

MMP-13 在早期股骨头坏死滑膜中的表达

王斯晟¹ 桂斌捷¹ 周 健² 王 刚²

摘要 目的 分析早期股骨头坏死(ONFH)患者滑膜中基质金属蛋白酶-13(MMP-13)的表达,探讨其在ONFH病情进展中的作用。方法 选取30例早期ONFH患者(坏死组)、30例髋关节骨性关节炎(OA)患者(OA组)、30例股骨颈骨折患者(骨折组),术中取滑膜组织,采用免疫组织化学技术检测滑膜中MMP-13蛋白的表达及滑膜形态学改变,并采用RT-PCR技术检测滑膜中MMP-13 mRNA的表达水平。结果

免疫组化结果显示,MMP-13蛋白于坏死组及OA组中表达与骨折组中表达差异有统计学意义($P < 0.05$),而坏死组与OA组间差异无统计学意义($P > 0.05$);RT-PCR结果显示坏死组与OA组的MMP-13 mRNA表达量差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MMP-13蛋白与mRNA在坏死组与OA组中呈高表达,表明两者可能有着相同的滑膜病变机制,但坏死组mRNA表达较OA组更高,表明滑膜病变的程度可能存在差异。

关键词 股骨头坏死;滑膜;基质金属蛋白酶-13;免疫组化;RT-PCR

中图分类号 R 681.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0502-04

目前股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)的研究多集中于股骨头骨质及软骨结构的改变,而临床工作中发现ONFH患者在股骨头塌陷之前已经出现了滑膜反应,如关节滑液增多、滑膜增生、滑膜侵蚀软骨等炎性改变^[1]。因此,滑膜在ONFH,特别是坏死早期的作用仍需进一步研究。基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinases-13, MMP-13)在骨性关节炎(osteoarthritis, OA)患者的滑膜中广泛表达,启动早期的软骨破坏机制^[2]。该实验通过检测滑膜中MMP-13蛋白和mRNA的表达及滑膜形态学改变,以进一步了解ONFH早期的滑膜病理改变,并为ONFH早期针对滑膜病变的相关治疗提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源 滑膜样本收集自安徽医科大学第

2013-12-20 接收

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 骨关节外科,² 骨科一病区,合肥 230022

作者简介:王斯晟,男,硕士研究生;

桂斌捷,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: guibinjie@163.com

一附属医院骨关节外科于2011年9月~2013年6月间就诊并手术的患者。坏死组:30例ONFH患者,男14例,女16例,年龄22~38(28 ± 7)岁,ONFH患者诊断均遵循2012版成人ONFH诊疗标准专家共识所提出的诊断标准^[3],均依据X线片及MRI确定ONFH处于Ficat I或II期。并于患者行游离腓骨移植术时切取滑膜。OA组:30例髋关节OA患者,男15例,女15例,年龄60~78(69 ± 8)岁,髋关节OA患者均遵循2012版成人ONFH诊疗标准专家共识所提出的诊断标准予以排除由ONFH所致的髋骨性关节炎,依据影像学Kellgren-Lawrence分级法显示2~3级改变。患者无内分泌、免疫系统、代谢性、肿瘤或其他炎症性疾病,无激素服用史,术前无长期服用非甾体抗炎类药物史。于行人工全髋关节置换术时切取滑膜。骨折组:30例股骨颈骨折病患者,男15例,女15例,年龄62~70(65 ± 4)岁,股骨颈骨折患者均排除髋骨性关节炎病史。患者无内分泌、免疫系统、代谢性、肿瘤或其他炎症性疾病,无激素服用史。于患者行人工股骨头置换术时切取滑膜。所有标本均收集2份,1份予10%甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋后保存;1份迅速至于RNALOCKER液中4℃过夜后,弃保护液,液氮保存。

1.2 仪器与试剂 兔抗人MMP-13抗体试剂购自美国Bioworld Technology公司;PV-6000两步法免疫组化检测试剂购自美国GBI公司;Oligo DT、Radom primer、dNTP、5×反转录buffer、RNase Inhibitor、反转录酶、SYBR Green Kit、RNAiso、DNA Marker DL1000试剂购自日本TaKaRa公司;DEPC购自美国Sigma公司;分光光度计、冷冻离心机购自美国Thermo公司;9600型PCR仪、9700型Real-Time PCR仪购自美国ABI公司;凝胶成像系统购自英国Alpha Innotch公司;凝胶电泳仪设备购自北京六一仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化 取各组标本蜡块予4 μm连续切片,常规脱蜡至水,予HE染色及免疫组化PV两步法染色,以OA组染色组织切片为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照。判断标准以细胞内出

