

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.19.007

基质金属蛋白酶-14 在骨关节炎滑膜、滑液中的表达及研究*

郑伟,史晨辉[△],王维山,霍红军,李保驰

(石河子大学医学院第一附属医院骨一科,新疆石河子 832000)

摘要:目的 探讨基质金属蛋白酶-14(MMP-14)在骨关节炎(OA)患者滑膜、滑液中的表达及意义。方法 采用半定量 RT-PCR 检测 32 例 OA 患者(实验组)及 26 例非 OA 患者(对照组)关节滑膜组织中 MMP-14 mRNA 的表达水平;采用 ELISA 法检测关节滑液中 MMP-14 蛋白的表达水平。结果 经 RT-PCR 检测 MMP-14 mRNA 在实验组与对照组患者滑膜组织中的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),ELISA 检测两组滑液中 MMP-14 蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MMP-14 在 OA 滑膜中呈高表达,表明在 OA 的发生及发展过程中可能起促进作用;在滑液中低表达,表明 OA 发生时 MMP-14 未大量释放至滑液,间接表明 MMP-14 的主要功能于滑膜细胞中表达并促进骨关节炎的发展。

关键词:骨关节炎;基质金属蛋白酶 14;逆转录聚合酶链反应;酶联免疫吸附测定

中图分类号:R684

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)19-2417-03

Expression and significance of matrix metalloproteinase 14 in synovial tissue and synovial fluid of osteoarthritis*

Zheng Wei, Shi Chenhui[△], Wang Weishan, Huo Hongjun, Li Baochi

(First Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: Objective To evaluate the expression and clinical significance of matrix metalloproteinase 14(MMP-14) in osteoarthritis(OA) patients in synovium and synovial fluid of knee joint. **Methods** Semi-quantitative RT-PCR were used to detect the expression of MMP-14 mRNA in 32 case of OA (experimental group) and 26 non-OA patients(control group) synovium; protein level expression of MMP-14 in synovial fluid were analyzed by ELISA. **Results** The expression of MMP-14 mRNA in experimental group synovium of knee joint was significantly increased compared with control group($P < 0.05$); but the protein level of MMP-14 was low in experimental group synovial fluid compared with control group($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of MMP-14 is increased in OA patients synovium and maybe promote the progress of OA directly; the protein level of MMP-14 is decreased in OA synovial fluid, indicated the function of MMP-14 in OA synoviocyte indirectly.

Key words: osteoarthritis; matrix metalloproteinase 14; RT-PCR; ELISA

骨关节炎(OA)是一种多因素引起的慢性的退行性关节疾病,多见于中老年人,主要病理表现为:进行性的关节软骨破坏消失;软骨下骨的骨化;关节边缘骨赘的形成;关节滑膜的充血,炎性细胞的浸润。临床表现为关节的慢性疼痛,关节功能障碍最终导致关节功能的丧失^[1],在生物化学的水平,OA 的主要特点是产生大量的基质降解酶,其中主要包括蛋白聚糖(ADAMTSs)和基质金属蛋白酶(MMPs),这将导致软骨基质的降解。有研究表明 OA 是一个累及整个关节(包括软骨、软骨下骨、半月板、关节滑膜和滑液)的疾病^[2],而 MMPs 作为主要的细胞外基质降解酶,近年来在 OA 各结构中的表达及相互关系成为研究的热点。其中 MMP-14 作为膜型-MMPs 家族成员之一,在 OA 软骨中的研究表明,它具有调节和促进其他 MMPs 活化的作用^[3],而自身在 OA 其他组成结构中的研究较少,本研究采用 RT-PCR 的方法检测 MMP-14 mRNA 在 OA 滑膜组织中的表达,ELISA 检测 MMP-14 蛋白在滑液中的表达,从而探讨其在 OA 中的作用,为 OA 的全面研究提供一定的实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有研究对象均来自 2012 年 7 月至 2013 年 8 月本院骨一科行膝关节镜或关节置换手术的患者。实验组:膝关节 OA 患者 32 例,男 10 例,女 22 例,年龄 34~76 岁,所有患者诊断标准符合美国风湿学会 1995 年确定的骨关节炎诊断标准。对照组:膝关节创伤后行关节镜诊治术或切开手术的患者 26 例,男 18 例,女 8 例,年龄 16~67 岁,既往无 OA 病史,关节镜或影像学检查无 OA 表现。取样均征得患者本人同意并获得医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 两组患者关节滑膜均于手术中获取,并用锡箔纸包裹,迅速置于液氮中速冻,后置于 -80°C 保存备用;关节滑液在门诊和手术中采用传统的无菌穿刺技术于关节腔内抽取 1~3 mL,置于无菌离心管中 4°C 离心取上清液置于 -80°C 冷冻保存待测。

