后细胞凋亡图像(x200)。Ti6Al4V: 钛铝钒合金; PMMA: 聚甲基丙烯酸甲酯; UHMWPE: 超高分子量聚乙烯; Co-Cr: 钴铬合金。

图2 各组组间比较4种颗粒对人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1和白细胞介素6的影响

Figure 2 Effects of comparison between groups on the secretion of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-6 in human peripheral blood mononuclear cells

3 讨论 Discussion

人工关节置换是一种去除骨关节终末期病痛和重建关节功能的有效治疗手段。虽然获得了非常卓越的临床效益,但是长期的日常活动产生了大量的假体组件磨损碎屑颗粒,并且各种颗粒导致骨溶解吸收引起的假体无菌性松动是术后最常见的失效原因^[12]。目前的研究认为骨溶解吸收是各种磨损颗粒引起的无菌性松动病理反应的初始阶段^[13]。各种磨损颗粒激活单核细胞后释放大量的炎性细胞因子和趋化因子,包括肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6和白细胞介素8,诱发无菌性炎症级联生物学反应招募大量的细胞形成假体周围界膜组织,同时诱导其他相关递质的合成释放促进破骨细胞的生成,抑制成骨细胞生成及I型胶原蛋白的合成,导致假体周围骨质紧密耦合的重塑平衡过程发生紊乱^[2]。由于目前尚未完全理解人工关节假体周围骨质溶解问题反映出的基本病理生理学原理,返修手术仍然是治疗人工关节假体无菌性松动最主要的方法,不但留给患者极大的病痛、心理压力和经济负担,而且对人工关节置换适应证的逐步年轻化发展存在一定的限制,迫使学者们重新考虑临床上常见骨科生物材料磨损颗粒在假体周围骨质溶解反应过程中的作用机制。因此作者设计此实验来研究临床常见的Ti6Al4V、PMMA、UHMWPE和Co-Cr颗粒对人

外周血单核细胞分泌溶骨性细胞因子的影响,探讨常见人工关节假体生物材料的功能生物学活性。

以往文献报道在人工假体无菌性松动患者返修手术中获取的组织上清液中含有一系列的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素10、人单核细胞趋化蛋白1、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、白细胞介素12p40等细胞因子^[14-15]。通过研究发现人外周血单核细胞在受到各种磨损颗粒刺激的情况下会释放相类似的炎症递质,并且证实活化的单核细胞在诱导炎症反应过程中具有重要的作用^[16]。肿瘤坏死因子 α 作为介导先天性免疫的关键性因子,具有调节单核细胞活化、分化及凋亡的作用。大量的研究发现肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1和白细胞介素6是骨溶解生物学反应过程中的始动因子,在人工关节假体发生无菌性松动的过程中发挥重要的作用。为了更好地模拟人工关节假体置换后假体周围磨损颗粒浓度逐步积聚变化的过程,基于以往研究磨损颗粒/单核细胞的比值为10, 100, 1000可以较好的模拟无菌性松动人工假体周围的生物学微环境。作者将每个实验组根据颗粒/细胞比值为0, 0.1, 1, 10, 100, 1000等设置6种不同浓度的颗粒与单核细胞培养体系。应用传统的ELISA技术检测各种颗粒刺激人外周血单核细胞后肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1

和白细胞介素6的表达水平,进一步探讨各种颗粒诱导的骨溶解生物反应引起人工假体无菌性松动可能的作用机制。

UHMWPE磨损颗粒是人们最早发现的引起假体周围骨质溶解反应的碎屑,也是临床上引起无菌性松动最常见的磨损颗粒^[17], 占有磨损碎屑的70%~90%。通过研究发现人外周血单核细胞在不同浓度的UHMWPE颗粒刺激下并未表现出特别强烈的生物学反应,伴随UHMWPE颗粒浓度的增加,肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1和白细胞介素6等细胞因子的表达水平仅仅出现轻微的增强。Matthews等^[18]通过研究人单核细胞对UHMWPE磨损颗粒刺激的生物学反应,发现肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等细胞因子的表达水平普遍较低。以往关于磨损颗粒的研究中,通过比较UHMWPE颗粒和Ti6Al4V颗粒对人单核细胞的生物学影响,发现UHMWPE颗粒的刺激作用明显弱于Ti6Al4V颗粒,炎症递质也仅仅是表现出基础水平的表达^[19-20]。虽然此研究同多数体外实验研究结果一致的显示UHMWPE颗粒对人外周血单核细胞的生物学影响较小,但是UHMWPE材质的髌臼和衬垫与金属人工股骨头的组合体系中存在比较严重的磨损,产生大量的大小不一形态各异的非降解UHMWPE颗粒,伴随时间的推移在假体周围潜在的腔隙中积聚。因此作者推断UHMWPE颗粒可能是形成假体周围假性肉芽肿的主要因素。

