

## · 综述 ·

## Toll 样受体及炎症小体在无菌性松动发病过程中的作用

刘乃澄, 赵建宁

(南京大学医学院附属金陵医院骨科, 江苏 南京 210093)

**【摘要】** 无菌性松动是导致关节置换术失败的最常见的原因, 磨损微粒诱导的骨溶解在其中起到了主导作用。磨损微粒产生后被假体周围的细胞吞噬, 释放各种促炎因子和化学物质, 抑制成骨细胞并激活破骨细胞, 导致骨溶解。然而对于磨损微粒识别并激活细胞的具体机制仍不清楚。目前研究发现磨损微粒能激活 Toll 样受体和炎症小体, 引起促炎因子的释放导致骨溶解的形成, 提示 Toll 样受体及炎症小体可能参与了无菌性松动的发病过程。但是, 对于 Toll 样受体是如何被激活, 以及 TLR 信号通路与下游信号通路之间是如何相互联系等问题, 目前仍未得到明确的解释。未来进一步探讨不同材料的磨损微粒激活 Toll 样受体和炎症小体的机制以及目前的临床药物能否针对 Toll 样受体或炎症小体发挥治疗作用等将有助于阐明人工关节假体无菌性松动的发病机制。

**【关键词】** 无菌性松动; Toll 样受体; 炎症小体; 巨噬细胞; 综述文献

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2016.07.020

**Role of Toll-like receptors and inflammasome in aseptic loosening** LIU Nai-cheng and ZHAO Jian-ning. Department of Orthopaedics, Jinling Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China

**ABSTRACT** Aseptic loosening, ascribes to particle-induced osteolysis, is the most common reason for total joint arthroplasty failure. Wear particles, liberated from the surface of prostheses, mediate the expression of inflammatory cytokines in macrophages and increase the osteoclastogenesis. However, it remains unclear how macrophages can recognize wear particles and be induced by wear particles. Recently, a number of studies have demonstrated that Toll-like receptors and inflammasome may play a critical role in osteolysis. However, the mechanism of activation of Toll-like receptors and the relationship between TLR pathway and downstream signaling pathways still remain unclear. It will be beneficial to understand the pathogenesis of aseptic loosening by exploring these mechanisms. This article highlights the role of Toll-like receptors and inflammasome in aseptic loosening, which is helpful to the development of therapies that prevent wear particle-induced aseptic loosening.

**KEYWORDS** Aseptic loosening; Toll-like receptors; Inflammasome; Macrophages; Review literature

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2016, 29(7): 673-676 www.zggszz.com

人工关节无菌性松动(Aseptic loosening)是一种常见的人工关节置换术后远期并发症,也是引起人工关节置换术失败最主要的原因,初次全髋关节置换术失败的患者中,75.7%归因于无菌性松动<sup>[1-2]</sup>。人工关节假体在长期的使用过程中假体部件相互摩擦产生磨损微粒,这些磨损微粒刺激周围的多种类型的细胞发生一系列生物学反应,引起假体周围的骨溶解,最终导致无菌性松动的发生<sup>[3-4]</sup>。目前认为骨溶解的发生主要是由于磨损微粒刺激假体周围的细胞表达促炎/促破骨细胞的细胞因子,以及增加破

骨细胞积聚/激活/存活和抑制成骨细胞成骨活性的化学活性物质,结果导致假体周围骨吸收水平超过骨生成水平。这些假体周围细胞主要包括巨噬细胞、破骨细胞、成骨细胞、成纤维细胞和淋巴细胞等<sup>[5-8]</sup>。然而,对于磨损微粒与细胞相互作用并产生炎症因子的机制仍未完全清楚,磨损微粒如何引起全身性的炎症反应也有待进一步研究。Takagi 等<sup>[9]</sup>首次报道了在无菌性松动的组织中检测到了 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)。TLR 缺失的小鼠骨溶解程度也明显降低,越来越多的证据表明 Toll 样受体在启动磨损微粒与细胞间相互作用中扮演了重要角色<sup>[10]</sup>。此外,最近的两项研究皆证实假体磨损产生的金属离子及微粒能活化 NLRP3 炎症小体,参与调节骨髓细胞对磨损微粒的应答<sup>[8,11]</sup>。基于以上这些发现,本文主要讨论了 Toll 样受体和炎症小体 NLRP3 在细胞识别磨损微粒及激活炎症反应中的作用,为

