

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

人工關節植入物金屬磨損微粒及組織反應物對巨噬細胞之作用

Effects of wear particles and tissue reactive debris from implantation of joint prosthesis on the macrophages

計畫編號：NSC 88-2314-B-002-255

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：劉堂桂 台大醫學院骨科

一、中文摘要

人工關節置換是目前治療嚴重關節疾病的重要手術之一，雖然此種治療改善許多病患的關節功能，使其生活品質大為改善，但是部分病患在接受置換人工關節一段時間之後，可能會發生一些併發症，引起人工關節的鬆脫，不但嚴重損害其關節功能，而且可能會使病患需要再度接受手術，重新置換人工關節，可惜這些病患經一再手術之後，關節功能及骨骼都會逐漸變差，嚴重影響治療成效，因此防範發生人工關節置換後的併發症，已成為骨科醫學的重要課題之一。

在置換人工關節以後，由於體內增加大量的異體材質，在長期使用之後會引起磨損，並且會釋出人工關節材質的一些磨損微粒，進而引起人工關節周圍組織發生局部變化，這些磨損微粒包括金屬磨損物，聚乙烯磨損物以及骨水泥磨損物等，依種類而異，這些可能會引起局部的炎性反應，造成進一步的局部骨骼吸收，使人工關節的固定鬆動，進而引起鬆脫，也可能會影響局部神經及肌肉組織的病變，造成更多的傷害。本研究小組曾經針對人工關節鬆脫病患在接受再度手術時所取出的人工關節周圍之偽膜組織進行組織學檢查及免疫化學染色檢，結果發現這些組織內含有

許多磨損金屬微粒，而且也可證明組織內含有蛋白分解酵素，可說明人工關節所引起的局部組織病變，這些變化也可能會影響局部其他組織的生理功能。由於在臨床上無法取得各種不同組織進行研究分析，因此，本研究的目標乃希望利用植入與人工關節同材質的金屬塊於動物體內的模擬動物模式來進行進一步研究，以深入探討其他組織內的金屬離子分佈情形，並且研究與炎性反應可能有關的因素，探討更多的人工關節植入後的局部生理變化。結果發現利用植入與人工關節同材質的金屬塊(組成為 Ti_6Al_4V)於動物體內的模擬動物模式，我們發現在植入物四周組織(腿部)有發炎現象，而且實驗動物血液中鈦元素含量有明顯增加情形。為進一步瞭解巨噬細胞培養模式，並且利用 NO 釋放及其生成酵素的測量，作為炎性反應的指標，以研究巨噬細胞暴露金屬磨損微粒或金屬元素(主要觀察鈦元素)後所造成的炎性反應。我們發現鈦離子會改變免疫細胞的免疫功能，在鈦離子(0.01-0.06 mM)處理的大鼠肺部巨噬細胞(primary culture cells)會抑制內毒素(lipopolysaccharide, 10 μ M)誘導的 iNOS 基因(mRNA)及蛋白的表現，進而抑制 NO 釋放；雖然在大鼠肺部巨噬細胞，鈦離子本身(0.01-0.06 mM)並無能力誘導 iNOS 的表現，但其在鼠類

巨噬細胞株(cell lines)- RAW264.1 及 J774, 即有能力誘導 iNOS 蛋白的表現。此顯示鈦離子的活體外細胞作用, 似乎具有細胞種類的差異性。

關鍵字: 巨噬細胞; 磨損微粒; 金屬離子; 一氧化氮

Abstract

Regional osteolysis is one major cause of the aseptic loosening in the patients undergoing total joint arthroplasty. Such a complication remains one of the most important complication and the cause of failure in these clinical situations. The fixation of the joint prosthesis may be compromised and caused late loosening. We have investigated the local periprosthetic tissue from the patients with loosened prosthesis. The histological examination showed the presence of metal ion and the polyethylene debris which has been phagocytosed by the macrophages and the giant cells in the local tissue surrounding the joint prosthesis. Furthermore, the immunohistochemistry study demonstrated the presence of proteolytic enzymes in the periprosthetic tissue. The tissue macrophages play an important role of the regional osteolysis surrounding joint prosthesis. Furthermore, nitric oxide is also important in the induction of regional inflammatory reaction. Therefore, we intend to investigate the role of wear particles in the induction of cultured macrophages to express nitric oxide synthase. We also want to assess the effect of coculturing regional reactive tissue surrounding joint prosthesis on the function of macrophages. Such an investigation of basic cellular physiology study may help us understand the regional cellular mechanism of the periprosthetic osteolysis. The results are obtained includes the following items:

1. We will set up the culture system of the murine macrophages and assess their expression of nitric oxide

synthase (NOS). These reaction represent the local inflammatory response. Various kinds of wear particles, including TIAIV and Co-Cr-Mo alloy particles will be used to test the response.

