

# 大鼠 DDH 关节软骨早期退变和 X 型胶原、基质金属蛋白酶 13 表达相关性的研究

张思成,袁亮,宁波,孙军

**摘要** 目的 检测 X 型胶原、基质金属蛋白酶 13 (MMP-13) 在发育性髋关节发育不良 (DDH) 大鼠模型不同时期关节软骨中表达的改变情况,探讨 X 型胶原、MMP-13 与软骨早期退变的相关性。方法 选取新生 Wistar 大鼠 80 只,随机均等分成 DDH 组和对照组。DDH 组新生大鼠后肢襁褓位固定 10 d 后解除固定继续饲养,分别于鼠的 2、4、6、8 周龄处死,离断髋关节,观察髋关节软骨的大体形态。用免疫组化和 qRT-PCR 法检测 X 型胶原、MMP-13 的表达。结果 DDH 模型鼠的尸体解剖样本显示关节囊增厚,髋臼表面呈不规则、不平整,股骨头扁平且发育较小,头臼包容差,尤其 4 周后更明显;与对照组相比,在髋关节软骨浅表区域有较高的 X 型胶原和 MMP-13 表达 ( $P < 0.05$ ),并且这种增长是随着年龄增长而增长的。X 型胶原和 MMP-13 的 mRNA 表达显示出相似的结果 ( $P < 0.05$ )。结论 DDH 模型鼠在较早阶段出现软骨退化,随着年龄逐渐加重;X 型胶原和 MMP-13 表达与 DDH 软骨早期退变有密切的关系。

**关键词** 发育性髋关节发育不良;关节软骨退变;大鼠;骨性关节炎

中图分类号 R 726.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0765-05

发育性髋关节发育不良 (developmental dysplasia of the hip, DDH) 是最常见的儿童畸形之一<sup>[1]</sup>,随着年龄的增长,许多患者出现典型的骨性关节炎表现,部分患者甚至中年前即需要行髋关节置换。尽管在早期给予充分适当的治疗,其远期退化性骨性关节炎的发病率仍明显高于正常人群<sup>[2]</sup>。推测 DDH 早期关节软骨可能发生了退变。有研究<sup>[3]</sup>表明, X 型胶原的表达异常与骨性关节炎发生可能有相关性。基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinases-13, MMP-13) 是降解软骨细胞外基质主要酶系<sup>[4]</sup>,有文献<sup>[5]</sup>报道胶原蛋白 II 主要是被 MMP-13 分解。该研究主要观察 DDH 大鼠模型髋关节不同时期软骨形态改变及软骨中 X 型胶原、MMP-13 的表达改变,探讨 DDH 早期软骨是否发生了退变及与 X 型胶原和 MMP-13 之间是否有关。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 实验 Wistar 新生大鼠 (安徽医科大学

2015-04-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金 (编号:1408085QH153)

作者单位:安徽医科大学儿科临床学院 (安徽省儿童医院) 骨科,合肥 230022

作者简介:张思成,男,硕士研究生;

孙军,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: sunjun500@aliyun.com

expression level in rennin-angiotensin system, and retinal nerve cells apoptosis in the process of diabetic retinopathy, in order to explore the relationship between the PRR receptor and retinal nerve cells apoptosis in diabetic rats. **Methods** First, we built the diabetic rat model by using streptozocin. Second, the expressions of CD14 and 8-OHdG were detected by immunohistochemical. Third, the mRNA expressions of AT2R and PRR after 4, 8 and 12 weeks of diabetes and normal control group were detected, respectively. Last, the levels of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, p-ERK1/2 proteins were measured by Western blot. **Results** AT2R and PRR mRNA expression levels in diabetes groups were higher than the control group significantly, and the expression level was increasing with the extension of the course ( $P < 0.05$ ). The longer the course of the disease, the more rats retinal cells apoptosis in diabetes group. There were less new blood vessels in diabetes group as the CD14 dyeing was negative. Through correlation analysis, PRR and AT2R expression levels were associated with the ganglion cell apoptosis. In diabetes groups ERK1/2, p-ERK1/2 protein expressions were significantly higher than the control group. **Conclusion** AT2R and PRR mRNA expression levels are related with the cell apoptosis of rats with diabetic retinopathy. RAS may play a key role in diabetic retinopathy through increasing the phosphorylation of ERK level. **Key words** diabetic retinopathy; renin-angiotensin system; ERK signal path

