

MMP-1、MMP-9 mRNA 在创伤性骨关节炎软骨中的表达

周辉 董刚 夏志敏 诸力 彭亮

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)02-0096-04

摘要:目的 研究兔前交叉韧带横断术(ACLT)创伤性骨关节炎(OA)动态模型软骨中MMP-1、MMP-9 mRNA的表达,探讨MMP-1、MMP-9在OA软骨退变中的作用。方法 30只新西兰兔随机分为对照组(10只)、ACLT组(20只),ACLT组行右膝ACLT,对照组行关节囊切开缝合术,ACLT组于术后4、8 w各处死10只,对照组术后4 w处死。解剖显微镜观察股骨内髌软骨形态学变化,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测股骨内髌软骨MMP-1、MMP-9 mRNA的表达。结果 形态学示ACLT组软骨退变重于对照组($P < 0.05$),且ACLT 8 w组重于4 w组($P < 0.05$);RT-PCR示ACLT组MMP-1、MMP-9 mRNA表达量均高于对照组($P < 0.01$),且ACLT 8 w组均高于4 w组($P < 0.01$)。结论 创伤性OA软骨退变过程中伴随着MMP-1、MMP-9 mRNA表达的上调,软骨中MMP-1、MMP-9 mRNA的表达一定程度上反映了OA软骨的退变程度。

关键词: 骨关节炎; 软骨; 金属蛋白酶-1; 金属蛋白酶-9

The mRNA expression of MMP-1 and MMP-9 in the cartilage of rabbits with traumatic osteoarthritis

ZHOU Hui, DONG Gang, XIA Zhimin, et al. Department of Orthopaedic, Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China

Abstract: **Objective** To observe the mRNA expression of matrix metalloproteinase-1, -9 (MMP-1, MMP-9) in cartilage of traumatic osteoarthritis (OA) in anterior cruciate ligament transaction (ACLT) of rabbit model and to explore the effects of MMP-1 and MMP-9 in Cartilage degeneration of OA. **Methods** Traumatic OA was induced in 20 rabbits by ACLT of right knee and 10 rabbits killed 4 and 8 weeks respectively after the operation. Other 10 rabbits received right knee arthrotomy as pseudo operative controls and were killed 8 weeks after operation. Cartilaginous changes of the medial femoral condyles were grossly checked and OA severity observed under dissecting microscope. The mRNA expression of MMP-1 and MMP-9 in cartilage of the medial femoral condyles was assessed by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **Results** Cartilage degeneration in ACLT group was significantly severer than that in control group ($P < 0.05$). Cartilage degeneration in 8-week group was also severer than that in 4-week group ($P < 0.05$). The expression of MMP-1 and MMP-9 mRNA in ACLT group was significantly higher than those in control group ($P < 0.01$). The mRNA expression of MMP-1 and MMP-9 in 8-week group was also higher than those in 4-week group ($P < 0.01$). **Conclusions** The expression of MMP-1 and MMP-9 mRNA was up-regulation in cartilage of traumatic OA model. To some extent the mRNA expression of MMP-1 and MMP-9 can be as an evaluation index for the degree of Cartilage degeneration in traumatic OA.

Key words: Osteoarthritis; Cartilage; Interstitial collagenase; Gelatinase B

骨关节炎(OA)是以关节软骨丢失伴关节周围新骨形成及骨反应为特点的一种滑膜关节病,其病因复杂,发病率高,但确切的发病机制至今仍不明确。近年的研究发现OA关节软骨细胞蛋白酶合成

增加,蛋白酶抑制物合成减少,从而造成软骨细胞外基质合成与降解失衡是造成软骨变性的重要原因之一。金属蛋白酶(MMPs)因能降解几乎所有的软骨基质而被认为在OA发病过程中起重要作用,是降解细胞外基质的主要酶系。本实验旨在探讨创伤性OA软骨中MMP-1、MMP-9 mRNA表达,揭示MMP-1、MMP-9在OA软骨退变中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录酶 Rtase ,dNTP ,RNA 酶抑制剂 ,Taq 酶 随机寡核苷酸引物(日本 TaKaRa 公司);PCR Marker(美国 Fermentas 公司);FFG02HSD PCR 仪(英国 Techne 公司),凝胶成像分析系统(法国 Vilber Lourmat 公司)。

