

膝痹病关节软骨中金属基质蛋白酶 1,9,13 及金属基质蛋白酶抑制剂 2 分证型表达的研究

胡华^{1△} 李秀成¹ 周刚¹ 陈茂华¹ 杨桂英¹

[摘要] 目的:探讨膝痹病(膝关节骨性关节炎)中医证候分型与关节软骨中 MMP1,MMP9,MMP13 及 TIMP2 阳性表达的相互关系。方法:膝痹病(膝关节骨性关节炎)手术(关节镜和关节置换)患者 90 例,按中医学证候分型标准分成风湿热痹证组、风寒湿痹证组、肝肾亏虚证组、瘀血痹阻证组共 4 组。免疫组织化学染色法测定关节软骨中 400 倍镜下 MMP1,MMP9,MMP13 及 TIMP2 阳性细胞数。结果:各证型组 400 倍镜下关节软骨中 MMP1,MMP9,MMP13 及 TIMP2 阳性细胞数比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:膝痹病患者术后关节软骨中 MMP1,MMP9,MMP13 及 TIMP2 的阳性表达可以为膝痹病中医宏观辨证分型提供参考依据。

[关键词] 膝骨关节炎;关节软骨;中医证型;金属基质蛋白酶;金属基质蛋白酶抑制剂

[中图分类号] R684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)01-0015-04

Research about Expression of MMP1, MMP9, MMP13, and TIMP2 in Patients' Articular Cartilage with Knee Bi-Disease according to TCM Syndrome Classification

HU Hua^{1△} LI Xiucheng¹ ZHOU Gang¹ CHEN Maohua¹ YANG Guiying¹

¹ Traditional Chinese Medicine Hospital of China Three Gorges University (Yichang Hospital of Traditional Chinese Medicine), Yichang 443008, Hubei China.

Abstract Objective: To explore the correlation between TCM syndrome classification and positive expression of MMP1, MMP9, MMP13, and TIMP2 in patients' articular cartilage with knee osteoarthritis. **Methods:** 90 patients with osteoarthritis of the knee who underwent surgery of arthroscopic knee debridement or knee joint replacement were divided into rheumatic heat arthralgia syndrome group, wind cold damp arthralgia syndrome group, liver-kidney deficiency syndrome group and blood stasis and arthralgia syndrome group according to standard of TCM syndrome types. Intraoperative articular cartilages were obtained for immune-histochemical staining with MMP1, MMP9, MMP13, and TIMP2. The number of MMP1, MMP9, MMP13 and TIMP2 positive cells in articular cartilage were determined under 400× microscope. **Results:** Comparison of the number of MMP1, MMP9, MMP13 and TIMP2 positive cells in articular cartilage under 400× microscope in each syndrome group showed statistically significant difference ($P<0.05$). **Conclusion:** The positive expression of MMP1, MMP9, MMP13 and TIMP2 in the postoperative articular cartilage of patients with knee osteoarthritis can be used as the reference basis for the macroscopic syndrome differentiation of TCM.

Keywords: knee osteoarthritis; articular cartilage; TCM syndrome type; matrix metalloproteinase; tissue inhibitor of metalloproteinases

膝关节骨性关节炎(KOA)属中医学“膝痹病”范畴,

研究发现基质金属蛋白酶(Matrix Metlloproteinases, MMPs)^[1-2]在 KOA 发病机制中起重要作用。郑素明等^[3]将 MMP1 和 MMP13 用于 KOA 中医证型研究。Yang 等^[4]发现关节软骨压力负荷增加可激活 MMP9, 能降解基底膜的Ⅳ型胶原。同时,在重度退变关节软骨中,基质金属蛋白酶组织抑制剂 2(Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, TIMP2)^[5]表达升高。

基金项目:宜昌市卫生科研课题(A19-301-45)

湖北省自然科学基金面上项目(2019CFB560)

¹ 三峡大学中医医院(宜昌市中医医院)骨 1 科
(湖北 宜昌, 443008)

[△]通信作者 E-mail: orthochinahu@163.com

本研究选取 MMP1, MMP9, MMP13 及 TIMP2 作为观测指标,对病变关节软骨行免疫组织化学染色,探讨 KOA 中医证候分型与 MMP1, MMP9, MMP13 及 TIMP2 之间的关系。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