动物实验室);试剂:MMP-13 小鼠抗单克隆抗体(美国 Lifespan 公司);X 型胶原兔抗多克隆抗体(英国 Abcam 公司);二抗:Detection Kit(丹麦 DAKO 公司);RNA 提取试剂 TRIzol(美国 Invitrogen 公司);ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒、SYBR Green Real-time PCR Masrer MiX(日本 TOYOBO 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本制备** 选取新生 Wistar 大鼠 80 只,随机分成 DDH 组( $n=40$ )和对照组( $n=40$ )。DDH 组大鼠后肢髌裸位固定(图 1) 10 d 后解除固定继续饲养<sup>[6]</sup>,饲养方法相同。DDH 组和对照组每次各 10 只大鼠分别于 2、4、6、8 周龄全麻处死,离断髌关节,观察髌关节软骨的大体形态,并留用于后面实验。

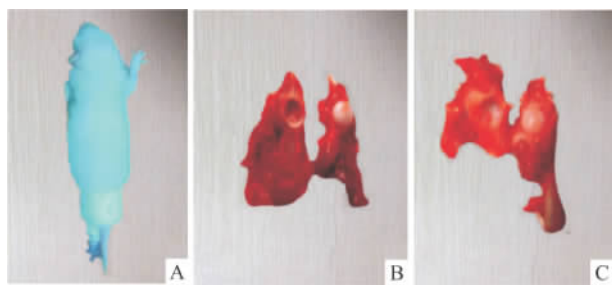


图 1 DDH 大鼠模型及髌关节大体外观

A:制作 DDH 模型的方法;B:8 周龄对照组正常大鼠的髌关节;C:8 周龄 DDH 组髌关节

**1.2.2 免疫组化** 所得髌关节在 4% 的多聚甲醛中固定,10% EDTA 中进行脱钙,直到完全脱钙,然后石蜡包埋。每个关节取来自不同深度 10 个具有代表性的切面( $5\text{ }\mu\text{m}$ )切片,室温下使用二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,再使用磷酸盐缓冲液清洗 3 次,每次 5 min。使用 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  进行内源性过氧化物酶活性阻断 10 min,然后将切片在 0.01 mol/L 柠檬酸抗原修复液(pH 6.0)中通过微波进行抗原修复 10 min,冷却后 PBS 液冲洗,山羊血清封闭非特异性抗体。滴加一抗(1:50 稀释的单克隆兔抗 X 型胶原或抗 MMP-13)在 4℃ 的温度下过夜孵育。在阴性对照反应中不加上述一抗,用 PBS 代替;然后根据二抗试剂盒(DAKO)说明,对切片进行处理,DAB 显色 5~10 min,苏木精复染、脱水、透明、封片。通过从每个切片的单位面积中随机抽取的 5 个区域所计算出的细胞数来决定每单位区域的软骨细胞数。通过物镜 40 倍镜下来计算阳性软骨细胞的比例,并以此作为结果的表达。

**1.2.3 RNA 提取与 qRT-PCR** 总组织和细胞的

RNA 通过使用 TRIzol 试剂盒提示步骤进行提取。提取的 RNA 的纯度和浓度,用分光光度计测量  $\text{OD}_{260/280}$  来确定纯度。琼脂糖凝胶电泳,评价 RNA 的完整性。取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA,利用 ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒逆转录生成 cDNA,用分光光度计测量  $\text{OD}_{260/280}$  来确定 cDNA 纯度。利用 SYBR Green Realtime PCR Masrer MiX 试剂盒对 cDNA 进行扩增。引物如下,X 型胶原上游引物 5'-GATCATG-GAGCTCACGGAAAA-3',下游引物 5'-CCGTTCGAT-TCCGCATTG-3';MMP-13 上游引物 5'-TACGAG-CATCCATCCCCGAGACC-3',下游引物 5'-AACCG-CAGCACTGAGCCTTTTC-3'。结果用相对定量法( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ )表示。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间行方差分析。

## 2 结果

**2.1 大体形态学观察** DDH 组模型 40 例均制作成功。解剖样本显示:DDH 组关节囊增厚,髌臼软骨表面呈不规则扁平,失去平滑性;股骨头扁平、发育不良,与相应的髌臼形成头大白小包容不全的关节;髌臼与股骨头的发育均较小,这些改变随着年龄增加逐渐加重;而对照组关节并无上述病例改变(图 1)。

