

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

张 杰,王维山,董金波,杨 坚,何仁豪,史晨辉*

(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:探讨膜型基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP/MMP-14)在骨性关节炎(OA)患者膝关节滑膜中的表达和意义。方法:应用免疫组化和 Western blot 方法检测 MT1-MMP 蛋白在 40 例 OA 与 40 例非 OA 患者滑膜中的表达情况。结果:免疫组化结果表明 MT1-MMP 蛋白在 OA 与非 OA 患者滑膜中的表达有显著性差异($\chi^2 = 29.46, P < 0.01$),且阳性表达多定位于滑膜细胞的胞质;Western blot 分析结果显示 MT1-MMP 蛋白在 OA 患者滑膜(1.042 ± 0.219)中表达显著高于非 OA 患者滑膜组织($0.256 \pm 0.050, F = 12.838, P = 0.001$)。结论:MT1-MMP 蛋白与骨性关节炎发生发展相关,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;膜型基质金属蛋白酶-1;免疫组化;Western blot

[中图分类号] R684.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)04-494-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20130415

The expression and significance of MT1-MMP in the synovium of knee joint of patients with osteoarthritis

Zhang Jie, Wang Weishan, Dong Jinbo, Yang Jian, He Renhao, Shi Chenhui

(Department of Orthopedic Surgery, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and significance of MT1-MMP in the synovium of knee joint of patients with osteoarthritis. **Methods:** We detected the expression of MT1-MMP protein in 80 cases of osteoarthritis by using immunohistochemically and Western blot. **Results:** The expression of MT1-MMP protein in the synovium of knee joint of patients with osteoarthritis was markedly higher than that in the normal synovium ($\chi^2=29.46, P < 0.01$), and the MT1-MMP protein was mainly located in the cytoplasm; The results of Western blot showed that the expression of MT1-MMP protein in the synovium of knee joint of patients with osteoarthritis (1.042 ± 0.219) was significantly higher than that in the non-osteoarthritis ($0.256 \pm 0.050, F = 12.838, P = 0.001$). **Conclusion:** There is a close relation between the expression of MT1-MMP protein and OA, it may be the marker of diagnosis and the judgment of osteoarthritis.

[Key words] osteoarthritis; MT1-MMP; immunohistochemical; Western blot

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 494-497]

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]。长

期以来学术界对 OA 的关注主要集中在关节软骨和软骨细胞,很少有人注意 OA 滑膜的改变,即使滑膜炎也仅被看作 OA 的继发性改变。近年来越来越多的证据表明,OA 在某种程度上也表现出类似于类风湿性关节炎(rheumatic arthritis, RA)的炎症性改变^[2-4]。滑膜的炎症反应在有症状的 OA 患者中普遍存在,而且与临床表现出来的症状有关。到目前为止,OA 的发病机制尚不清楚,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

[基金项目] 国家自然科学基金(30960387);石河子大学科学技术研究发展计划(ZRKYB-16)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: sch7890@yahoo.com.cn

系日益受到医学界的重视^[3]。最近研究表明^[5]膜型基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP)不仅能直接降解细胞外基质(ECM)底物,而且可启动酶原激活(明胶酶 A、B)作用间接促进细胞外基质破坏,明胶酶 A、B^[6]已被证实 OA 患者滑膜中表达显著增高,但 MT1-MMP 在滑膜中的表达尚未见相关文献报道。因此本文拟通过免疫组织化学和 Western blot 方法检测 MT1-MMP 在 OA 患者滑膜中的表达情况,探讨其与骨性关节炎的相关性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

收集石河子大学第一附属医院 2010 年 9 月~2012 年 5 月在本科行膝关节镜、关节置换或截肢手术的患者滑膜标本共 80 例(实验组选择临床确诊为 OA 的患者 40 例;对照组选择单纯膝关节半月板损伤、滑膜皱襞综合征或者截肢的患者 40 例),男 49 例,女 31 例,年龄为 18~79 岁,中位年龄为 58 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。

Western blot 及免疫组化所用的 MT1-MMP 一抗为美国 Abcam 公司兔抗人单克隆抗体(Lot: GR36169-4),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过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)以及丹麦 Dako 公司的 Envision 试剂盒。

