

The Study of Particles Joint Replacement Materials Induce Apoptosis of Rabbit Synoviocytes

人工關節材料顆粒引發兔滑液膜細胞凋亡作用之研究

F.M. Chu^{*1}, S.S. Lian¹, Y.J. Sung²

朱峰民^{*1}、連雙喜¹、宋晏仁²

對於磨耗顆粒與巨噬細胞、蝕骨細胞、成骨細胞所造成的影響過去曾被廣泛的討論，關節滑液膜細胞亦為一種可能接觸到磨耗顆粒的細胞，然而，以往對於關節滑液膜細胞的研究卻較少。本論文，將研究人工關節材料磨耗顆粒對於關節滑液膜細胞之作用，所使用材料為直徑 1-2 μm 之金屬鈷及二氧化鈦顆粒，探討其會造成兔關節滑液膜細胞 Hig-82 的細胞凋亡作用與生物效應。結果發現金屬鈷顆粒會造成細胞顯著的凋亡現象，並透過活化 MAPKs (mitogen-activated protein kinases) 的 JNK 造成細胞凋亡，而二氧化鈦並不會對 Hig-82 細胞造成重大的影響。由於關節滑液膜細胞亦為一產生發炎反應的細胞，且人工關節顆粒有可能活化關節滑液膜細胞，造成細胞的凋亡或是其他活化作用之傾向，因此對人工關節成形術的成功與否中亦扮演了很重要的角色。

關鍵詞：生物相容性、磨耗顆粒、金屬鈷顆粒、二氧化鈦、關節滑液膜細胞、細胞凋亡

AMost prior studies have focused on the biological responses of macrophages, osteoblasts and osteoclasts cells that may not be in direct contact with wear particles. Studies on the response of synoviocytes, which are in close contact with wear particles within the joint cavity, are rare.

In this study the effects of wear particles on synoviocytes were examined. Cultured HIG-82 rabbit synoviocytes were employed in the presence of various implant particles, including of 1~2 μm cobalt and titanium dioxide. Pro-apoptotic effect of these particles on HIG-82 cells was studied by biochemical methods. The results showed that metal cobalt particles could induce significant apoptosis and activate JNK (c-jun N-terminal kinase) to induce apoptosis of HIG-82 cell. However, no significant effects of titanium dioxide on the apoptosis of HIG-82 cells were observed.

Since synoviocytes may also serve as inflammatory cells of the joint, it is likely for particulate implant materials to activate synoviocytes and cause apoptosis of these cells. The results of this work supports that biological functions of synoviocytes may be essential to the success of joint replacement surgery.

Keyword: biocompatibility, wear particles, cobalt particles, titanium dioxide particles, synoviocyte, cell apoptosis

本文轉載自 2004 年中國材料科學學會材料年會論文集。

¹Department of Materials Science and Engineering National Taiwan University

²Institute of Anatomy and Cell Biology National Yang Ming University

(¹臺灣大學材料科學與工程學系)

(²陽明大學解剖暨細胞生物學研究所)

1. 前言

生醫材料能夠修補或取代硬組織的功能，然而在體內的環境中，在承受荷重的部位如膝關節，主要會面臨磨耗的問題，在無承受荷重的部位如骨幹則主要面臨腐蝕的問題，因此金屬生醫材料在人體複雜的環境中，如何減少腐蝕造成的金屬離子釋出及磨耗的磨屑所引起的骨質流失及疏鬆，一直是各方致力改進的重點。

磨耗的碎屑會刺激植入物附近的組織，如關節腔，骨髓腔，骨基質等，使得人體內產生急性或慢性發炎，可能造成骨質疏鬆，使人工關節鬆脫，組織附近亦會有不同種類的細胞聚集，如巨噬細胞、骨母細胞、骨蝕細胞等，而滑液膜細胞亦是一種直接接觸磨耗顆粒的細胞。