基金项目:江苏省临床医学科技专项资助(编号:BL2012002)

Fund program: Scientific and Technological Foundation for Clinical Research of Jiangsu Province (No. BL2012002)

通讯作者: 赵建宁 E-mail: zhaojianning.0207@163.com

Corresponding author: ZHAO Jian-ning E-mail: zhaojianning.0207@163.com

无菌性松动的防治策略提供新的思路。

## 1 Toll 样受体与无菌性松动

### 1.1 Toll 样受体

固有免疫系统在机体控制感染、启动获得性免疫应答以及组织修复等过程中具有重要作用。固有免疫细胞如巨噬细胞及树突细胞利用其自身模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)来识别病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMP)和损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMP),在宿主防御入侵的病原体过程中有决定性的作用。Toll 样受体正是 PRR 中一个最具特征的代表,它可以通过识别 PAMP 启动固有免疫系统,包括各种细菌胞壁成分、病毒 DNA 和 RNA。

迄今为止,已经陆续发现哺乳动物有 13 种 Toll 样受体,即 TLR1-TLR 13,其中包括 12 种小鼠(TLR1-TLR9、TLR11-TLR13)和 10 种人类(TLR1-TLR10)Toll 样受体,其中 TLR4 是第 1 个被发现的 Toll 样受体。TLR 是一种 I 型跨膜糖蛋白,由胞外区、胞内区和跨膜区 3 部分组成。胞外区主要由 16~28 个重复亮氨酸序列(leucine rich repeats, LRR)组成,能够识别各种病原体。胞内结构域因与白细胞介素(IL)-1 受体家族的胞质区高度相似,称为 Toll/IL-1 受体同源区(TIR),TIR 结构负责向下游进行信号传导。

### 1.2 Toll 样受体介导的信号通路

Toll 样受体的胞外区一旦识别 PAMP 形成受体-配体复合物就启动了 TLR 信号通路。信号通路启动后,细胞内的接头蛋白被募集至变构后的 TIR 结构域,介导下游的一系列级联反应。目前被证实的接头蛋白主要有 5 种,包括髓系分化因子 88(MyD88)、MyD88 接头蛋白样/TIR 相关蛋白(Mal/TIRAP)、含 TIR 结构的可诱导干扰素  $\beta$  的接头分子(TRIF)、TRIF 相关接头分子(TRAM)和 SARM(Sterile- $\alpha$  and HEAT-armadillo motifs containing protein)<sup>[12]</sup>。根据信号转导过程中接头蛋白的不同,TLR 信号转导途径可分为 MyD88 依赖途径和非 MyD88 依赖途径,其中 MyD88 依赖途径主要分为 2 条:TLR-MyD88/IRAK-丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径;TLR-MyD88/IRAK-NF- $\kappa$ B 诱导激酶途径(NIK)/NF- $\kappa$ B 途径。MyD88 依赖途径参与了除 TLR3 以外的所有 TLR 通路,通过 MyD88 和 IRAK 相互作用募集下游的信号分子来诱导 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 等激活,分泌促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-12,激活固有免疫反应。非 MyD88 依赖途径主要由 TLR3 和 TLR4 参与,由 TRIF 和 TRAM 两种接头蛋

白介导。此条途径能够通过募集 TRAF-6、TRAF-3、TRADD 诱导转录因子 NF- $\kappa$ B 和干扰素调节因子-3(IRF-3),以及随后干扰素(IFN- $\beta$ )的产生和树突状细胞的成熟和活化。