临床常见的硬对软人工关节组合体系中人工股骨头的材质多数是钛合金金属。虽然在超高分子聚乙烯髌臼的日常磨合中存在较弱的磨损,但是作者通过研究发现Ti6Al4V颗粒对人外周血单核细胞的生物学影响作用最强,引起肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1和白细胞介素6等细胞因子高水平的表达。伴随着磨损颗粒浓度的增加,细胞因子表达水平逐步增高,这可能意味着钛合金金属良好的耐磨特性被较强的功能生物学活性相抵消。Haynes等^[21]通过研究单核细胞对磨损颗粒的反应,发现Ti6Al4V颗粒会引起白细胞介素1、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 、前列腺素E2等细胞因子的高水平表达,而Co-Cr颗粒则引起炎症递质基础水平的表达。以往的研究显示Ti6Al4V颗粒刺激人外周血单核细胞后分泌白细胞介素1 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6细胞因子的水平是原始幼稚单核细胞的5-13倍^[19-20]。钛合金的磨损碎屑由于存在多种金属,在适宜环境下容易发生化学腐蚀反应和电离分解反应释放各种金属离子。Ti6Al4V颗粒可以独自对单核细胞产生很强的刺激作用^[22],表明Ti6Al4V颗粒的表面结构、表面化学性质,长期的释放金属离子可能是激活单核细胞的重要因素,而不取决于颗粒的吞噬性。

由于PMMA具有良好的化学稳定性和耐磨性。目前仍然是人工关节置换手术中常用的骨粘固定剂。通过研究发现PMMA颗粒对人外周血单核细胞的刺激作用是比较温和的,引起肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1和白细胞介素6等细胞因子中等水平的表达,伴随着颗粒浓度的增强,细胞因子表达水平会逐步增强。Yamanaka等^[23]通过研究发现PMMA颗粒通过刺激单核细胞/巨噬细胞导致炎症骨质溶解的主要途径是激活MAP激酶和NF- κ B通路。体外实验研究发现单核细胞与粒子直径小于20 μ m的PMMA颗粒和

UHMWPE颗粒共培养后可以释放大量的白细胞介素1、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 、前列腺素E2等细胞因子^[24]。

Co-Cr金属材质的假体组件被广泛应用于金属对金属和金属对聚乙烯人工关节假体系统中。通过研究发现Co-Cr颗粒对人外周血单核细胞生物学影响会伴随浓度的增强出现白细胞介素1、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 细胞因子分泌水平的增强,但是当颗粒/细胞比值为1 000时,白细胞介素1、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 细胞因子的表达水平却出现不同程度的降低,但是总体水平比Ti6Al4V颗粒所引起的细胞因子表达水平低,比PMMA颗粒和UHMWPE颗粒所引起的细胞因子表达水平高。Sabbatini等^[25-26]通过研究发现Co-Cr颗粒不但可以引起炎症细胞因子的释放,而且还具有一定的细胞毒性,可以引起单核细胞的凋亡。作者推测当Co-Cr颗粒/单核细胞比值为1 000时细胞因子的表达水平出现降低,可能是因为Co-Cr颗粒产生的细胞毒性抑制单核细胞的活性并引起单核细胞凋亡导致。Co-Cr金属颗粒会不断分解电离释放金属离子。金属离子在适宜的条件中会与蛋白质结合形成具有半抗原活性的有机金属粒子蛋白质复合物,参与引发迟发型超敏反应^[27]。作者目前的研究数据表明Co-Cr颗粒可能在急性骨溶解吸收反应过程中具有重要的作用,Co-Cr颗粒作为宿主全身系统性损伤的一个因素,值得继续深入研究。

