

聚蛋白多糖酶-4 及基质金属蛋白酶-3 在骨关节炎中的表达及意义

姜苗苗¹ 谭勇海¹ 宋修刚¹ 鞠昌军¹ 孙文学¹ 姜红江^{1△}

[摘要] **目的:**分析聚蛋白多糖酶-4(ADAMTS-4)及基质金属蛋白酶-3(MMP-3)在骨关节炎(OA)中的表达,探讨两者在 OA 的发生和进展中的作用。**方法:**收集 40 例 OA 标本(关节软骨、关节滑膜、关节液)及 40 例正常软骨、关节滑膜及关节液标本。关节软骨、关节滑膜标本中的 ADAMTS-4 及 MMP-3 表达采用免疫组化法测定,关节液标本中的 ADAMTS-4 及 MMP-3 采用酶联吸附法(ELISA)测定。比较 OA 关节和正常关节的关节软骨、OA 关节液和正常关节液中的 ADAMTS-4 及 MMP-3 的产物表达情况。比较 ADAMTS-4 及 MMP-3 在关节滑膜中的表达。**结果:**在正常软骨组织和 OA 软骨组织中,存在 ADAMTS-4 及 MMP-3 的表达。ADAMTS-4 主要表达于软骨细胞胞浆内,可见大量棕黄色颗粒、细胞膜黄染的细胞,特别是固缩退变的软骨细胞更明显;MMP-3 的表达主要在软骨细胞胞浆内,细胞内可见棕褐色颗粒。正常软骨中 ADAMTS-4 阳性表达量较少,且主要表达在表层,深层无表达;OA 软骨中 ADAMTS-4 阳性表达量较正常软骨明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),尤其是表层表达量升高更明显,其表达量随软骨深度的增加而降低($P<0.05$)。正常软骨除了表层少量表达 MMP-3 外,中层、深层均无表达;OA 软骨中各层 MMP-3 表达量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),且随软骨深度的增加而升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。在正常滑膜组织和 OA 滑膜组织中,均存在 ADAMTS-4 及 MMP-3 的表达,但分布无明显规律。ADAMTS-4 在滑膜组织中呈浅黄色,多定位于细胞胞浆;MMP-3 在滑膜组织中呈棕色,在 OA 患者滑膜组织中可见大量棕色颗粒分布在细胞胞浆。ADAMTS-4 及 MMP-3 在滑膜中的阳性表达率差异有统计学意义($P<0.05$)。OA 关节液的 ADAMTS-4 和 MMP-3 的产物 ARGxx 和 FFGxx 的表达水平均较正常关节液明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**在人的 OA 中,ADAMTS-4、MMP-3 在 OA 的发生和进展中均发挥作用。磨损的关节软骨均高表达 ADAMTS-4 和 MMP-3,且随着磨损程度的加深,ADAMTS-4 表达水平逐渐减少,而 MMP-3 表达水平逐渐增加。抑制 ADAMTS-4 及 MMP-3 的活性可能是 OA 防治的一个治疗方向。

[关键词] 骨关节炎;蛋白多糖;糖胺多糖;聚蛋白多糖酶;基质金属蛋白酶

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)11-0001-04

Expression and Significance of Polyproteoglycan Enzyme-4 and Matrix Metalloproteinase-3 in Osteoarthritis

JIANG Miaomiao¹ TAN Yonghai¹ SONG Xiugang¹ JU Changjun¹
SUN Wenxue¹ JIANG Hongjiang^{1△}

¹Wendeng Osteopath & Rehabilitation Hospital of Shandong Province, Weihai 264400, Shandong China.

Abstract Objective: To analyze the expression of polyproteoglycan-4 (ADAMTS-4) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in osteoarthritis (OA) and explore their roles in the occurrence and progress of OA. **Methods:** 40 OA specimens (articular cartilage, synovium and synovial fluid) and 40 normal cartilage, synovium and synovial fluid specimens were collected. The expressions of ADAMTS-4 and MMP-3 in articular cartilage and synovium were detected by immunohistochemical method. The expressions of

ADAMTS-4 and MMP-3 in synovial fluid were determined by enzyme-linked sorption assay (ELISA). The expression of ADAMTS-4 and MMP-3 in cartilage, OA synovial fluid and normal synovial fluid of OA and normal joints were compared. To compare the expression of ADAMTS-4 and MMP-3 in synovium. **Results:** There were expressions of ADAMTS-4 and MMP-3 in

