

论著

文章编号:1000-5404(2013)16-1676-04

钛颗粒和炎症因子对人滑膜细胞 MMP-2 表达的影响

符纯锋¹, 黄伟¹, 梁熙¹, 胡宁¹, 宋国立^{2,3}, 谢静², 陈荣富¹, 王春莉², 林良波¹, 王志强¹, 陈诚¹ (400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院骨科¹; 400044 重庆, 重庆大学生物工程学院²; CA92093-0412 美国加利福尼亚州, 美国加州大学圣地亚哥分校骨科与生物工程系³)

[摘要] 目的 研究钛颗粒和炎症因子(TNF- α 、IL-1 β)对人滑膜细胞基质金属蛋白酶2(MMP-2)表达及活性的影响,探讨滑膜在钛磨损颗粒诱导的金对金人工关节假体周围骨溶解中的可能机制。方法 用钛颗粒和TNF- α 、IL-1 β 处理体外培养的人膝关节滑膜细胞,处理后12、24、48、72 h收集培养上清液,用明胶酶谱法检测MMP-2的活性。结果 直径最小的钛颗粒($\leq 5 \mu\text{m}$)能刺激人滑膜细胞MMP-2蛋白表达4倍于对照组;与对照组相比,钛颗粒、TNF- α 、IL-1 β 及相互联合作用均明显增加了MMP-2的表达($P < 0.01$),三者联合作用更明显($P < 0.01$)。钛颗粒和TNF- α 、IL-1 β 能够刺激人膝关节滑膜细胞增加MMP-2蛋白活性,并具有协同效应。结论 金对金人工关节置换术后,磨损钛颗粒可能和炎症因子协同刺激滑膜细胞,增加骨细胞外基质的降解,导致假体的骨性支持结构力学性能下降,促使假体无菌性松动的发生。

[关键词] 钛颗粒;滑膜;炎症因子;基质金属蛋白酶;无菌性松动

[中图分类号] R318.08;R322.72;R329.28

[文献标志码] A

Effect of titanium particles and inflammatory cytokines on MMP-2 expression in human knee joint synovial cells

Fu Chunfeng¹, Huang Wei¹, Liang Xi¹, Hu Ning¹, K-L Paul Sung^{2,3}, Xie Jing², Chen Rongfu¹, Wang Chunli², Lin Liangbo¹, Wang Zhiqiang¹, Chen Cheng¹ (¹Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China; ²College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400044, China; ³Department of Orthopaedics and Bioengineering, University of California at San Diego, California, CA92093-0412, USA)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of titanium (Ti) particles, and cytokines TNF- α and IL-1 β on the expression and activity of MMP-2 in human synovial cells so as to explore the probable mechanism of post-operative osteolysis of metal-on-metal total joint arthroplasty in human synovial cells induced by Ti particles. **Methods** Human synovial cells were freshly isolated and cultured from normal knee joint synovium, and then those at passage 4 were treated with Ti particles in size of ≥ 10 , $>5 - <10$, and $\leq 5 \mu\text{m}$ respectively for 12, 24, 48 or 72 h. TNF- α , and IL-1 β at different doses were used to treat the cells in presence or absence of Ti particles for above time periods. Gelatin zymography was performed to detect the activity of MMP-2 in the cell supernatant. **Results** Compared with the cells without any treatment, the expression level of MMP-2 treated by Ti particles in size of $\leq 5 \mu\text{m}$ was significantly increased by 4 times, that treated by Ti particles, TNF- α , and IL-1 β respectively or combined of any 2 agents were also increased significantly ($P < 0.01$), and that treated by the combination of the 3 agents were most significantly higher ($P < 0.01$). Ti particles, TNF- α , and IL-1 β induced the stimulation of MMP-2 activities in human knee joint synovial cells, and exerted synergetic effect. **Conclusion** Synovial cells may be involved in aseptic loosening after metal-on-metal arthroplasty through increasing the degradation of bone matrix and declining of osseous support structure mechanics.

