

MMP-3、MMP-13 在骨性关节炎患者滑膜中的表达及意义

李保驰¹ 王维山¹ 董金波¹ 张杰² 霍红军¹ 史晨辉^{1*}

1. 石河子大学医学院第一附属医院骨一科,新疆 石河子 832000

2. 六安市中医院骨三科,安徽 六安 237000

中图分类号: R362 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 06-0593-05

摘要: 目的 探讨 MMP-3、MMP-13 在骨性关节炎患者滑膜中的表达及相关性。方法 应用免疫组化和 Western blotting 法检测 MMP-3、MMP-13 蛋白在 30 例骨性关节炎(OA, 实验组)与 30 例非 OA(对照组)患者滑膜组织中的表达情况。结果 免疫组化结果表明 MMP-3、MMP-13 蛋白在实验组与对照组患者滑膜中的表达有显著性差异($P < 0.01$),且阳性表达多定位于滑膜细胞的胞浆;Western blotting 分析结果显示 MMP-3、MMP-13 蛋白在实验组患者滑膜中表达明显高于对照组患者,且二者在 OA 组中表达呈正相关性。结论 MMP-3、MMP-13 蛋白与骨性关节炎发生发展密切相关,可能作为诊断及判断骨性关节炎的一项重要指标。

关键词: 骨性关节炎;基质金属蛋白酶-3/-13;免疫组化;Western blotting

Expression of MMP-3/-13 in the synovium in patients with osteoarthritis and its significance

LI Baochi¹, WANG Weishan¹, DONG Jinbo¹, ZHANG Jie², HUO Hongjun¹, SHI Chenhui¹

1. The First Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of the Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000

2. The Third Department of Orthopedics, the Traditional Chinese Medicine Hospital, Liuan 237000, China

Corresponding author; SHI Chenhui, Email: lbclbc128@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression of MMP-3/-13 in the synovium in patients with osteoarthritis and their correlation. **Methods** Thirty patients with osteoarthritis (OA, experiment group) and 30 patients without OA (normal group) were selected. The expression of MMP-3/-13 in the synovium in both groups was detected using immunohistochemistry method and Western blotting method. **Results** The results of immunohistochemistry method showed that, the expression of MMP-3/-13 in experiment group was significantly higher than that in normal group ($P < 0.01$). And the positive expression of MMP-3/-13 mainly located in the cytoplasm. The results of Western blotting showed that the expression of MMP-3/-13 in experiment group was significantly higher than that in normal group. And the expression of MMP-3 was positively correlated with the expression of MMP-13 in experiment group. **Conclusion** The expression of MMP-3/-13 is closely correlated with the development of OA, which may be an important indicator in the diagnosis and judgment of OA.

Key words: Osteoarthritis; MMP-3/-13; Immunohistochemistry; Western blotting

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种慢性、渐进性、退行性关节病变,以关节软骨基质崩解、减少、骨赘形成、滑膜无菌性炎症为特征,以关节周围疼痛及关节功能障碍为主要临床表现,是一组有不同病因但有相似生物学、形态学和临床表现的疾病^[1]。据流行病学调查结果显示^[2]美国骨性关节炎发病率是5%,而我国的总发病率为12.5%,大约有1.75亿患者,其中75岁以上的人群中高达80%会出现

骨性关节炎的临床症状。OA的早期治疗主要通过非甾体类抗炎药、镇痛药及关节腔内注入润滑剂等措施来缓解症状,但这并不能有效改变病程的进展且长期服用易产生细菌性关节炎等副作用,晚期只能行人工关节置换术,尽管关节置换术为OA患者带来新的希望,但由于人工关节寿命有限,对年轻患者的远期疗效仍面临一项巨大的挑战^[3]。

到目前为止,OA的发病机理尚不清楚,一般认为与外伤、软骨代谢异常、免疫、酶对软骨基质的降解等多种因素有关,其中基质金属蛋白酶家族(MMPs)与OA的关系日益受到医学界的重视。近

