

人工关节无菌性松动的生物学机制 Biological mechanism of aseptic loosening of prosthesis

曾晓峰 赵建宁
ZENG Xiaofeng, ZHAO Jianning

【关键词】 人工关节; 骨质溶解; 骨结合素 【Key words】 Joint prosthesis; Osteolysis; Osteonectin

假体松动与以下一些因素有关:骨对微粒反应所致的骨吸收;应力对假体及其粘合组织的作用;骨床与假体嵌合欠紧密致骨生长受抑;应力遮挡导致骨吸收;材料磨损等。此外,假体早期失败更与患者的骨质条件、手术技巧、负重程度、假体设计有关。与这些因素相关的假体周围骨组织完整性受到破坏是造成假体松动的最重要的原因^[1]。在假体的远期松动中,金属、聚乙烯和骨水泥磨屑所致的“微粒病”起着十分关键的作用,最终可引起假体周围的骨溶解。

1 界膜的细胞成分

骨对骨水泥或假体的组织反应将形成一层界膜组织。尸解发现未松动假体周围也有一层纤维组织膜,并可见部分骨化,其间细胞成分较少。翻修假体界膜的组织学表现是异物肉芽肿,其突出的特征是在新生的纤维组织中包含有大量的细胞成分,其中以巨噬细胞为主,偶伴有多核巨细胞,同时还可见到大量的破骨细胞、成纤维细胞、少量的慢性炎性细胞,淋巴细胞少见。组织学上界膜组织分为三层:紧贴骨水泥或假体为滑膜层,为小圆形的滑膜细胞;其下是成纤维细胞及吞噬大量磨屑的巨噬细胞、异物巨细胞;深层紧贴骨组织周围是许多破骨细胞^[2]。骨水泥型假体的界膜组织中,异物巨细胞较为常见。应用单克隆抗体技术检测巨噬细胞、异物巨细胞、破骨细胞膜上的细胞因子受体,发现它们均表达 gp130、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 、M-CSF、SCSF 的受体成分,提示了这些细胞间的同源性,巨噬细胞及异物巨细胞也可能向破骨细胞转化^[3]。

2 间质的细胞因子

松动假体的界膜组织代谢非常活跃。该组织产生许多调节炎症反应的细胞因子,其中诱导骨吸收的因子主要包括:IL-1、IL-6、IL-11、TNF- α 、M-CSF、GM-CSF、PGE₂、MCP-1(单核细胞趋化蛋白)、MIP-1 α (单核细胞活化蛋白)、OPGL(护骨素配体)等^[4-6]。细胞因子前体的水平与过氧化氢含量的升高及触媒含量的下降存在显著的相关性,提示在磨屑的刺激下,过量过氧化氢的产生,将引发各种细胞因子的合成及分泌^[7]。巨噬细胞是产生各种细胞因子的最早且最主要的细胞部分,即使与微粒无直接接触,滑液中的磨屑就可导致巨噬细

胞内 Ca²⁺ 的脉冲性升高, Ca²⁺ 作为第二信使进而引发各种细胞因子的释放,该作用可被电压门控 Ca²⁺ 通道阻滞剂尼莫地平阻断^[8]。在这个过程中,成骨细胞的协同作用有重要意义;巨噬细胞激活首先释放 TNF- α ,然后刺激成骨细胞释放 GM-CSF、IL-6、PGE₂、OPGL 等其它因子,这些因子的趋化及促分化作用进一步引起巨噬细胞、破骨细胞、成纤维细胞的增殖和分化,合成并分泌更多的细胞因子及各种蛋白酶^[9]。另有研究表明,骨水泥型假体与非骨水泥型假体各因子成分及含量无明显差异,出现骨溶解的患者界膜组织中 IL-1 升高更为显著^[10]。

3 破骨细胞激活机制

3.1 基质糖蛋白机制

基质中的糖蛋白成分可分为三类:粘附性糖蛋白,如纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、亲玻粘连蛋白、固生蛋白等;骨相关的基质糖蛋白,如骨钙蛋白、骨桥蛋白等;弹性蛋白和弹性蛋白沉积相关糖蛋白,如原纤维蛋白、基质相关糖蛋白。粘附性糖蛋白的 RGD(Arg-Gly-Asp) 序列是多种细胞膜受体的识别和激活信号,能引发细胞的粘附和分泌活动。