### 1.3 Toll 样受体与无菌性松动

Toll 样受体作为固有免疫受体广泛分布于各类细胞中,包括单核/巨噬细胞、成纤维细胞、成骨细胞和破骨细胞等。最近有报道证实在无菌性松动患者的假体组织内发现了 TLR 的表达,表明 TLR 可能在无菌性松动的发病中起到了重要作用<sup>[9]</sup>。本文主要讨论颇受关注的 TLR1、TLR2 和 TLR4 种 Toll 样受体。

TLR1 和 TLR2 主要分布于细胞膜表面,且能形成异质二聚体,识别胞外的细菌病原体,如细菌成分脂多糖、脂肽、肽聚糖等<sup>[13]</sup>。将小鼠大腿植入不锈钢假体和钛颗粒后,在假体周围的骨组织中均能检测到 TLR1 和 TLR2 的表达。在小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 中也能检测到 TLR1 和 TLR2 的表达,但将 RAW264.7 与钛颗粒共培养后只有 TLR1 表达升高<sup>[14]</sup>。在松动患者的界膜组织中,也证实了巨噬细胞表面 TLR2 的表达<sup>[15]</sup>。Hirayama 等<sup>[16]</sup>发现用 LPS 包裹的钛颗粒刺激细胞后 TLR2 的表达明显升高。Greenfield 等<sup>[17]</sup>发现野生型小鼠比 TLR2 缺失的小鼠更容易发生骨溶解,并且 TLR 缺失的巨噬细胞与钛颗粒共培养后分泌的 TNF- $\alpha$  减少。这些实验表明,无论是在无菌性松动的患者体内、动物模型中,还是体外细胞模型中,TLR1 和 TLR2 都起着关键作用。

TLR4 可以识别革兰氏阴性菌脂多糖(LPS),还可识别宿主坏死细胞释放的热休克蛋白(heat-shock proteins, HSP)。在松动的假体周围组织中能检测到 TLR4 明显升高。当 TLR4 被抑制时,磨损微粒刺激引起的炎症反应和骨溶解均受到抑制,并且 TLR4 缺失小鼠产生的骨溶解也明显降低。这些结果均提示 TLR4 可能在无菌性松动的发病过程中起着重要作用<sup>[14-15]</sup>。Hao 等<sup>[18]</sup>发现超高交联聚乙烯微粒能够上调单核细胞表面 TLR4 和 HSP60 的表达,而 HSP60 能与 TLR4 结合,促进炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 的分泌。因此,抑制 TLR4 能够减少细胞因子的分泌。

Toll 样受体与配体结合形成受体-配体复合物,启动了 TLR 信号通路,使 TIR 区发生结构重排同时募集相应的接头蛋白(MyD88、TRIF 和 TIRAP),最终导致 NF- $\kappa$ B 的激活。Pearl 等<sup>[10]</sup>发现 MyD88 抑制剂能够抑制骨水泥(PMMA)颗粒刺激所引起的炎症反应。用 PMMA 颗粒刺激 MyD88 缺失的巨噬细胞也得到相似的结果。这些结果均提示,TLR 识别磨损微粒有可能是通过 MyD88 依赖性信号途径。Maitra

等<sup>[19]</sup>也报道了 UHMWPE 颗粒激活 TLR1/TLR2 受体引起的炎症反应是受 NF- $\kappa$ B 信号通路所调节的。另有学者发现体外实验中磨损微粒诱导的破骨细胞分化是受 p38 和 JNK 信号通路所调节的<sup>[20]</sup>,但是对于 Toll 样受体与这些通路之间的相互关系鲜有报道。因此,研究 Toll 样受体与下游的 p38 和 JNK 信号通路之间的相互作用,能为防治无菌性松动提供新的思路 and 策略。