基金项目:国家自然科学基金(30960387)

* 通讯作者:史晨辉,Email:lbclbc128@163.com

年来有研究证实基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinases-3, MMP-3) 和基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinases-13, MMP-13) 是两个最为突出的降解酶^[4,5], 但二者的相关性研究尚未见文献报道。因此, 深入研究参与 OA 的信息分子及作用机制, 明确它们在 OA 发生发展过程中的角色和作用, 对于进一步阐明 OA 的发生机制具有重要意义, 同时也为 OA 的早期诊疗提供理论依据和实验基础。

1 材料和方法

1.1 临床资料

收集石河子大学第一附属医院 2012 年 3 月 ~ 2013 年 2 月在我科行膝关节镜、关节置换或截肢手术的患者滑膜标本共 60 例 (实验组选择临床确诊为 OA 患者 30 例; 对照组选择单纯膝关节半月板损伤、滑膜皱襞综合症或者截肢的患者 30 例), 男性 36 例, 女性 24 例, 年龄为 18 ~ 75 岁, 中位年龄为 60.2 岁, 所有病例均经本院骨科和影像学检查确诊 (根据 1995 年美国风湿病学会关于 OA 的诊断标准), 取样时均征得患者本人同意及医院伦理委员会的批准。

1.2 主要试剂

Western blotting 及免疫组化所用的 MMP-3、MMP-13 一抗为 abcam 公司兔抗人多克隆抗体, 二抗所用试剂分别为北京中杉金桥生物技术有限公司的辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H + L) 以及 Dako 公司的 Envision 试剂盒。

1.3 免疫组化染色方法

所有标本经 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 然后连续 4 μm 切片, 免疫组化染色采用 Envision 法, MMP-3、MMP-13 抗浓度分别为 1: 50、1: 100、抗原经高压修复, 操作步骤严格按照试剂盒说明进行。

1.4 Western blotting 方法

取新鲜标本约 100 mg, 液氮低温研磨, 加裂解液 100 μL , 冰上充分裂解 30 min, 离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min, 15 min), 吸取上清, 通过核酸蛋白检测仪测定蛋白浓度, 取 300 μg 总蛋白, 加含 β -巯基乙醇的上样缓冲液, 放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中煮 5 min 使蛋白变性; 配制 10% 和 4% 的分离胶及浓缩胶, 电泳槽中加电泳缓冲液, 提取的蛋白每孔上样 10 μL , 最后一个泳道加入标准蛋白 Marker; 电泳完毕后以半干转膜法将蛋白转印于 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭抗原 1 h, 加入含 MMP-3 (1: 800 稀

释)、MMP-13 (1: 2 000 稀释) 兔抗人单克隆抗体的 TBST 中室温孵育 2 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 次日洗膜后加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG 二抗 (1: 35 000 稀释) 室温下孵育 1 h, 洗膜, ECL 化学发光检测杂交信号, X 线光片压片曝光, 凝胶图像分析其积分光密度值, 其中 MMP-3/-13 蛋白的表达水平用 β -actin 蛋白的表达量来校正。

1.5 结果判断标准

(1) 免疫组化: MMP-3/-13 阳性染色为棕黄色颗粒, 多定位于位于滑膜的细胞浆。其阳性反应的分级采用兼阳性细胞染色强度以及阳性细胞所占百分比作为评判标准, 将每张切片随机选取 5 个高倍视野, 根据阳性细胞所占百分比评分: 阴性为 0 分, 阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为 1 分、 $> 10\%$ 且 $\leq 50\%$ 为 2 分、 $> 50\%$ 且 $\leq 75\%$ 为 3 分、 $> 75\%$ 为 4 分; 按染色强度评分: 不着色为 0 分、淡黄色为 1 分、棕黄色为 2 分、棕褐色为 3 分。阳性细胞数评分乘染色强度评分即为乘积分数, 将乘积分数 ≤ 4 分定为阴性、 > 4 分定为阳性。所有切片采用双盲法由两位病理医师独立阅片, 进行结果评定; (2) Western blotting 结果判定: 采用 Quantity One 4.62 软件对电泳条带进行灰度分析, MMP-3/-13 蛋白表达相对值 = MMP-3/-13 条带灰度值/同一标本 β -actin 灰度值, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.6 统计学处理

