

# 聚乙烯颗粒对人单核细胞分泌促炎因子与抗炎因子的影响

丁悦<sup>1</sup>, Barden Bertram<sup>2</sup>, 刘尚礼<sup>1</sup>, 马若凡<sup>1</sup>, 黄东生<sup>1</sup>, Löer Franz<sup>2</sup>

(1. 中山大学附属第二医院骨外科, 广东 广州 510120; 2. 德国埃森大学骨外科, 埃森市 45147)

**摘要** 【目的】探讨聚乙烯颗粒对人单核细胞分泌促炎因子与抗炎因子的影响。【方法】用 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒(聚乙烯颗粒)平均直径 14.27, 6.39, 1.74, 1.01, 0.54 和 0.28  $\mu\text{m}$ ) 分别刺激人单核细胞, 颗粒体积与细胞数的比例为 100:1 和 10:1。在颗粒刺激细胞 24 h 后, 运用 ELISA 检测培养上清液中的促炎因子(白介素-1 $\beta$ , 白介素-6 和细胞坏死因子  $\alpha$ ) 及抗炎因子(白介素-10) 的表达。【结果】Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒可刺激单核细胞分泌白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6) 和细胞坏死因子  $\alpha$ (TNF $\alpha$ ), 但未能引起白介素-10(IL-10) 的表达。颗粒比例增高可促使单核细胞分泌更多的 IL-6 和 TNF $\alpha$ , 却减少 IL-1 $\beta$  分泌, 对 IL-10 的分泌则无影响。个体差异使巨噬细胞对同种颗粒的刺激产生不同的反应, 其差异可达到 30 倍。【结论】个体差异是影响人工关节寿命的重要因素, 聚乙烯颗粒可刺激单核细胞产生炎因子但对产生抗炎因子(IL-10) 的作用不明显, 提示促炎因子与抗炎因子的不平衡或许是人工关节松动不断进展的另一重要因素。

**关键词** 聚乙烯; 细胞因子; 单核细胞

中图分类号 R687.4

文献标识码 A

文章编号 1672-3554(2004)02-0127-04

## The Effect of Polyethylene Particles on Secretion of Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Cytokines by Human Monocytes

DING Yue<sup>1</sup>, Barden Bertram<sup>2</sup>, LIU Shang-li<sup>1</sup>, MA Ruo-fan<sup>1</sup>, HUANG Dong-sheng<sup>1</sup>, Löer Franz<sup>2</sup>

(1. Department of Orthopaedic Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Department of Orthopaedic Surgery, Essen University, Essen 45147, Germany)

**Abstract** 【Objective】To study the effect of polyethylene particles on secretion of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines by human monocytes. 【Methods】Ceridust 3615<sup>®</sup> particles (mean sizes: 14.27, 6.39, 1.74, 1.01, 0.54 and 0.28  $\mu\text{m}$ ) were co-cultured with the monocytes at particle volume ( $\mu\text{m}^3$ ) to cell number ratios of 10:1 and 100:1. The 24-hour production of osteolytic mediators (interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor  $\alpha$ ) and anti-inflammatory cytokine (interleukin-10) were assessed by enzyme-linked immunoabsorbent assay. 【Results】Ceridust 3615<sup>®</sup> particles could stimulate monocytes to secrete tumor necrosis factor  $\alpha$ (TNF $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) but no interleukin-10 (IL-10). Higher concentrations of particles in the cell culture provoked higher secretions of TNF $\alpha$  and IL-6. For IL-1 $\beta$  this was vice versa. The particles had no effect on IL-10 secretion. The individual responses of the donors were rather heterogeneous, the maximum difference of cytokine production was 30 fold. 【Conclusion】The heterogeneity of human reactivity to polyethylene wear particles appears to be a major factor in determining implant life. The particles could stimulate monocytes to secrete pro-inflammatory cytokines but had no effect on anti-inflammatory cytokines (IL-10) production, it suggests that the imbalance secretion of the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines may be the other factor to cause the progress of the

收稿日期 2003-08-29

基金项目 国家教育部留学回国人员科研启动基金 (2003)

作者简介: 丁悦 (1972 - ) 女, 浙江杭州人, 博士, 主治医师. E-mail: dingyue36@hotmail.com

artificial joints loose.