基金项目:国家中医药管理局 2018 年孙文学全国名老中医
药专家传承工作室建设项目

¹ 山东省文登整骨医院(山东 威海, 264400)

[△]通信作者 E-mail: boneman@163.com

normal cartilage tissue and OA cartilage tissue. ADAMTS-4 was mainly expressed in the cytoplasm of chondrocyte, and a large number of brown-yellow granules and yellowish-stained cell membranes were observed, especially in the chondrocyte with solid degeneration. MMP-3 was mainly expressed in the cytoplasm of chondrocyte, and brown granules were observed in the cells. The positive expression of ADAMTS-4 was less in normal cartilage, and mainly in the surface layer, but not in the deep layer. The positive expression of ADAMTS-4 in OA cartilage was significantly higher than that in normal cartilage ($P < 0.05$), especially in the surface layer. The expression of ADAMTS-4 decreased with the increase of cartilage depth ($P < 0.05$). There was no expression of MMP-3 in the middle and deep layers of normal cartilage except for a little expression of MMP-3 in the surface layer. The expression of MMP-3 in all layers of OA cartilage increased significantly ($P < 0.05$), and increased with the increase of cartilage depth ($P < 0.05$). ADAMTS-4 and MMP-3 were expressed in normal synovial tissues and OA synovial tissues, but the distribution of ADAMTS-4 and MMP-3 was not obvious. ADAMTS-4 was light yellow in synovial tissue, mostly located in cytoplasm; MMP-3 was brown in synovial tissue, and a large number of brown granules were found in synovial tissue of patients with OA. The positive rates of ADAMTS-4 and MMP-3 in synovium were significantly different ($P < 0.05$). The expression levels of ARGxx and FFGxx in OA synovial fluid were significantly higher than those in normal synovial fluid ($P < 0.05$). **Conclusion:** In human OA, ADAMTS-4 and MMP-3 play an important role in the occurrence and progress of OA. The expression of ADAMTS-4 and MMP-3 in worn articular cartilage was high. With the deepening of wear, the expression of ADAMTS-4 decreased gradually, while the expression of MMP-3 increased gradually. Inhibiting the activities of ADAMTS-4 and MMP-3 may be one of the therapeutic approaches for prevention and treatment of OA.

Keywords: osteoarthritis; proteoglycan; glycosaminoglycan; polyproteoglycan enzyme; matrix metalloproteinase

骨关节炎(OA)是指可动关节因关节软骨退行性变和关节面边缘形成新骨为特征的一类非炎症性疾病,是机械和生物学共同作用的结果^[1-5]。当前,临床上的治疗手段均不能实现OA引发的软骨退行性损伤后透明软骨的再生修复。因此,深入研究关节软骨退变的机理,确定治疗靶点进行早期预防显得尤为重要。早期的研究者^[6-8]通过克隆纯化获得两个与关节炎相关的聚蛋白多糖酶,分别称为ADAMTS-4和MMP-3,它们均可造成OA的发生,但在病理情况下是以何种酶的作用为主尚不明确。本研究对ADAMTS-4和MMP-3及其产物ARGxx和FFGxx表达水平进行测定,以探讨OA中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 标本来源

40例OA标本,来源于2018年12月至2019年6月在本院关节科行全膝关节置换手术治疗的患者。标本均取自股骨髁,用手术刀将软骨自软骨下骨表面全层剥离,同时获取关节滑膜。OA关节液取自因膝关节OA出现关节积液而需关节穿刺治疗的患者;抽取关节液前2年内无关节穿刺史,X线片提示关节间隙狭窄和骨赘形成。正常关节液取自40例志愿者。正常软骨及滑膜40例,取自我院非OA但需行关节镜手术的患者。正常软骨肉眼观察股骨髁表面光滑,无蟹肉样磨损改变,探针探查无“水泡”和软化表现。本研究获得山东省文登整骨医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 诊断标准