将所得的数据采用 SPSS17.0 进行统计学分析, 所有计数资料均采用 χ^2 检验和 $\bar{x} \pm s$ 表示, 相关性采用 Pearson 积矩相关分析, 以 $P < 0.05$ 确定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化染色检测滑膜组织中 MMP-3/-13 的表达情况

MMP-3/-13 在对照组患者的滑膜组织中仅有少量表达, 在小部分滑膜细胞胞浆中呈浅黄色, 基质中可见少许棕色颗粒分布, 滑膜衬里层部分成纤维样细胞、巨噬细胞表达不明显 (图 1、2); 实验组患者滑膜组织中 MMP-3/-13 蛋白的阳性表达多定位于胞浆, 呈棕黄色, 可见大量棕色颗粒分布其内, 滑膜衬里层及衬里下层成纤维样细胞、巨噬细胞强阳性表达 (图 3、4)。结果表明实验组滑膜组织中 MMP-3/-13 的阳性细胞率与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$, 表 1、2)。

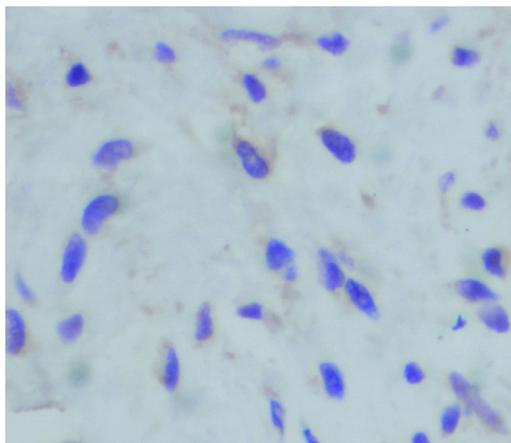


图1 MMP-3 在对照组滑膜组织中呈弱阳性表达(观察倍数×400)

Fig. 1 Weak positive expression of MMP-3 in the synovium in normal group (×400)

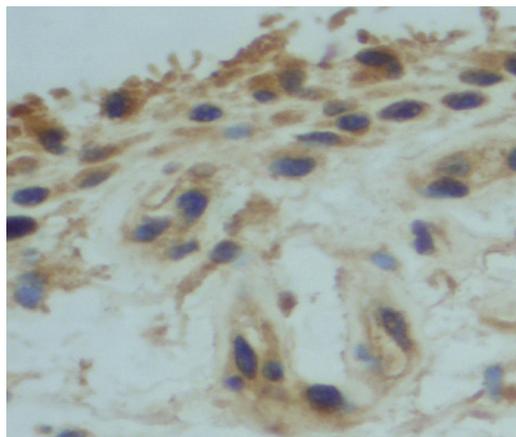


图4 MMP-13 阳性表达多定位于滑膜的细胞浆(观察倍数×400)

Fig. 4 The positive expression of MMP-13 mainly located in the cytoplasm in the synovium (×400)

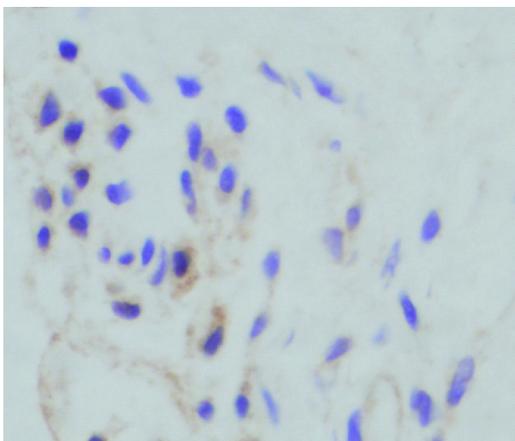


图2 MMP-13 在对照组滑膜组织中呈弱阳性表达(观察倍数×400)