磨耗顆粒在巨噬細胞和成骨細胞上的生物影響過去已被廣泛討論了，但滑液膜細胞造成人工關節植入失敗所扮演的角色仍需進一步地了解，對於滑液膜細胞凋亡的研究目前仍十分的缺乏。因此，本研究之目的在於探討顆粒性的生醫材料引起滑液膜細胞的死亡或生物效應。本文中將會對於生醫材料顆粒如金屬鈷顆粒、二氧化鈦顆粒與滑液膜細胞交互間之生物效應做一深入的探討。

2. 材料與實驗方法

2.1 測試材料

金屬鈷、二氧化矽(Sigma)其粒徑為1~2 μ m，材料浸入磷酸緩衝液(PBS; phosphate buffered saline)之中，並經高溫高壓滅菌。

2.2 SEM掃描式電子顯微鏡與EDX成份

2.3 細胞培養

Hig-82 是一種兔關節滑液膜細胞株(ATCC)。細胞培養在含 10% 胎牛血清(Biological Industries, Israel)，100 U/ml 青黴素，100 μ g/ml 鏈黴素(Sigma)的F12 培養液(GIBCO-BRL)裡。置於 100 mm 培養皿於攝氏 37 度，5% 之 CO₂ 細

胞培養箱，CO₂，每兩天以 trypsin-EDTA 溶液(Life Technologies)將細胞取下繼代培養一次。

2.4 細胞存活率試驗

採用 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol -2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma)方式來分析細胞存活率。MTT 是一種水溶性 tetrazolium，呈黃色，經過細胞粒腺體酵素的催化作用後，會轉變為藍色且不溶於水的 formazan；此反應速率和存活細胞的數目成正比，因此常被用來定量存活的細胞。

2.5 Acridine Orange

染色細胞型態分析 HIG-82 細胞利用 Acridine orange 染劑能與核酸親和的特性，其會嵌入 DNA 與 RNA 中，在螢光顯微技術下可清楚觀測細胞經處理後整體型態與核內染色質的改變。

2.6 FITC-VAD-FMK 染色偵測凋亡之細胞

FITC-VAD-FMK 可和活化的 caspases 結合以偵測凋亡的細胞。

2.7 Annexin V 偵測細胞凋亡

在細胞凋亡早期時，phosphatidylserine 會由細胞膜內層(inner leaflet)轉移到細胞膜外層(outer leaflet)，而 annexin V 可和 phosphatidylserine 結合以標示凋亡的細胞。

2.8 西方點墨法偵測 JNK 活化

經不同藥物處理後的試件，含蛋白質的上清液定量後，每個標本取含 30 μ g 蛋白質的上清液置於 10% SDS-polyacrylamide 凝膠進行電泳以分離蛋白質，再將分離好的蛋白質轉移至 PVDF 膜，接著將 PVDF 膜浸泡於含 5% 脫脂奶粉之 TBST 一小時，然後將 PVDF 膜與 1:1000 一級抗體(primary antibody)於 4°C 反應過夜，一級抗體為 rabbit anti-human phosphorylated JNK (phospho-JNK) 抗體、rabbit anti-human JNK 抗體。PVDF 膜與一級抗體反應時間結束後以 TBST 清洗，再與二級抗體(採用 goat anti-rabbit 抗體)於室溫下作用 60 分鐘。經

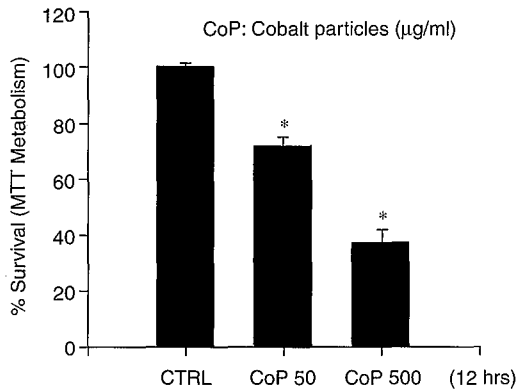


圖1 使用MTT細胞存活率試驗偵測12小時不同金屬鈷顆粒濃度之細胞存活狀況

TBST 再次清洗後，PVDF 膜上的抗原 - 抗體複合體採用化學冷光顯影方式來偵測。

2.9 共軛焦電子顯微鏡

顆粒與滑液膜細胞間之關係可由共軛焦電子顯微鏡(Leica)來觀察。

2.10 統計分析

數據以 ANOVA 分析後，以 Fisher's least significant difference (LSD) test 進行多重比較，並以取 P 值小於 0.05 數據的呈現。結果以 mean \pm S.E.M. (standard error of the mean) 表示，所有資料的統計分析是採用 SAS® 軟體在 Pentium IV 個人電腦下操作。