[Key words] titanium particles; synovium; inflammatory cytokines; matrix metalloproteinases; aseptic loosening

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31070875). Corresponding author: Huang Wei, E-mail: huangwei68@263.net

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31070875)

[通信作者] 黄伟, E-mail: huangwei68@263.net

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130425.0902.009.html>(2013-04-25)

全关节置换术目前仍然是终末期关节疾病较好的治疗方法,成功率高达90%以上,但无菌性松动是影响远期疗效的主要并发症^[1]。目前假体无菌性松动的具体机制尚未完全明朗,不过专家一致认为磨损颗粒引起的骨溶解为其主要成因^[2-3]。失败假体取出发现在假体-骨界面形成一种名为“界膜”的组织,主要包含成纤维细胞、巨噬细胞和外源性巨细胞^[4]。磨损颗粒导致的炎症反应主要有肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-1 beta (IL-1 β),他们能引起破骨细胞的激活。研究报道,钛颗粒(Ti)刺激人巨噬细胞能导致TNF- α 与IL-1 β 大量释放,钛颗粒和TNF- α 联合作用可抑制成骨细胞增殖和碱性磷酸酶(ALP)的产生,这可能是假体周围骨溶解的一个原因^[5-6]。MMPs家族的一个主要成员MMP-2,能降解多种胶原。研究表明人巨噬细胞、成纤维细胞中钛颗粒和炎症因子能影响MMP-2的表达和激活^[7]。在骨溶解过程中存在界膜组织的滑膜细胞是磨损颗粒的重要作用靶点。本研究模拟金属关节置换术后体内滑膜细胞和钛颗粒/炎症因子的相互影响,探讨钛颗粒刺激滑膜细胞影响MMP-2表达及其在细胞外基质重塑过程中的重要作用,探索无菌性松动和骨溶解的另一可能通路,为临床防治无菌性松动提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 人滑膜细胞的培养

2010年10月至2011年11月在重庆医科大学附属第一医院骨科收集4例因外伤行下肢截肢治疗患者的正常膝关节滑膜组织标本,年龄25~42岁,男女各2例。经医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。无菌条件下取出截肢患者正常滑膜组织。采用组织培养法培养细胞,实验选用3~5代的滑膜细胞^[8]。

1.2 钛颗粒处理

接种第4代人滑膜细胞,细胞完全贴壁后,先予以2%高血清DMEM液饥饿12h,后更换为1%血清的培养基进行培养。同时分别予以不同直径大小($\leq 20 \mu\text{m}$,质量比0.1%)的钛颗粒处理滑膜细胞。分组:①对照组;②钛颗粒1组:钛颗粒直径 $\geq 10 \mu\text{m}$;③钛颗粒2组:钛颗粒直径: $>5 \sim <10 \mu\text{m}$;④钛颗粒3组:钛颗粒直径 $\leq 5 \mu\text{m}$ 。根据文献^[9-10]进行分组及处理,处理完毕开始计时,于处理后12、24、48、72h采集细胞培养上清液行明胶酶谱分析MMP-2活性。

1.3 TNF- α 、IL-1 β 处理

接种第4代人滑膜细胞,细胞完全贴壁后,先予以2%高血清DMEM液饥饿12h,后更换为1%血清的培养基进行培养。同时分别予以不同浓度的TNF- α 、IL-1 β 及TNF- α 与IL-1 β 联

合作用处理滑膜细胞。具体分组:①对照组;②TNF- α 处理组(1、10、20 ng/mL);③IL-1 β 处理组(1、5、10 ng/mL);④TNF- α + IL-1 β 处理组(TNF- α :10 ng/mL;IL-1 β :5 ng/mL)。处理完毕开始计时,于处理后12、24、48、72h采集细胞培养上清液行明胶酶谱分析MMP-2活性。

1.4 钛颗粒和炎症因子联合作用

接种第4代人滑膜细胞,细胞完全贴壁后,先予以2%高血清DMEM液饥饿12h,后更换为1%血清的培养基进行培养。同时分别予以Ti、TNF- α 、IL-1 β 及Ti + TNF- α /IL-1 β 联合作用处理滑膜细胞。具体分组:①对照组;②Ti处理组;③Ti + TNF- α 组;④Ti + IL-1 β 组;⑤Ti + TNF- α + IL-1 β 组。处理完毕开始计时,于处理后12、24、48、72h采集细胞培养上清液行明胶酶谱分析MMP-2活性。

1.5 明胶酶谱检测MMP-2活性

各组在处理12、24、48、72h采集细胞培养上清液,BCA蛋白定量后,样品蛋白与上样缓冲液以1:1体积比例混合。在110V恒定电压下,含有10%明胶的SDS-PAGE中电泳150min。电泳结束后将凝胶用洗脱液(2.5% Triton X-100)震荡洗脱20min \times 3次,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育液(50 mmol/L Tris-HCl, 1 $\mu\text{mol/L}$ NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 0.02% Brij35, pH 7.6)孵育16h后,用考马斯亮蓝R-250将凝胶染色1h后,脱色液(30%甲醇,10%乙酸)脱至条带清晰。用凝胶成像系统GS-800扫描凝胶,Quantity One软件测量各条带的光密度值,共测量3次独立实验,进行相对定量分析。