2016 年 1 月至 2019 年 6 月共收集本院骨科住院病人确诊为膝痹病(膝骨性关节炎)并行关节镜手术或者关节置换手术患者共 90 例,手术治疗前针对拟收集术中患者失去功能且完全剥脱的关节软骨,在术前谈话中明确告知每名患者及家属,并签署知情同意书,同时获本院伦理委员会批准。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准

1)前 1 个月内有膝痛;2)X 线示膝关节边缘骨赘;3)实验室检查符合骨性关节炎;4)年龄≥40 岁;5)晨僵<30 min;6)关节活动时有关响声。满足 1)2)或 1)3)5)6)或 1)4)5)6)即可确诊。

1.2.2 中医辨证标准

综合参考《中药新药临床研究指导原则》^[6]、《膝痹病(膝关节骨性关节炎)诊疗方案》及李文顺等^[7]的临床研究。1)风寒湿痹证:膝关节酸楚疼痛、痛处固定,舌质淡,苔白腻,脉紧或濡。2)风湿热痹证:起病较急,病变膝关节红肿、灼热、疼痛,舌质红,苔黄,脉滑数。3)瘀血痹阻证:膝关节刺痛,痛处固定,舌质紫暗,苔白而干涩。4)肝肾亏虚证:膝关节隐隐作痛,腰膝酸软无力,舌质红、少苔,脉沉细无力。

1.3 纳入标准

符合西医诊断标准,同时严格按照中医证候辨证分型诊断标准分组。

1.4 排除标准

不符合骨性关节炎中西医诊断及分型标准者;膝关节肿瘤、结核、骨髓炎患者;合并其他系统严重疾病及精神病患者;研究者认为不宜参加临床试验者。

1.5 方法

1.5.1 试剂与仪器 MMP1, MMP9, MMP13 及 TIMP2 抗体购自 Elabscience Biotechnology 公司。实验用其他仪器来自于三峡大学医学实验中心。

1.5.2 免疫组织化学法 用链霉素抗生物素蛋白-生物素免疫染色法(S-P 法)进行实验。

1.6 统计学方法

数据应用 SPSS 20.0 统计学软件分析,计数资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显微镜下(10×40 倍)取 3 个不同视野中免疫组织化学法反应阳性细胞数所占细胞总数的百分率作为原始统计数据,计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

根据中医膝痹病的辨证分型标准,将入组 90 例患者分为风湿热痹证 20 例,风寒湿痹证 20 例,瘀血痹阻证 20 例,肝肾亏虚证 30 例。风湿热痹证组:男 9 例,女 11 例;年龄(60.8±7.7)岁。风寒湿痹证组:男 8 例,女 12 例;年龄(59.7±8.3)岁。瘀血痹阻证组:男 12 例,女 8 例;年龄(59.7±8.2)岁。肝肾亏虚证组:男 16 例,女 14 例;年龄(62.5±8.3)岁。4 组患者性别及年龄等一般资料经统计学处理,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

2.2 观察指标比较

实验各组 MMP1, MMP9, MMP13 及 TIMP2 阳性细胞数比较,见表 1。

表 1 实验各组阳性细胞数统计表($\bar{x} \pm s$)

证型分组	例数	MMP1	MMP9	MMP13	TIMP2
湿热痹阻	20	59.75±17.58	49.25±8.16	93.75±14.32	23.50±7.96
寒湿痹阻	20	46.75±9.77	41.00±7.00	67.25±30.54	30.50±6.67
瘀血痹阻	20	38.00±10.56	35.25±7.34	49.00±20.17	39.0±4.47
肝肾亏虚	30	25.94±16.48	27.03±8.51	37.78±7.53	45.56±7.23
<i>F</i>		24.303	35.204	42.147	54.038
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 1 中 MMP1, MMP9, MMP13 阳性细胞表达率的变化趋势与本课题组前期测得患者血清和关节积液中 SOD 及 MDA 测定值变化趋势基本一致^[8-9],TIMP2 阳性细胞表达率的变化趋势与本课题组前期所测得患者血清和关节积液中 NO 测定值变化趋势基本一致^[8-9]。这可以作为氧化应激及软骨细胞凋亡参与膝痹病(膝关

节骨性关节炎)软骨基质降解的参考证据。MMP1, MMP9, MMP13 及 TIMP2 阳性表达率在湿热痹阻证型组、寒湿痹阻证型组、瘀血痹阻证型组、肝肾亏虚证型组各组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