亲玻粘连蛋白(Vitronectin):VN 是联系细胞粘附与蛋白降解之间重要的调节成分。研究表明,炎症滑膜中的巨噬细胞及成纤维细胞可以合成 VN, TGF β 、IL-6 可以上调 VN 基因的表达。与骨吸收相关的 VN 受体主要为 α V β ₃, 它可以促进细胞的扩散和迁移, IL-1、TNF- α 、TGF β 、GM-CSF 可以调节该受体基因的表达。THR 患者中升高的各种细胞因子,可能正是通过刺激 VN- α V β ₃ 复合物的形成而引发骨质溶解^[10]。在紧邻骨组织的界膜中可以发现大量 In β ₃/MMP-13 或 In β ₃/MMP-2 双阳性细胞,提示了这种受体复合物与 MMPs 释放的潜在关系。此外, α V β ₃ 受体是破骨细胞特征性的细胞表面标志物,进一步说明 VN 在破骨细胞与骨基质表面的粘附、骨吸收过程的启动中起着重要的作用。

纤维粘连蛋白(Fibronectin):采用 APAAP(碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶)及双重免疫荧光标记法在人工关节的界膜组织及血管内膜中可见 FN 的存在,与骨性关节炎的滑膜组织相比,其中的细胞成分表达高水平的 FN 受体的 α ₄、 α ₅、 β ₁ 亚单位,同时也可见较多的受体/胶原酶 I 或受体/胶原酶 III 双阳性细胞,提示 FN 与受体的相互作用促进了细胞产生基质酶,细胞过度表达 FN 受体是假体周围骨溶解的可能机制^[11]。

层粘连蛋白(Laminin): 对比松动假体周围界膜组织与骨性关节炎、无松动假体周围的滑膜组织发现, 前者层粘连蛋白(Lr 10, Lr 11) 及其受体(β_1 及 α_6 亚单位为主) 的含量明显升高, 双重免疫荧光法显示 α_6 亚单位常与胶原酶 I 或胶原酶 III、TNF α 、IL-6 共存于同一细胞, 提示了 LN 受体在细胞因子与基质蛋白酶之间的桥梁作用^[12]。

固生蛋白(Tenascin): 固生蛋白家族包括固生蛋白 C、R、X 三型, 其中固生蛋白 C 常表现出对于细胞的抗粘合作用, 无菌性松动患者界膜的假体面及骨面中的固生蛋白 C 含量, 较无松动关节周围的滑膜组织及纤维层中明显升高, 提示该蛋白过度升高可能降低骨组织间的粘合力, 引发假体松动^[13]。

3.2 OPG/OPGL 机制 护骨素(Osteoprotegerin, OPG) 及其配体蛋白(Ligand of Osteoprotegerin, OPGL) 是近年来新发现的一对调节破骨细胞分化和激活的关键因子, 它们均由成骨细胞/成骨细胞前体/基质细胞合成和分泌。破骨细胞表面表达 RANK(Receptor activator of NF- κ B) 受体, 它们可被 OPGL 激活, 进而活化 NF- κ B, 调节破骨细胞核基因的转录过程。OPG 是 TNF 受体家族的一员, 以旁分泌方式在骨的微环境中发挥作用, 它充当 RANK 的可溶性竞争者, OPGL 的假受体, 干扰 OPGL 与 RANK 之间的信号传递, 进而抑制破骨细胞前体向破骨细胞转化, 促进破骨细胞凋亡, 抑制成熟破骨细胞活化^[14, 15]。OPGL 则表达于成骨细胞表面, 通过细胞间的相互作用激活破骨细胞。

3.3 一氧化氮(NO) 机制 NO 是一种重要的细胞递质, 它在 DNA 合成、细胞增殖及刺激 PGE₂ 的释放中均有重要作用^[16]。假体周围的界膜组织中, 可见大量充满吞噬颗粒及富含 NO 合成酶和 COX-2 的细胞, 提示磨屑对这两种酶的诱导作用。NO 与磨屑具有时间和浓度的相关性, 诱导效应钛合金 > 纯钛 > 骨水泥。NO 通过与 COX 协同而产生作用, 它们可以调节细胞的存活力。界膜组织的 CD68+ 巨噬细胞及成纤维细胞中, 同时存在两个过程: 细胞因子增强 NO 合成酶的活性, 导致 NO 的积累; NO 诱导 COX-2 的合成, 使前列腺素的合成增加, 放大了炎症反应^[17]。胞内积累的 NO 能与过氧化物反应形成氮过氧化物, 导致细胞的损伤。

4 组织损伤机制

激活的破骨细胞合成和分泌大量基质金属蛋白酶, 导致假体周围骨溶解。与骨基质降解有关的基质金属蛋白酶主要包括: MMP-1、MMP-2(明胶酶 A)、MMP-9(明胶酶 B)、MMP-13(胶原酶 III)、MMP-14(即 MT1-MMP, 又称明胶酶 A 活化剂), 这些基质蛋白的合成和分泌以及蛋白活性受到多种因素的调节。研究表明, 细胞因子 IL-1、TNF- α 、PDGF、PGE₂ 可以促进 MMPs 的合成与分泌, 而 TGF- β 、前列腺素合成酶抑制剂则起抑制作用, 此外, 基质金属蛋白酶的活性主要受其组织抑制剂 TIMP 的影响。