**Key words:** polyethylene; cytokines; monocytes

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004 (1): 127-130]

目前,全球每年约有 100 万关节假体植入,而关节 10 年失效率几近 10%<sup>[1,2]</sup>。巨噬细胞与磨损颗粒相互作用引起假体周围骨溶解是导致人工关节远期松动失效的主要原因<sup>[2]</sup>。既往的组织病理学研究表明聚乙烯磨损颗粒,特别是直径小于 10  $\mu\text{m}$  的颗粒对假体周围的骨溶解起重要作用<sup>[3]</sup>。体外实验显示,巨噬细胞受到聚乙烯颗粒刺激后可分泌 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF $\alpha$  等炎症前因子,可介导人工关节假体周围骨溶解<sup>[4]</sup>,其机制尚不清楚。本研究旨在比较来源于人外周血的单核/巨噬细胞对直径 10  $\mu\text{m}$  以下不同大小、质量、比例的聚乙烯颗粒的反应,探讨炎症前因子与抗炎因子在人工关节松动中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验颗粒的准备

Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒(由德国 Clariant 公司提供)是一种高密度聚乙烯磨损颗粒。将其置入 RPMI-1640 (Sigma 公司)溶液与 7X 去污剂(德国 Steffen Kelch 公司)的混合液中并打碎,混合液中去污剂的体积分数为 0.125%。悬浮的颗粒将分别通过不同孔径的滤纸过滤,采用图象分析仪检测不同孔径的滤纸上颗粒的大小(德国 Leica 公司)。根据颗粒大小将 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒(模型聚乙烯颗粒)分成 6 组,直径( $d$ )分别为:( $14.27 \pm 5.38$ )  $\mu\text{m}$ , ( $6.39 \pm 3.10$ )  $\mu\text{m}$ , ( $1.74 \pm 0.56$ )  $\mu\text{m}$ , ( $1.01 \pm 0.49$ )  $\mu\text{m}$ , ( $0.54 \pm 0.36$ )  $\mu\text{m}$  和 ( $0.28 \pm 0.17$ )  $\mu\text{m}$ 。获得的颗粒均用体积分数 70% 乙醇冲洗 3 次,然后再用环氧乙烷消毒。测量每组颗粒的重量。消毒后的颗粒放置 7 d 以使残余环氧乙烷消除。将上述各组颗粒分别在培养液中稀释,体积数密度为  $0.4 \times 10^9$  /mL。采用 Limulus amoebocyte lysate assay 试剂盒测定颗粒中可能污染的内毒素。

### 1.2 单核细胞的提取与培养

从 8 名健康志愿者分别抽取 50 mL 外周血。用 lymphoflot (德国 Biotest 公司)和 Percoll (美国 Sigma 公司)梯度离心获得外周血中的单核细胞<sup>[9]</sup>。

细胞记数采用 Coulter counter (德国 Coulter Elec-

tronics Ltd 公司)。将细胞在 24 孔培养皿中培养(培养液:RPMI-1640 + 体积分数 10% 胎牛血清 + 质量分数 1% 链霉素、青霉素 + 2 mmol/L 左旋谷氨酰胺)  $4 \times 10^6$  个/孔。在温度 37  $^{\circ}\text{C}$ , 体积分数 5% 二氧化碳的培养箱中培养 30 min, 使细胞贴壁,在显微镜下观察,见细胞的贴壁率 98%。洗去未贴壁的细胞,重新加入培养液后将细胞置入培养箱中培养过夜使其分化。

### 1.3 颗粒与单核细胞相互作用

在与颗粒作用前,酞酚蓝检测结果显示:细胞活性 > 98%。各组 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒均以 10:1 和 100:1 [颗粒体积( $\mu\text{m}^3$ ):细胞数目(个)]刺激单核细胞。用 LPS (lipopolysaccharide) 1  $\mu\text{g}$ /mL 作阳性对照,单纯单核/巨噬细胞培养作为阴性对照。所有的实验组与对照组将重复 3 次。将单核/巨噬细胞与颗粒共同培养(培养液:RPMI-1640 + 质量分数 1% 链霉素、青霉素 + 2 mmol/L 左旋谷氨酰胺 + 体积分数 10% 胎牛血清)24 h,在此过程中不断震荡培养皿以使细胞与颗粒更好接触。用 ELISA 试剂盒(美国 Endogen 公司)检测培养上清液中的细胞因子:白介素 -1 $\beta$ , 白介素 -6, 细胞坏死因子  $\alpha$  和白介素 -10。

