

• 论著 •

MMP8 在 小 鼠 长 骨 发 育 中 基 因 表 达 的 探 讨

王英民 王强 石磊 张华伟

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108 (2010) 11-0817-03

摘要: 目的 通过测定 MMP8 在 小 鼠 长 骨 发 育 阶 段 的 基 因 表 达, 并 与 MMP13 的 基 因 表 达 相 比 较, 进 一 步 探 讨 MMP8 在 长 骨 发 育 中 的 作 用。方 法 应 用 原 位 杂 交 技 术, 在 小 鼠 胚 胎 发 育 阶 段 及 出 生 时 的 长 骨 组 织 切 片 中, 用 同 位 素 标 记 探 针 显 示 MMP8 及 MMP13 的 基 因 表 达。结 果 在 小 鼠 胚 胎 15.5 天, MMP8 的 基 因 表 达 很 微 弱, 出 生 第 一 天, MMP8 在 长 骨 骨 干 中 可 以 看 到 明 显 的 基 因 表 达, 但 MMP13 在 15.5 天 及 出 生 时 均 可 看 到 有 很 强 的 基 因 表 达。结 论 同 是 胶 原 酶, MMP8 在 骨 的 发 育 中 基 因 表 达 时 段 和 强 度 不 同 于 MMP13, 可 能 在 基 质 的 降 解 及 骨 的 发 育 中 起 到 不 同 的 作 用。

关键词: MMP8; MMP13; 小鼠; 骨发育

Investigation of MMP8 gene expression during the long bone development in mice WANG Yingmin, WANG Qiang, SHI Lei, et al. Department of Orthopaedics, Beijing Hospital, Beijing 100730, China
Corresponding author: WANG Yingming, Email: friend4343@sina.com.cn

Abstract: Objective To investigate the function of the MMP8 gene in the long bone development by measuring MMP8 gene expression during mouse long bone development, and by comparison with MMP13 gene expression. **Methods** Using in situ hybridization technique, MMP8 and MMP13 gene were labelled with isotope probes in long bone tissue sections of embryo and new born mice. **Result** The MMP8 gene expression was weak in E15.5 days of mouse embryo. However, the MMP8 gene expression in long bones were obvious in new born mice. MMP13 gene expressions were strong both in embryo and in new born mice. **Conclusion** Both as collagenase, the gene expression stage and intensity of MMP8 were different from MMP13. MMP8 may have different functions in matrix degradation and bone development.

Key words: MMP8; MMP13; Mice; Bone development

骨和软骨的细胞外基质由胶原构成,例如骨中的 I 型胶原,软骨中的 II 型胶原。在骨和软骨的发育中,成骨细胞和软骨细胞合成胶原和其他细胞外基质^[1]。在胚胎发育中,骨和软骨的细胞外基质要发生降解和转换^[2]。基质金属蛋白酶(MMP)在细胞外基质的降解中起到非常重要的作用。只有基质金属蛋白酶中的胶原酶可以降解 I 型,II 型,III 型中的原始的胶原分子^[3]。人的胶原酶包括 MMP1, MMP8, MMP13。但在小鼠中目前只发现 MMP8 和 MMP13^[3]。起初研究表明,在骨及软骨发育中仅有 MMP13 参与了细胞外基质的降解^[4],近来研究认为,MMP8 不仅由中性粒细胞分泌,而且,软骨细胞,纤维母细胞,内皮细胞均有合成。并且 MMP8 对 I 型胶原和 II 型胶原的降解有很强作用^[5]。Sasano

等发现在大鼠骨与软骨的胚胎发育过程中,MMP8 有很强基因表达,证实 MMP8 参与了大鼠长骨胚胎发育中细胞外基质的降解,在长骨的胚胎发育中起到重要的作用^[6]。但在小鼠胚胎骨发育中 MMP8 的基因表达尚未见到类似报道,本文用原位杂交的方法,测定 MMP8 在小鼠长骨胚胎发育中的基因表达,并与 MMP13 相比较,以探讨 MMP8 在小鼠骨胚胎发育中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

取孕期 15.5 天(C57BL/6, Charlestown MGH)小鼠,安乐死后取胚胎股骨及胫骨组织,另取新生小鼠,安乐死后取股骨及胫骨组织,在 10% 的福尔马林中固定,然后经 14% EDTA 脱钙,经酒精梯度脱水后用石蜡包埋。延长骨纵轴方向作 5 μ m 厚的切片备用。