1.2 动物分组与处理

30 只健康 6 月龄纯种雌性新西兰大白兔由浙江中医药大学实验动物中心提供,体重 2.4 ~ 2.8 kg 随机分为对照组(10 只)、ACLT 组(20 只)。3% 戊巴比妥钠麻醉,ACLT 组行右膝 ACLT,并行抽屉实验确认,对照组行关节囊切开缝合术,不破坏囊内组织。术后 4 d 肌注青霉素 40 万 U/(kg·d)预防感染,白兔不作固定,分笼饲养。ACLT 组于术后 4、8 w 各处死 10 只,对照组术后 4 w 处死。

1.3 形态学观察

观察膝关节有无关节积液、滑膜肿胀,并于解剖显微镜(10 倍)下观察股骨内髁软骨退变情况,按以下标准评分^[1] 0 分,关节面光整,色泽如常;1 分,关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗;2 分,关节面糜烂,软骨缺损达软骨表中层;3 分,关节面溃疡形成,缺损达软骨深层;4 分,软骨剥脱,软骨下骨质暴露。

1.4 RT-PCR

①各基因的引物序列、片段长度见表 1,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。②总 RNA 提取:取股骨内髁退变区软骨组织置于 1 mL Trizol 液中匀浆,参照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,以紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 比值 ≥ 1.8 控制总 RNA 纯度。③mRNA 逆转录产生 cDNA 第一链:采用 20 μ L 逆转录反应体系,依次加入 5 $\times$ M-MLV 逆转录酶缓冲液 5 μ L,M-MLV 逆转录酶 1 μ L,10 mmol/L dNTP 1.25 μ L,RNase 抑制剂 1.6 μ L,Oligdt (50 pM)2 μ L,DEPC 去离子水补至 20 μ L,充分混均后 42℃反应 60 min,95℃灭活逆转录酶 5 min。冰浴 10 min 完成 cDNA 链合成。④PCR 扩增:反应体系为 50 μ L,包含 cDNA 10 μ L,10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L,10 mmol/L dNTP 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,TaqDNA 聚合酶 2 U。扩增条件:94℃预变性 5 min 后,94℃变性 30 s,55.5℃退火 50 s,72℃延伸 1 min,反应 30 个循环,最后一轮 72℃延伸 5 min,4℃保存。扩增产物取 18 μ L 目的基因在 1.5% 琼脂糖(含 EB 0.5 ng/mL)上电泳,紫外灯下观察结果并照相,吸光度扫描仪扫描

后 PCR 条带用软件进行定量分析,结果为基因表达量对 β -actin 内参的比值,以上结果重复 3 次,取平均值。

表 1 MMP-1、MMP-9、 β -actin 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	目的基因片段长度
MMP-1	上游 TCTTCAAATGCTTACCAA	205 bp
	下游 CATGCCACATCCTGTAC	
MMP-9	上游 AACAGGGCTTGGCTTTGG	146 bp
	下游 CGTACTGGTGAGCGATTTGG	
β -actin	上游 ATGCCATCCTGCGTCTG	416 bp
	下游 ACTCCTGCTTGTGATCCACAT	

1.5 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 软件包进行统计处理,形态学评分采用秩和检验,mRNA 表达比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 形态学观察

对照组无明显关节积液、滑膜肿胀等滑膜炎表现,大部分样本关节面光整,色泽如常。ACLT 组多数样本可见滑膜炎表现,软骨退变主要位于股骨内髁内侧,ACLT 4 w 组关节面色泽灰暗,软骨膜、软骨出现糜烂缺损,ACLT 8 w 组软骨膜、软骨出现糜烂缺损,有溃疡形成,甚至可见软骨下骨。各组形态学评分见表 2,提示 ACLT 组软骨退变重于对照组($P < 0.05$),且 ACLT 8 w 组重于 4 w 组($P < 0.05$)。