实验各组 MMP1, MMP9, MMP13 及 TIMP2 阳性表达见图 1-4。

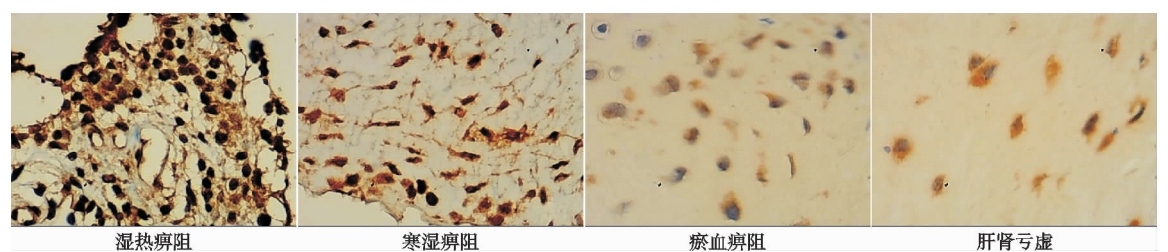


图 1 各证型 MMP1 阳性表达(×400)

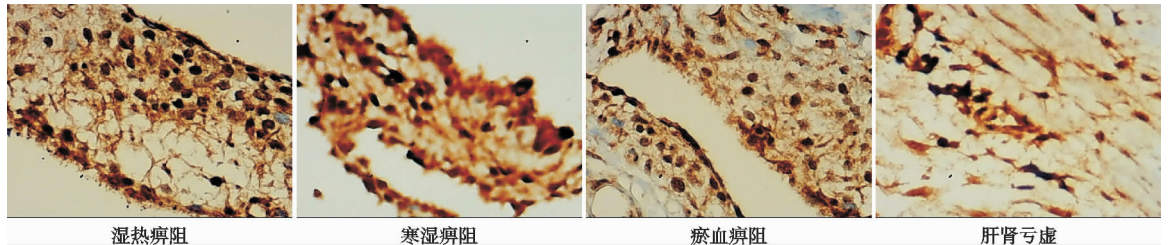


图 2 各证型 MMP9 阳性表达(×400)

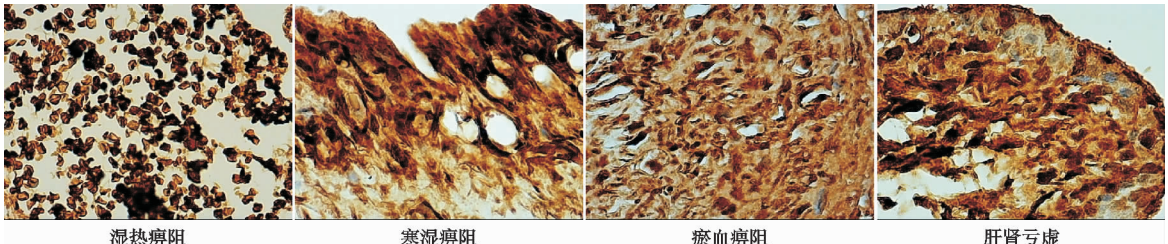


图 3 各证型 MMP13 阳性表达(×400)

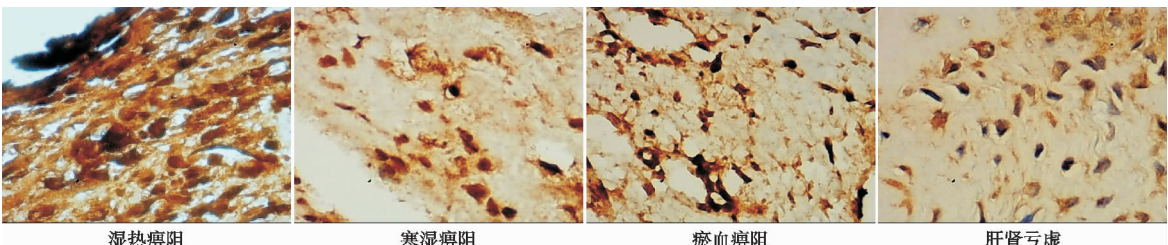


图 4 各证型 TIMP2 阳性表达(×400)

