

· 基础研究 ·

聚甲基丙烯酸甲酯颗粒诱导骨溶解实验研究

蔡燕, 施勤, 赵环, 顾巧丽

(苏州大学附属第一医院骨科, 苏州 215006)

摘要:目的 通过动物模型,探讨聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)诱导骨溶解对破骨细胞和骨溶解的影响,研究 PMMA 颗粒诱导假体周围骨质溶解的机制。方法 选用 8 周龄 BALB/c 小鼠 30 只分为两组,小鼠背部注射无菌空气形成气囊后植入同系小鼠的颅骨,实验组小鼠注入 PMMA 颗粒,对照组注入等量生理盐水,14 d 后处死小鼠,对气囊组织及颅骨进行破骨细胞激活相关基因(RANK/RANKL)及自噬组织形态学检查。结果 实验组抗酒石酸酸性磷酸酶染色(TRAP)阳性的破骨细胞(21.31 ± 6.32)明显高于对照组(7.45 ± 3.23),免疫组织化学结果显示实验组自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、自噬基因(Beclin 1)抗体染色评分等级明显高于对照组。实时定量聚合酶链反应显示实验组 RANK 基因 mRNA 含量(1.35 ± 0.05)较对照组显著性增加(1.18 ± 0.03)($P < 0.05$)。结论 PMMA 诱导的自噬参与了骨溶解的形成。

关键词:聚甲基丙烯酸甲酯类;自噬;酒石酸盐类;染色标记

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.34.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)34-4160-02

Experimental study on polymethylmethacrylate particles induce osteolysis

Cai Yan, Shi Qin, Zhao Huan, Gu Qiaoli

(Department of Orthopaedics, The First Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract: Objective To explore the effects of polymethylmethacrylate(PMMA)-induced autophagy osteoclasts on bone dissolution animal models, and study the mechanism of PMMA particle-induced pyrophosphate osteolysis. **Methods** 30 8-week-old BALB/c mice were randomly divided into two groups, sterile air with back injection on mice to form airbag and homologous skulls were implanted into experimental group mice were injected with PMMA particles, the control group were injected with physiological saline. After 14 d, the mice were killed, osteoclast activation related gene(RANK / RANKL) and autophagy morphological examination of the the airbags tissue and the skull were detect. **Results** The tartrate-resistant enzyme staining(TRAP)-positive osteoclasts(21.31 ± 6.32)s of experiment group is significantly higher than that of the control group(7.45 ± 3.23), immunohistochemistry showed that autophytic protein microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3) and Beclin 1 antibody staining score level in experimental group was significantly higher than that of control group. RT-PCR showed that the RANK mRNA level(1.35 ± 0.05) of experimental group was significantly increased($P < 0.05$). **Conclusion** The autophagy induce by PMMA is involved in the formation of osteolysis.

Key words: methylmethacrylates; autophagy; tartrates; staining and labeling

人工关节置换术是骨科领域的革命性进步之一,目前,全球每年大约有上百万例的关节假体植入,人工关节置换已经成为治疗许多关节疾病的有效手段,通过关节置换,可明显减轻患者的疼痛,提高患者的活动能力及生活质量^[1],但随着关节置换时间的延长,晚期假体松动的问题逐渐增多^[2],而磨损颗粒诱导的破骨细胞性骨性溶解是假体松动的最重要因素^[3],聚甲基丙烯酸甲酯是人工关节置换术中固定和支撑的常用骨水泥材料^[4],其磨损颗粒作用下的破骨细胞活化、骨溶解增加已经得到证实^[5]。但其确切机制尚不清楚。本研究探讨聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)诱导的自噬对破骨细胞功能和骨溶解的影响,为阐明骨溶解机制提供新的思路。

1 材料与与方法

1.1 动物模型 取 8 周龄 BALB/c 小鼠 30 只(实验动物中心提供)分为实验组和对照组,每组 15 只,所有小鼠腹腔麻醉后,无菌条件下在小鼠背部注射无菌空气 5 mL 形成气囊,植入同系小鼠的颅骨,实验组在气囊注入 30 g/L PMMA 颗粒的 α -