## 2 炎症小体与无菌性松动

### 2.1 炎症小体

固有免疫反应激活后,一方面诱导 NF- $\kappa$ B 及 IRF3 等转录因子的转录,以此来激活细胞分泌一系列炎症因子,包括 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 以及干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 等,引发快速的免疫反应,另一方面招募其他蛋白质分子共同形成炎症复合体,即炎症小体 (inflammasome)。炎症小体的基本结构包含 3 种蛋白,分别是感受器(如 NLR、RIG-I、IFI16 等),接头蛋白 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) 和效应分子半胱天冬蛋白酶前体 pro-caspase-1。NLR 包含 3 个区域,分别为 C 端亮氨酸重复序列 (LRRs)、核苷酸结合寡聚化区域 (NACHT 区或 NOD 区) 以及 N 端 caspase 募集和活化结构域 (caspase activation and recruitment domain, CARD)。炎症小体的主要作用是活化半胱天冬蛋白酶 (caspase-1),剪切 IL-1 $\beta$ 、IL-18 及 IL-33 的前体,使其成熟并发挥促炎作用。

### 2.2 炎症小体介导的信号通路

LRRs 是炎症小体信号感知区域,LRR 识别相关信号后可以诱导 NACHT 区寡聚化,暴露 N 端的 CARD 区,进而募集同样含有 CARD 区的 pro-caspase-1,以 CARD-CARD 的方式传递信号。但并非所有 NLR 的 N 端都有 CARD 区,有些被 PYD 区取代,这时则需要接头蛋白 ASC 辅助信号传递。ASC 含有 PYD 和 CARD 两个结构域,其中 PYD 区可与 NLR 的 PYD 区相互作用,将信号传递给另一端的 CARD 区,再由 CARD 区募集同样含有 CARD 区的 pro-caspase-1。pro-caspase-1 经过自剪切作用水解为 p35(含 CARD 区)和 p10,p35 再被剪切为 CARD 和 p20,2 个 p20 和 2 个 p10 结合构成具有活性的 caspase-1,发挥对 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18 的剪切作用,进而产生成熟的具有生物学活性的 IL-1 $\beta$  和 IL-18。

炎症小体信号通路与其他信号通路(尤其是 TLR 信号通路)之间存在着广泛而密切的联系。一般认为,炎症小体发挥作用需要双重信号的刺激。第 1 信号被称为预刺激信号,由 TLR 或其他模式识别受

体介导,通过活化 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号途径而上调炎症小体中心分子和 IL-1 $\beta$ 、IL-18 前体的表达;第 2 信号又叫活化信号,即 ATP、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 等 PAMP 或 DAMP 诱导 NLR 的寡聚化及变构,进而募集 ASC,活化 caspase-1。

本文讨论目前研究最多、机制最清楚的 NLRP3 炎症小体,它由 NLR 家族成员 NLRP3、接头蛋白 ASC 和效应分子 caspase-1 组成。其活化需要接头蛋白 ASC 的参与。

NLRP3 的活化机制主要分为 3 种:第 1 种认为 K<sup>+</sup>外流是 NLRP3 活化的必要信号;第 2 种认为活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的产生对活化 NLRP3 至关重要;第 3 种则认为组织蛋白酶 B 的释放可引起 NLRP3 活化。细胞吞噬的磨损微粒能破坏溶酶体膜,导致组织蛋白酶 B 释放进入细胞质,促进 NLRP3 的活化,但具体机制尚未研究清楚。这 3 种机制都参与了磨损微粒诱导的炎症小体活化,而其中第 3 种机制被认为是磨损微粒诱导炎症小体活化的主要机制。