表 2 形态学评分

组别	样本数	评分				
		0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
对照组	10	8	2	0	0	0
ACLT 4 w 组	10	0	3	5	2	0
ACLT 8 w 组	10	0	1	2	6	1

注:以上 3 组之间两两比较均 $P < 0.05$

2.2 软骨 MMP-1、MMP-9 mRNA 的表达

MMP-1、MMP-9、 β -actin 的 RT-PCR 产物电泳结果见图 1,各组 MMP-1、MMP-9 mRNA 表达量(相对于 β -actin 内参的比值)见表 3,ACLT 组 MMP-1、MMP-9 mRNA 表达量均高于对照组($P < 0.01$),且 ACLT 8 w 组均高于 4 w 组($P < 0.01$)。

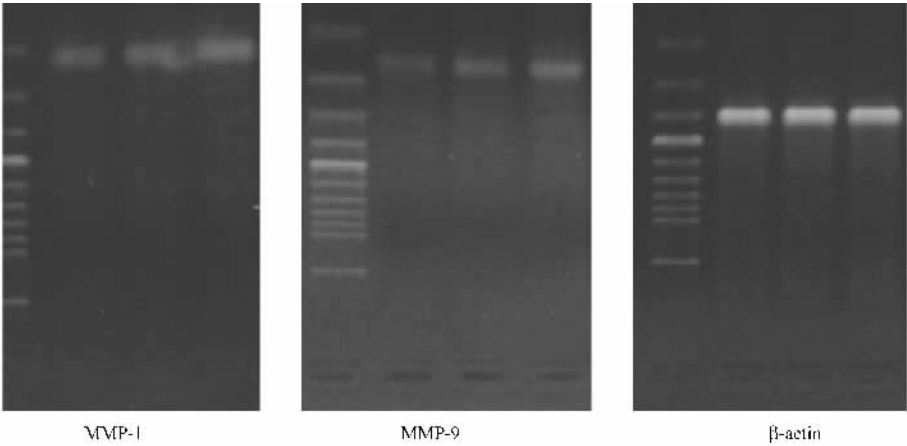


图 1 MMP-1、MMP-9、β-actin 电泳图
左→右 :Marker、对照组、ACLT 4 w 组、ACLT 8 w 组

表 3 MMP-1、MMP-9 mRNA 表达量

组别	MMP-1 mRNA	MMP-9 mRNA
对照组	0.06 ± 0.05	0.04 ± 0.03
ACLT 4 w 组	0.31 ± 0.12	0.26 ± 0.13
ACLT 8 w 组	0.60 ± 0.17	0.54 ± 0.16

注 :以上 3 组 MMP-1 mRNA 之间两两比较均 $P < 0.01$,MMP-9 mRNA 之间两两比较均 $P < 0.01$

3 讨论

大量的创伤性疾患常常因伤及关节、术后关节制动等原因诱发创伤性 OA ,它所带来的疼痛、关节功能障碍 ,严重影响了人的生活质量。生理条件下 ,软骨成分的降解与合成之间保持动态平衡 ,OA 时关节软骨中多种 MMPs 的表达明显上调 ,且越来越多的研究显示 MMP-1、MMP-9 在 OA 软骨退变中具有重要作用。

3.1 MMP-1、MMP-9 在 OA 软骨降解过程中表达上调的理论依据

OA 软骨降解过程中 ,IL-1β、TNF-α 等多种前炎症细胞因子被激活 ,它们通过不同的受体、信号转导途径 ,最终将生物化学信号传递给 AP-1、NF-κB 等转录因子^[2,3] ,可以说 AP-1、NF-κB 是介导 OA 软骨内环境中各种前炎症细胞因子调控下游靶基因表达的最重要转录因子 ,Burrage 等^[4]认为 MMP-1、MMP-9 的基因启动子区域包含典型的 AP-1 和 NF-κB 结合位点 ,这为 MMP-1、MMP-9 在 OA 软骨退变中的高表达提供了理论基础 ,而我们的实验显示在 OA 软骨退变中 ,MMP-1、MMP-9 mRNA 的表达明显上调 ,为 MMP-1、MMP-9 在 OA 软骨退变中的高表达提供了实验依据。