采用美国风湿病学会修订的KOA诊断标准^[9]: 1)1个月来大多数时间有膝关节疼痛;2)X线片示关节边缘有骨赘形成;3)关节滑液检查符合OA;4)年龄

>40岁;5)晨僵持续时间 ≤ 30 min;6)关节活动时有关节摩擦音。同时满足1)2)或1)3)5)6)或1)4)5)6)者即可诊断为KOA。

1.3 实验试剂

抗原修复剂(上海西唐生物科技有限公司),第一抗体:兔抗人ADAMTS-4寡肽的多克隆抗体(Abcam公司)。SP超敏试剂盒(上海江莱生物)包括:内源性过氧化物酶阻断剂(无色)、正常非免疫动物血清(蓝色)、生物素标记的第二抗体(黄色)、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(红色)。DAB缓冲液、DAB底物、DAB显色剂(上海信裕生物科技有限公司),PBS缓冲液、PBS贮存液、微波修复液(Sigam公司),兔抗人ADAMTS-4多克隆抗体、兔抗人MMP-3,鼠抗人ARGxx,FFGxx的单克隆抗体(Abcam公司),碱性磷酸酶标记的羊抗兔Ig-G抗体、碱性磷酸酶标记的羊抗鼠Ig-G抗体(上海迪申生物技术有限公司),ELISA底物溶液(PNPP溶液)(上海恒远生物技术有限公司)。

1.4 实验仪器

37XC倒置显微镜(上海光学仪器进出口有限公司),XTL-2200光学显微镜(北京傲松欣实验室设备有限公司),MC50数码成像系统(常州诺基仪器有限公司),美的X3-233A微波炉,DNM-3700酶标分析仪(上海天呈医流科技股份有限公司)。

1.5 标本处理及实验观察

所有软骨先用脱钙液脱钙1周,后置于10%甲醛溶液固定1周。滑膜标本获得后置于10%甲醛溶液固定1周。将二者用清水冲洗3次,酒精脱水,二甲苯透明后,进行石蜡包埋切片。软骨和滑膜的正常观察采用苏木精-伊红染色法,软骨和滑膜标本中的AD-

AMTS-4 和 MMP-3 表达水平采用免疫组化法测定。关节液中 ADAMTS-4 和 MMP-3 及其产物 FFGxx, ARGxx 表达的测定采用酶联免疫吸附法(ELISA)。

1.6 统计学方法

计数资料采用率表示,采用 χ^2 检验,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,采用 SPSS17.0 软件进行数据分析。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色结果

组织学观察发现,正常软骨表面光滑,软骨细胞位于软骨陷窝内,逐层呈规则排列(见图 1),OA 软骨表面粗糙,软骨基质有裂隙形成,可见呈簇状、排列紊乱及退变肥大的软骨细胞(见图 2)。正常的滑膜呈淡黄色,未见明显肥厚,镜下见滑膜细胞排列整齐,未见明显炎细胞浸润(见图 3);OA 滑膜组织肥厚、凹凸不平,镜下可见滑膜组织呈绒毛状增生,可见大量的炎细胞浸润(见图 4)。

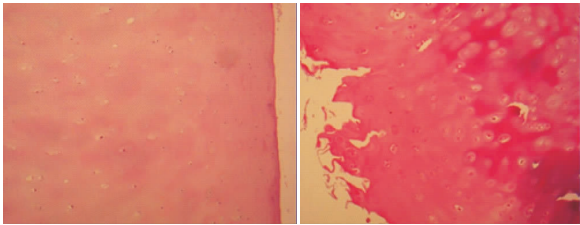


图 1 正常软骨的苏木精-伊红染色(200×) 图 2 OA 软骨的苏木精-伊红染色(200×)

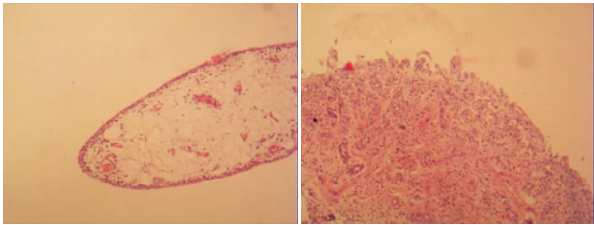


图 3 正常滑膜的苏木精-伊红染色(200×) 图 4 OA 滑膜的苏木精-伊红染色(200×)

2.2 ADAMTS-4 及 MMP-3 在软骨组织中的表达

在正常软骨组织和 OA 软骨组织中,存在 ADAMTS-4 及 MMP-3 的表达。ADAMTS-4 主要表达于软骨细胞胞浆内,可见大量棕黄色颗粒、细胞膜黄染的细胞,特别是固缩退变的软骨细胞更明显;MMP-3 的表达主要在软骨细胞胞浆内,细胞内可见棕褐色颗粒。正常软骨中 ADAMTS-4 阳性表达量较少,且主要表达在表层,深层无表达;OA 软骨中 ADAMTS-4 阳性表达量较正常软骨明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),尤其是表层表达量升高更明显,其表达量随软骨深度的增加而降低($P<0.05$),见图 5-6 及表 1。正常软骨除了表层少量表达 MMP-3 外,中层、深层均无表达;OA 软骨中各层 MMP-3 表达量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),且随软骨深度的增加而升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 7-8 及表 2。