3 讨论

3.1 关于测定指标的选择

MMP1 及 MMP13 能特异性降解 II 型胶原。MMP1 主要是作用于软骨的浅层,在 OA 发病过程中持续起作用。韦桂勇等^[10]认为 KOA 早中期,关节软骨表层最先受损,MMP1 主要表达于软骨非钙化层,呈进行性增多。MMP1 能与 II 型胶原上的 MMP1 裂解位点结合,使其降解,表达量明显上升。而 MMP13 作用于软骨的深层,在 OA 早中期起作用。MMP13 降解 II 型胶原的活性是 MMP1 的 5~10 倍,因此,MMP1 及 MMP13 浓度变化最能反映出软骨基质中 II 型胶原的代谢变化^[11-12]。

鲁海等^[13-14]研究发现关节软骨压力负荷增加可激活 MMP9,膝关节炎骨性关节炎患者关节液中的 MMP9 能够更早、更及时地反映 OA 的病理性改变。庞显伦等^[15]和张贤杰等^[16]认为,MMP9 可作为 OA 早期检测诊断的一个重要指标。一旦胶原蛋白的三维螺旋结构被胶原酶所裂解,MMP9 能够降解基底膜的 IV 型胶原等,可进一步降解已经变性的胶原或者明胶^[17-18]。

在重度退变关节软骨中 MMP1 和 TIMP1 表达减少,软骨细胞的死亡和数量减少是主要原因^[19-20]。但 TIMP2 在重度退变软骨中较中度退变和正常软骨表达升高,相对于 MMP2 过量表达,这将抑制 MMP2 的功能发挥,致使其作用特异性底物 IV 型胶原降解受阻,出现器官纤维化增生和硬化,TIMP2 和 MMP13 的平衡关系对于关节微环境、特别是软骨细胞的活性具有重要的意义^[21]。重度退变关节软骨出现纤维化增生和硬化与此有关。

3.2 MMP1,MMP13,MMP9 及 TIMP2 与膝痹病中医证候分型的关系

本研究提示各证型组中 MMP1,MMP9,MMP13 及 TIMP2 阳性细胞表达率差异有统计学意义,变化趋势与本课题组前期关于氧化应激与各证型组变化的趋势基本一致^[8-9],具有一定的理论意义。本实验研究提示 MMP1,MMP9 及 MMP13 阳性细胞表达率按照

湿热痹阻证型组、寒湿痹阻证型组、瘀血痹阻证型组、肝肾亏虚证型组依次递减。TIMP2 阳性细胞表达率按照湿热痹阻证型组、寒湿痹阻证型组、瘀血痹阻证型组、肝肾亏虚证型组依次递增。据以往文献研究, MMP1 及 MMP13 主要反映细胞因子诱导的软骨基质Ⅱ型胶原纤维降解情况, MMP9 主要反映关节软骨所受压应力所导致关节软骨Ⅳ型胶原纤维降解情况。TIMP2 主要反映重度退变关节软骨出现纤维化增生和硬化。各证型组各项指标的变化趋势具有一定的临床意义, 从另一个侧面证实了中医证候分型的客观存在及其科学意义。

3.3 MMP1, MMP13, MMP9 及 TIMP2 对膝痹病中医宏观证候分型的指导意义

中医证候分型是传统中医学依据疾病的宏观表现所归纳总结的结果, 膝痹病的证候分型对膝痹病中医临床辨证论治有着绝对的指导意义。而 MMP1, MMP13, MMP9 及 TIMP2 是现代医学从微观分子生物学水平阐述膝关节骨性关节炎病理机制中具有代表性的生化指标。本实验将两者结合起来探索发现, 现代生化指标在证实传统证候分型客观存在的同时也对宏观辨证具有参考意义, 反映细胞因子诱导的软骨基质Ⅱ型胶原纤维降解情况的 MMP1 及 MMP13 表达水平越高, 其临床症状越明显, 多起病急、病程短, 属风寒湿热证型居多; 反映关节软骨所受压应力所导致关节软骨Ⅳ型胶原纤维降解情况 MMP9 表达水平越高, 其临床症状多不明显, 多起病缓慢, 病程长, 属瘀血痹阻、肝肾亏虚证型居多; 反映重度退变关节软骨出现纤维化增生和硬化的 TIMP2 表达水平越高, 其临床症状多复杂迁延, 多病情反复, 病程长, 属肝肾亏虚、虚实夹杂证型居多。

