

• 综述 •

关节软骨破坏的分子生物学机制

上海中医药大学骨伤研究所 (上海 200032)

汪青春 沈培芝 徐 宇 石印玉*

软骨组织无血管、神经分布,成熟的关节软骨包含少量的软骨细胞和其周围的大量的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。由于关节软骨具有这种富含基质的组织学特征,因此基质的破坏几乎与软骨破坏同义。在关节破坏的研究中,过去认为,关节炎时,激活的蛋白酶起重要作用,其后,不断有报告发现细胞因子、前列腺素、氧自由基等物质或炎症介质直接或间接参与了关节的破坏。最近一氧化氮的作用,更令人关注。业已证明,各种因子决不是各自单独作用,而是不断形成网络互相影响。然而,各种因素的相互作用机制尚未完全阐明。

关节破坏与金属蛋白酶

软骨基质破坏有多种分解酶参与。这些酶主要由浸润的炎细胞、增殖的滑膜细胞和软骨细胞分泌^[1]。根据活性基因,蛋白酶可分为四大类型:①丝氨酸蛋白酶 (serine proteinases); ② 巯基蛋白酶 (cysteine

proteinases); ③基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs); ④天门冬氨酸蛋白酶 (aspartic proteinases)。其中,金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶的活性环境为中性,称为中性蛋白酶。由于软骨基质呈中性环境,因此中性蛋白酶,尤其是金属蛋白酶备受重视^[2,3]。

1. 金属蛋白酶的种类与特异性 金属蛋白酶目前已经发现 13 种,它们的分子结构相似,均具有以下特征:①结构中有金属原子;②酶活化时,需要 Ca^{2+} ;③以酶原形式分泌,在受到细胞因子等因素的刺激时,酶原失去部分结构后转为活化型;④有共同的抑制物。不同种类的酶其作用基质有不同的特性 (表 1)^[4]。依基质特异性可分为:①胶原酶群 (MMP-1、MMP-8、MMP-13); ②明胶酶群 (MMP-2、MMP-9); ③基质溶解酶群 (MMP-3、MMP-10); ④膜型金属蛋白酶 (MT-MMP); ⑤其它如 (MMP-7、MMP-11、MMP-12)。

表 1 MMPs 的分类及基质特异性

分类	MMP 序号	名称	基质特异性
胶原酶群	MMP-1	间质胶原酶	I、I、II、VI 和 X 型胶原, 明胶
	MMP-8	中性胶原酶	I、I、II 型胶原和蛋白聚糖
	MMP-13	胶原酶-3	I、I、II、IV、V、VI、X 型胶原, 明胶
明胶酶群	MMP-2	明胶酶 A	I、I、II 明胶, IV、V、VI、X 胶原
	MMP-9	明胶酶 B	I、V 型明胶, IV、V 型胶原
基质溶解酶群	MMP-3	基质溶解酶-1	蛋白聚糖, 纤维粘连蛋白, 层粘连蛋白, I、IV、V 型明胶, II、IV、V、IX 胶原, 前胶原肽
	MMP-10	基质溶解酶-2	I、II、IV、V 型明胶, II、IV、V 型胶原
膜型 MMP 群	MT-MMP	膜型胶原酶	
其它	MMP-7	matrilysin	层粘连蛋白, I、II、IV、V 型明胶
	MMP-11	stromelysin-3	纤维粘连蛋白
	MMP-12	metalloelastase	弹性蛋白