MMP-1 可降解 I、II、III 型胶原, 免疫荧光法证实, 界膜组织的各层均有大量骨基质金属蛋白酶诱导剂(EMMPRIN)/MMP-1 双阳性细胞, 而在关节炎患者的滑膜组织中少见, 由于 EMMPRIN 可上调细胞表达 MMP-1 且对 MMPs 组织抑制剂 TIMP 影响甚微, 提示 MMPs 与 TIMP 含

量的失衡, 可能是假体松动的原因^[18]。

MMP-13 在 THR 和 OA 患者中的含量较正常滑膜组织明显升高, 免疫组化证实, 它主要存在与血管内皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞中, 由于各种旁分泌的细胞因子的激活, 释放至基质当中, 导致间质成分的破坏^[19]。

MMP-2 及 MMP-9 一般以酶原形式由成纤维细胞合成并释放至滑液中, THR 患者中同时含有丰富的 MMP-14、TIMP-1 及 TIMP-2。随着界面间的微动及关节内液体压的变化, MMP-2 可通过与 TIMP-2 形成稳定的复合物而迁移并吸附至假体表面及界膜组织中。免疫组化及原位杂交证实, 界膜组织中的巨噬细胞中同时存在 TIMP-2、原 MMP-2、MMP-14 并形成一种三联体分子, 正是通过这种机制使 MMP-2 激活并产生组织破坏作用^[20, 21]。由于 MMP-9 可与 TIMP-1 稳定结合, 它的迁移和激活机制可能与此类似。

参考文献

- Huiskes R. The causes of failure for hip and knee arthroplasties. Ned Tijdschr Geneesk, 1998, 142: 2035-2040.
- Fukunishi S. The bone implant interface: An experimental study on the effects of micromotion. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1995, 69: 53-63.
- Neale SD, Athanasou NA. Cytokine receptor profile of arthroplasty macrophages, foreign body giant cells and mature osteoclasts. Acta Orthop Scand, 1999, 70: 452-458.
- Neale SD, Sabokbar A, Howie DW, et al. Macrophage colony stimulating factor and interleukin 6 release by periprosthetic cells stimulates osteoclast formation and bone resorption. J Orthop Res, 1999, 17: 686-694.
- Xu JW, Li TF, Partsch G, et al. Interleukin 11(IL-11) in aseptic loosening of total hip replacement (THR). Scand J Rheumatol, 1998, 27: 363-367.
- Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, et al. Induction of macrophage G C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles. Bone Joint Surg(Br), 1999, 81: 155-162.
- Tucci M, Baker R, Benghuzzi H, et al. Levels of hydrogen peroxide in tissues adjacent to failing implantable devices may play an active role in cytokine production. Biomed Sci Instrum, 2000, 36: 215-220.
- 蔡晋, 王继芳, 胡永成, 等. 人工关节磨损颗粒激活骨假体界面巨噬细胞生物学机制探讨. 中华外科杂志, 1999, 37(1): 53-56.
- Li TF, Xu JW, Santavirta S, et al. Expression of vitronectin and its integrin receptors in the synovial membrane like interface tissue from aseptic loosening of total hip replacement. J Rheumatol, 2000, 27: 727-734.
- Kim KJ, Chiba J, Rubash HE. In vivo and in vitro analysis of membranes from hip prostheses inserted without cement. J Bone Joint Surg(Am), 1994, 76: 172-180.
- Li TF, Xu JW, Santavirta S, et al. Distribution of fibronectins and their integrin receptors in interface tissue from aseptic loosening of hip prostheses. Clin Exp Rheumatol, 2000, 18: 221-225.
- Kontinen YT, Li TF, Xu JW, et al. Expression of laminins and their integrin receptors in different conditions of synovial membrane and synovial membrane like interface tissue. Ann Rheum Dis, 1999, 58: 683-690.
- Kontinen YT, Li TF, Michelsson O, et al. Expression of tenascin C in aseptic loosening of total hip replacement. Ann Rheum Dis, 1998,