Fig. 2 Weak positive expression of MMP-13 in the synovium in normal group (×400)

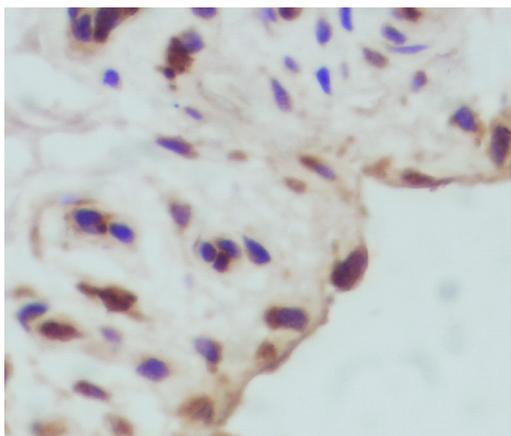


图3 MMP-3 阳性表达多定位于滑膜的细胞浆(观察倍数×400)

Fig. 3 The positive expression of MMP-3 mainly located in the cytoplasm in the synovium (×400)

表1 两组患者滑膜组织中 MMP-3 阳性细胞率比较($P < 0.01$)

Table 1 Comparison of the positive cell rate of MMP-3 in the synovial tissue between two groups ($P < 0.01$)

组别	例数	MMP-3 蛋白 阳性例数	χ^2	P 值
实验组	30	27	29.697	$P < 0.01$
对照组	30	6		

表2 两组患者滑膜组织中 MMP-13 阳性细胞率比较($P < 0.01$)

Table 2 Comparison of the positive cell rate of MMP-13 in the synovial tissue between two groups ($P < 0.01$)

组别	例数	MMP-13 蛋白 阳性例数	χ^2	P 值
实验组	30	26	21.991	$P < 0.01$
对照组	30	8		

2.2 Western blotting 检测患者滑膜中 MMP-3/-13 蛋白的表达及相关性

60 例滑膜组织中均检测到 MMP-3/-13 的表达, 将 MMP-3/-13 的灰度值与 β -action 的比值作为 MMP-3/-13 的相对表达值, 将所得数据进行统计学分析显示: MMP-3 在对照组与实验组患者滑膜组织中的相对表达量分别为 0.214 ± 0.043 、 1.147 ± 0.219 ($F = 14.634$, $P < 0.01$, 图5); MMP-13 在对照组与实验组患者滑膜组织中的相对表达量分别为 1.051 ± 0.248 、 0.275 ± 0.134 ($F = 17.634$, $P < 0.01$, 图6)。将实验组中 MMP-3、MMP-13 蛋白的相对表达量行 Pearson 积矩相关分析, 得出相关系数 r

$=0.845 (P < 0.01)$, 表明二者呈正相关。



图5 MMP-3在对照组(1)与实验组(2、3)滑膜组织中的表达情况

Fig. 5 Expression of MMP-3 protein in the synovial tissue in normal group (1) and experiment group (2, 3) detected using Western blotting

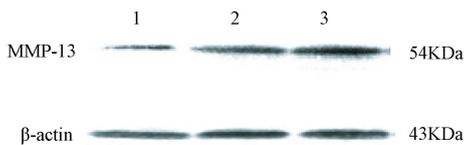


图6 MMP-13在对照组(1)与实验组(2、3)滑膜组织中的表达情况

Fig. 6 Expression of MMP-13 protein in the synovial tissue in normal group (1) and experiment group (2, 3) detected using Western blotting