3. 結果

3.1 金屬鈷顆粒造成滑液膜細胞死亡

在細胞存活率試驗中可以明顯的顯示在 12 小時後當金屬鈷顆粒濃度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度下將會使得滑液膜細胞的存活率下降至 37%，而在濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的情況下其存活率則為 71%。(圖 1)。

3.2 金屬鈷顆粒引起滑液膜細胞凋亡

在 AO 染色下可清楚觀測核內染色質的改變，我們可以發現加入金屬鈷顆粒 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

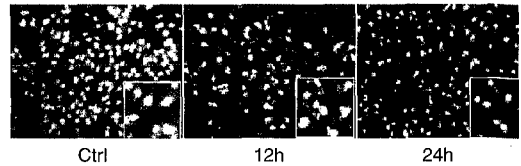


圖2 使用AO染色下觀測金屬鈷顆粒500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度在不同時間下核內染色質的改變詳細情形

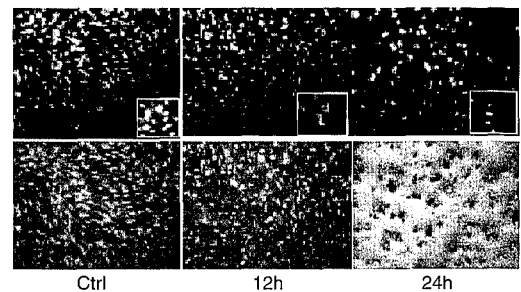


圖3 使用AO染色下觀測金屬鈷顆粒50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度在不同時間下核內染色質的改變詳細情形

與 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度下，在 12 小時後細胞有萎縮的現象，且細胞核的部份有明顯濃縮、崩解(圖 2，圖 3)，此為細胞凋亡的特徵之一。為更進一步確認鈷顆粒引起滑液膜細胞的凋亡，我們使用 FITC-VAD-FMK 染色觀察 Caspase 的活化，其活化在凋亡中扮演了一個重要的角色。我們發現在加入兩種濃度的鈷顆粒在 6 小時後均有 Caspase 的活化，其強度在加入金屬鈷顆粒後隨處理時間而增強(圖 4，圖 5)。另外二氧化鈦顆粒不會使 Caspase 有明顯活化，因此並不會對滑液膜細胞產生明顯的凋亡現象。

3.3 鈷顆粒引起MAPK家族之JNK活化

MAPK 需透過磷酸化，才能將接受的訊號，做出放大及整合的反應使細胞做出適當的反應。所以，西方點墨法和磷酸化的 JNK 抗體來檢驗細胞內的 JNK 是否會受到材料作用而被磷酸化。結果顯示：在金屬鈷顆粒 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下，可看到有 JNK 的活化，在 6 小時的處理時間強度明顯增加，8 小時強度最強(圖 6)。而在 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度下，亦可見 JNK 的活化，因濃