1.2 方 法

1.2.1 免疫组化染色方法

所有标本经 10%福尔马林固定,石蜡包埋,然后连续 4 μm 切片,免疫组化染色采用 Envision 法,MT1-MMP 一抗浓度为 1:200,抗原经高压修复,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知乳腺癌阳性组织为阳性对照。

结果判断:MT1-MMP 阳性染色为棕黄色颗粒,多定位于滑膜的细胞质。采用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,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,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 2 位

病理医师独立阅片,进行结果评定。

1.2.2 Western blot 方法

取新鲜标本约 100 mg,液氮低温研磨,加裂解液 80~100 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 ;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 MT1-MMP 兔抗人单克隆抗体(1:1 000 稀释)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过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗(1:30 000 稀释)室温下孵育 1 h,洗膜, ECL 化学发光检测杂交信号, X 线片压片曝光,采用 Quantity One 4.62 软件对电泳条带进行灰度分析, MT1-MMP 蛋白表达相对值=MT1-MMP 条带灰度值/同一标本 β -actin 灰度值。

1.3 统计学方法

将所得的数据应用 SPSS17.0 软件处理,所有计数资料采用 χ^2 检验,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组化检测滑膜中 MT1-MMP 的表达情况

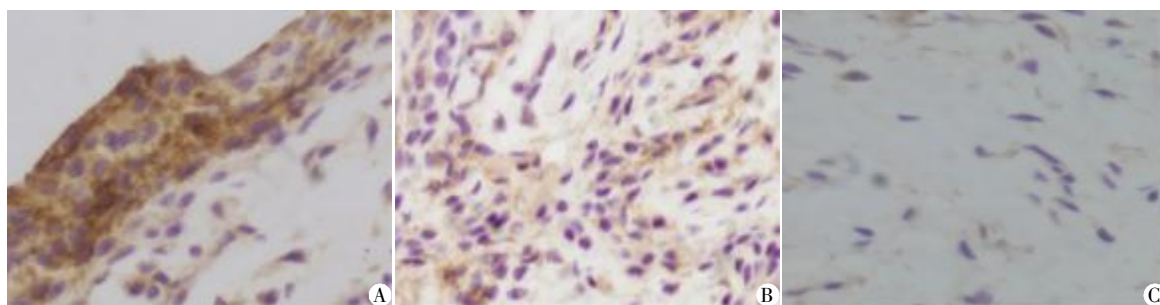
OA 患者滑膜组织中 MT1-MMP 蛋白的阳性表达主要定位于滑膜上皮细胞的胞质(图 1A),也可见于滑膜的间质(图 1B),而在非 OA 患者的滑膜组织中呈弱阳性表达(图 1C)。结果表明实验组滑膜组织中 MT1-MMP 的阳性细胞率(87.5%)与对照组(27.5%)比较有显著性差异($\chi^2 = 29.46, P < 0.01$)。

2.2 Western blot 检测滑膜中 MT1-MMP 表达情况

80 例滑膜组织中均可检测到 MT1-MMP 蛋白的表达,OA 患者滑膜组织中表达水平明显高于对照组(图 2)。将 MT1-MMP 的灰度值与 β -actin 的比值作为 MT1-MMP 的相对表达值,对所得数据进行统计分析,MT1-MMP 在非 OA 组与 OA 组患者滑膜组织中的相对表达量分别为 0.256 ± 0.05 和 1.042 ± 0.219 ($F = 12.838, P = 0.001$)。

3 讨 论

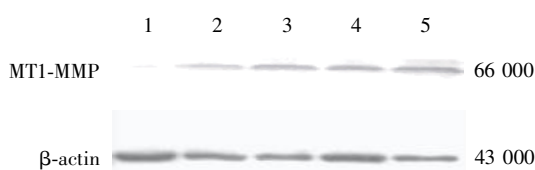
MT1-MMP 是 1994 年 Sato 等^[7]从人胚胎 cDNA 文库中筛选出的一条新基因,编码含 582 个氨基酸



A: MT1-MMP阳性表达多定位于滑膜的细胞浆;B: MT1-MMP阳性表达定位于细胞间质;C: MT1-MMP在正常滑膜呈弱阳性表达。

图 1 两组患者滑膜组织中 MT1-MMP 的表达(Envision 法,×400)

Figure 1 The expression of MT1-MMP protein in OA or normal synovial tissues(Envision,×400)