现棕黄色阳性颗粒为阳性表达。每张玻片随机计数 10 个高倍镜视野($\times 400$), 计算阳性细胞占视野内细胞总数的百分比。根据细胞数量对阳性程度进行分级: 阳性细胞数量 0% ~ 10% 为阴性(-), 阳性细胞数量 11% ~ 25% 为弱阳性(+), 阳性细胞数量 26% ~ 50% 为阳性(++), 阳性细胞数量 51% ~ 100% 为强阳性(+++)

1.3.2 MMP-13 mRNA 提取与检测 采用 TRIzol 法提取滑膜成纤维细胞总 RNA。取 2 μ l RNA 反转录成 cDNA, 逆转录条件为: 42 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 2 min。取 2 μ l cDNA 进行 PCR 反应, 以 β -actin 为内参照。PCR 反应引物由上海生工公司合成: 目的基因 MMP-13 上游为: 5'-TGCTGCATTCTCCTTCAG-GA-3', 下游为: 5'-ATGCATCCAGGGTCTGGC-3', 产物片段 183 bp; 内参基因 β -actin 上游为: 5'-TG-GACATCCGCAAAGACCTGTAC-3', 下游为: 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTGA-3', 产物片段 142 bp。PCR 体系反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环, 终延伸 72 $^{\circ}$ C 7 min。取 2 μ l PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。电泳条带清晰, 且与理论值相同后, 取上下游引物各 1 μ l, cDNA 2 μ l, DEPC 水 6 μ l, SYBR Green 10 μ l 于 Real-Time PCR 仪中, 经预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 36 个循环, 测得 Ct 值。RT-PCR 结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值计算相对表达量。Ct 值为样本达到一定拷贝数时所需的循环次数, 以样本目的基因的 Ct 值减去样本内参 Ct 值为 ΔCt , 以目的基因 ΔCt 减去对照基因 ΔCt 为 $-\Delta\Delta Ct$, 以此计算相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。等级资料组间差异采用秩和检验。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数采用 t 检验。

2 结果

2.1 免疫组化结果 标本中 MMP-13 蛋白阳性信号表达呈棕黄色或棕褐色颗粒, 主要位于胞质, 少数可见胞核着色。骨折组的滑膜组织中, MMP-13 仅见于少许滑膜细胞中表达。在 OA 组中可见 MMP-13 主要表达于滑膜衬里层细胞、间质炎性细胞及血管内皮细胞, 其阳性程度及细胞数量显著增加。而坏死组中表达与 OA 组类似, MMP-13 的阳性程度及细胞数量呈高表达, 见表 1、图 1。统计学分析显示, 经 Kruskal-Wallis 检验, 组间差异有统计学意义(χ^2

$= 17.758, P < 0.05$)。经过秩次转换后, 组间方差分析显示, 骨折组与 OA 组间、骨折组与坏死组间差异有统计学意义($P < 0.05$), OA 组与坏死组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 MMP-13 蛋白表达强度($n = 30$)

组别	MMP-13 表达强度				阳性率 (%)
	-	+	++	+++	
坏死	3	3	10	14	90.0
OA	2	2	14	12	93.3
骨折	16	13	1	0	46.7

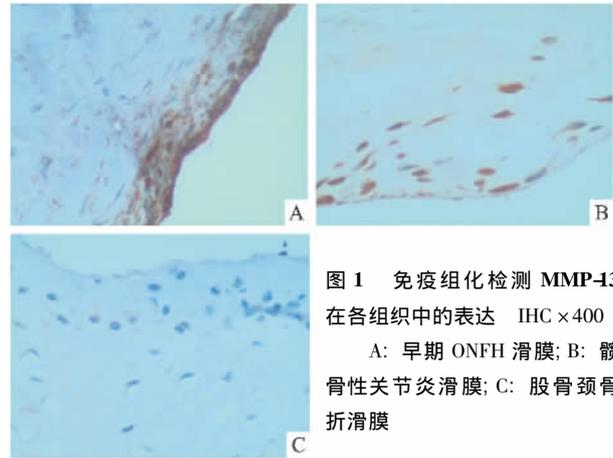


图 1 免疫组化检测 MMP-13 在各组织中的表达 IHC $\times 400$
A: 早期 ONFH 滑膜; B: 髌骨性关节炎滑膜; C: 股骨颈骨折滑膜

2.2 RT-PCR 结果 扩增产物凝胶电泳结果见图 2。经免疫组化分析显示骨折组滑膜形态接近正常滑膜组织, MMP-13 仅见少量表达与滑膜细胞中。因此以骨折组为阴性对照组, 计算坏死组与 OA 组的 MMP-13 相对表达量, 并比较。坏死组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值为 6.941 ± 0.843 , OA 组坏死组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值为 6.074 ± 0.893 。独立样本 t 检验分析显示, 两组间 MMP-13 相对表达量差异有统计学意义($P < 0.05$)。

