

· 临床研究 ·

MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 评价膝关节骨性关节炎的临床研究*

贺占坤¹, 沈杰威^{2△}

(1. 河南省新乡市第一人民医院骨科 453000; 2. 北京积水潭医院骨科, 北京 100035)

摘要:目的 研究膝关节骨性关节炎(OA)患者关节液中基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-3、MMP-9 和基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIM-1)4 种蛋白水平,并探讨其与关节损伤程度及患者预后的关系。方法 52 例患者均给予关节镜下清理术联合玻璃酸钠、双醋瑞因的治疗方法,于治疗前后采用 ELISA 检测 52 例膝关节 OA 患者及 10 例症状轻、X 线等影像阴性者关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的含量并进行相关分析,并在关节镜下对膝关节软骨损伤程度进行评价。结果 膝关节 OA 患者关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的含量均明显高于对照组($P < 0.01$)。关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的含量与关节软骨损伤程度呈正相关,随着病情的好转,关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的含量也随之降低。结论 检测关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 水平对膝关节 OA 的早期诊断、病情程度判断、预后评价有一定的意义。

关键词:骨关节炎;滑液;膝关节;基质金属蛋白酶;预后

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.008

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)32-3872-03

The value of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 levels in the evaluation of knee joint osteoarthritis*

He Zhankun¹, Shen Jiewei^{2△}

(1. Department of Orthopaedics, the First People's Hospital of Xinxiang, Xinxiang, Henan 453000, China;

2. Department of Orthopaedics, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the level of matrix metallo-proteinase(MMP)-2, MMP-3, MMP-9 and matrix metallo-proteinase inhibitor-1(TIM-1) in the synovial fluid of the patients with knee joint osteoarthritis(OA) and the degree of articular cartilage injury and prognosis. Methods 52 patients(knee OA group) were given arthroscopic debridement combined with sodium hyaluronate, diacerein. The levels of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 in synovial fluid were detected in 52 patients with knee OA and 10 normal controls(control group) by enzyme-linked immunosorbent assay. The degree of cartilage injury was assessed with arthroscopy. Results The level of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 in knee OA group were significantly higher than those of the control group(all $P < 0.01$). The levels of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 in the synovial fluid were positively correlated with the degree of articular cartilage injury, and the levels of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 decreased with the improvement of the disease. Conclusion The measurement of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 have a certain significance to early diagnosis, degree judgment and prognostic evaluation of knee OA.

Key words: osteoarthritis; synovial fluid; knee joint; matrix metalloproteinase; prognosis

骨性关节炎(OA)为最常见的关节疾患,也是危害人类健康的常见疾病,OA 的发病率与年龄呈正相关,其病理改变表现为关节软骨的退行性变、完整性破坏以及骨质增生等^[1-2]。而关节软骨细胞外基质的均衡是维持关节软骨完整性和功能的前提。大量基础及临床研究表明,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)在关节软骨的破坏中起重要作用^[3-4],其中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 是关节软骨基质降解中重要的酶,基质金属蛋白酶抑制剂-1(matrix metalloproteinase inhibitor-1, TIMP-1)是 MMPs 的特异性抑制剂,二者的水平关系是 OA 软骨降解的关键^[5]。本研究对 52 例膝关节 OA 患者关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的含量进行检测,结合关节镜下软骨损伤分级,探讨 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的含量在膝关节 OA 发病中的作用及与关节损伤程度和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 根据纳入标准及排除标准收集 2011 年 1 月至 2012 年 3 月在新乡市第一人民医院就诊和治疗的膝关节

OA 患者 52 例,其中男 25 例,女 27 例,平均年龄(52.6±5.7)岁;并根据本组患者的年龄、性别等一般资料将来本院进行体检的 10 例症状轻、X 线等影像阴性者作为对照组,其中男 6 例,女 4 例,平均年龄为(57.3±8.4)岁。两组均排除肝、心、肾及其他系统等器质性疾病及感染性疾病。本组 OA 患者与健康对照在年龄、性别等一般情况方面比较,差异无统计学意义,具有可比性($P > 0.05$)。

1.2 纳入标准 52 例膝关节 OA 患者的诊断均符合以下纳入标准:(1)符合 1995 年美国风湿病学会制定的关节炎诊断标准;(2)有明显骨关节炎的临床症状;(3)关节 X 射线等影像学检查符合骨关节炎的诊断,并合并关节积液^[6]。对所有患者进行关节镜检查并对软骨损伤分度:I 度 15 例,II 度 15 例,III 度 12 例,IV 度 10 例。排除 2 周内接受过其他药物关节腔内注射者或局部封闭治疗者;1 个月内膝关节或者全身有严重感染史者或关节液化验有脓细胞者;1 周内应用非甾体类药物者;1 个月内注射过激素类药物及伴有其他疾病者。