1:非 OA 患者滑膜组织;2-5:OA 患者滑膜。

图 2 MT1-MMP 在非 OA 与 OA 滑膜组织中的表达情况

Figure 2 The expression of MT1-MMP protein in normal or OA synovial tissues by Western blot

的蛋白质,它是 MMPs 家族中的一种特殊蛋白酶,除具有 MMPs 原型结构外,还具有羧基端穿膜区(TM)分布在细胞表面。本研究表明 MT1-MMP 蛋白在 OA 与非 OA 患者滑膜组织中均有表达,提示它可能参与了正常滑膜细胞的生长和发育,这与显示骨骼表型 MT1-MMP 缺陷的小鼠相一致^[8],MT1-MMP 的缺乏可导致小鼠结缔组织的严重异常,表现为身材矮小、骨量减少、纤维症、关节炎以及骨骼发育异常,缺乏溶胶原活性的变异小鼠发生韧带和肌腱进行性纤维化及骨囊性变,表明 MT1-MMP 在结缔组织的生长和发育过程中具有不可或缺的作用。而滑膜一旦发生炎症反应时 MT1-MMP 表达量显著增高,且与病变的过程呈正相关,过度表达的 MT1-MMP 可激活 MMP-2、MMP-13 并间接激活 MMP-9,有证据表明这 3 种蛋白在 OA 患者滑膜中均明显增高^[9-12],且产生的酶类又与 MT1-MMP 共同降解 I 型、II 型胶原、明胶以及纤维连接蛋白^[13],而软骨基质主要由胶原蛋白、多聚糖等组成。本文认为 OA 滑膜组织中上调的 MT1-MMP 可能通过多种途径调节酶类导致炎症介质的生成,从而改变关节内的理化性质,破坏正常状态下关节软骨基质分解代谢与合成代谢间的动态平衡,进而加速了分解代谢,使蛋白聚糖和

胶原等分解明显增加,最终导致关节软骨的损害,因此它可能是 OA 发生发展的一个重要枢纽。

本研究还发现部分对照组滑膜组织也有 MT1-MMP 明显表达,这可能因半月板损伤后疼痛以及碎裂的微粒等刺激引起的滑膜反应所致,对结果可能会有一定的影响,但这可以间接反映 OA 患者与非 OA 患者之间滑膜中 MT1-MMP 表达的情况。

研究结果表明 OA 患者滑膜组织中 MT1-MMP 蛋白的表达明显高于非 OA 患者,在一定程度上说明了它在骨关节炎发生发展中的重要作用,因此 MT1-MMP 可能成为 OA 诊断和治疗的一项有用指标,并且可能为 OA 的治疗提供一个新的靶点。通过干预 MT1-MMP 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

[2] Pearle AD, Scanzello CR, George S, et al. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, 15(5):516-523

[3] Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(9):1263-1267

[4] Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, et al. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee; correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(11):3492-3501

[5] 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(20): 303-312
- [6] 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
- [7] Sato H, Takino T, Okada Y, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells [J]. *Nature*, 1994, 370(19): 61-65
- [8] Zhou Z, Apte SS, Soininen R, et al. Tryggvason, impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (20): 4052-4057
- [9] Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover [J]. *Cell*, 1999, 99(1): 81-92
- [10] Wernicke D, Seyfert C, Hinzmann B, et al. Cloning of collagenase-3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *J Rheumatol*, 1996, 23(4): 590-597
- [11] 吕大鹏, 白伦浩, 孔冉冉. MMP-7、MMP-9 及其抑制剂 TIMP-3 在骨性关节炎患者滑膜中的表达和意义 [J]. *中国医科大学学报*, 2009, 38(4): 284-285
- [12] Gupta K, Shukla M, Cowland JB, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is expressed in osteoarthritis and forms a complex with matrix metalloproteinase 9 [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(10): 3326-3335
- [13] Borriukwanit K, Lafleur MA, Mercuri FA, et al. The type I collagen induction of MT1-MMP-mediated MMP-2 activation is repressed by alphavbeta in human breast cancer cells [J]. *Matrix Biol*, 2007, 26(4): 291-305

[收稿日期] 2012-11-05

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》编辑部
荣获第四届江苏省科技期刊“金马奖”优秀团队奖!