MEM 培养液 100 μ L,对照组注射等量生理盐水。建立骨吸收动物模型,2 周后脱颈处死小鼠,采集颅骨及周围组织标本,10% 中性甲醛固定 3 d,脱钙 48 h 后石蜡包埋,做组织切片。同时取周围组织做免疫组织化学染色检测自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、自噬基因 Beclin 1 抗体,并进行实时定量 PCR 检测两组的 RANK(核因子 κ B 受体活化因子)基因 mRNA 含量。

1.2 TRAP 染色 石蜡切片常规脱蜡至水,切片,滴加 TRAP 染色试剂 37 $^{\circ}$ C 孵化箱放置 1 h,光镜下观察,临近骨组织的区域染色呈红色阳性为破骨细胞。

1.3 免疫组织化学染色 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)法,石蜡切片常规脱蜡至水后以胰酶进行抗原修复,依次滴加过氧化物酶阻断液、10% 非免疫动物血清、第一抗体、生物素标记的第二抗体、S-A/HRP 溶液、DAB 显色、苏木精复染、脱水透明、中性树脂封片。用磷酸盐缓冲液(PBS)代替第一抗体作阴性对照。结果的观察采用盲法由两位病理科医师分开判断,细胞质内有棕黄色颗粒为

阳性细胞,随机观察 10 个高倍视野,根据其中的阳性细胞比例进行评分。(1)染色深度评分:无染色 0 分,淡黄色 1 分,黄色至棕黄色为 3 分,2 分为染色强度介于 1 分与 3 分之间。(2)阳性细胞的比率评分:阳性细胞数占总细胞数小于 10% 为 0 分,10%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,>50% 为 3 分。(3)总分=阳性细胞比率评分+染色强度评分:0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为中强阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。

1.4 实时定量 PCR 实时荧光定量 PCR 测骨中 RANKL mRNA 表达 取出颅骨后加 1 mL 总 RNA 抽提试剂 Trizol 后置于研磨器中研磨 5 min,加氯仿沉淀后离心取上清液。用等体积异丙醇沉淀,离心去除上清液,75% 乙醇洗涤后风干,然后用焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理水溶解。取总 RNA 500 ng,随机引物 1 μL,加焦碳酸二乙酯处理水补至 12 μL,70 °C 水浴 5 min,加入反应缓冲液等,然后加反转录酶 1 μL,配制 20 μL 反应液。cDNA 第 1 链合成,-70 °C 保存。采用 Primer premier 5.0 设计引物,选 25 μL 反应体系,采用 Real time PCR 仪,用三步法进行 PCR 反应。通过 ABI prism 7500 SDS 软件对各组目的基因作相对定量分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。等级资料采用 Spearman 秩和检验相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组在不同浓度的 PMMA 颗粒诱导下破骨细胞数目比较 实验组的破骨细胞数目评分为(21.31±6.32)分,显著高于对照组的(7.45±3.23)分,差异有统计学意义($t = 7.563, P < 0.05$)。

2.2 两组的免疫组织化学染色结果分析 LC3 和 Beclin1 在实验组中的表达明显高于对照组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组的免疫组织化学染色结果分析 (n)

组别	LC3					总阳性数	Beclin1					总阳性数
	-	+	++	+++	++++		-	+	++	+++	++++	
实验组	0	3	4	8	15 ^{ab}	0	2	4	9	15 ^{ab}		
对照组	11	3	1	0	4 ^b	9	4	1	1	6 ^b		

a: $P < 0.05$,与对照组比较; b: $P < 0.05$,与“-”比较。

2.3 两组的 RANKL mRNA 的表达水平差异比较 实验组的 RANKL mRNA 的相对量为(1.35±0.05),显著高于对照组的(1.18±0.03),差异有统计学意义($t = 11.291, P < 0.05$)。

3 讨 论

20 世纪 60 年代, Yang 等^[6]将骨水泥应用到医学领域,从此 PMMA 就应用为固定关节置换术的内植入物。广泛用于人工关节假体的固定和脊柱椎体的支撑,通常骨水泥有两种使用形式,即液态单体与粉末状聚合物^[7-9]。液态单体是装在密闭的玻璃容器中的甲基丙烯酸盐,而粉末聚合物是由 PMMA (或混合共聚物)的有机预聚物颗粒组成。临床上应用时,通常要在粉末中加入不透 X 线的颗粒,使骨水泥可以在 X 线片上显影^[10-11]。PMMA 磨损颗粒作用下的破骨细胞活化、骨溶解增加已经得到证实。本实验所使用的 PMMA 颗粒是粉末状的聚合物,通过研究 PMMA 颗粒诱导自噬对破骨细胞功能和