1.3 治疗方法 52 例患者均给予关节镜下清理术联合玻璃

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101397)。 作者简介:贺占坤(1963~),副主任医师,本科,主要从事骨关节病人工关节置换复杂骨折研究。 △ 通讯作者, E-mail: jstjx@163.com。

表 1 膝关节 OA 患者与对照组关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 水平比较($\mu\text{g/L}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	MMP-2	MMP-3	MMP-9	TIMP-1
对照组	10	94.37±8.52	784.61±124.37	155.64±34.06	265.53±37.46
OA 组治疗前	52	283.26±58.19	2 836.47±512.48	357.26±43.19	485.23±57.76
OA 组治疗后	52	176.14±36.20	846.39±108.27	189.47±27.88	294.21±37.46

表 2 不同程度膝关节 OA 患者关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 水平比较($\mu\text{g/L}$, $\bar{x}\pm s$)

损伤分度	n	MMP-2	MMP-3	MMP-9	TIMP-1
I 度	15	184.23±23.35	1 235.27±125.04	228.34±33.47	327.13±45.82
II 度	15	233.56±34.77	2 373.32±423.78	287.21±34.48	389.24±36.27
III 度	12	292.48±39.46	3 192.78±429.16	359.63±42.69	562.73±63.10
IV 度	10	367.03±56.71	5 232.27±535.25	636.17±57.36	735.55±103.26
F		23.15	17.38	24.74	4.67
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

酸钠、双醋瑞因的治疗方法。关节镜下清理术:采用硬膜外麻醉,仰卧位,应用止血带,采用常规 AM、AL 入路,必要时增加入路。首先进行膝关节常规检查,结合病史、体检、影像学检查观察记录膝部软骨剥脱情况、滑膜增生情况,是否存在半月板退变、损伤。影响膝关节运动中的骨赘、游离体、髌间窝狭窄及外侧髌股关节高压症。术中大量生理盐水灌注冲洗,刨削增生肥厚遮挡视线的滑膜,不做广泛切除,去除游离体,摘除影响关节运动或有脱落风险的骨赘,清除关节内剥脱分离和不稳定的软骨碎片,修整、气化紧缩、损伤或退变半月板,并尽可能保留半月板,解除髌间窝狭窄,松解部分过窄的外侧髌支持带;对部分小范围软骨下骨暴露处者行微骨折术,部分存在内侧滑膜皱襞的患者清理增生滑膜。术后患肢加压包扎,常规药物应用,指导患者分期适时进行功能锻炼。药物治疗:术后两组均给以玻璃酸钠 2 mL(20 mg,上海昊海生物科技有限公司生产,批准文号国药准字 H20051837)关节腔内注射,每周 1 次,共 5 周。治疗组同时给予双醋瑞因(安必丁,昆明积大制药有限公司,批准文号国药准字 J20060017)50 mg,口服,每日 2 次,服药时间均为 12 周。

1.4 标本的采集及生化指标的测定 研究对象在治疗前后行关节镜检查时抽取膝关节液,患者采用屈膝 90°坐位,于髌下内外侧进针,用 5 mL 一次性注射器进入关节腔内,抽吸无回血后抽取关节液,离心后取上清液分装 -70 °C 保存待测。关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的检测均采用 ELISA 双抗体夹心法,试剂盒由美国 R&D 公司提供,采用美国 Hyperion MR III 型酶标仪测定,严格按照说明书进行实验操作^[7]。

1.5 统计学处理 所有资料采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,成组设计的多个样本均数的比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 *t* 检验,相关性研究采用直线回归分析,检验水平设置为 0.05,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 膝关节 OA 患者治疗前后与对照组关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 水平比较 膝关节 OA 患者关节液 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 水平均明显高于对照组($P<0.01$);治疗后,患者的症状明显减轻,关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的水平明显低于治疗前水平。见表 1。

2.2 不同程度膝关节 OA 患者关节液中 MMP-2、MMP-3、

MMP-9 和 TIMP-1 水平比较 膝关节 OA 患者关节液 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 水平随着疾病的严重程度而升高,各组间比较差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 2。