由于陶瓷对陶瓷人工关节组合体系是目前生物学性能和临床效益比较好的人工关节假体系统。陶瓷是临床常用假体材料中最坚硬、最抗磨的,即使产生磨损碎屑也是生物惰性颗粒,人工关节置换后假体周围发生骨溶解吸收反应的可能性较低。以往体外实验研究表明氧化铝陶瓷颗粒对人体细胞不具有细胞毒性,但在人体内存在弱基因毒性^[28]。但也有研究报道陶瓷颗粒由于具有诱导细胞凋亡的特性,在假体周围组织损伤中具有重要的作用^[29]。目前几乎很少有关于陶瓷颗粒引起生物学反应的研究。关于陶瓷磨损颗粒在人工关节置换后假体无菌性松动过程中的作用值得进一步研究,这也是此研究中存在遗憾的一点。

该研究仅仅涉及4种临床常见磨损颗粒对人外周血单核细胞表达白细胞介素1、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 水平的影响。虽然存在一定的缺陷性,但是从局部的微弱变化仍可以扩伸到人工关节假体周围骨溶解反应过程中的整个生物学反应。虽然各种磨损颗粒都会不同程度地引起单核细胞合成分泌白细胞介素1、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 等细胞因子,但是这些细胞因子在骨溶解反应过程中需要其他更多趋化因子和细胞因子的参与。各种因子的协同或拮抗作用可能在这个极其复杂的多级联生物学反应中具有一定的作用。到目前为止,仍不清楚有患者早期出现骨溶解而有患者推迟数年未出现骨溶解的真正原因,最可能的答案可能存在于生物基因学中。关于人工关节置换后假体无菌性松动的生物基因学证据,目前几乎没有统一的观点。因此,为进一步了解人工关节置换后假体无菌性松动的发生机制,必须将基础的科学研究转化为临床研究与实践。

结论:通过4种临床常见磨损颗粒进行标准化后发现各种颗粒的功能生物学活性不同,在骨溶解生物反应过程中对人外周血单核细胞的影响差异存在剂量依赖性。Co-Cr

颗粒具有一定的细胞毒性可以诱导细胞凋亡, Ti6Al4V颗粒具有较强的功能生物学活性, Co-Cr颗粒存在一定的细胞毒性, 提示可能是影响骨溶解生物反应过程的关键因素, 日积月累而又难以降解的PMMA和UHMWPE颗粒可能在人工假体周围形成假性肉芽肿过程中具有重要的作用。

致谢: 感谢杨上游教授馈赠实验所用的磨损颗粒及对实验的大力支持。

作者贡献: 实验设计为张锴、李朋、杨淑野, 实验实施为李朋、贾龙、杜刚强, 实验评估为张新军、王志刚, 资料收集为杨淑野、刘栋、张德刚。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81241061)”、“山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0023)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 该研究的实施符合滨州医学院附属医院的相关伦理要求。

知情同意问题: 实验所用外周循环血来源于健康志愿者。在采集外周血时已告知志愿者应用于实验研究, 并签署实验知情同意书。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过滨州医学院附属医院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*. 2007;370(9597):S1508-1519.

[2] Del Buono A, Denaro V, Maffulli N. Genetic susceptibility to aseptic loosening following total hip arthroplasty: a systematic review. *Br Med Bull*. 2012;101:39-55.

[3] Gudena R, Kuna S, Pradhan N. Aseptic loosening of total hip replacement presenting as an anterior thigh mass. *Musculoskelet Surg*. 2013;97(3):247-249.

[4] Landgraeber S, Wegner A, Canbay A, et al. Serum levels of adiponectin in patients with aseptic loosening after total hip replacement. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93(2):748-752.

[5] Ollivier B, Darrah C, Brankin RC, et al. The continued value of clinical and radiological surveillance: the Charnley Elite Plus hip replacement system at 12 years. *J Bone Joint Surg Br*. 2009;91(6):720-724.