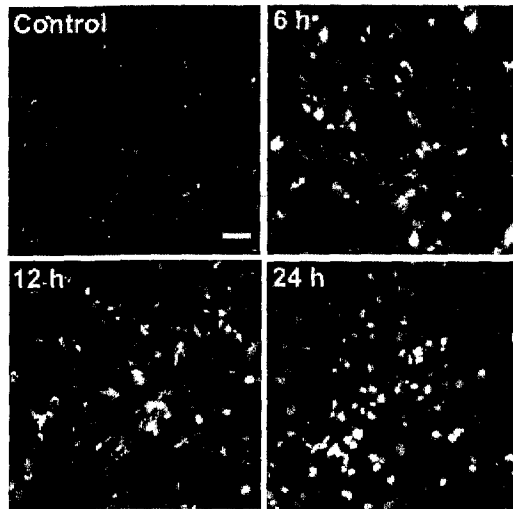


圖4 使用FITC-VAD-FMK染色偵測金屬鈷顆粒500 µg/ml的濃度在不同時間下細胞凋亡的情形

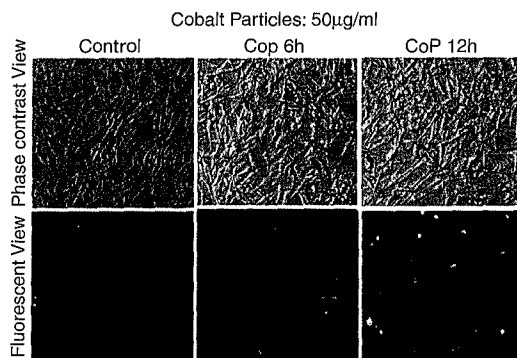


圖5 使用FITC-VAD-FMK染色偵測金屬鈷顆粒50 µg/ml的濃度在不同時間下細胞凋亡的情形

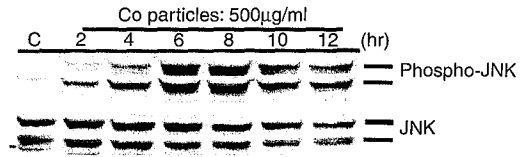


圖6 以西方點墨法來在金屬鈷顆粒500 µg/ml下JNK的活化情形

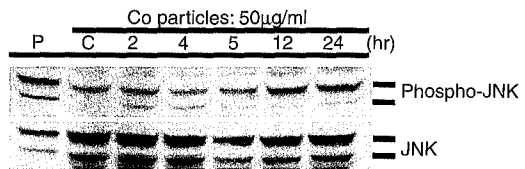


圖7 以西方點墨法來在金屬鈷顆粒50 µg/ml下JNK的活化情形。Positive Control：金屬鈷顆粒500µg/ml下，處理6小時

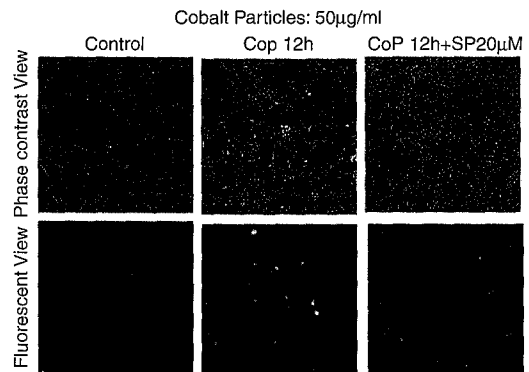


圖8 使用Annexin V偵測金屬鈷顆粒50 µg/ml加入SP600125的JNK抑制劑20µM之細胞凋亡狀況

度的不同在 12 小時後才有明顯的增加(圖 7)。

3.4 JNK路徑在細胞凋亡所扮演的角色

為研究 JNK 在金屬鈷顆粒引起滑液膜細胞凋亡是否扮演重要的角色，實驗先將 JNK 的抑制劑(採用 SP600125)加入的濃度設定在 1-30 µM，此設定是參考文獻中常用的濃度。

接著以西方點墨法來確認 JNK 抑制劑 (SP600125)的抑制能力，我們發現在 JNK 抑制

劑 20 µM 的濃度下，即有明顯的抑制效果，因此選定此濃度做進一步的探討。

使用 Annexin V，其為偵測在細胞膜內層表面的 PS 做為指標。結果顯示在加入 JNK 抑制劑 SP600125 後，Annexin V 的染色強度有明顯的下降(圖 8)。再使用 FITC-VAD-FMK 染色(圖 9A)，亦發現明顯的抑制現象，另外定量分析中分析細胞凋亡的比例，可發現在加了 JNK 抑制劑後，也有顯著的差異(圖 9B)。