**2.2 关节软骨中 X 型胶原及 MMP-13 的表达** 随着年龄增长,DDH 组中软骨浅层出现裂隙,细胞数目减少,排列紊乱;软骨细胞成簇样改变,失去了正常的软骨表型,与软骨退变表型相似。软骨退变指标 X 型胶原的免疫组织化学具体表现见图 2。在 2 周时,两组间表达量的相似;然而 4 周后,相对于对照组,DDH 模型在关节软骨中的表达更加显著(图 3)。而其 mRNA 表达相似的结果(图 4),在 4、6、8 周龄两组差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。X 型胶原不同周龄免疫组化、mRNA 方差分析( $F = 0.020$ 、32.686、34.499、42.965,  $F = 0.414$ 、41.256、325.848、440.800)。MMP-13 的免疫组化见图 2。对照组中,在各年龄都未检出 MMP-13 的表达;相反在 DDH 模型中,其表达随着年龄不断增加(图 3),在 4、6、8 周特别明显。而其 mRNA 表达相似的结果(图 4),在 4、6、8 周龄两组差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。MMP-13 不同周龄免疫组化、mRNA 方差分析( $F = 0.096$ 、20.568、41.768、35.871,  $F = 0.135$ 、240.849、437.546、737.042)。MMP-13 的表达随着年龄的增加基本保持增加,而 X 型胶原蛋白