1.2.2 MMP-14 mRNA 的检测 取液氮冷冻的滑膜组织,按 Trizol 一步法抽提得到总 RNA,分光光度计测得 RNA 的浓

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960387)。 作者简介:郑伟(1986-),住院医师,硕士,主要从事关节外科工作。 [△] 通讯作者, E-mail: sch77890@yahoo.com.cn。

度,1%凝胶电泳确定 RNA 片段的完整性。取 1 μg 总 RNA 采用逆转录试剂盒(Thermo Scientific #K1622)进行 cDNA 合成。取 2 μL cDNA 作为模板,与 MMP-14 的引物混合,选用 GAPDH 作为内参照。将其引物置于 PCR 管内同时扩增,总反应体系 25 μL ,经过 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s,扩增 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。引物序列由引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,见表 1。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察产物特异条带,并采集图像用数码凝胶图像分析系统作条带密度扫描。将 MMP-14 与 GAPDH 的吸光度比值作为 MMP-14 mRNA 的相对值。

表 1 PCR 引物序列

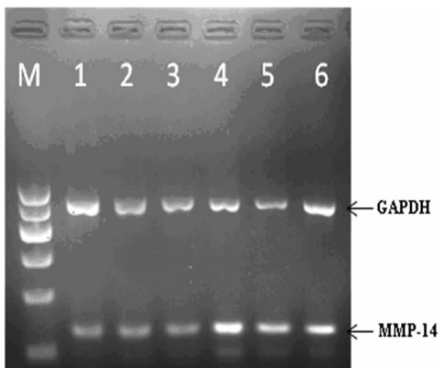
| 名称 | 引物(5'→3') | 产物长度 (bp) |
|--------|------------------------------|--------------|
| MMP-14 | 上游引物 CATGGCTAAACTGTGCATG | 126 |
| | 下游引物 GCAGGCCATAGGACTAGCC | |
| GAPDH | 上游引物 CAAGGTCATCCATGACAACCTTG | 496 |
| | 下游引物 GTCCACCACCTGTGTGCTGTAG | |

1.2.3 MMP-14 蛋白的检测 采用 ELISA 检测人关节滑液中 MMP-14 蛋白水平。MMP-14 试剂盒购于 MYBioSource 公司,关节滑液标本用 PBS 以 1:50 稀释后,操作严格按试剂盒说明书进行,用酶标仪在 450 nm 处读取吸光度值,并依照各自标准绘制标准曲线,计算 MMP-14 水平。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MMP-14 mRNA 在关节滑膜中的表达 58 例关节滑膜组织中均检测到 MMP-14 mRNA 的表达(图 1),将 MMP-14 的灰度值与 GAPDH 的比值作为 MMP-14 的相对表达量,结果显示 MMP-14 mRNA 在对照组与实验组患者滑膜组织中的相对表达量分别为 $0.244 0 \pm 0.061 4$ 、 $0.988 7 \pm 0.075 0$ ($t = 0$, $P < 0.05$)。



M: 标记物;1~3: 对照组;4~6: 实验组。

图 1 MMP-14 mRNA 在两组患者滑膜组织中的表达

2.1 MMP-14 蛋白在关节滑液中的水平 对照组关节滑液中 MMP-14 蛋白表达水平 (47.555 ± 7.121) ng/mL 高于实验组 (21.186 ± 4.502) ng/mL,差异有统计学意义 ($t = 17.164$, $P < 0.05$)。