3.2 MMP-1 在 OA 软骨中的表达及对软骨代谢影响

MMP-1 是 OA 发病机制中极其重要的胶原酶 ,其作用底物主要是 I、II、III 型胶原和蛋白多糖 ,II 型胶原含有一个由 3 个相同的 α 链构成的长三股螺旋结构 ,其上有 MMPs 裂解位点 ,MMP-1 约于离氨基酸末端 3/4 距离的特殊部位裂解 II 胶原。MMP-1 是 OA 软骨中表达水平最高的胶原酶 ,这样在对 II 型胶原的降解中 MMP-1 表达量上的绝对优势弥补了其相对于其他胶原酶的低效率 ,使 MMP-1 在启动 OA 软骨基质 II 型胶原降解 ,影响 II 型胶原降解速率的方面起到了主导性作用^[5]。有研究表明 MMP-1 在 OA 软骨的浅层表达占优势 ,而表层正是 OA 最早发病的部位^[1] ,其原因可能与 MMP-1 是滑膜细胞、嗜中性粒细胞的最初产物有关。本研究显示 MMP-1 mRNA 无论在正常软骨还是在退变软骨中均有表达 ,退变软骨中 MMP-1 mRNA 表达明显增加 ,且随着 OA 软骨退变程度的加重 ,软骨中 MMP-1 mRNA 的表达稳定性增加。

3.3 MMP-9 在 OA 软骨中的表达及对软骨代谢影响

MMP-9 是明胶酶中的一个重要元素 ,它能够将胶原酶变性裂解的 II 型胶原进一步裂解 ,并对 IV、V、VII、IX、XI 型胶原、弹性蛋白、明胶等小分子细胞外基质成分有降解作用。Soder 等^[6]的研究证实正常关节软骨中仅有少量软骨细胞表达 MMP-9 ,然而在 OA 软骨中大部分的软骨细胞表达 MMP-9 ,MMP-9 mRNA 主要在 OA 软骨退变部位的深层表达 ,并且在 OA 早期表达增高明显。而 Mohtai 等在 OA 关节软 (下转第 95 页)

(上接第 98 页)

骨纤维化严重的区域发现仅有 MMP-9 mRNA 的高表达,提示 MMP-9 可能是 OA 关节软骨进行性破坏的标志物之一。而我们的研究显示随着 OA 软骨退变的进展,软骨中 MMP-9 mRNA 的表达稳定性增加。

我们的研究显示软骨中 MMP-1、MMP-9 mRNA 的表达与 OA 软骨的退变密切相关,且随着 OA 软骨退变程度的加重,MMP-1、MMP-9 mRNA 表达明显增加,OA 软骨中 MMP-1、MMP-9 mRNA 的表达一定程度上反映了 OA 软骨的退变程度,可以作为评价 OA 软骨退变进程的一个客观指标。

【参 考 文 献】

[1] 吴宏斌,杜靖远,郑启新,等. 基质金属蛋白酶-1 在创伤性骨关节炎软骨及滑膜中的表达. 中华创伤杂志,2003,19(1): 42-46.

- [2] Chiu YC, Yang RS, Hsieh KH, et al. Stromal cell-derived factor-1 induces matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. Mol Pharmacol, 2007, 72(3): 695-703.
- [3] Lianxu C, Hongti J, Changlong Y. NF-kappa Bp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(4): 367-376.
- [4] Peter S. Burrage, Kimberlee S. Mix, Constance E. Brinckerhoff. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. Front Biosci, 2006, 11: 529-543.
- [5] Elliott S, Hays E, Mayor M, et al. The triterpenoid CDDO inhibits expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-13 and Bcl-3 in primary human chondrocytes. Arthritis Res Ther, 2003, 5(5): R285-R291.
- [6] Soder S, Roach HI, Oehler S, et al. MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage. Clin Exp Rheumatol, 2006, 24(3): 302-304.

(收稿日期:2008-09-20)