骨溶解的影响,为阐明骨溶解机制提供新的思路。

试验结果显示:实验组 TRAP 阳性的破骨细胞明显高于对照组,免疫组织化学显示 LC3、Beclin 1 抗体染色评分等级实验组明显高于对照组,并且实验组 RANK 基因 mRNA 含量较对照组显著性增加($P < 0.05$)。

研究表明,磨损颗粒刺激假体周围膜形成并影响假体周围细胞的细胞因子表达,其刺激作用的强度与颗粒的大小和浓度有关^[12-13]。颗粒刺激巨噬细胞、成纤维细胞和成骨细胞表达 RANKL。另一方面,巨噬细胞是力学敏感细胞,培养中,循环压力使巨噬细胞释放溶骨性细胞因子增加,细胞因子通过正向调节基质细胞表达 RANKL 和巨噬细胞集落刺激因子并增强破骨细胞前体细胞对 RANKL 的反应性促进破骨细胞分化^[14-15]。

综上所述,本实验结果表明,在体内条件下,PMMA 诱导的自噬参与了骨溶解的形成。磨损颗粒诱导假体周围骨溶解,从而导致人工假体松动,继而影响人工假体使用寿命。提示通过减少磨损颗粒的产生以及抑制磨损颗粒刺激细胞分泌细胞因子可以达到预防人工假体松动的目的。

参考文献:

[1] 刘建华,徐栋梁.人工关节固定方法的研究进展[J].中华关节外科杂志,2011,5(1):59-63.
 [2] 尤田,查振刚.人工髋关节置换术后假体无菌性松动的机制及预防的研究现状[J].中国矫形外科杂志,2011,24(19):2061-2064.
 [3] Roukis TS, Prissel MA. Management of extensive talar osteolysis with agility™ total ankle replacement systems using geometric metal-reinforced polymethylmethacrylate cement augmentation [J]. J Foot Ankle Surg, 2013, 8(13):304-309.
 [4] 王艳红,顾汉卿.医用粘合剂的发展及临床应用进展[J].透析与人工器官,2008,19(3):23-32.
 [5] 方庆,朱庆生,张大伟,等.聚甲基丙烯酸甲酯颗粒诱导假体周围骨溶解的实验研究[J].科学技术与工程,2008,7(23):6025-6030.
 [6] Yang SY, Zhang K, Bai L, et al. Polymethylmethacrylate and titanium alloy particles activate peripheral monocytes during periprosthetic inflammation and osteolysis [J]. J Orthop Res, 2011, 29(5):781-786.
 [7] Ierardi AM, Mangini M, Vaghi M, et al. Occlusion of an intraosseous arteriovenous malformation with percutaneous injection of polymethylmethacrylate [J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2011, 34(2):150-153.
 [8] Nich C, Rao AJ, Valladares RD, et al. Role of direct estrogen receptor signaling in wear particle-induced osteolysis [J]. Biomaterials, 2013, 34(3):641-650.
 [9] 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.

糖处理后,足细胞中 Cdk5 蛋白表达水平显著增高,并且呈时间依赖性。这表明 Cdk5 蛋白的高表达不受渗透压的影响,而是高糖刺激的结果。继而本研究应用 RNA 干扰技术,将 Cdk5 miRNA 干扰质粒成功转染至足细胞中抑制 Cdk5 基因的表达,FMC 和 TUNEL 检测结果显示,给予高糖刺激后,Cdk5 miRNA 干扰质粒组足细胞凋亡率显著低于单纯高糖刺激组和阴性质粒对照组,说明高糖刺激引起的 Cdk5 表达增高可能与足细胞凋亡有关。