3 讨 论

在 OA 的发展过程中,关节软骨的降解是其主要的病理改变,但是随着研究的不断深入扩展,已逐渐表明 OA 是整个关节的疾病,其中除了涉及软骨,还包括软骨下骨、半月板、关节滑膜及滑液等的各种改变(生理、生化、生物力学)均造成了 OA 的进一步恶化^[4]。而关节滑膜中 MMPs 的过多分泌,也进一步打破了整个关节微环境 MMP-TIMP 的平衡,除了造成关节滑膜本身局部的病理改变外,还进一步加剧了关节软骨细胞外基质的持续性降解,成为 OA 一系列退行性改变的重要原因。MMPs 除了能够降解细胞外基质,它还参与调解许多细胞外基质以外蛋白的活性^[5],诸如生长因子、细胞因子、趋化因子、细胞受体、丝氨酸拮抗剂以及其他的 MMPs^[6]。其中, MMP-14 是 MMPs 家族中的主要成员之一,是一种膜型蛋白酶,除了能够降解不同的细胞外基质成分,比如 I/II/III 型胶原以及纤连蛋白和层粘连蛋白外^[7],MMP-14 作为细胞表面的脱落酶还能够裂解许多膜型蛋白。目前研究的热点主要集中在 MMP-14 能够激活其他的 MMPs,其中主要包括 Pro-MMP-13 和 Pro-MMP-3。MMP-13 在 OA 软骨细胞的合成和分解代谢中起着重要的作用,主要降解 II 型胶原纤维,还有蛋白聚糖以及软骨中一些较大的蛋白多糖^[8],MMP-3 则分解软骨中其他的一些蛋白聚糖,包括链接蛋白、糖蛋白^[9],这些蛋白在维持蛋白聚糖和透明质酸形成的非共价键稳定结构中起着重要作用。这一过程促进了关节微环境中 MMP-13 和 MMP-3 的高表达,进一步加速了关节软骨的破坏。最新的研究表明, MMP-14 在软骨细胞的表面表达并且能够激活 Pro-MMP-2,通过 MMP-14 激活的 MMP-2 可以腐蚀软骨细胞周围所有的细胞外基质成分,包括蛋白聚糖^[10]。

以往对 MMP-14 的研究多集中在风湿性关节炎,认为 MMP-14 的高表达可以促使类风湿关节滑膜成纤维细胞侵入至关节软骨,导致关节结构的破坏^[11],而在 OA 滑膜中的深入研究较少。本课题前期研究表明,OA 滑膜中 MMP-14 的蛋白表达升高,并主要于滑膜衬里细胞细胞质中表达^[12]。本实验采用 RT-PCR 的方法从基因水平检测到滑膜组织中 MMP-14 mRNA 在实验组与对照组中的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$),表明在 OA 滑膜中 MMP-14 在基因水平也存在高表达,进一步说明 MMP-14 与 OA 有重要关系,可能有促进骨关节炎发展恶化的作用。另外,关节滑液作为关节滑膜与软骨之间的重要媒介之一,在 OA 的发展过程中也起着重要的作用,其中 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9、MMP-13 在滑液中高表达^[13],表明这些 MMPs 从滑膜或软骨中激活并迁移释放至关节液中,促使整个关节微环境中 MMP-TIMP 的平衡失调。而本实验滑液中 MMP-14 蛋白的表达低于对照组,表明 MMP-14 蛋白的表达主要发生在滑膜细胞内,并未大量分泌至关节滑液中,而滑液中 MMP-14 的低表达可能与其激活途径有关,通过诱导滑膜细胞中的 MMP-14 转移至细胞膜表面而发挥调节激活其他酶初始活化的作用,软骨细胞中 MMP-14 的激活过程可能也与滑液中低表达有关。从而表明 MMP-14 除了本身的细胞外基质降解作用之外,其激活活化调节作用在 OA 的发展过程中也至关重要。另外,MMP-14 在 OA 中研究较少,其原因是 MMP-14 基因敲除的小鼠在短期内均死亡,并