### 1.4 统计学分析

运用 SAS 软件,采用完全随机设计的方差分析和两两比较统计数据,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒样本中的内毒素含量

Limulus amoebocyte lysate assay 试剂盒测定结果显示:Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒样本中,内毒素含量 < 0.01 单位/ $0.4 \times 10^9 \mu\text{m}^3$  颗粒。

### 2.2 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒对单核细胞的刺激作用

与阴性对照组相比,Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒可明显刺激单核细胞分泌 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF $\alpha$ ,但未引起 IL-10 的表达(两两比较)。IL-6 的表达明显高于 IL-1 $\beta$  和 TNF $\alpha$  ( $F = 9.15$ ,  $P < 0.01$ )(图 1~3)。

### 2.3 直径 10 $\mu\text{m}$ 以下的颗粒,其大小对单核细胞刺激作用的影响

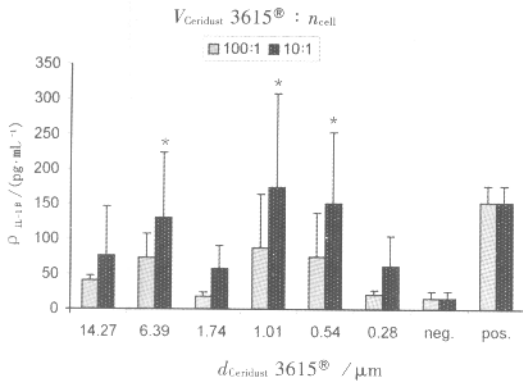


图 1 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒刺激单核细胞产生 IL-1 $\beta$   
 Fig. 1 Monocytes secreted IL-1 $\beta$  by challenged with Ceridust 3615<sup>®</sup> particles

neg : negative control (NC) ; pos : positive control (PC) ; \* : Compare with NC  $P < 0.05$  ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  6.39 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 10:1$ ) vs NC  $t = 2.55$ ,  $P < 0.05$ .  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  1.01 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 10:1$ ) vs NC  $t = 2.43$ ,  $P < 0.05$ ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  0.54 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 10:1$ ) vs NC  $t = 2.31$ ,  $P < 0.05$

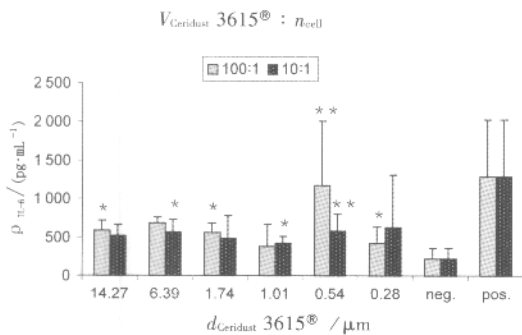


图 2 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒刺激单核细胞产生 IL-6  
 Fig. 2 Monocytes secreted IL-6 by challenged with Ceridust 3615<sup>®</sup> particles

neg : negative control (NC) ; pos : positive control (PC) ; \* : Compare with NC  $P < 0.05$  ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  14.27 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 100/1$ ) vs NC  $t = 2.32$ ,  $P < 0.05$ ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  6.39 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 10:1$ ) vs NC  $t = 2.18$ ,  $P < 0.05$ ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  1.74 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 100:1$ ) vs NC  $t = 2.43$ ,  $P < 0.05$ ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  1.01 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 10:1$ ) vs NC  $t = 2.24$ ,  $P < 0.05$ ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  0.28 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 100:1$ ) vs NC  $t = 2.61$ ,  $P < 0.05$ ; \* \* : Compare with NC  $P < 0.01$  ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  0.54 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 100:1$ ) vs NC  $t = 6.15$ ,  $P < 0.01$ ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  0.54 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 10:1$ ) vs NC  $t = 7.55$ ,  $P < 0.01$

颗粒大小对刺激单核细胞产生 IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-10 的影响不明显(图 1 ~ 3)。