2. In alveolar macrophages, incubation with LPS (10 µg/ml) for 6-24 hours resulted in a significant increase in nitrite production and iNOS mRNA and protein synthesis, that were inhibited by co-incubation with Ti (0.01-0.06 Mm) without cytotoxic effects. However, addition of Ti after induction of NO synthase by LPS failed to affect the nitrite production.

Conclusively, from the findings of this project, it is considered that Ti-induced immunosuppression may be another important factor in the development of implant-associated infection in patients with a prosthesis.

Keywords: Macrophages, Wear particles, NOS, Reactive periprosthetic tissue

二、緣由與目的

由於人工關節置換手術的成功, 使它被廣泛應用於治療嚴重關節疾患, 但是由於人體組織的自然反應, 使得在置換人工關節達一段時間之後, 引起一些併發症, 輕者影響病患的功能, 重者可能使病患感到十分疼痛, 而必須再度施行手術置換人工關節。由於人工關節的材質為合金, 在植入體內後會引起局部組織的排斥反應, 使人工關節表面增生一些纖維組織, 並且可能會釋出分解蛋白質的酵素和細胞動力素, 引起局部骨吸收, 而進一步影響人工關節的固定並引起鬆脫, 造成臨床上的重大問題。[1-9] 無論使用骨水泥固定式或是無骨水泥式人工關節, 都可能會引起人體骨代謝變化。骨水泥, 金屬碎屑, 或是多聚乙炔等都可能造成局部骨骼吸收。本研究小組也曾進行一些研究,

探討無骨水泥式人工關節鬆脫時的局部變化，結果也印證這些事實。臨床研究發現，關節變形病患在接受人工關節置換之後，患肢的肌力雖有改善，但其恢復情形仍有許多限制，許多病患的肌肉萎縮現象及神經系統功能仍有相當程度的限制。這種現象可能與病患長期罹患疾病及長期服藥有關，但是可能也會與植入人工關節後所引發的局部組織反應有關。病患在接受人工關節之後，植入人工關節之後所釋出的磨損微粒除了引起前述的局部骨骼組織發生變化之外，在置換人工關節之後也可能會影響其他組織，例如纖維組織內的巨噬細胞，肌肉組織及神經組織等，以及在遠處的其他組織，並引起不同的變化。[1,4,6] 這些變化可能與一些內源性因素有關，如一些細胞動力素及酵素等。其中氧化氮合成酵素 (Nitric oxide synthase, 簡稱 NOS) 與許多骨骼疾病有關，包括炎性反應時的巨噬細胞活性，關節炎，骨質疏鬆症，敗血病，韌帶癒合過程及人工關節鬆脫等 [10-18]，這些變化可能與造骨細胞或破骨細胞的活性有關。細胞的 NOS 有兩類，一種為本質性 (constitutive NOS; nNOS)，另一種為可誘發性 (inducible NOS; iNOS)。正常身體內有許多細胞皆可被誘發合成 NOS，並進一步合成 NO。本質性的 NOS 只產生少量 NO 且存在短暫時間，而誘發性 NOS 可產生大量 NO 而且會存在較久時間，因此會引起更大的作用。[10,14,16] 許多細胞動力素 (如 IL-1, TNF- α , IFN- γ 等)，細胞內毒素及吞噬作用皆可誘發合成 NOS。[10,17] 研究報告指出，活化的巨噬細胞會有很明顯的 NOS 產生，並會對局部組織產生傷害 [10-16]。但是臨床上有關人工關節植入後的肌肉組織與神經組織和 NOS 的研究很少，而由於骨科臨床上幾乎每日都有許多病患接受人工關節手術，因此探討在人工關節置換手術後的局部代

謝變化是刻不容緩的當務之急，此乃目前的重要課題。本研究重點乃是建立體外巨噬細胞培養模式，並且利用 NO 釋放及其生成酵素的測量，作為炎性反應的指標，可研究巨噬細胞對各種磨損微粒後所造成的炎性反應。另外，利用取得大鼠人工關節四周後的局部組織作共同培養以分析該組織對巨噬細胞釋出 NO 其生成酵素之變化。由此更能明白人工關節手術所引起的變化，以供臨床的研究分析及檢查。經由此研究我們可更明白病患的真正手術後反應，對於整個臨床骨科而言，這是非常珍貴的資料。目前有關此方面的研究報告很少，因此，更顯得本研究的臨床意義十分重大。