表现出与细胞外基质处理缺失相关的严重的发育畸形,这也表明 MMP-14 在整个细胞外基质代谢过程中的重要作用,但是其相关酶激活途径仍然有待进一步研究完善。

临床上对 OA 引起的关节疼痛常选择关节腔内注射透明质酸,而国外文献报道,透明质酸在 OA 滑膜中可以通过抑制 IL-1 β 诱导的 MMPs 的活性达到治疗目的^[14]。表明在滑膜组织中特异性的抑制或封闭 MMPs 的活性,可以为临床治疗 OA 提供一定的指导。

本研究从基因水平检测到 MMP-14 在 OA 滑膜组织中高表达,表明 MMP-14 自身在骨关节炎发生、发展过程中起着重要作用;而滑液中 MMP-14 蛋白的低表达可能与 MMP-14 的激活途径有关,通过其在滑膜细胞的膜性转移激活其他相关酶的活化,从而间接促进骨关节炎的恶化。因此,选择性的封闭或抑制 MMP-14 及相关的信号通路,有助于加强维持关节软骨乃至整个关节微环境的稳定。

参考文献:

- [1] Felson DT. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(2): 203-210.
- [2] Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, et al. Osteoarthritis; A disease of the joint as an organ [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(6): 1697-1707.
- [3] Dreier R, Grassel S, Fuchs S, 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]. *Exp Cell Res*, 2004, 297(4): 303-312.
- [4] Kato H, Matsumine A, Wakabayashi T, et al. Large-scale gene expression profiles, differentially represented in osteoarthritic synovium of the knee joint using cDNA microarray technology [J]. *Biomarkers*, 2007, 12(4): 384-402.
- [5] Butler GS, Overall CM. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(46): 10830-10845.
- [6] Strongin AY. Mislocalization and unconventional functions of

cellular MMPs in cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25(1): 87-98.

- [7] Giantin M, Aresu L, Benali S, et al. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours[J]. *J Comp Pathol*, 2012, 147(4): 419-429.
- [8] Rosa MB, Eleonora O, Stefania P, et al. MMP-13 loss associated with impaired ECM remodeling disrupts chondrocyte differentiation by concerted effects on multiple regulatory factors [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(8): 2370-2381.
- [9] Blom AB, van Lent PL, Libregts S, et al. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis; involvement of matrix metalloproteinase 3 [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(2): 147-157.
- [10] Osenkowski P, Toth M, Fridman R. Processing, shedding and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase(MT1-MMP)[J]. *J Cell Physiol*, 2004, 200(1): 2-10.
- [11] Itoh Y, Mary-Clare M, Hugh B. MT1-MMP is a crucial promoter of synovial invasion in human rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(3): 686.
- [12] 张杰, 王维山, 董金波, 等. 膜型基质金属蛋白酶-1 在骨性关节炎患者滑膜中的表达及意义[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(4): 494-497.
- [13] Krawetz R, Heard BJ, Martin L. Matrix Metalloproteinase protein expression profiles cannot distinguish between normal and early osteoarthritis synovial fluid [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2012, 13(2): 126-128.
- [14] Waddell DD, Kolomytkin OV, Dunn S, et al. Hyaluronan suppresses IL-1 β -induced metalloproteinase activity from synovial fluid[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2007, 465(3): 241-248.

(收稿日期: 2014-02-10 修回日期: 2014-03-14)

(上接第 2416 页)

- on myeloid cells-1 (TREM-1) in patients with septic arthritis or rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(11): 1768-1774.
- [10] Murakami Y, Akahoshi T, Aoki N, et al. Intervention of an inflammation amplifier, triggering receptor expressed on myeloid cells 1, for treatment of autoimmune arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(6): 1615-1623.
 - [11] Park JJ, Cheon JH, Kim BY, et al. Correlation of serum-soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 with clinical disease activity in inflammatory bowel dis-

ease[J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(7): 1525-1531.

- [12] Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, et al. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response[J]. *J Immunol*, 2003, 170(7): 3812-3818.
- [13] Marshall JC. SIRS and MODS; what is their relevance to the science and practice of intensive care[J]. *Shock*, 2000, 14(6): 586-589.

(收稿日期: 2014-02-16 修回日期: 2014-03-10)