3 讨论

自1962年Gross和Lapieve首先发现MMP-1以来,迄今已认识到MMPs是由25个成员组成的锌离子蛋白酶超家族,存在于关节炎、牙周炎等多种结缔组织疾病中,与炎症反应息息相关。研究表明蛋白酶降解关节软骨细胞外基质及基底膜成分所致的软骨基质合成与分解代谢失衡可能是OA病变的主要机制,关节软骨退变和滑膜无菌性炎症反应是骨性关节炎病变进展的中心环节。MMP-13又称为胶原酶-3,能够特异性地降解胶原分子中三维螺旋结构的酶,其对于H型胶原的降解效率是所有基质蛋白酶中最高。MMP-13主要由滑膜细胞、软骨细胞、中性粒细胞等产生,主要通过破坏H型胶原之间的肽链而达到裂解软骨的目的,曾有文献报道^[6]骨性关节炎患者中MMP-13蛋白比正常人高十倍。本实验亦发现实验组滑膜组织中的MMP-13蛋白的含量远高于对照组,且表达量随着骨性关节炎的进展而逐渐增加,这与既往文献报道相一致。

MMP-3由滑膜细胞、成纤维细胞等产生,主要是将细胞外基质中蛋白多糖和糖蛋白(如纤维连接蛋白、层粘连蛋白等)作为底物,通过降低对纤溶酶的激活作用而下调与之相关的纤溶酶活性,继而

促进纤溶酶介导的蛋白酶水解,Nahss等曾经研究不同病变程度的OA软骨组织中MMP-3表达情况,发现早期软骨组织中MMP-3即出现高表达,且与关节软骨退变程度呈正相关^[7]。本研究表明MMP-3、MMP-13在对照组关节滑膜中表达量少,而在OA早期含量即有所增加,晚期时增加显著,与骨关节的病变过程密切相关,且二者呈正相关性,可以推测由于炎症的刺激滑膜分泌过量的MMP-13降解胶原、MMP-3降解蛋白多糖,二者共同作用打破了关节软骨基质合成和分解的平衡,进而导致骨性关节炎的发生、发展。

有关文献报道,在OA病变过程中,pro-MMP-9被激活为MMP-9参与胶原的降解和加速软骨破坏,在此过程中存在两条潜在的激活通道,MMP-3和MMP-13分别是这两条激活通道中的关键酶,并且MMP-13介导的为主要的激活通道^[8]。而本实验研究表明MMP-13和MMP-3的表达成正相关性,因此我们有理由推测MMP-3/-13除了参与激活MMP-9之外还受到同一条激活通道的调控。

该实验结果发现在晚期OA病例中存在MMP-13/-3表达量甚至低于非OA组。可能是滑膜组织增生严重、滑膜细胞等功能下降导致MMP-13/-3分泌减少。具体机制有待于进一步的研究。

本实验还发现部分对照组滑膜组织MMP-3/-13也存在高表达,这可能因半月板损伤后由于疼痛以及碎裂的微粒等刺激引起的滑膜反应所致,对结果可能会产生一定的影响,但这可以间接反映实验组与对照组之间滑膜组织中MMP-3/-13蛋白表达的情况。

研究结果表明实验组患者滑膜组织中的MMP-3/-13蛋白的表达明显高于对照组,在一定程度上说明了它们在骨关节炎发生发展中的重要作用。OA的病理发展是一个复杂的过程,并非一个细胞因子单独作用的结果,但是MMP-3/-13有可能成为OA诊断和治疗的一项有用的指标,并且可能为OA的治疗提供一个新的靶点。通过干预MMP-3/-13的信号转导通路或抑制其生物活性,将为治疗骨性关节炎开辟一条新的途径。

【参 考 文 献】

- [1] Miyazaki T, Wada M, Kawahara H, et al. Dynamic load at baseline can predict radiographic disease progression in medial compartment knee osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(7):617-622.