作者单位: 100730 北京,北京医院骨科

通讯作者: 王英民, Email: friend4343@sina.com.cn

1.2 方法

用常规的原位杂交方法进行组织切片处理^[7], MMP13 和 MMP8 的 cDNA 来源于 Dr. Krane^[8]。经限制性内切酶消化, PCR 扩增后, 用同位素 S^{35} -UTP 标记制成反向核苷酸探针 (Amersham Bioscience 公司), 组织切片经过常规脱蜡水化后, 用蛋白酶 K 消化 15 min, 再用乙酸酐酸化 10 min 以暴露 mRNA, 在 55℃ 条件下杂交过夜, 杂交洗涤后用 Kodak NTB2 (Kodak 公司) 乳化显影, 并置 4℃ 冰箱 1~2 周, 再用 Kodak EDF/EDP (Kodak 公司) 显影及定影。最后, 用 HE 染色进行背景染色。用 Nikon 光学显微

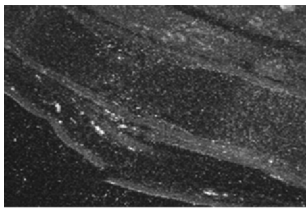


图 1 MMP8 在 15.5 天胚胎胎骨基因表达 ($\times 4$)

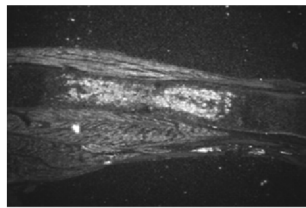


图 2 MMP8 在新生小鼠胎骨基因表达 ($\times 4$)

3 讨论

3.1 在胚胎发育过程中, 骨和软骨的细胞外基质要发生降解和转换^[2]。基质金属蛋白酶 (MMP) 在细胞外基质的降解中起到非常重要的作用。只有基质金属蛋白酶中的胶原酶可以降解 I 型, II 型, III 型中的原始的胶原分子^[3]。人的胶原酶包括 MMP1, MMP8, MMP13。但在大鼠及小鼠中目前只发现 MMP8 和 MMP13^[4]。Winchester^[4] 等人认为, 在骨及软骨发育中, 仅有 MMP13 这种胶原酶参与了细胞外基质的降解, 在骨及软骨的发育过程中起到了非常重要的作用。MMP13 由成骨细胞和肥大的软骨细胞分泌, MMP13 基因缺陷可以产生细胞外基质降解障碍, 导致软骨内骨化的发育障碍^[9], 长骨干垢端发育不良 (Missouri 型)^[10], 影响对于骨折修复所产生的骨骼的再生^[11]。一直以来, 认为 MMP8 由中性粒细胞分泌, 由于对 I 型胶原的降解作用, 它的基因缺乏可以导致 I 型胶原的堆积, 影响伤口的愈合^[12]。Sasano 等人用原位杂交的办法, 在大鼠后肢组织切片中, 发现在大鼠骨与软骨的胚胎发育过程中, MMP8 在成骨细胞前体细胞, 成骨细胞, 以及软骨细胞中都有基因表达, 证实 MMP8 也可能参与了基质的降解, 对胚胎骨与软骨的发育起作用^[6]。近来, Ando^[13] 等人在大鼠关节炎的动物模型中发现在关节软骨中 MMP8 和 MMP13 均有基因表达, 也证

镜 (Nikon, Melville, NY 美国) 进行切片分析, 用 Spot RT 数码相机系统 (Diagnostic Instruments, Sterling heights, MI 美国) 记录图像。

2 结果

在小鼠胚胎 15.5 天和新生小鼠胫骨组织切片中, 用光学显微镜暗视野观察, 可以看出 MMP8 在胚胎 15.5 天的长骨发育中基因表达很弱 (图 1), 但仍可以看到, 在新生小鼠长骨中有非常明显的基因表达 (图 2)。MMP13 在 15.5 天 (图 3) 和新生小鼠 (图 4) 的长骨中均有很强的基因表达。

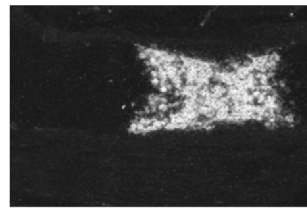


图 3 MMP13 在 15.5 天胚胎胎骨基因表达 ($\times 10$)