1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,PLSD检验确定差异性, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

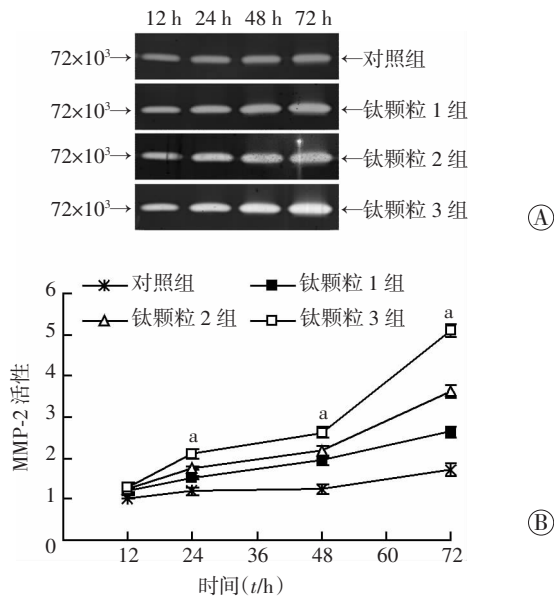
2 结果

2.1 不同直径大小钛颗粒对滑膜细胞分泌MMP-2的影响

不同直径的钛颗粒处理滑膜细胞均能增高MMP-2的表达,且呈时间依赖性地增高(图1A)。光密度值相对定量分析显示(图1B),钛颗粒直径越小越能促进滑膜细胞MMP-2的表达。钛颗粒处理滑膜细胞3d,钛颗粒1、2、3组中MMP-2的活性较相应时间点的对照组分别增加了1.66、2.12、3.95倍,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

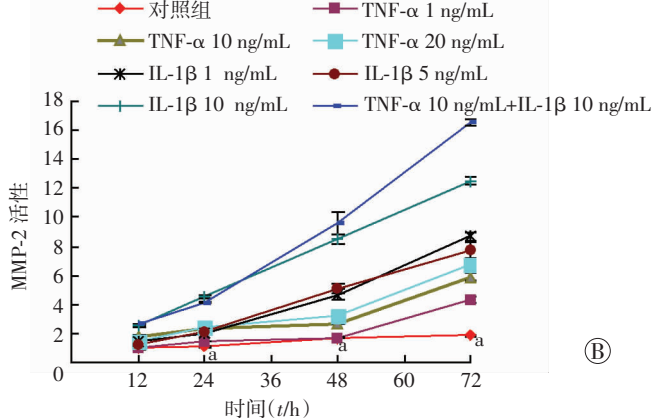
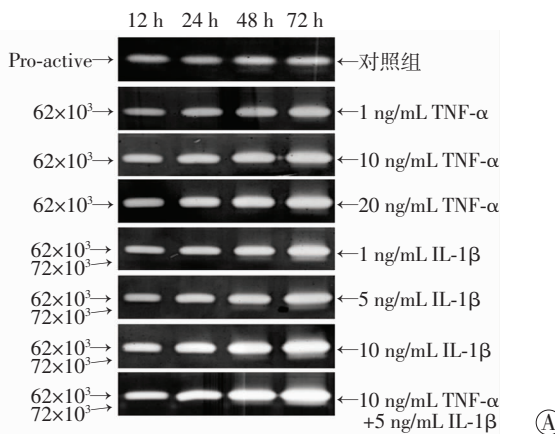
2.2 TNF- α 和IL-1 β 呈时间、浓度依赖性地增加滑膜细胞MMP-2的活性

酶谱结果表明:与对照组相比,TNF- α 、IL-1 β 、TNF- α + IL-1 β 处理滑膜细胞后均能增高MMP-2的活性,且呈浓度、时间依赖性增加,IL-1 β 作用更为明显(图2A)。定量分析显示:TNF- α 、IL-1 β 、TNF- α + IL-1 β 处理组对滑膜细胞MMP-2有着不同程度的促进作用(图2B),TNF- α + IL-1 β $>$ IL-1 β $>$ TNF- α ,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。