骨组织工程研究进展

Progress of bone tissue engineering

金黎明 刘万顺 韩宝芹 刘晨光 刘伟治

JIN Liming, LIU Wanshun, HAN Baoqin, LIU Chenguang, LIU Weizhi

【关键词】 组织工程; 成骨细胞 【Key words】 Tissue engineering; Osteoblasts

组织工程学是一门应用工程学和生命科学的原理和方法,以载体结合被分离细胞,并在宿主体内降解释放细胞,形成新的有功能组织的科学。其基本方法是:取少量自体组织,在体外分离、培养细胞,将一定量的培养细胞种植到具有一定空间结构的三维支架上,再将此细胞-支架复合物植入体内或在体外继续培养,通过细胞的生长繁殖、相互粘附、分泌细胞外基质,形成具有一定结构和功能的组织和器官。近年来应用骨组织工程临床治疗骨缺损成为目前研究的热点。这不仅可以减少自身骨移植的供区损伤,也可避免同种异体移植供体来源有限和不可避免的免疫排斥反应。目前骨组织工程的研究主要包括:①种子细胞的体外培养;②细胞种植基质材料的研究开发;③组织培养中各种因子的调控作用。

1 种子细胞的来源

体外培养种子细胞是组织工程学的关键一环,成骨细胞是骨组织工程的种子细胞。理想的细胞来源应具备下列特点:①取材容易,对机体的损伤小;②在体外培养中易定向分化为成骨细胞和具有较强的传代繁殖力;③植入机体后能适应受区的环境并保持成骨活性。当前成骨细胞主要有以下几个来源:

1.1 骨^[1-3] 目前较多使用的是胚胎骨或新生骨。利用骨作为来源获得的细胞在体外较易定向分化为成骨细胞,且具

有生长迅速,传代繁殖快的优点。但此法会对患者造成手术损伤且供源有限。

1.2 骨外膜 骨外膜分为内外两层。其中内层含有较多骨祖细胞和成骨细胞。骨外膜来源的成骨细胞作为种子细胞应用于临床治疗骨缺损全过程均已实现^[4-7]。此种方法获得的细胞具有很强的繁殖分化能力,但也同样存在着对机体造成新的较明显创伤的缺点。

1.3 骨髓^[8-11] 骨髓分造血和基质两大系统,其成骨能力来源于基质。骨髓基质细胞称作成纤维细胞集落形成单位,具有多向分化潜能,可分化为成骨系细胞、成纤维系细胞、脂肪细胞和造血系细胞。在诱导因子作用下,可使其向成骨系细胞分化。骨髓具有取材方便、对供体损伤小、有流动性和可经皮注射等优点。体外培养细胞具有较强床上已取得良好疗效。

1.4 骨外组织^[12-14] 起源于胚胎时期间充质的骨外部位的骨祖细胞,即可诱导性骨祖细胞,在诱导因子的持续作用下,可维持其成骨的功能,这就解释了异位骨化现象。有研究发现毛细血管周细胞^[12]、成纤维细胞^[13]、毛细血管系统的内皮细胞或网状内皮细胞^[14]都可在体外培养条件下向成骨细胞定向分化。这种方法取材容易,对人体的创伤较小,体外培养传代繁殖能力较强,提供了一条新的成骨细胞的来源。但由于定向分化为成骨细胞及适应受区环境的能力较低,限制了其应用。

成骨细胞的这四种来源,在作为种子细胞方面各有优势,

青岛海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003
基金项目: 863 计划资助项目(2001AA625050)

57: 619-623.

14 Itonaga I, Sabokbar A, Murray DW, et al. Effect of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand on osteoclast formation by arthroplasty membrane derived macrophages. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59: 26-31.

15 Donatella G, Elisabetta C, Lucia S, et al. Bone cement extracts modulate the osteoprotegerin/osteoprotegerinligand expression in MG63 osteoblast like cells. *Biomaterials*, 2002, 23: 2359-2365.

16 Shanbhag AS, Macaulay W, Stefanovic-Racic M, et al. Nitric oxide release by macrophages in response to particulate wear debris. *J Biomed Mater Res*, 1998, 41: 497-503.

17 Hukkanen M, Corbett SA, Platts LA, et al. Nitric oxide in the local host reaction to total hip replacement. *Clin Orthop*, 1998, 52: 53-65.

18 Li TF, Santavirta S, Virtanen I, et al. Increased expression of EMM-

PRIN in the tissue around loosened hip prostheses. *Acta Orthop Scand*, 1999, 70: 446-451.

19 Imai S, Konttinen YT, Jumppanen M, et al. High levels of expression of collagenase 3(MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign body reaction. *J Bone Joint Surg(Br)*, 1998, 80: 701-710.

20 Takei I, Takagi M, Santavirta S, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in joint fluid of the patients with loose artificial hip joints. *J Biomed Mater Res*, 1999, 45: 175-183.

21 Nawrocki B, Polette M, Burllet H, et al. Expression of gelatinase A and its activator MT1-MMP in the inflammatory periprosthetic response to polyethylene. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 288-294.

(收稿: 2002-09-04 编辑: 李为农)