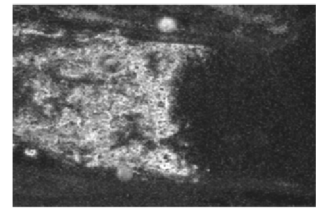


图 4 MMP13 在新生小鼠胎骨基因表达 ($\times 10$)

实 MMP8 和 MMP13 参与了软骨基质的降解。但 MMP8 在小鼠骨与软骨的胚胎发育中的基因表达情况未见报道。本试验当中, 应用原位杂交的方法, 在 15.5 天及新生小鼠的胫骨组织切片中都看到 MMP8 的基因表达, 虽然在 15.5 天时基因表达较弱, 新生小鼠时表达较强, 与 Sasano 等人在大鼠胚胎及新生大鼠骨组织中的发现相符。因此, 也证实 MMP8 在小鼠骨的胚胎发育过程中, 也可能参与了细胞外基质的降解和转换。

3.2 本试验中, 可见 MMP8 在小鼠胫骨胚胎发育中的基因表达, 但与 MMP13 比较明显较弱, 尤其在骨的胚胎发育早期, 如 15.5 天。因此, 认为 MMP13 在骨的胚胎发育过程中, 尤其是早期, 对胶原基质的降解起主要的作用。MMP8 也参与了胶原基质的降解, 在骨胚胎发育前期作用较弱, 新生小鼠时作用较强。虽然同是胶原酶, 由于 MMP8 和 MMP13 在骨的胚胎发育时间及空间上不同强度的基因表达, 因此, 认为 MMP8 参与了骨及软骨的发育过程中基质的降解, 但与 MMP13 所起的作用是不同的, 有待于进一步的研究和探讨。

【参 考 文 献】

- [1] Zhu JX, Sasano Y, Takahashi I, et al. Temporal and Spatial Gene Expression of Major Bone Extracellular Matrix Molecules during Embryonic Mandibular Osteogenesis in Rats. *Histochem J*, 2001, 33:25-35.

(下转第 816 页)

(上接第 818 页)

- [2] Sasano Y, Li HC, Zhu JX, et al. Immunohistochemical Localization of Type 1 Collagen, Fibronectin and Tenascin C during Embryonic Osteogenesis in the Dentary of Mandibles and Tibias in Rats. *Histochem J*, 2000, 32: 591-598.
- [3] Woessner JF, Nagase H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford, UK, Oxford University Press, 2000.
- [4] Winchester SK, Bloch SR, Fiocco GJ, et al. Regulation of Expression of Collagenase-3 in Normal, Differentiating Rat Osteoblasts. *J Cell Physiol*, 1999, 181: 479-488.
- [5] Woessner JF. *Matrix Metalloproteinase*. San Diego, Academic press, 1998, 1-14.
- [6] Yasuyuki Sasano, Jing-Xu Zhu, Makoto Tsubota, et al. Gene Expression of MMP8 and MMP13 During Embryonic Development of Bone and Cartilage in the Rat Mandible and Hind Limb. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2002, 50 (3) : 325-332.
- [7] Jemtland R, Lee K, Segre GV. Heterogeneity among cells that express osteoclast associated genes in developing bone. *Endocrinology*, 1998, 109: 340-349.
- [8] Inada M, Wang YM, Byrne M H, et al. Critical roles for

collagenase-3 (MMP13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *PNAS*, 2004, 101: 17192-17197.

- [9] Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, et al. Altered Endochondral Bone Development in Matrix Metalloproteinase 13-Deficient Mice. *Development*, 2004, 131, 5883-5895.
- [10] Kennedy AM, Inada M, Krane SM, et al. MMP13 Mutation Causes Spondyloepimetaphyseal Dysplasia, Missouri Type (SEMD). *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115: 2832-2842.
- [11] Behonick DJ, Xing ZQ, Lieu S, et al. Role of Matrix Metalloproteinase 13 in Both Endochondral and Intramembranous Ossification during Skeletal Regeneration. *PLoS ONE*, 2007, 1150, 1-10.
- [12] Fernandez AG, Inada M, Balbin M, et al. Increased Inflammation Delays Wound Healing in Mice Deficient in Collagenase-2 (MMP8). *The FASEB J*, 2007, 21: 2580-2591.
- [13] Ando A, Hagiwara Y, Tsuchiya M, et al. Increased expression of metalloprotein-8 and -13 on articular cartilage in a rat immobilized knee model. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 217 (4) : 271-278.

(收稿日期: 2010-04-20)