2.4 颗粒的比例对单核细胞刺激作用的影响

比例为 100 : 1 的 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒使单核

细胞分泌更多的 IL-6 和 TNF $\alpha$  (图 2, 3), 但却减少 IL-1 $\beta$  的分泌(图 1), 但此两种颗粒比例对刺激单核细胞产生 IL-10 的影响则不明显。

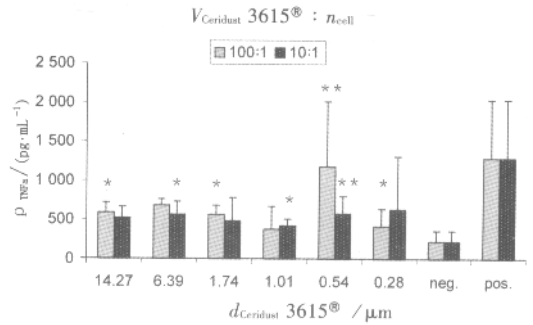


图 3 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒刺激单核细胞产生 TNF $\alpha$   
 Fig. 3 Monocytes secreted TNF $\alpha$  by challenged with Ceridust 3615<sup>®</sup> particles

neg : negative control (NC) ; pos : positive control (PC) \* : Compare with NC  $P < 0.05$  ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  14.27 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 100:1$ ) vs NC  $t = 2.15$ ,  $P < 0.05$ ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  6.39 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 10:1$ ) vs NC  $t = 2.53$ ,  $P < 0.05$ .  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  1.74 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 100:1$ ) vs NC  $t = 2.45$ ,  $P < 0.05$ ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  1.01 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 10:1$ ) vs NC  $t = 2.34$ ,  $P < 0.05$ ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  0.28 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 100:1$ ) vs NC  $t = 2.60$ ,  $P < 0.05$ ; \* \* : Compare with NC  $P < 0.01$  ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  0.54 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 100:1$ ) vs NC  $t = 9.72$ ,  $P < 0.01$ ;  $d_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}}$  0.54 ( $V_{\text{Ceridust 3615}^{\text{®}}} : n_{\text{cell}} = 10:1$ ) vs NC  $t = 3.12$ ,  $P < 0.01$

2.5 个体差异对单核细胞刺激作用的影响

来源于不同志愿者的单核细胞对同种颗粒的反应有明显差异, 这种差异可达 30 倍, 平均 5.8 倍。

3 讨论

尽管在翻修关节手术中发现, 超高分子聚乙烯(UHMWPE)颗粒是主要的磨损颗粒, 但因体内 UHMWPE 磨损颗粒较难获得, 故在既往的研究中常采用模型颗粒(包括钛颗粒与高密度聚乙烯颗粒)建立体外的颗粒与巨噬细胞相互作用的模型[4, 5]。Bi 等[5]提出去除钛颗粒表面的内毒素后, 其失去了对鼠骨髓细胞及人巨噬细胞的刺激作用。在鼠的体内实验中, 钛颗粒去除表面内毒素后, 其引起骨溶解的作用减少 50% ~ 70% [5]。本实验作用于巨噬细胞的含颗粒培养液的内毒素含量小于 0.01 单位 /  $4 \times 10^9 \mu\text{m}^3$  颗粒, 远低于刺激人巨噬细胞产生炎症前因子的浓度。故本实验的结

果可排除内毒素的影响。

到目前为止,许多细胞已被用于与聚乙烯颗粒的体外作用模型,如鼠细胞系(J774, P338D1, C3H 或 IC-21)、鼠腹腔巨噬细胞,人单核细胞系(U973)等<sup>[6]</sup>。虽然这些细胞容易得到,也易建立相对稳定的与颗粒体外作用的模型,但是颗粒对这些细胞的作用与来源于人外周血的巨噬细胞是不同的。聚乙烯颗粒不能刺激 J774 细胞分泌 IL-1 $\beta$ ,而人巨噬细胞在 Ceridust 3615<sup>®</sup> 的刺激下可分泌明显高于阴性对照组的 IL-1 $\beta$ <sup>[4]</sup>。尽管直径 0.1 ~ 10  $\mu\text{m}$  的 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒对人单核细胞系及鼠巨噬细胞有较强的生物活性,但本研究结果表明 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒的大小对人单核细胞分泌促炎因子的影响不明显,而平均直径 0.24  $\mu\text{m}$  的颗粒对鼠巨噬细胞活性最强<sup>[4]</sup>。故本研究采用来源于人外周血的单核细胞来建立人工关节松动的体外模型,其结果将更接近体内的实际情况。