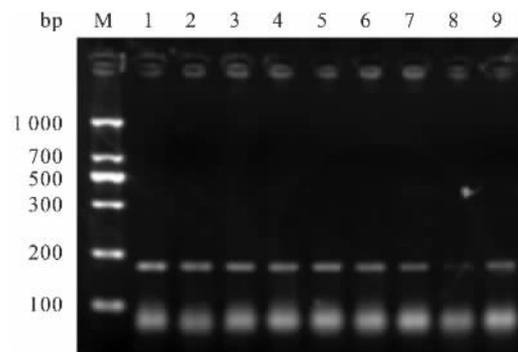


图 2 MMP-13 PCR 扩增产物电泳图

M: Marker DL 1000; 1, 2, 3: 坏死组; 4, 5, 6: OA 组; 7, 8, 9: 骨折组

3 讨论

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases,

MMPs) 是一类广泛存在于各结缔组织中,在细胞外基质的生理性和病理性降解过程中起重要作用的蛋白酶超家族。MMPs 在正常细胞中的表达很低,但在 OA 中, MMPs 则主要由软骨细胞、滑膜成纤维细胞所表达,造成结缔组织的破坏,从而启动 OA 的最早期改变^[4]。其中 MMP-13 特异性降解 II 型胶原,而关节软骨基质中最具特征,含量最多的是 II 型胶原。MMP-13 通过破坏胶原肽链 GLY794-Leu795 之间的肽链进而降解 II 型胶原纤维,继而破坏软骨间的拱形结构,最终造成关节软骨破坏。同时其他许多 MMP 亚型对 II 型胶原的降解需要通过 MMP-13 起作用。因此, MMP-13 成为目前骨关节疾病研究中的重点研究的靶向分子^[2,5]。

本实验通过免疫组化及 RT-PCR 技术,同时检测 ONFH 早期患者髋关节滑膜中 MMP-13 蛋白以及 mRNA 的表达,并与未发生 OA 患者(骨折组)以及已发生 OA 患者(OA 组)的髋关节滑膜中 MMP-13 蛋白以及 mRNA 的表达进行对比。因临床手术指征对年龄的限制,无法排除组别间年龄的统计学差异。但有研究^[6-7]表明,成年患者中 MMP-13 的表达与滑膜炎程度相关,而与年龄及性别无显著相关性,或仅作为混杂因素存在。而 3 组患者经术前检查均已排除合并其他炎性疾病影响,近期均无激素或非甾体类药物服用史。因此,实验结果仅与疾病引起的滑膜病变程度相关。免疫组化结果显示 ONFH 早期滑膜已出现了与 OA 类似的滑膜改变, MMP-13 的阳性表达明显高于骨折组,与 OA 组间无显著差异。这表明 ONFH 早期的滑膜可能已经出现了与 OA 滑膜类似的病理改变,并且滑膜的病理改变已经对软骨造成了破坏。滑膜的炎性改变在 OA 中起着重要作用,但单一的急性滑膜炎并不能诱发 OA 的发生,只有在出现关节不稳的因素时,才能导致 OA 的发生。而一旦 OA 形成后,引起了继发性的滑膜炎,滑膜炎便会成为 OA 继续发展的主要因素^[8]。正常的滑膜组织中 MMPs 与组织蛋白酶抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP)的生成呈动态平衡。当滑膜炎时, MMPs 与 TIMPs 间的动态平衡被打破。滑膜细胞大量表达 MMPs,因此 MMP-13 表达增高^[9]。ONFH 患者早期即出现 MMP-13 表达增高,表明 ONFH 在早期即出现了类似于 OA 的滑膜炎性病变。

本实验 RT-PCR 结果显示 ONFH 早期患者滑膜中 MMP-13 的 mRNA 表达较 OA 组更高。这表明,虽然 ONFH 与 OA 有着相似的滑膜病理改变,但滑

膜病变的程度可能仍有不同, ONFH 在早期可能出现了更加严重的滑膜反应。这可能与 ONFH 的病程进展有关, ONFH 的发病过程经历了早期 X 线片正常的局部骨坏死、MRI 提示的关节软骨下骨坏死形成、关节软骨下骨质塌陷形成“新月征”、关节间隙尚正常的股骨头塌陷变形,直到最终股骨头塌陷扁平形成 OA^[10]。MMP-13 的表达可能随着 ONFH 病情的进展而有所不同。