3.4 MMP1, MMP13, MMP9 及 TIMP2 与膝痹病中医证候分型之间的关系及思考

现代医学微观生化指标和传统中医证候分型之间不是绝对的一一对应关系, 同时中医证候分型也只是脏腑辨证分型。近期针对膝痹病的经筋分型研究颇多, 本实验中反映关节软骨所受压应力所导致关节软骨Ⅳ型胶原纤维降解情况, MMP9 多与其有关。同样, 现代医学反映膝关节骨性关节炎的微观生化指标也绝非只有 MMP1, MMP13, MMP9 及 TIMP2 这四种。传统医学与现代医学, 脏腑辨证和经筋辨证, 微观与宏观之间的错综复杂的关系有待于进一步探索。

总之, 通过本实验笔者发现膝痹病各证型组关节软骨中 MMP1, MMP13, MMP9 及 TIMP2 的阳性表达能够为中医学宏观辨证提供参考依据。虽然其临床应用价值受到一定的限制, 但是为膝痹病发生发展机制的探索及中医临床宏观辨证提供了有价值的参考依

据, 具体的对应关系值得进一步探索。

参考文献

- [1] 刘娣, 李春, 马晓秀, 等. 温针灸对不同时间点 KOA 模型兔关节软骨中 MMP-1、MMP-13 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(12): 2652-2655.
- [2] 龚志贤, 卢敏, 罗凌威, 等. 跌打通痹膏对兔膝关节软骨细胞 MMP-1, MMP-3, MMP-13 及 COL-Ⅱ 的 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(9): 1-4.
- [3] 郑素明, 关俊辉. 膝关节关节炎不同证型软骨细胞在 t-RNA 中的表达[J]. 实用中西医结合临床, 2016, 16(2): 28-30.
- [4] YANG C C, LIN C Y, WANG H S, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in medial plica and pannus-like tissue contribute to knee osteoarthritis progression[J]. PLoS One, 2013, 8(11): 79662.
- [5] KO J H, KANG Y M, YANG J H, et al. Regulation of MMP and TIMP expression in synovial fibroblasts from knee osteoarthritis with flexion contracture using adenovirus-mediated relaxin gene therapy[J]. Knee, 2019, 26(2): 317-329.
- [6] 国家食品药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 350-352.
- [7] 李文顺, 沈冯君, 易洪城. 膝骨性关节炎的中医辨证分型与膝关节镜下病理改变对比性研究[J]. 中国骨伤, 2003, 16(7): 13-14.
- [8] 李秀成, 胡华, 杨桂英, 等. 膝关节骨性关节炎中医证候分型与血清中 MDA、SOD、NO 含量相关性研究[J]. 河南中医, 2018, 38(8): 1221-1223.
- [9] 李秀成, 胡华, 杨桂英, 等. 膝关节骨性关节炎中医证候分型与关节液中 MDA、SOD、NO 含量相关性研究[J]. 实用疼痛医学杂志, 2018, 14(1): 31-35.
- [10] 韦桂勇, 黄剑, 郑玲玲, 等. 筋骨痹痛丸对家兔膝关节炎症模型软骨细胞凋亡及 mmp-1 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(10): 2376-2378.
- [11] 陆继鹏, 舒钧, 熊鹰, 等. 软骨下骨刚度增加对关节软骨Ⅱ型胶原和 MMP-1 表达的影响[J]. 国际骨科学杂志, 2007, 28(4): 273-276.
- [12] 熊鹏程, 沈霖, 熊昌源. 三联疗法对兔膝关节骨性关节炎软骨 MMP-1, MMP-13 及 TIMP-1 mRNA 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(3): 9-12.
- [13] 鲁海, 卢超, 张嘉良, 等. 膝骨性关节炎患者关节液中 MMP-7、MMP-9、TIMP-1、TNF- α 的表达及意义[J]. 中国医药科学, 2015, 5(22): 11-15.
- [14] 周伟, 郑红波, 冯穗, 等. 活血膏联合中药熏药治疗膝关节骨性关节炎的效果及对 IL-1 β 、MMP-9 的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(27): 117-121.
- [15] 庞显伦, 杨健, 秦昊, 等. 人工关节炎性介质对滑膜细胞基质金属蛋白酶-9 表达的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(4): 1052-1054.