[6] Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, et al. The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91(1):128-133.

[7] Jiang Y, Jia T, Wooley PH, et al. Current research in the pathogenesis of aseptic implant loosening associated with particulate wear debris. *Acta Orthop Belg*. 2013;79(1):1-9.

[8] Jiang Y, Jia T, Gong W, et al. Effects of Ti, PMMA, UHMWPE, and Co-Cr wear particles on differentiation and functions of bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(10):2817-2825.

[9] Ingham E, Fisher J. Biological reactions to wear debris in total joint replacement. *Proc Inst Mech Eng H*. 2000;214(1):21-37.

[10] Zhang K, Yang SY, Yang S, et al. Different influence of Ti, PMMA, UHMWPE, and Co-Cr particles on peripheral blood monocytes during periprosthetic inflammation. *J Biomed Mater Res A*. 2015 103(1):358-364.

[11] Lin TH, Tamaki Y, Pajarinen J, et al. Chronic inflammation in biomaterial-induced periprosthetic osteolysis: NF- κ B as a therapeutic target. *Acta Biomater*. 2014;10(1):1-10.

[12] Catelas I, Jacobs JJ. Biologic activity of wear particles. *Instr Course Lect*. 2010;59:3-16.

[13] Lübbecke A, Garavaglia G, Barea C, et al. Influence of patient activity on femoral osteolysis at five and ten years following hybrid total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br*. 2011;93(4):456-463.

[14] Chiba J, Rubash HE, Kim KJ, et al. The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*. 1994;(300):304-312.

[15] Shanbhag AS, Kaufman AM, Agarwal S, et al. Critical insights into osteolysis using protein microarrays: The importance of IL-6 and T-cell Activation. *Trans Orthop Res Soc*. 2005; 30:148.

[16] Kaufman AM, Alabre CI, Rubash HE, et al. Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84(2):464-474.

[17] Atkins GJ, Haynes DR, Howie DW, et al. Role of polyethylene particles in peri-prosthetic osteolysis: A review. *World J Orthop*. 2011;2(10):93-101.

[18] Matthews JB, Besong AA, Green TR, et al. Evaluation of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles of known size and dose. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(2):296-307.

[19] Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, et al. Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro. *J Orthop Res*. 1995;13(5):792-801.

[20] Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, et al. Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 1997; (342):205-217.

[21] Haynes DR, Rogers SD, Hay S, et al. The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. *J Bone Joint Surg Am*. 1993;75(6): 825-834.

[22] Sethi RK, Neavyn MJ, Rubash HE, et al. Macrophage response to cross-linked and conventional UHMWPE. *Biomaterials*. 2003; 24(15):2561-2573.

[23] Yamanaka Y, Karuppaiah K, Abu-Amer Y. Polyubiquitination events mediate polymethylmethacrylate (PMMA) particle activation of NF- κ B pathway. *J Biol Chem*. 2011;286(27):23735-23741.

[24] González O, Smith RL, Goodman SB. Effect of size, concentration, surface area, and volume of polymethylmethacrylate particles on human macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1996;30(4): 463-473.

[25] Sabbatini M, Piffanelli V, Boccafocchi F, et al. Different apoptosis modalities in periprosthetic membranes. *J Biomed Mater Res A*. 2010;92(1):175-184.

[26] Catelas I, Petit A, Zukor DJ, et al. TNF-alpha secretion and macrophage mortality induced by cobalt and chromium ions in vitro-qualitative analysis of apoptosis. *Biomaterials*. 2003; 24(3): 383-391.

[27] Schalock PC, Menné T, Johansen JD, et al. Hypersensitivity reactions to metallic implants - diagnostic algorithm and suggested patch test series for clinical use. *Contact Dermatitis*. 2012;66(1):4-19.

[28] Tsaousi A, Jones E, Case CP. The in vitro genotoxicity of orthopaedic ceramic (Al₂O₃) and metal (CoCr alloy) particles. *Mutat Res*. 2010; 697(1-2):1-9.

[29] VanOs R, Lildhar LL, Lehoux EA, et al. In vitro macrophage response to nanometer-size chromium oxide particles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(1):149-159.