本次实验中所选取的 OA 患者均已排除由 ONFH 所引起的 OA,因此实验结果尚不能进一步说明 MMP-13 的表达与 ONFH 病程进展间的关系。MMP-13 表达与 ONFH 病程间的相关性还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Rabquer B J, Tan G J, Shaheen P J et al. Synovial inflammation in patients with osteonecrosis of the femoral head[J]. *Clin Transl Sci*, 2009, 2(4): 273-8.
- [2] Takaishi H, Kimm T, Dalai S et al. Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13[J]. *Curt Pharm Biotechnol*, 2008, 9(1): 47-54.
- [3] 中华医学会骨科分会显微修复学组及中国修复重建外科专业委员会骨缺损及骨坏死学组. 成人 ONFH 诊疗标准专家共识[J]. *中华关节外科杂志*, 2012, 6(3): 89-92.
- [4] Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis) [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(1): 16-21.
- [5] Goldring M B, Otero M, Plumb D A et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis [J]. *European Cells Material*, 2011, 21: 202-20.
- [6] Koskinen A, Vuolteenaho K, Nieminen R et al. Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2011, 29(1): 57-64.
- [7] 玛丽艳, 宋旭东, 张德新等. MMP-13 和 Galectin-3 在 OA 滑膜组织中的临床意义 [J]. *中国骨与关节杂志*, 2013, 2(5): 280-4.
- [8] Sokolove J, Lepus C M. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2013, 5(2): 77-94.
- [9] Amălinei C, Căruntu I D, Giușcă S E et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2010, 51(2): 215-28.
- [10] 康鹏德, 裴福兴. ONFH 的临床分期 [J]. *中华骨科杂志*, 2010, 30(1): 25-8.

终末期肾脏病患者血清 ucMGP 及 PIVKA-II 与桡动脉钙化的相关性

王科任 伟汪鹏 王珣 倪力军

摘要 目的 探讨血清非活性基质 Gla 蛋白(ucMGP)及凝血酶原前体蛋白(PIVKA-II)与终末期肾脏病(ESRD)患者桡动脉钙化的关系。方法 选取45例ESRD住院患者作为病例组,行动静脉内瘘手术时取桡动脉标本,桡动脉标本均行 von kossa 染色,判断有无钙化,并计算钙化积分。选取同期健康体检人群30例作为对照组。所有研究对象均检测血清 ucMGP、PIVKA-II、血红蛋白(Hb)、钙(Ca)、磷(P)、白蛋白(ALB)、全段甲状旁腺素(iPTH)、C反应蛋白(CRP)指标。结果 病例组血清 ucMGP 低于对照组($P < 0.01$), PIVKA-II 高于对照组($P < 0.01$)。在病例组中桡动脉钙化与高血 P

相关,与低 ucMGP 相关。血清 PIVKA-II 与 ucMGP 水平及桡动脉钙化无相关性。结论 ESRD 患者血清 ucMGP 低于正常人群,且与桡动脉钙化相关。ESRD 患者血清 PIVKA-II 高于正常人群。

关键词 肾功能衰竭;慢性;动脉硬化;维生素 K 缺乏病;uc-MGP; PIVKA-II

中图分类号 R 692.5; R 543.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0505-04

终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)患者血管钙化是心血管疾病的独立危险因素^[1]。血清基质 Gla 蛋白(matrix Gla protein, MGP)是一种具有抑制血管钙化作用的维生素 K 依赖性蛋白。维生素 K 缺乏可导致 MGP 以非活性基质 Gla 蛋白(uncarboxylated matrix Gla protein, ucMGP)形式沉积于血管钙化部位。凝血酶原前体蛋白(protein in-

2013-10-10 接收

基金项目:安徽省卫生厅立项课题(编号:2010C040)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院肾脏内科,合肥 230001

作者简介:王科男,硕士研究生;

任伟,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: renweishn@163.com

Expression of matrix metalloproteinase-13 in synovium of early osteonecrosis of femoral head

Wang Sisheng¹, Gui Binjie¹, Zhou Jian², et al

(¹Dept of Joint Surgery, ²Dept of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze the expression of matrix metalloproteinase-13 in synovium of early osteonecrosis of femoral head(ONFH) patients, and to study its effect on progress of ONFH. **Methods** Selected 30 ONFH patients (osteonecrosis group), 30 Hip osteoarthritis (OA) patients (OA group), 30 transcervical fracture patients (fracture group). Synovium dissected in operations. Investigate expressing of MMP-13 protein and morphological change of synovium by immunohistochemical technology. Investigate expressing of MMP-13 mRNA of synovium by RT-PCR technology. **Results** Immunohistochemistry results showed statistically significant difference in expression of MMP-13 protein in osteonecrosis group and OA group between fracture group ($P < 0.05$). No statistically significant difference between osteonecrosis group and OA group ($P > 0.05$). RT-PCR results showed statistical significantly difference in expression of MMP-13 mRNA in osteonecrosis group between OA group ($P < 0.05$). **Conclusion** High expression of MMP-13 protein in osteonecrosis group and OA group show they may have the same synovial pathological mechanism. Higher expression of MMP-13 mRNA in osteonecrosis group than OA group show the severity of abnormality synovium is different.

Key words osteonecrosis of the femoral head; synovium; matrix metalloproteinases-13; immunohistochemistry; real time-polymerase chain reaction