Bcl-2 蛋白家族在细胞凋亡中发挥重要作用,是线粒体凋亡途径的中心^[13]。此家族中主要包含两类蛋白:促凋亡蛋白(Bax 等);抗凋亡蛋白(Bcl-2 等)。本研究选择 Bcl-2 和 Bax 作为代表观察抑制 Cdk5 蛋白表达对高糖诱导足细胞凋亡的影响。结果显示,与 HG 组和 HG+S 组相比,HG+C 组 Bax 蛋白表达降低,而 Bcl-2 表达增高,Bax/Bcl-2 比率显著降低。cleaved caspase-3 蛋白表达水平在 HG+C 组也明显低于 HG 组和 HG+S 组,说明 Cdk5 可能是通过线粒体途径参与了高糖诱导的足细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Chittiprol S, Chen P, Petrovic-Djergovic D, et al. Marker expression, behaviors, and responses vary in different lines of conditionally immortalized cultured podocytes [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(3): F660-671.
- [2] Diez-Sampedro A, Lenz O, Fornoni A. Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder [J]. *Am J Kidney Dis*, 2011, 58(4): 637-646.
- [3] Pyram R, Kansara A, Banerji MA, et al. Chronic kidney disease and diabetes [J]. *Maturitas*, 2012, 71(2): 94-103.
- [4] Stitt-Cavanagh E, MacLeod L, Kennedy C. The podocyte in diabetic kidney disease [J]. *Scientific World Journal*, 2009(9): 1127-1139.

- [5] Weil EJ, Lemley KV, Mason CC, et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2012, 82(9): 1010-1017.
- [6] Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases [J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(3): 169-175.
- [7] Barnett DG, Bibb JA. The role of Cdk5 in cognition and neuropsychiatric and neurological pathology [J]. *Brain Res Bull*, 2011, 85(1/2): 9-13.
- [8] Lalioi V, Pulido D, Sandoval IV. Cdk5, the multifunctional surveyor [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(2): 284-311.
- [9] López-Tobón A, Castro-Álvarez JF, Piedrahita D, et al. Silencing of CDK5 as potential therapy for Alzheimer's disease [J]. *Rev Neurosci*, 2011, 22(2): 143-152.
- [10] Zhu J, Li W, Mao Z. Cdk5: mediator of neuronal development, death and the response to DNA damage [J]. *Mech Ageing Dev*, 2011, 132(8-9): 389-394.
- [11] Griffin SV, Hiromura K, Pippin J, et al. Cyclin-dependent kinase 5 is a regulator of podocyte differentiation, proliferation, and morphology [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(4): 1175-1185.
- [12] Liu W, Zhang Y, Liu S, et al. The expression of intermediate filament protein nestin and its association with cyclin-dependent kinase 5 in the glomeruli of rats with diabetic nephropathy [J]. *Am J Med Sci*, 2013, 345(6): 470-477.
- [13] García-Sáez AJ. The secrets of the Bcl-2 family [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(11): 1733-1740.

(收稿日期: 2013-08-04 修回日期: 2013-09-03)

(上接第 4161 页)

- [10] Trumm CG, Jakobs TF, Stahl R, et al. CT fluoroscopy-guided vertebral augmentation with a radiofrequency-induced, high-viscosity bone cement (StabiliT ()): technical results and polymethylmethacrylate leakages in 25 patients [J]. *Skeletal Radiol*, 2013, 42(1): 113-120.
- [11] Alhawagri M, Yamanaka Y, Ballard D, et al. Lysine392, a K63-linked ubiquitination site in NEMO, mediates inflammatory osteoclastogenesis and osteolysis [J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(4): 554-560.
- [12] Lochner K, Fritsche A, Jonitz A, et al. The potential role of human osteoblasts for periprosthetic osteolysis following exposure to wear particles [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28(6): 1055-1063.

- [13] Yamanaka Y, Karuppaiah K, Abu-Amer Y, et al. Polyubiquitination events mediate polymethylmethacrylate (PMMA) particle activation of NF-kappaB pathway [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 23735-23741.
- [14] Fang Q, Wang H, Zhu S, et al. N-acetyl-L-cysteine inhibits wear particle-induced prosthesis loosening [J]. *J Surg Res*, 2011, 168(2): 163-172.
- [15] 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.

(收稿日期: 2013-09-10 修回日期: 2013-10-30)