- Osteoporotic femoral neck fracture in 375 cases. *Guangdong Medical Journal*, 2005, 26(11): 1548-1550.
- [18] Ahmad MA, Hopkins MT, Thomas J, et al. Parathyroid responsiveness to hypocalcemic and hypercalcemic stimuli in adult growth hormone deficiency after growth hormone replacement. *A M J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286: E986-E993.
- [19] Bikle DD, Sakata T, Leary C, et al. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic action of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res*, 2002, 17: 1570-1578.
- [20] Alshehlee A, Kominski HJ, Ruf RL. Neuromuscular manifestations of endocrine disorders. *Neurol Clin*, 2002, 20(1): 35-38.
- [21] Xing W, Govoni K, Donahue LR, et al. Genetic evidence that thyroid hormone is indispensable for prepubertal IGF-1 expression and bone acquisition in mice. *Journal of Bone Miner Research*, 2012, 27(5): 1067-1079.
- [22] Losa M, Scavini M, Gatti E, et al. Long-term effects of growth hormone replacement therapy on thyroid function in adults with growth hormone deficiency. *Thyroid*, 2008, 18(12): 1249-1254.
- [23] Lakatos P, Foldes J, Nagy Z, et al. Serum insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor binding proteins and bone mineral content in hyperthyroidism. *Thyroid*, 2000, 10: 417-423.
- [24] Kassem M, Okazaki R, Harris SA, et al. Estrogen effects in insulin-like growth factor gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptor. *J Calcif Tissue Int*, 1998, 62: 60-66.
- [25] Li Wei, Miao Yide, Gou Shuqin. Relationship of mineral density and insulin-like growth factor-1 and other related hormones in aged men. *Chin J Osteoporos*, 2002, 8(4): 287-289.
- [26] Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Eng J Med*, 1990, 323(1): 1-6.
- [27] Dennison EM, Syddall HE, Jameson KA, et al. A study of relationships between single nucleotide polymorphisms from the growth hormone-insulin-like growth factor axis and bone mass: the Hertfordshire cohort study. *The Journal of Rheumatology*, 2009, 36(7): 1520-1526.
- [28] Huang X, Blackman MR, Herremans K, et al. Effects of growth hormone and/or sex steroid administration on whole-body protein turnover in healthy aged women and men. *Metabolism*, 2005, 54(9): 1162-1167.
- [29] Hameed M, Lange KH, Andersen JL, et al. The effect of recombinant human growth hormone and resistance training on IGF-1 mRNA expression in the muscles of elderly men. *J Physio*, 2004, 555(1): 231-240.
- [30] Mariam Elbornsson, Galina Götherström, Ingvar Bosæus, et al. Fifteen years of growth hormone (GH) replacement increases bone mineral density in hypopituitary patients with adult onset GH deficiency. *Eur J Endocrinol*, 2012, 166(5): 787-795.

(收稿日期: 2013-06-25, 修回日期: 2013-08-18)

(上接第596页)

- [2] 张乃崢, 施金旺, 张雪哲, 等. 膝骨性关节炎的流行病学调查 [J]. *中华内科杂志*, 1995, 34(2): 84-85.
- Zhang NZ, Shi JW, Zhang XZ, et al. Epidemiological investigation of osteoarthritis in knee joint [J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 1995, 34(2): 84-85. (in Chinese)
- [3] Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States Part II [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(1): 26-35.
- [4] Hashimoto M, Nakasa T, Hikata T, et al. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis [J]. *Med Res Rev*, 2008, 28(3): 464-81.
- [5] Pelletier JP, Boileau C, Brunet J, et al. The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K [J]. *Bone*, 2004, 34(3): 527-538.
- [6] Iannone F, LaPadula G, et al. The Pathophysiology of osteoarthritis [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2003, 15(5): 364-367.
- [7] Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, et al. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases-3 and -9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(25): 2625-2631.
- [8] Rita Dreier, Susanne Grassel, Susanne Fuchs, et al. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. [J]. *Experimental Cell Research*, 2004, 297: 303-312.

(收稿日期: 2013-06-28, 修回日期: 2013-10-09)