### 2.3 炎症小体与无菌性松动

Caicedo 等<sup>[11]</sup>首次证实 NLRP3 或 ASC 的缺失能够减少微粒刺激 THP1 细胞释放 IL-1 $\beta$ ,并进一步发现微粒是通过损伤溶酶体来激活 NLRP3 促进 IL-1 $\beta$  的释放。而 St Pierre 等<sup>[8]</sup>则从基因层面证实了钛颗粒刺激巨噬细胞释放 IL-1 $\beta$  是受 NLRP3、ASC 和 caspase-1 所调控的。Qu 等<sup>[21]</sup>发现 NLRP3 表达异常升高的小鼠表现出严重的骨量减少,除了激活炎症因子 IL-1 $\beta$ ,NLRP3 还能通过重组肌动蛋白骨架以及促进多聚 ADP-核糖聚合酶 1(一种破骨细胞生成抑制剂)的降解来增强破骨细胞骨吸收的能力。Burton 等<sup>[22]</sup>则利用小鼠颅骨骨溶解模型证实了炎症小体 NLRP3 介导的信号通路在促炎因子的释放以及微粒诱导的骨溶解中起着重要作用。

目前研究认为,钛颗粒的内吞触发了溶酶体释放组织蛋白酶 B,激活 NLRP3 炎症小体。活化的 NLRP3 炎症小体通过 PYD 区的相互作用招募接头蛋白 ASC,进而通过 CARD 区的相互作用募集同样含有 CARD 区的 pro-caspase-1。

## 3 展望

无菌性松动是导致关节置换术失败的最常见的原因之一,其发生机制十分复杂,磨损微粒在其中起到了主导作用。磨损微粒能促进假体周围细胞释放促炎因子,抑制成骨细胞而激活破骨细胞,导致骨溶解<sup>[23]</sup>。综上所述,磨损微粒能够通过 MyD88 依赖途径激活巨噬细胞表面的 Toll 样受体,Toll 样受体激活后一方面通过活化 AP-1 和 NF- $\kappa$ B 信号途径释

放各种促炎因子;另一方面能够上调炎症小体中心分子的表达,激活炎症小体,引起促炎因子的释放,造成骨代谢的失衡,导致骨溶解的形成。此外,磨损微粒也能通过刺激细胞溶酶体释放组织蛋白酶 B 来激活炎症小体,释放促炎因子。由此可见,Toll 样受体与炎症小体在人工关节无菌性松动的发病过程中起到了重要作用。然而,对于 Toll 样受体是如何识别磨损微粒而被激活的,TLR 信号通路与下游信号通路之间具体是如何相互联系的,磨损微粒又是如何诱导炎症小体活化等问题,目前仍未得到明确的解释,有待进一步的探索。未来的研究重点将集中在:不同材料的磨损微粒能够分别激活哪些 Toll 样受体;Toll 样受体激活后介导了哪些下游信号通路;炎症小体在其中又起到了怎样的作用;目前的临床药物能否针对 Toll 样受体或炎症小体发挥治疗作用等。