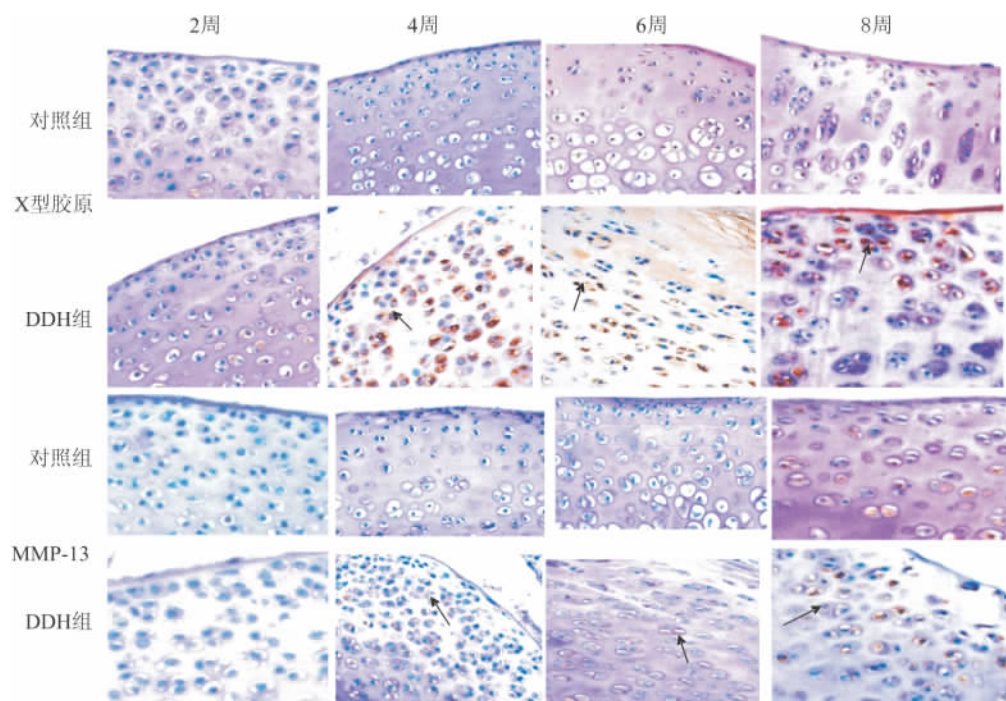


图2 DDH组与对照组不同周龄X型胶原、MMP-13免疫组化结果(箭头示阳性) ×400

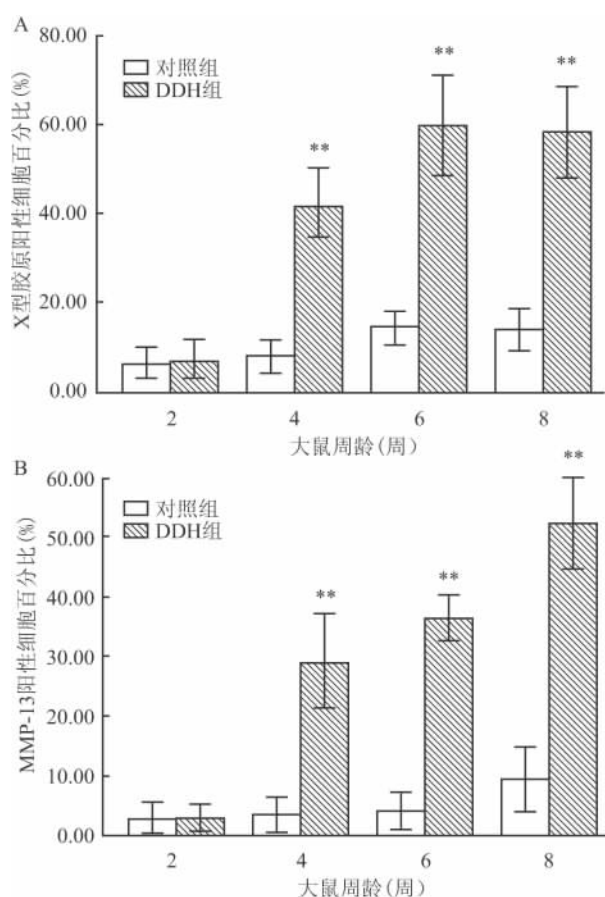


图3 DDH组与对照组不同周龄免疫组化

A:X型胶原免疫组化阳性细胞百分比;B:MMP-13阳性细胞百分比;与对照组比较:\*\* $P < 0.01$

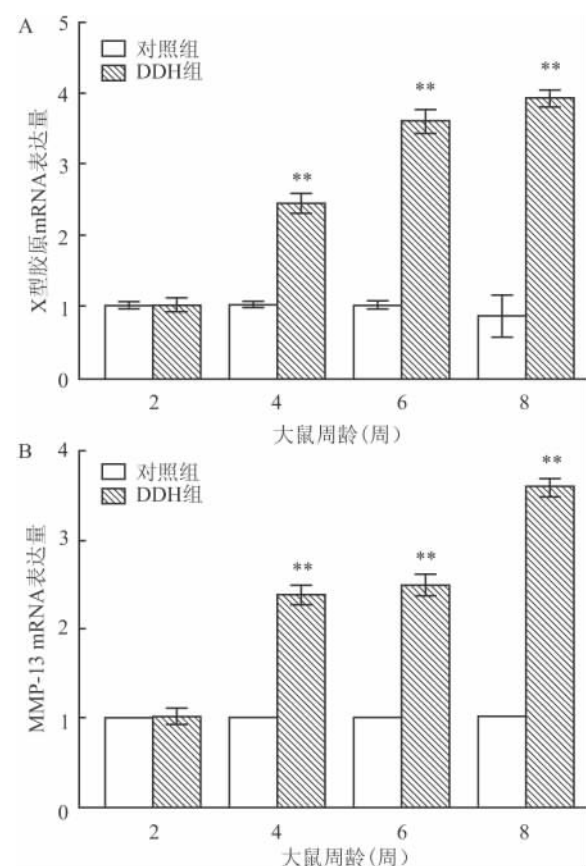


图4 DDH组与对照组不同周龄的mRNA表达

A:X型胶原 mRNA 表达;B:MMP-13 mRNA 表达;与对照组比较:\*\* $P < 0.01$

在后期(6~8周龄)增加不明显。

### 3 讨论

DDH是一种最常见的畸形之一,然而,这种疾病治疗是非常困难的。尽管在疾病早期给予充分适当的治疗,但其远期退化性骨性关节炎的发病率仍比正常群体高<sup>[7]</sup>。骨性关节炎通常是由于关节软骨受损,导致关节功能的严重丧失<sup>[8]</sup>。骨性关节炎一般表现为软骨的发育不良和退变<sup>[9]</sup>;然而,DDH并发骨性关节炎样表现的相关软骨发育和退化的分子机制仍不明确。从DDH患者中获得软骨比较困难,因此,在此次研究中,根据襁褓体位好发髋关节脱位,将新生鼠的后肢固定在伸直、内收的直腿襁褓位置获得试验模型。已有许多固定动物髋关节成功获得DDH模型的研究<sup>[6,10]</sup>。大鼠与人类髋关节对应关系是:在2周(相当于人类的学步期)4周(5~7岁)6周(9~11岁)8周(13~16岁)<sup>[11]</sup>。本研究DDH组大鼠全部制作成功,大体形态学观察到关节囊增厚,股骨头脱出与关节之外,头臼不称,其髋关节改变和人类DDH患儿髋关节病理改变一致。