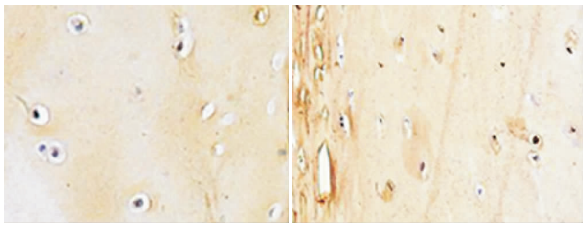


图 5 正常软骨 ADAMTS-4 的表达(200×) 图 6 OA 软骨 ADAMTS-4 的表达(200×)

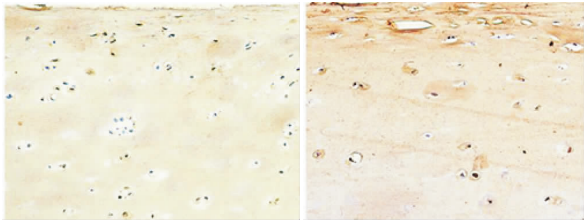


图 7 正常软骨 MMP-3 的表达(200×) 图 8 OA 软骨 MMP-3 的表达(200×)

表 1 不同软骨中 ADAMTS-4 阳性细胞表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	表层	中层	深层
正常软骨	4.41±1.26	1.68±0.72	0
OA 软骨	61.53±17.54	7.95±3.40	1.25±0.49
t	28.750	5.874	1.587
P	<0.01	<0.01	<0.01

表 2 不同软骨中 MMP-3 阳性细胞表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	表层	中层	深层
正常软骨	1.03±0.41	0	0
OA 软骨	2.57±0.84	18.61±6.58	57.49±13.24
t	2.741	52.470	125.890
P	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 ADAMTS-4 及 MMP-3 在滑膜组织中的表达

在正常滑膜组织和 OA 滑膜组织中,均存在 ADAMTS-4 及 MMP-3 的表达。ADAMTS-4 在滑膜组织中呈浅黄色,多定位于细胞胞浆(见图 9-10);MMP-3 在滑膜组织中呈棕色,在 OA 患者滑膜组织中可见大量棕色颗粒分布在细胞胞浆(见图 11-12)。ADAMTS-4 及 MMP-3 在滑膜中的阳性表达率差异有统计学意义($P<0.05$,见表 3)。

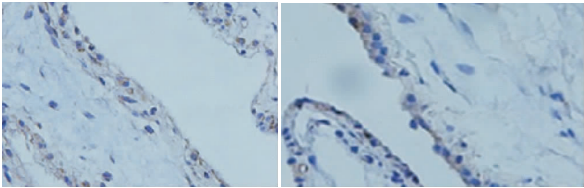


图 9 正常滑膜组织 ADAMTS-4 的表达 图 10 正常滑膜组织 MMP-3 的表达

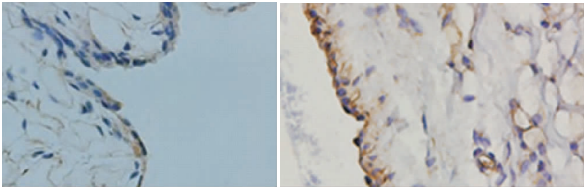


图 11 OA 滑膜组织的 ADAMTS-4 的表达 图 12 OA 滑膜组织 MMP-3 的表达

表 3 不同滑膜中 ADAMTS-4、MMP-3 阳性细胞表达情况(̄x±s)

组别	ADAMTS-4	MMP-3
正常滑膜	6.85±1.86	1.97±0.59
OA 滑膜	54.86±12.57	9.83±2.57
<i>t</i>	38.650	9.478
<i>P</i>	<0.01	<0.01

2.4 关节液中 ADAMTS-4 和 MMP-3 及其产物

表 4 关节液中 ADAMTS-4 和 MMP-3 及其产物 ARGxx 和 FFGxx 的表达比较(̄x±s)

组别	例数	ADAMTS-4/(pmol·mL ⁻¹)	MMP-3/(pg·mL ⁻¹)	ARGxx	FFGxx
正常关节液	40	8.92±1.52	35.65±7.50	2.22±0.70	2.54±0.63
OA 关节液	40	59.72±13.42	209.48±28.69	17.67±3.54	10.32±2.89
<i>t</i>		8.657	89.57	2.471	1.578
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