2. 金属蛋白酶的分泌与活性调节 不同的金属蛋白酶不但作用基质有所不同,其分泌细胞也不尽一样,

如表 2 所示^[4,5]。由软骨细胞、滑膜细胞及巨噬细胞分泌的主要有 MMP-1、MMP-2、MMP-3 和 MMP-13、

MMP-7、MMP-9。其中在关节软骨破坏中起重要作用的主要有 MMP-1、MMP-3 和 MMP-13。金属蛋白酶的分泌和活性调节是一个非常复杂的过程。IL-1、IL-6、TNF、内皮细胞生长因子 (EGF)、血小板生长因子 (PDGF) 等多种细胞因子, 不仅促进酶从细胞内向细胞外释放, 且在 DNA 水平上激活酶的活性。金属蛋白酶存在特异性抑制物, 即组织金属蛋白酶抑制物 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMPs)。TIMPs 与 MMPs 形成等分子量复合体, 抑制酶的氨基部分, 使酶的活性降低。应注意的是, 炎症时不仅分解酶的含量升高, 其抑制因子也升高。在炎症剧烈的情况下, 两者比较而言, MMP 的产生及活性相对高于 TIMP, 即达到失平衡状态, 如类风湿关节炎。

表 2 金属蛋白酶的分泌

MMP 序号	分泌细胞
MMP-1	纤维细胞、软骨细胞、巨噬细胞、内皮细胞
MMP-2	纤维母细胞、软骨细胞、巨噬细胞、内皮细胞
MMP-3	纤维母细胞、软骨细胞、滑膜细胞
MMP-7	巨噬细胞肾小球膜细胞 癌细胞
MMP-8	嗜中性粒细胞
MMP-9	嗜中性粒细胞、巨噬细胞、破骨细胞、癌细胞
MMP-10	癌细胞
MMP-11	癌间质细胞
MMP-12	巨噬细胞
MMP-13	乳腺癌细胞、软骨细胞
MT-MMP	癌细胞、纤维母细胞

3. 金属蛋白酶破坏软骨的机制 近年的研究发现, 关节液及血清中 MMP-3 的浓度, 类风湿性关节炎 (RA) 高于其它关节疾患如骨关节炎 (OA)、结晶性关节炎、外伤性关节炎^[6,7], 蛋白中 CRP 和 MMP-3 浓度相关, 血清 MMP-3 与关节液中 MMP-3 浓度相关^[8,9]。MMP-1 在软骨胶原破坏中起重要作用, 临床研究发现, RA 及 OA 患者关节滑液中 MMP-1 均明显升高, 而 RA 患者更明显。OA 患者血清中 MMP-3 值明显高于健康人 (99ng/ml; 32ng/ml)。最近的一项研究证实, MMP-13 在 OA 软骨中的含量高于 MMP-1, 且对胶原的分解作用是 MMP-1 的 10 倍^[10]。然而, 上述这些酶对软骨的破坏作用并非各自单独进行, 而可能是通过以下机制协同作用。首先, MMP-3 破坏软骨基质的 PG (proteoglycan) 结构, 使胶原暴露, 破坏酶——胶原酶 (MMP-1、MMP-3) 易与胶原接触, 同时激活酶的活性; 由此, MMP-1 和 MMP-13 迅速破坏胶原的链状结构,

进而引起 PG 的进一步破坏; 接着 MMP-2 破坏已经破坏的胶原, 使其碎解。经过这一过程, 胶原链的网状结构失去坚固性, 导致不可逆的软骨变性。当然, 这一过程常受到 TIMP 的抑制。只有 TIMP 与 MMPs 的失衡, 这一进程才能得以完成^[2,11]。

前列腺素与关节软骨破坏

已知, 前列腺素 (prostaglandins) 与关节滑膜的血管增生及骨、软骨破坏密切相关。前列腺素是以磷脂酶 A2 水解细胞膜上磷脂所产生的花生四烯酸为原料, 在环氧化酶 (cyclo-oxygenase, COX) 等一系列酶群作用下产生的。环氧化酶具有脂肪酸氧化酶和前列腺素羧化酶两种活性, 可把花生四烯酸转化为前列腺素 H₂^[12]。近年, 在炎症局部发现了与 COX-1 (PGHs-1) 结构不同的同工酶 COX-2 (PGHs-2)。在 RA 患者的滑膜细胞、血管内皮细胞、软骨细胞、炎性单核细胞中发现大量的 COX-2, IL-1、TNF_α 等细胞因子激活 COX-2 mRNA 的分泌, 产生 PGE₂、PGF_{2α}、PGI₂、TXA₂ 等前列腺素^[13], 特别是 COX-2 分泌时, PGE₂ 大量产生。PGE₂ 在前列腺素样物质中, 促进骨吸收的作用最强, 可激活破骨细胞, 破坏骨与软骨, 且可激惹血管新生, 在关节炎病理及关节破坏中起重要作用。其它的前列腺素, 如 PGI₂ 可增强血管通透性, TXA₂ 参与白细胞游走等, 但与关节破坏的相关性仍有许多不明之处。