正常的关节软骨是透明软骨,由少量的软骨细胞和丰富的细胞外基质构成,软骨细胞约占1%,散在细胞基质中并受到其调节和保护,细胞基质是由软骨细胞合成、分泌、降解的。正常情况下软骨细胞基质合成和降解处于动态平衡状态。正常的软骨细胞合成分泌Ⅱ、Ⅸ、Ⅺ型胶原蛋白,其中Ⅱ型胶原蛋白最多,占细胞基质的90%<sup>[8]</sup>。Ⅱ胶原纤维直径为10~20 nm,周期性横纹不明显,交织形成三维网状,在关节软骨表面,有维持软骨的机械稳定性的作用<sup>[12]</sup>。正常关节软骨细胞为静止的,不再成熟,并维持一定的生理状态。

MMPs存在于正常人体,是一类能够降解细胞外基质蛋白酶,是软骨基质降解、骨吸收的关键酶。MMPs酶系之间可以相互激活,形成瀑布效应,在胚胎发育、组织重塑中起着不可替代的作用,也具有重要的病理意义,软骨细胞产生的多种细胞因子可通过对MMPs调控而影响软骨代谢<sup>[4]</sup>。有文献<sup>[5,13]</sup>报道胶原蛋白Ⅱ主要是被MMP-13分解,在人类OA关节中MMP-13表达明显增高。

在骨性关节炎早期,关节软骨退变的早期机制是以关节软骨不合时宜的成熟,软骨细胞多为肥大软骨细胞,主要分泌X型胶原<sup>[14]</sup>。在成人骨性关节炎软骨中X型胶原明显增多<sup>[15]</sup>。

本研究中观察到DDH组髋臼及股骨头发育不

良,相互包容差,并随着年龄的增长逐渐加重。关节软骨切片可以观察到软骨细胞排列紊乱,浅层出现裂隙等软骨退变早期改变,并随着年龄的增长而加重,说明在髋关节发生脱位的情况下,不仅髋臼及股骨头发育受到影响,而且早期可能发生了退行性改变,而这种退变改变随着脱位时间的延长而逐渐加重。影响关节软骨细胞合成代谢、分解代谢平衡的两个关键因子:X型胶原、MMP-13在大鼠4周龄(相当于人类儿童期)开始出现明显高表达,随着年龄增长而到8周龄(相当于人类性成熟期)表达更高;这说明在DDH鼠早期髋关节软骨细胞即出现退变。提示DDH患者虽在早期予以恰当治疗后得到同心复位关节,但从细胞分子微观上有明显的改变,可能导致早期关节软骨退变的发生,并且是最终引起远期骨性关节炎发病提前且症状较重的原因。同时X型胶原、MMP-13改变在时间上呈正相关性,可能是由于髋关节脱位状态,软骨细胞受到异常应力导致软骨细胞分泌的细胞基质改变,如X型胶原表达增加。这些异常的细胞基质可能通过某些机制激活了细胞基质降解的MMPs,本实验中后期(6~8周龄)X型胶原的增长速度下降可能与MMPs激活增加分解加快有关,其中的因果关系还有待进一步证实。而这些酶系最后激活了MMP-13,MMP-13的高表达会导致关节软骨内Ⅱ型胶原降解,破坏了软骨的稳定性,从而加重了软骨的退行性变。而这两者与DDH关节软骨退变的关系有待进一步研究。

本研究表明DDH模型鼠的关节软骨存在早期退化。这些结果为DDH患者出现较高的骨性关节炎发病率提供了新的研究思路。需要进一步研究软骨细胞的分子基础改变来探索DDH关节软骨早期退化的机制。为预防和减少DDH患者出现早期髋关节骨性关节炎提供理论基础。

### 参考文献

- [1] Stein-Zamir C, Volovik I, Rishpon S, et al. Developmental dysplasia of the hip: risk markers, clinical screening and outcome[J]. *Pediatr Int* 2008;50(3):341-5.
- [2] Thomas S R, Wedge J H, Salter R B. Outcome at forty-five years after open reduction and innominate osteotomy for late-presenting developmental dislocation of the hip[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2007;89(11):2341-50.
- [3] Martel-pelletier J, Boileau C, Pelletier J P, et al. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2008;22(2):351-84.
- [4] Bramono D S, Richmond J C, Weitzel P P, et al. Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics[J]. *Clin Or-*