三、結果與討論

利用植入與人工關節同材質的金屬塊 (組成為 Ti₆Al₄V) 於動物體內的模擬動物模式，我們發現在植入物四周組織 (腿部) 有發炎現象，而且實驗動物血液中鈦元素含量有明顯增加情形，此與我們先前於臨床病患的相關實驗有一致的變化 [18]，在人工關節鬆脫病患在接受再度手術時所取出的人工關節周圍之偽膜組織進行組織學檢查及免疫化學染色檢，結果發現這些組織內含有許多磨損金屬微粒，且血液中鈦元素含量有明顯增加情形。為進一步瞭解這些變化是否可能與一些內源性因素有關，我們利用體外巨噬細胞培養模式，並且利用 NO 釋放及其生成酵素的測量，作為炎性反應的指標，以研究巨噬細胞暴露金屬磨損微粒或金屬元素 (主要觀察鈦元素) 後所造成的炎性反應。我們發現鈦離子會改變免疫細胞的免疫功能，在鈦離子 (0.01-0.06 mM) 處理的大鼠肺部巨噬細胞 (primary culture cells) 會抑制內毒素 (lipopolysaccharide, 10 μ g/ml) 誘導的 iNOS 基因 (mRNA) 及蛋白的表現，進而抑制 NO 釋放；雖然在大鼠肺部巨噬細胞，鈦離子本身 (0.01-0.06 mM) 並無

能力誘導iNOS的表現，但其在鼠類巨噬細胞株 (cell lines)- RAW264.1 及 J774，即有能力誘導iNOS蛋白的表現。此顯示鈦離子的活體外細胞作用，似乎具有細胞種類的差異性。

四、自評

在本研究計劃中，我們利用體外巨噬細胞培養模式，並且利用NO釋放及其生成酵素的測量，作為炎性反應的指標，可研究巨噬細胞對各種金屬磨損微粒後所造成的炎性反應。另外，利用取得大鼠人工關節四周後的局部組織作共同培養以分析該組織對巨噬細胞釋出NO其生成酵素之變化。

我們得到之具體成果包括：體外巨噬細胞培養模式之建立，以探討其生化學酵素變化以及其他互動關係，並且供以推論人體接受人工關節置換後的相關變化；利用NO及其生成酵素的測量，作為炎性反應的指標，可研究巨噬細胞對各種金屬磨損微粒後所造成的炎性反應；本研究計劃的執行可供培訓有關骨代謝的基礎研究人才，為國內的骨科研究紮根，使骨代謝疾病的研究方法更為廣泛而實用。

五、參考文獻

1. Agins HJ, Alcock NW, Bansal M, et al.: Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. *J Bone Joint Surg* 70A:347-356, 1988.
2. Horowitz SM, Doty SB, Lane JM, and Burstein AH: Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmethacrylate leads to bone resorption. *J Bone Joint Surg* 75A:802-813, 1993.
3. Callaghan JJ: The clinical results and basic science of total hip arthroplasty with porous-coated prostheses. *J Bone Joint Surg* 75A:310, 1993.
4. Horowitz SM, Frondoza CG and Lennox DW: Effects of polymethylmethacrylate exposure upon macrophages. *J Orthop Res* 6:827-832, 1988.
5. Salvati EA, Betts F, Doty SB: Particulate metallic debris in cemented total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 293:160-173, 1993.
6. Santavirta S, Sorsa T, Kontinen YT, et al.: Role of mesenchymal collagenase in the loosening of total hip prosthesis. *Clin Orthop* 290:206-215, 1993.
7. Santavirta S, Hoikka V, Eskola A, et al.: Aggressive granulomatous lesions in cementless total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 72B:980-984, 1990.
8. Tettebaum SL and Kahn, AJ: Mononucleus phagocytes, osteoclasts and bone resorption. *Miner Electro Metab* 3: 2-9, 1980.
9. Anderson RE, Woodbury DM and Jee WSS: Humoral and ionic regulation of osteoclast activity. *Calcif Tissue Int* 39:252-258, 1986.
10. Evans CH, Stefanovic-Racic M, Lancaster J. Nitric oxide and its role in orthopaedic disease. *Clin Orthop* 312:275-294, 1995.
11. Fox SW, Chambers TJ, Chow JW. Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. *Am J Physiol* 270:E955-960, 1996.
12. Sunyer T, Rothe L, Jiang X, et al. Proinflammatory agents, IL-8 and IL-10, upregulate inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in avian osteoclast-like cells. *J Cell Biochem* 60:469-483, 1996.
13. Hukkanen M, Hughes FJ, Buttery LD, et al. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat, and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. *Endocrinology* 136:5445-5453, 1995.
14. Riancho JA, Zarrabeitia MT, Fernandez-Luna JL, et al. Mechanism controlling nitric oxide synthesis in osteoblasts. *Molecular and Cell Endocrinol* 107: 87-92, 1995.
15. Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, et al. Expression of functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 10:439-446, 1995.
16. Brandi ML, Hukkanen M, Umeda T, et al. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc National Acad Sci USA* 92:2954-2958, 1995.
17. Vollmar AM, Schulz R. Atrial natriuretic peptide inhibits nitric oxide synthesis in mouse macrophages. *Life Sci* 56:PL149-155, 1995.
18. Liu TK, Liu SH, Chang CH, Yang RS. Concentration of metal elements in the blood and urine in the patient with cementless total knee arthroplasty. *Tohoku J. Exp. Med.* 185:253-262, 1998.