一般认为, IL-1 引起 PGE₂ 的分泌亢进是通过激活 PLA₂ 和诱导 COX-2 而产生的, 然而, 破骨细胞系统中, PGE₂ 自身也具有诱导 IL-1 的能力^[14]。在小鼠胚胎的头颅骨中添加 1 α , 25-(OH)₂ 维生素 D₃ 后培养, 发现 PGE₂ 本身不仅促进骨吸收, 并通过 cAMP 依赖性蛋白激酶 (proteinkinase A, PKA) 浓度依赖性地诱导 IL-1 分泌, 促进骨吸收。内源性 IL-6 基因表达也与 PGE₂ 呈浓度依赖性, PGE₂ 在破骨细胞形成中, 与炎性细胞因子相互联系, 共同起到重要作用。

在 RA 的病程中, 过去认为, PGE₂ 也参与了血管新生。最近有人报告, 从 RA 患者提取的成骨细胞和成纤维细胞中, 存在一种与 PGE₂ 浓度依赖的血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial cell growth factor, VEGF)^[15]。VEGF 除具有促进血管新生作用外, 尚有促进骨的 Ca²⁺ 游离, 增强骨吸收等作用, 参与关节软骨的破坏。另一方面, 其他的细胞因子可抑制 COX 的分泌。如活化 T 细胞所释放的抑制炎症和免疫应答的 IL-13, 可抑制成骨细胞分泌 COX, 抑制 PGE₂ 的产生, 阻止骨的吸收^[16]; IL-10 对单核巨噬细胞系, 不抑制 COX-1 的诱导, 而选择性地抑制 COX-2^[17]。总之, PGE₂ 在关节破坏中的作用, 受多种细胞因子的调节。

关节破坏与一氧化氮

1980 年, Furchgot 等发现, 乙酰胆碱引起兔主动脉舒张必须有内皮细胞 (endothelium cell, EC) 的存在, 后来证实, EC 通过释放某种物质而起到对血管舒张的介导作用, 将这种物质命名为 EDRF (endothelium derived relaxing factor)。1987 年研究发现, EDRF 就是一氧化氮 (nitric oxide, NO), 从而对 NO 作为细胞的信息传递物质备受重视。NO 由体内 L-精氨酸 (L-Arg) 生成, 生物学半衰期只有 4~8 秒, 与氧自由基反应后, 成亚硝酸离子 (NO_2^-) 进入血中和尿中^[18,19]。一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 作为 NO 生成的关键因素, 对其生物功能的发挥起非常重要的作用。

1. 一氧化氮的生物学作用 (1) 酶活化作用: NO 可激活鸟苷酸环化酶 (guanylic acid cyclase), 由 GTP 生成 cGMP。cGMP 可激活 cGMP 依赖性蛋白酶, 影响代谢环路和离子频率。(2) 酶失活作用: 所有的酶, 均可因 NO 与 Fe 结合而失活, NO 可使线粒体的电子传递系中复合体 I、II 及乌头酸酶 (aconitase) 失活, 使 ATP 合成下降, 使 DNA 合成的速度酶——核糖核苷酸还原酶 (ribonucleotide reductase, RRs) 失活, 阻止细胞分裂。(3) 细胞毒作用: ①与胺基 (amine) 和硫醇 (thiols) 反应, 形成具有致癌作用的亚硝胺化合物; ②NO 与 O_2^- 反应, 生成过氧化物, 其中 ONOO^- 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{NO}_2\cdot$ 均是极强的组织伤害性氧自由基化合物, 可造成细胞的损伤。