- thop Relat Res ,2004 (428) :272 – 85.
- [5] Glasson S S , Askew R , Sheppard B , et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis [J]. *Nature* 2005 ,434 (7033) :644 – 8.
- [6] 赵小明,王恩波,李建军,等. 下肢伸直襻体位对髌臼软骨复合体发育影响的实验研究 [J]. *中国当代儿科杂志* 2009 ,11 (10) :836 – 40.
- [7] da Silva M A , Yamada N , Clarke N M , et al. Cellular and epigenetic features of a young healthy and a young osteoarthritic cartilage compared with aged control and OA cartilage [J]. *J Orthop Res* , 2009 27 (5) :593 – 601.
- [8] Martel-Pelletier J , Boileau C , Pelletier J P , et al. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008 22 (2) :351 – 84.
- [9] Brandt K D , Dieppe P , Radin E L. Etiopathogenesis of osteoarthritis [J]. *Rheum Dis Clin North Am* 2008 34 (3) :531 – 59.
- [10] Senaran H , Ozdemir H M , Ogiin T C , et al. Value of limited hip abduction in developmental dysplasia of the hip [J]. *Pediatr Int* , 2004 46 (4) :456 – 8.
- [11] Bo N , Peng W , Xinghong P , et al. Early cartilage degeneration in a rat experimental model of developmental dysplasia of the hip [J]. *Connect Tissue Res* ,2012 53 (6) :513 – 20.
- [12] Wess T J. Collagen fibril form and function [J]. *Adv Protein Chem* , 2005 70 :341 – 74.
- [13] Brew C J , Clegg P D , Boot-Handford R P , et al. Gene expression in human chondrocytes in late osteoarthritis is changed in both fibrillated and intact cartilage without evidence of generalised chondrocyte hypertrophy [J]. *Ann Rheum Dis* ,2010 69 (1) :234 – 40.
- [14] Garvican E R , Vaughan-Thomas A , Innes J F , et al. Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of collagen degradation and synthesis [J]. *Vet J* 2010 ,185 (1) :36 – 42.
- [15] Goldring M B , Goldring S R. Osteoarthritis [J]. *J Cell Physiol* , 2007 213 (3) :626 – 34.

## The correlation research among early articular cartilage degeneration and type X collagen , matrix metalloproteinase – 13 expression in rats DDH model

Zhang Sicheng ,Yuan Liang ,Ning Bo , et al

(*Dept of Orthopaedics ,Anhui Provincial Children's Hospital ,Hefei 230022*)

**Abstract Objective** To detect the changes of expressions of X type collagen and matrix metalloproteinases-13 (MMP-13) of acetabular cartilage in the different stages of developmental dysplasia of the hip (DDH) and to investigate the relevance between type X collagen , MMP-13 and the retrogression mechanism of acetabular cartilage.

**Methods** 80 neonatal Wistar rats were randomly divided into DDH group ( $n = 40$ ) and control group ( $n = 40$ ). The DDH model was induced by fixation on both hips and knees for ten days and continued to be raised after relieving fixation. Those rats were sacrificed at age of 2 ,4 ,6 ,8 weeks respectively. The hips were isolated from the DDH model rats and an untreated control group for gross morphometry. Meanwhile ,collagen X and matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) were detected by quantitative RT-PCR and immunofluorescence.

**Results** Necropsy specimens of DDH model rats showed thickening of the capsule. The acetabular surface was irregularly flat and had lost its smoothness. Flat and underdeveloped femoral head were observed as well. We also found the acetabulum and femoral head became smaller with poorer containment particularly after 4 weeks of age. Collagen X and MMP-13 expressions were higher in the superficial zone of hip cartilage of DDH rats than in that of controls ( $P < 0.05$ ) , and the increase was age-dependent. mRNA expression of Collagen X and MMP-13 showed similar results ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** This study shows that degenerative cartilage changes occur at an early stage in the rats of the DDH model and become aggravated with age , which are closely associated with collagen X and MMP-13.

**Key words** developmental dysplasia of the hip; articular cartilage degeneration; rat; osteoarthritis