2.3 膝关节 OA 患者关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 含量与关节软骨损伤程度相关性分析 经直线回归分析,52 例患者关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 含量与软骨损伤程度呈正相关($r=0.463、0.856、0.638、0.531, P<0.05$)。

3 讨 论

膝关节 OA 的主要病理改变表现为软骨降解、骨赘形成、软骨下骨质改变等。研究表明软骨降解的主要原因在于软骨细胞生存所需的细胞外基质的降解,而 MMPs 可导致软骨细胞生存依赖的细胞外基质的降解^[8]。MMPs 是一组 Zn^{2+} 依赖性内肽酶,可降解细胞外基质中的胶原、蛋白多糖以及其他的细胞外基质分子,在膝关节 OA 发生、发展中起重要病理作用,导致关节破坏畸形^[9]。不同 MMPs 相互作用不仅可降解细胞外基质,而且它们之间可以相互协同作用,加速关节软骨的破坏。MMP-3 是 MMPs 的主要成员之一,由软骨细胞、滑膜细胞分泌,不仅能降解多种细胞外基质中的细胞外蛋白多糖、IX 型胶原等多种基质蛋白底物,更为重要的是 MMP-3 可激活 MMP-1、MMP-9、MMP-13 等酶原产生级联放大效应,加速软骨破坏^[10-11]。而且膝关节 OA 软骨损伤部位的代谢产物堆积所致的酸性环境更有利于 MMP-3 发挥降解软骨的作用。MMP-9 主要发挥破坏软骨基质、暴露胶原、破坏胶原形成的网状结构等作用, MMP-9 破坏胶原可使胶原碎裂分解从而更易被 MMP-3 降解, MMP-3 及 MMP-9 的联合作用使得胶原网状结构失去原有的坚固特性,从而导致软骨的不可逆改变^[12-13]。MMPs 家族中另外一个重要的 MMP-2 是以酶原形式分泌到细胞外, MMP-2 可以降解细胞外基质中关节软骨重要成分的 I 型、IV 型、V 型及 X 型胶原和层粘连蛋白、纤维结合素、蛋白多糖等^[14],有研究认为, MMP-2 表达水平升高是早期软骨分解的信号^[15]。

尽管如此,人体内仍有抑制 MMPs 分子从而达到关节内环境平衡的目的,而 TIMP 即为抑制 MMPs 分子的主要酶类^[13]。目前发现有 4 种 TIMP,均可以抑制所有的 MMPs。正常生理条件下 TIMP 的表达受组织发育情况的调控,通过结合细胞表面特异性受体发挥促进组织细胞生长的作用。且 MMPs 与其对应组织的 TIMP 之间相互抑制,以达到关节内环境的平衡。当平衡被打破后, MMPs 水平升高而发挥降解

软骨的作用。上述 MMPs 降解软骨的病理改变发生时,可产生多种细胞因子,这些细胞因此能够诱导产生 TIMP,因此 TIMP 的表达水平与 MMPs 的活动密切相关, MMPs 的表达水平越高, TIMP 的表达水平也越高^[16]。如 MMP-2 含量的增多,会刺激 TIMP 活性增强,活性增强的 TIMP 可以抑制 MMPs 酶活性,启动该平衡机制,反过来抑制 MMP-2 的分泌并降解过多的 MMP-2,以维持关节液内环境平衡^[17]。本研究也显示了膝关节 OA 患者关节液 TIMP-1 水平明显增多,以发挥其抑制降解 MMPs 的作用。一项在 OA 患者的研究表明: MMPs 与 TIMP-1 的水平并不完全一致,并认为是 MMPs 活性增强超过了 TIMP-1 的作用,打破了 MMPs 与 TIMP-1 之间的平衡,从而继发了软骨的破坏等病理改变^[18]。

本研究还显示,膝关节 OA 患者关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 水平呈均显著升高,并与病变的严重程度呈正相关。提示 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 在膝关节 OA 发生、发展过程中具有重要作用。经治疗后,膝关节 OA 患者的症状明显减轻,关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的水平也明显降低,因此认为 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 是反映膝关节软骨损伤程度的生物标志物,检测关节液中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 的水平对疾病的早期诊断、病情程度判断、预后评价有一定的临床意义。

参考文献:

[1] Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(1): 31-33.
 [2] Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis[J]. *Clin Geriatr Med*, 2010, 26(3): 355-369.
 [3] Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis[J]. *Clin Immunol*, 2013, 146(3): 185-196.
 [4] Murphy G, Lee MH. What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(1): 44-47.
 [5] 宋朋飞, 阚卫兵, 袁琴, 等. 基质金属蛋白酶与骨关节炎的关系[J]. *广东医学*, 2011, 32(20): 2736-2738.
 [6] 李卫平, 蹇睿, 胥方元. 基质金属蛋白酶及其抑制物与骨性关节炎[J]. *西南军医*, 2010, 12(6): 1165-1167.
 [7] 王秉文. 不同疗法治疗膝关节骨性关节炎的临床疗效分析[J]. *重庆医学*, 2010, 39(6): 728-730.
 [8] Haeusler G, Walter I, Helmreich M, et al. Localization of matrix metallo proteinases (MMPs) their tissue inhibitors, and vascular engrowth factor (VEGF) in growth

plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation [J]. *Cal Tiss Int*, 2005, 76(5): 326-335.

[9] Meszaros E, Malesud CJ. Prospects for treating osteoarthritis: enzyme-protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity[J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2012, 3(5): 219-229.
 [10] Bassiouni HM, El-Deeb M, Kenawy N, et al. Phonoarthography, musculoskeletal ultrasonography, and biochemical biomarkers for the evaluation of knee cartilage in osteoarthritis[J]. *Mod Rheumatol*, 2011, 21(5): 500-508.
 [11] 张金山, 程园园, 刘健. 膝关节炎患者血清 MMP-3、TIMP-1 水平变化及相关性研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(9): 1066-1069.
 [12] Ding QH, Ji XW, Cheng Y, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases and inducible nitric oxide synthase by andrographolide in human osteoarthritic chondrocytes[J]. *Mod Rheumatol*, 2012, 15(1): 57-64.
 [13] 王维山, 董金波, 何斌, 等. OA 患者血液及关节液中 MMP-3、uPA 水平检测及临床意义[J]. *山东医药*, 2011, 51(1): 63-64.
 [14] 黄媛霞, 段永壮, 李康, 等. 膝关节 OA 患者血清和关节液中 IL-1、MMP-3、TIMP-1 的水平变化及意义[J]. *山东医药*, 2010, 50(1): 59-60.
 [15] Yuan PW, Yu HC, Zhou HZ, et al. Preventive administration of juanbi capsules for knee osteoarthritis: effects on serum MMP-2 and MMP-9 levels and cartilage repair[J]. *J Tradit Chin Med*, 2011, 31(4): 334-337.
 [16] 刘永刚, 鲍隽君, 邢自宝, 等. 骨性关节炎与细胞因子相关性研究进展[J]. *骨科*, 2010, 1(2): 105-107.
 [17] Ryu JH, Lee A, Huh MS, et al. Measurement of MMP activity in synovial fluid in cases of osteoarthritis and acute inflammatory conditions of the knee joints using a fluorogenic peptide probe-immobilized diagnostic kit[J]. *Theranostics*, 2012, 2(2): 198-206.
 [18] 王力民, 汤慧. 骨性关节炎患者关节囊滑液 MMP-3、PGE2 检测的临床意义[J]. *放射免疫学杂志*, 2010(1): 59-61.

(收稿日期: 2013-06-05 修回日期: 2013-07-30)

(上接第 3871 页)

Am, 2013, 24(1): 209-220.
 [8] Xu X, Han H, Gao H, et al. The increased range of cervical flexed motion detected by radiographs in hirayama disease[J]. *Eur J Radiol*, 2011, 78(1): 82-86.
 [9] 卢祖能. 实用肌电图学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 947.
 [10] 黄洞, 冯慧宇, 张成. 强直性肌营养不良症的临床、电生理学和病理学特点[J]. *临床神经病学杂志*, 2010, 23(4): 288-290.
 [11] 杨晓黎, 王殿华, 陈金亮. 强直性肌营养不良 64 例临床分析[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2010, 27(6): 564-565.

[12] 杜文津, 陈晋文, 谢仁厚. 强直性肌营养不良一家系 5 例报告及临床分析[J]. *卒中与神经疾病*, 2010, 17(3): 172-176.
 [13] 李懋, 黄旭升, 王占军. 强直性肌营养不良 1 型患者临床特点分析[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2013, 20(1): 37-40.
 [14] 吴筠凡, 周志华, 韩咏竹. 强直性肌营养不良临床、电生理和肌肉病理研究[J]. *中国临床神经科学*, 2013, 21(1): 70-74.

(收稿日期: 2013-06-03 修回日期: 2013-07-16)