于膝关节、髋关节、脊柱等承重关节,分为继发性和原发性两种。继发性 OA 是因外伤、炎症、类风湿关节炎引起。原发性 OA 无明确病因,可能是遗传、年老、肥胖、关节过度使用等因素共同作用的结果。OA 的治疗主要是解除疼痛症状、保护关节结构和改善关节功能,治疗方法主要包括药物治疗、手术治疗、物理治疗、附加治疗等。近年来,随着基因技术在骨科中的应用,基因治疗 OA 被认为是一个有效的方法,其治疗原理是通过转基因技术,提高自身产生抵御有害性因素的能力。该技术目前还处于动物实验阶段^[10]。

ADAMTS 和 MMPs 是两个与软骨退变关系最密切的家族^[11-14]。体外软骨培养体系表明,软骨退变早期 ADAMTS 是聚蛋白多糖裂解的主要酶类,MMPs 在培养约 20 d 后才发挥作用,且可见胶原蛋白的降解,说明聚蛋白多糖丢失是 OA 软骨退变早期的一个重要表现,故给予 ADAMTS 抑制剂可预防 OA 的发生。采用基于敲除技术敲除小鼠的 ADAMTS-4 或 ADAMTS-5 基因,其发生 OA 的概率明显降低^[10]。而 ADAMTS 对磨损后的晚期 OA 软骨的作用目前少有研究。近年来发现 ADAMTS 和 MMPs 参与了 OA 发生和进展过程。因此,本研究欲通过对 OA 关节中 ADAMTS 及 MMPs 及其产物的表达进行检测,以探讨 ADAMTS 及 MMPs 在 OA 发生和进展中的作用机制。

本研究发现不管软骨缺损程度如何,ADAMTS-4 及 MMP-3 多表达于软骨靠近关节面的区域,此区域为软骨受摩擦力影响最明显之处,表明机械应力异常虽是简单的机械摩擦引起,但它可能激活了 ADAMTS 和 MMPs,两种酶及摩擦力共同作用而引起软骨变薄。ADAMTS 和 MMPs 活性增加后导致聚蛋白多糖丢失,使软骨弹性降低,更易产生磨损,如此形成恶性循环而使软骨退变加快。

本研究结果显示,存在磨损的关节软骨均高表达

ARGxx 和 FFGxx 的表达比较

OA 关节液的 ADAMTS-4 和 MMP-3 及其产物 ARGxx 和 FFGxx 的表达水平均较正常关节液明显升高,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 4。

3 讨论

OA 是一种退行性关节疾病,其发病率随年龄的增长而升高,是因关节软骨退化磨损所致。OA 常见

ADAMTS-4 和 MMP-3,且随着磨损程度的加深,ADAMTS-4 表达水平逐渐降低,而 MMP-3 表达水平逐渐增高,这可能是因为所选 OA 标本磨损程度与 OA 的病变时期相对应,即 OA 软骨早期软骨表层高表达 ADAMTS-4,随着病情的进展,软骨损害加重,随着聚蛋白多糖的大量丢失,ADAMTS-4 作用逐渐减弱,而释放大量的 MMP-3,促进聚蛋白多糖裂解,加重软骨损害,这一结果与 OA 早期 ADAMTS 发挥主要作用,而中晚期主要由 MMPs 起作用的观点相符。同时本研究发现,在 OA 软骨滑膜中均存在 ADAMTS-4 和 MMP-3 的表达,故认为对 ADAMTS 及 MMPs 活性的抑制可能对 OA 的防治具有积极作用。

参考文献

[1] KIM S. Changes in surgical loads and economic burden of hip and knee replacements in the US [J]. Arthritis Rheum, 2013, 59(2): 481-488.

[2] 申延清,刘凤霞,曹红,等. 膝骨关节炎患者的临床表现及相关影响因素[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 7(9): 1643-1646.

[3] 李凤国,张兰云,周志洁,等. 关节内注射复方双氯芬酸钠治疗中重度骨关节炎的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019, 27(7): 23-26.

[4] 庞坚,曹月龙,石印玉. 骨关节炎软骨下骨研究进展[J]. 中国骨伤, 2011, 34(8): 702-704.

[5] 滕金艳,查华荣,胡意. 电针对膝骨性关节炎关节术后康复的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(8): 23-26.

[6] GLASSON S, ASKEW R, SHEPPARD B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis[J]. Nature, 2015, 434(2): 644-648.

[7] STANTON H, ROGERSON F M, EAST C J, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro[J]. Nature, 2015, 434(2): 648-652.