#### 参考文献

- [1] Del BA, Denaro V, Maffulli N. Genetic susceptibility to aseptic loosening following total hip arthroplasty: a systematic review[J]. *Br Med Bull*, 2012, 101: 39-55.
- [2] 曾晓峰, 赵建宁. 人工关节无菌性松动的生物学机制[J]. *中国骨伤*, 2003, 16(6): 380-382.  
Zeng XF, Zhao JN. Biological mechanism of aseptic loosening of prosthesis[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2003, 16(6): 380-382. Chinese.
- [3] Hoenders CS, Harmsen MC, van Luyn MJ. The local inflammatory environment and microorganisms in "aseptic" loosening of hip prostheses[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008, 86(1): 291-301.
- [4] 祖罡, 毕大卫, 费骏. 全髋置换术后假体周围骨溶解[J]. *中国骨伤*, 2008, 21(3): 240-242.  
Zu G, Bi DW, Fei J. Periprosthetic osteolysis following the total hip arthroplasty[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2008, 21(3): 240-242. Chinese with abstract in English.
- [5] Atkins CJ, Haynes DR, Howie DW, et al. Role of polyethylene particles in peri-prosthetic osteolysis: a review[J]. *World J Orthop*, 2011, 2(10): 93-101.
- [6] Catelas I, Wimmer MA, Utzschneider S. Polyethylene and metal wear particles: characteristics and biological effects[J]. *Semin Immunopathol*, 2011, 33(3): 257-271.
- [7] Gallo J, Goodman SB, Kontinen YT, et al. Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty[J]. *Innate Immun*, 2013, 19(2): 213-224.
- [8] St Pierre CA, Chan M, Iwakura Y, et al. Periprosthetic osteolysis: characterizing the innate immune response to titanium wear particles[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(11): 1418-1424.
- [9] Takagi M, Tamaki Y, Hasegawa H, et al. Toll-like receptors in the interface membrane around loosening total hip replacement implants[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 81(4): 1017-1026.
- [10] Pearl JI, Ma T, Irani AR, et al. Role of the Toll-like receptor pathway in the recognition of orthopedic implant wear-debris particles[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(24): 5535-5542.
- [11] Caicedo MS, Desai R, McAllister K, et al. Soluble and particulate Co-Cr-Mo alloy implant metals activate the inflammasome danger signaling pathway in human macrophages: a novel mechanism for implant debris reactivity[J]. *J Orthop Res*, 2009, 27(7): 847-854.
- [12] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(7): 499-511.
- [13] Huang QQ, Pope RM. The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2009, 11(5): 357-364.
- [14] Pajarinen J, Mackiewicz Z, Pollanen R, et al. Titanium particles modulate expression of Toll-like receptor proteins[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 92(4): 1528-1537.
- [15] Tamaki Y, Takakubo Y, Goto K, et al. Increased expression of Toll-like receptors in aseptic loose periprosthetic tissues and septic synovial membranes around total hip implants[J]. *J Rheumatol*, 2009, 36(3): 598-608.
- [16] Hirayama T, Tamaki Y, Takakubo Y, et al. Toll-like receptors and their adaptors are regulated in macrophages after phagocytosis lipopolysaccharide-coated titanium particles[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(7): 984-992.
- [17] Greenfield EM, Beidelschies MA, Tatro JM, et al. Bacterial pathogen-associated molecular patterns stimulate biological activity of orthopaedic wear particles by activating cognate Toll-like receptors[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(42): 32378-32384.
- [18] Hao HN, Zheng B, Nasser S, et al. The roles of monocytic heat shock protein 60 and Toll-like receptors in the regional inflammation response to wear debris particles[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 92(4): 1373-1381.
- [19] Maitra R, Clement CC, Scharf B, et al. Endosomal damage and TLR2 mediated inflammasome activation by alkane particles in the generation of aseptic osteolysis[J]. *Mol Immunol*, 2009, 47(2-3): 175-184.
- [20] Yamanaka Y, Clohisy JC, Ito H, et al. Blockade of JNK and NFAT pathways attenuates orthopedic particle-stimulated osteoclastogenesis of human osteoclast precursors and murine calvarial osteolysis[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(1): 67-72.
- [21] Qu C, Bonar SL, Hickman-Brecks CL, et al. NLRP3 mediates osteolysis through inflammation-dependent and -independent mechanisms[J]. *FASEB J*, 2015, 29(4): 1269-1279.
- [22] Burton L, Paget D, Binder NB, et al. Orthopedic wear debris mediated inflammatory osteolysis is mediated in part by NALP3 inflammasome activation[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(1): 73-80.
- [23] 刘国印, 赵建宁, 王瑞. 磨损微粒诱导细胞凋亡与无菌性松动的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2013, 26(9): 791-796.  
Liu GY, Zhao JN, Wang R. Progress on the relationship between wear debris-induced apoptosis and aseptic loosening of prosthesis[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2013, 26(9): 791-796. Chinese with abstract in English.

(收稿日期: 2015-11-02 本文编辑: 李宜)