2. 一氧化氮合酶的种类与结构 NOS 是一种二氧化酶, 现已克隆出三种 NOS 基因^[20]。其中两种基因产物是原生型 NOS (constitutive NOS, cNOS), 最早纯化的 cNOS 是从大鼠和猪的小脑分离出来, 称神经原生型 NOS (neuronal cNOS, ncNOS), ncNOS 以二聚体形式存在于胞浆内, 其单体分子量为 150~160kDa, ncNOS 为 Ca^{2+} /CaM 依赖型, 其活化不要求 BH_4 , 它存在于外周非肾上腺素能非胆碱能神经元、骨骼肌、胰岛细胞、肾致密斑细胞、子宫内膜等细胞中; 另一种 cNOS 是从血管内皮细胞中纯化来的, 称内皮类原生型 NOS (endothelial cNOS, ecNOS), 它的活化也依赖于 Ca^{2+} /CaM。ecNOS 是膜结合型蛋白, 其单体分子量为 133kDa, 其 N-末端有一个十四烷基化的氨基酸序列, 对其结合于膜上起着关键作用。还有一种基因产物是诱导型 NOS (inducible NOS, iNOS), 从小鼠巨噬细胞中纯化得到的 iNOS 以二聚体形式存在于胞浆内, 其单体分子量为 130kDa。iNOS 不依赖 Ca^{2+} /CaM, 受细胞毒素-LPS 及 IL-1、IL-6、TNF α 、IFN γ 等炎症细胞因

子诱导而分泌^[21], 可产生 nmol/L 水平的 iNOS。iNOS 可在许多细胞中表达, 如炎症中性粒细胞、肿瘤细胞、肝细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞、软骨细胞、心肌细胞等^[22]。

3. 一氧化氮与关节破坏 NO 对关节破坏作用的分子机制, 目前仍未十分清楚, 目前的研究可归纳以下几点: ①抑制破骨细胞的活性; ②在成骨细胞中发现 iNOS, 提示 NO 抑制成骨细胞增殖; ③软骨细胞中存在 iNOS, NO 对软骨细胞有多种抑制作用: 抑制蛋白聚糖合成, 抑制软骨增殖^[23~26]。

在 RA 动物模型的血清与尿中可出现 NO 的代谢产物 NO_2^- 上升, 给予 NOS 阻滞剂后, NO 产生受到抑制, 关节的炎症程度减轻。RA 患者尿及关节液中 NO_2^- 也显示高值。链球菌胞壁碎片 (SCWF) 诱导的关节炎大鼠关节滑膜上有 iNOS 表达, 滑膜组织产生 NO。RA 和 OA 患者滑液中 NO 含量比血清中高, 并在外周血和关节滑液中有高水平的 3-硝基酪氨酸, 提示滑膜产生的 NO 是 RA 的致病因素^[27]。运用 RT-PCR 方法, 在 OA 小鼠模型的关节软骨中, 也发现了 NOS 的表达增强, 而用中药养肝方、补肾方及芬必得治疗的小鼠, NOS 表达明显受到抑制。

小 结

软骨的破坏机制相当复杂, 多种因素多种机制参与, 并互相影响。在分子生物学研究中, 除上述酶类、前列腺素、NO 等参与外, 与细胞因子关系也非常密切。

关节软骨破坏机制的研究对各种关节疾患的治疗有着非常重要的意义。如研究与开发抑制 MMPs 及调整 MMPs/TIMPs 的药物。NOS 抑制剂如 L-NMMA 可明显降低 SCWF 诱导大鼠关节炎的发病率, 对佐剂关节炎也有同样的防治作用。随着关节软骨破坏的分子生物学研究的不断深入, 对 RA 和 OA 等以软骨破坏为主的疾病的防治研究也将进入一个新的时期。