本研究结果显示了 100 : 1 与 10 : 1 两种不同比例的颗粒均可刺激单核/巨噬细胞,高浓度聚乙烯颗粒可刺激单核/巨噬细胞分泌更多的 IL-6 和 TNF $\alpha$ ,但却减少 IL-1 $\beta$  的分泌。这提示不同比例的颗粒将对巨噬细胞产生炎症前因子起不同的作用。既往的研究发现,单核细胞受到颗粒刺激时可产生 IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  和 IL-6,这 3 种细胞因子可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,从而引起的人工关节松动<sup>[3, 7-12]</sup>。本研究结果也显示 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒可明显刺激单核细胞分泌 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF $\alpha$ 。IL-10 具有抗炎及免疫抑制作用,他可通过抑制单核细胞的核因子  $\text{kB}$  (NF- $\text{kB}$ ) 降低 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF 的产生<sup>[9-11]</sup>。本研究结果显示,两种不同大小、比例的颗粒均不能刺激单核细胞产生 IL-10,这提示了抗炎因子与促炎因子的不平衡也许是人工关节松动不断进展的另一重要因素。

在本研究中,不同个体的单核细胞刺激 Ceridust 3615<sup>®</sup> 颗粒产生炎症前因子的作用显示了较大的个体差异,这提示了个体差异是影响人工关节远期松动的一个重要因素。不同个体的单核细胞对 Ceridust 3615<sup>®</sup> 的作用差异可达到 30.2 倍。Matthews 等<sup>[4]</sup> 研究结果也显示个体差异可使巨噬细胞对 Ceridust 3615<sup>®</sup> 的反应相差 20 倍。个体差异是影响人工关节寿命的重要因素,单核/巨噬细胞可刺激聚乙烯颗粒产生炎症前因子但对产生抗炎因子(IL-10)的作用不明显,提示炎症前因子与

抗炎因子的不平衡或许是人工关节松动不断进展的另一重要因素。

#### 参考文献:

- [1] Harris W H. The problem is osteolysis[J]. Clin Orthop, 1995, (311): 46-53.
- [2] Amstutz H C, Campbell P, Kossovsky N. Mechanism and clinical significance of wear debris induced osteolysis[J]. Clin Orthop, 1992, (276): 6-7.
- [3] Jasty M, Smith E. Wear particles in total joint replacements and their role in periprosthetic osteolysis[J]. Curr Opin Rheumatol, 1992, 4(2): 204-9.
- [4] Matthews J B, Green T R, Martin H, et al. Comparison of the response of human peripheral blood mononuclear phagocytes from different donors to challenge with model polyethylene particles of known size and dose[J]. Biomaterials, 2000, 21(20): 2033-44.
- [5] Bi Y, Seabold J M, Kaar S G, et al. Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(11): 2082-91.
- [6] Horowitz S M, Gonzales J B. Effects of polyethylene on macrophages[J]. J Orthop Res, 1997, 15(1): 50-6.
- [7] Kontinen Y T, Xu J W, Waris E, et al. Interleukin-6 in aseptic loosening of total hip replacement prostheses[J]. Clin Exp Rheumatol, 2002, 20(4): 485-90.
- [8] Kitazawa R, Kimble R B, Vannice J L, et al. Interleukin-1 receptor and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice[J]. J Clin Invest, 1994, 94(6): 2397-406.
- [9] de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes[J]. J Exp Med, 1993, (150): 4754.
- [10] Clarke C J P, Hales A, Hunt A, et al. IL-10 mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa activity[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(5): 1719-26.
- [11] Dickensheets H L, Freeman S L, Smith M F, et al. Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes[J]. Blood, 1997, 90(10): 4162-71.
- [12] Hatton A, Nevelos J E, Matthews J B, et al. Effects of clinically relevant alumina ceramic wear particles on TNF $\alpha$  production by human peripheral blood mononuclear phagocytes[J]. Biomaterials, 2003, 24(7): 1193-204.

(编辑 张敏瑞)