A: 明胶酶谱法检测 MMP-2 活性; B: 定量分析 a: $P < 0.01$, 与对照组比较

图1 不同直径大小钛颗粒对滑膜细胞分泌 MMP-2 的影响

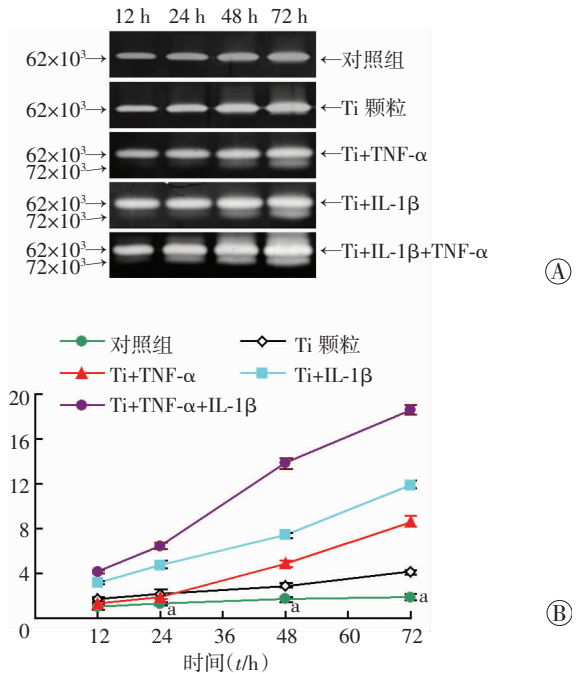


A: 明胶酶谱法检测 MMP-2 活性; B: 定量分析 a: $P < 0.01$, 与其余各组比较

图2 不同浓度 TNF-α 和 IL-1β 及 TNF-α + IL-1β 联合作用对滑膜细胞分泌 MMP-2 的影响

2.3 钛颗粒和炎症因子联合作用对滑膜细胞分泌 MMP-2 的影响

钛颗粒、TNF-α、IL-1β 及钛颗粒和炎症因子联合均增加了 MMP-2 的活性,且呈时间依赖性(图 3A)。明胶酶谱相对定量分析显示:处理 72 h 时,与对照组比较,Ti、Ti + TNF-α、Ti + IL-1β、Ti + TNF-α + IL-1β 组分别增加 MMP-2 活性 3.2、5.5、6.1、8.5 倍,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3B)。



A: 明胶酶谱法检测 MMP-2 活性; B: 定量分析 a: $P < 0.01$, 与其余各组比较

图3 钛颗粒和炎症因子联合作用对滑膜细胞分泌 MMP-2 的影响

3 讨论

无菌性松动是全关节置换术远期主要并发症之一,并且可能发生假体周围骨折^[1]。界膜内细胞和磨损颗粒之间的生物学反应被认为是骨溶解的关键因素,其产生的大量炎性因子如 TNF、IL-1、IL-6 等已被证实,在假体周围骨溶解中起重要作用^[5-6]。许多研究者聚焦在破骨细胞上,然而部分研究表明滑膜细胞也是骨溶解中磨损颗粒重要的作用靶点,能直接或间接的打破细胞外基质 (ECM) 的平衡。

关节置换术后关节滑液中存在的金属颗粒最常见的直径范围为 1 ~ 10 μm^[9],这与本课题组前期实验所用钛颗粒直径一致。本实验采用钛颗粒直径进行梯度分组,目的是观察颗粒大小对滑膜细胞分泌 MMP-2 是否有影响以及怎样的影响。结果发现颗粒越小其引起的 MMP-2 分泌更多,这与 Choi 等^[10] 结果不一致,可能

是因为所用物种及细胞种类不同。MMP-2 作为 MMPs 家族一个重要的成员能降解 ECM 中很多成分如明胶、胶原、粘连蛋白等^[7]。MMP-2 有两种形式(62×10^3 的活性形式和 72×10^3 的酶原形式),酶原形式只有活性形式的 10% 降解活性。有研究者在松动的假体周围组织中检测到活性形式的 MMP-2。Morimoto 等^[11] 体内实验已经发现钛颗粒刺激肺组织可增加 MMP-2 和 MMP-9 的表达,从界膜组织中分离的成纤维细胞在钛颗粒刺激下也能够促进胶原酶和 MMP-12 的表达^[5], MMPs 的表达能被多种因子调控如白介素、b-FGF、TNF- α 以及 TGF- β ,前期研究发现钛颗粒能上调 MMP-2 在滑膜细胞中的表达,与在巨噬细胞中的研究^[6] 结果一致。在许多细胞型中(如巨噬细胞、破骨细胞)炎症因子和 MMP-2 有明显关联已被证实。