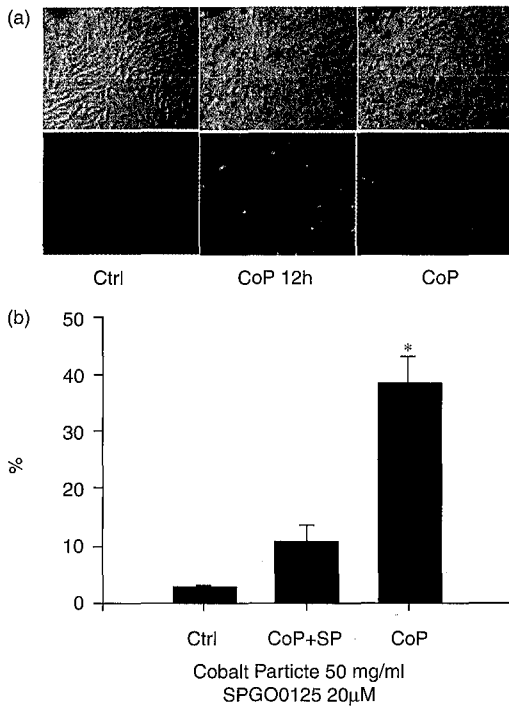


圖9 使用FITC-VAD-FMK 染色偵測金屬鈷顆粒50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加入SP600125 的JNK 抑制劑20 μM 之細胞凋亡狀況(a)以螢光顯微鏡所擷取之影像，(b)使用Scion Image 定量分析分析細胞凋亡的比例

4. 討論

本研究結果中證明在加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的金屬鈷顆粒會使滑液膜細胞死亡，其死亡率會隨著金屬鈷顆粒的濃度增加而提高。關於細胞凋亡我們使用 Annexin V 與 Caspase 染色證實了金屬鈷顆粒會引起滑液膜細胞的凋亡，而二氧化鈦則不會造成明顯的細胞凋亡。實驗中並發現金屬鈷顆粒會導致滑液膜細胞中的 JNK 活化，且當抑制了 JNK 活化後，有明顯降低細胞凋亡的現象，這表示滑液膜細胞的凋亡是會經由 JNK 的途徑所引發。目前對於人工關節材料顆粒的相關研究，較少針對於材料與細胞間凋亡

機制做仔細的探討，而本研究中，我們發現滑液膜細胞接觸了金屬顆粒產生的凋亡現象，會透過 JNK 的路徑造成細胞凋亡，這提供了一個細胞凋亡的路徑，且凋亡可以藉由抑制生物死亡路徑的方式來解決，因此本研究中提供一個新的方向來解決人工關節鬆脫的問題。

誌謝

本論文獲得經費支助，得以順利完成，國科會計劃編號：NSC92-2218-E-002-023。

參考文獻

1. Chang, H.H., Lin, C.H., and Lo, S.J. (1999). Recombinant rhodostomin substrates induce transformation and active calcium oscillation in human platelets. *Exp Cell Res* 250, 387-400.
2. Georgescu, H.I., Mendelow, D., and Evans, C.H. (1988). HIG-82: an established cell line from rabbit periarticular soft tissue, which retains the "activatable" phenotype. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 24, 1015-1022.
3. Ingham, E. and Fisher, J. (2000). Biological reactions to wear debris in total joint replacement. *Proc Inst. Mech. Eng [H.]* 214, 21-37.
4. Lee, D.H., Park, J.C., and Suh, H. (2001). Synergistic induction of cyclooxygenase-II by bacterial lipopolysaccharide in combination with particles of medical device materials in a murine macrophage cell line J774A.1. *J. Biomed. Mater. Res.* 55, 547-553.
5. Mahdi, F., Madar, Z.S., Figueroa, C.D., and Schmaier, A.H. (2002). Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, gC1qR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes. *Blood* 99, 3585-3596.
6. Marti, A. Cobalt-base alloys used in bone surgery. *Injury* 31 Suppl 4:18-21., 18-21 (2000).
7. Migita, K. et al. Regulation of rheumatoid synovocyte proliferation by endogenous p53 induction. *Clin. Exp. Immunol.* 126, 334-338 (2001).
8. Mosta Georgescu, H.I., Mendelow, D., and Evans, C.H. (1988). HIG-82: an established cell line from rabbit periarticular soft tissue, which retains the "activatable" phenotype. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 24, 1015-1022.