参考文献

1. Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW, et al. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36 (2): 181.
2. 今井一志, 冈田保典. 细胞外マトリックスの代謝とマトリックス分解酵素. *医学のあゆみ* 1996; 177 (1): 31.
3. 泽井高志, 中村浩规, 桥本道夫, 等. 关节破坏的分子机构. *最新医学* 1996; 51 (12): 62.
4. 石黑直树. 慢性関節リウマチと細胞外マトリックス破壊. *医学のあゆみ* 1996; 177 (1): 81.
5. Vincenti MP, Clark IM, Brinckerhoff CE, et al. Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. *Arthritis*

- Rheum 1994; 37 (8): 1115.
6. Obata K, Iwata K, Okada Y, et al. A one step sandwich enzyme immunoassay for human metalloproteinase 3 using monoclonal antibodies. Clin Chirm Acta 1992; 211 (1): 59.
 7. Martel-Pelletier, Mccollum R, Fujimoto N, et al. Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Lab Invest 1994; 70: 807.
 8. Sasaki S, Iwata H, Ishiguro N, et al. Detection of stromelysin in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Clin Rheumatol 1994; 13: 228.
 9. Baker T, Tickle S, Wasan H, et al. Serum metalloproteinases and their inhibitors; markers for malignant potential. Br J Cancer 1994; 70 (3): 506.
 10. Mitchell PG, Mogna HA, Reeves LM, et al. Cloning, expression and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritis cartilage. J Clin Invest 1996; 97 (3): 761.
 11. Hiraoda K, Sasaguri Y, Komiya S, et al. Effects of lipid peroxide on production of matrix metalloproteinase-1 and 3 and TIMP-1 by human rheumatoid synovial fibroblasts. Exp Mol Pathol 1993; 59 (1): 169.
 12. Knott I, Dieu M, Barton M, et al. Differential effects of interleukin-1 and on the arachioenic acids cascade in human synovial cells and chondrocytes culture. Agents Actions 1993; 39: 126.
 13. Amaso S, Naganuma K, Kawata Y, et al. Prostaglandin E2 Stimulates osteoclast formation via endogenous IL-1 expressed through protein kinase A. J Immunol 1996; 156 (5): 1931.
 14. Ben-Av P, Crofford LJ, Hla T, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and IL-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. FFBS Lett 1995; 372: 83.
 15. Onoe Y, Miyaura C, Suda T, et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2 dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. J Immunol 1996; 156 (2): 758.
 16. Mertz PM, Dewitt DL, Wahl LM, et al. Interleukin-10 suppression of monocyte 2 prostaglandin H synthase 2. J Biol Chem 1994; 269 (33): 21322.
 17. Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, et al. Macrophage nitric oxide synthase subunits. J Biol Chem 1993; 268 (26): 21120.
 18. MacIntyre I, Zaidi M, Towhidul ASM, et al. Osteoclastic inhibition; An action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88 (71): 2936.
 19. Ogden JE, Moore PK. Inhibition of nitric oxide synthase potential for a novel class of therapeutic agent. TIBRECH 1995; 13 (1): 70.
 20. Hukkanen M, Hughes FJ, Buttery LDK, et al. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. Endocrinol 1995; 136 (15): 5445.
 21. Nathan C, Xie Qw. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem 1994; 269 (19): 13725.
 22. Blanco FJ, Thiel BA, Lucas S, et al. IL-1 induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. Exp Cell Res 1995; 218 (1): 319.
 23. Stefanovic-Racic M, Taskiran D, Georgescu HI, et al. Modulation of chondrocyte proteoglycan synthesis by endogenously produced nitric oxide. Inflamm Res 1995; 44 (Suppl2): S216.
 24. Hauselmann HJ, Oppliger L, Michel BA, et al. Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. FFBS Lett 1994; 352 (2): 361.
 25. Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, et al. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. Biochem Biophys Res Commun 1994; 200 (1): 142.
 26. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, et al. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. J Immunol 1991; 147 (11): 3915.
 27. George AC, Martin MD, Daniel J, et al. Nitric oxide; an important articular free radical. J Bone Joint Surg 1996; 78 (2): 265.

(收稿: 1998-01-15)