本研究发现在滑膜细胞中 IL-1 β 、TNF- α 能增加 MMP-2 的活性,并存在浓度和时间依赖性,说明这些炎症细胞的存在会对假体周围组织产生持续累积的降解作用。研究证实钛颗粒能诱导巨噬细胞分泌炎症因子如 IL-1 β 、TNF- α ^[6]。钛颗粒增加 MMP-2 在滑膜细胞中的表达亦证明炎症因子为假体周围骨溶解的重要调控因子。因此本研究联合钛颗粒和炎症因子,结果证明钛颗粒和炎症因子同时存在能诱导 MMP-2 在滑膜细胞中高表达,说明钛颗粒不仅自身刺激滑膜细胞分泌 MMP-2,还能诱导炎症因子引起更多的 MMP-2 释放,MMP-2 的过表达直接导致了 ECM 的过度降解,骨-假体界面中高 MMPs 活性在关节置换术后长期存在^[12],导致 ECM 的慢性降解。这可能是假体周围骨溶解和无菌性松动发生的重要原因之一。

综上所述,本研究表明钛颗粒越小,其引起的 MMP-2 分泌越多,提示在假体设计方面应该考虑到磨损颗粒的因素;炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 呈浓度和时间依赖性地增加滑膜细胞 MMP-2 的活性,且钛颗粒和炎症因子联合作用引起滑膜细胞 MMP-2 剧增,这可能是金对金关节置换术后假体周围骨溶解的另一作用通路,当然,体内环境复杂,涉及的炎症因子众多,如 PGE₂ 等都被证实与无菌性松动有关,故进一步研究其他磨损颗粒和炎症因子的相互作用亦是非常必要。

参考文献:

- [1] Kurtz S M, Ong K L, Schmier J, *et al.* Future clinical and economic impact of revision total hip and knee arthroplasty [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2007, 89(Suppl 3): 144 - 151.
- [2] The NJR centre HH. National joint registry for England and Wales [OL]. [2010-7th]. <http://www.njrcentre.co.uk>.
- [3] Shubayev V, Branemark R, Steinauer J, *et al.* Titanium implants induce expression of matrix metalloproteinases in bone during osseointegration [J]. *J Rehabil Res Dev*, 2003, 41(6A): 757 - 766.
- [4] Overgaard L, Danielsen N, Bjrsten L M. Anti-inflammatory properties of titanium in the joint environment. An experimental study in rats[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1998, 80(5): 888 - 893.
- [5] Zhang Y, Dong J, He P, *et al.* Genistein inhibit cytokines or growth factor-induced proliferation and transformation phenotype in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis [J]. *Inflammation*, 2012, 35(1): 377 - 387.
- [6] Taki N, Tatro J M, Lowe R, *et al.* Comparison of the roles of IL-1, IL-6, and TNFalpha in cell culture and murine models of aseptic loosening [J]. *Bone*, 2007, 40(5): 1276 - 1283.
- [7] Overall C M, Wrana J L, Sodek J, *et al.* Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(21): 14064 - 14071.
- [8] Xue R, Yang L, Tang Z, *et al.* MMPs and TIMPs expression and the anterior cruciate ligament repair [C]. 2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2009.
- [9] Bylski D, Wedemeyer C, Xu J, *et al.* Alumina ceramic particles, in comparison with titanium particles, hardly affect the expression of RANK-, TNF-alpha-, and OPG-mRNA in the THP-1 human monocytic cell line[J]. *J Biomed Mater Res*, 2009, 89(3): 707 - 716.
- [10] Choi M G, Koh H S, Klues D, *et al.* Effects of titanium particle size on osteoblast functions *in vitro* and *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(12): 4578 - 4583.
- [11] Morimoto Y, Oyabu T, Ogami A, *et al.* Investigation of gene expression of MMP-2 and TIMP-2 mRNA in rat lung in inhaled nickel oxide and titanium dioxide nanoparticles [J]. *Ind Health*, 2001, 49(3): 344 - 352.
- [12] Wagner S, Gollwitzer H, Wernicke D, *et al.* Interface membrane fibroblasts around aseptically loosened endoprostheses express MMP-13[J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(2): 143 - 152.

(收稿:2013-02-12;修回:2013-03-12)

(编辑 龙 亮)