

OA 患者关节液与血清中金属蛋白酶及其抑制剂的检测及临床意义

李德达 张凯 王毅 于顺禄 李世民 刘长明 马淑香 王介民 赵春英
(天津医院,天津 300211)

【摘要】 目的 本文探讨基质金属蛋白酶(MMP-3、MMP-1)及组织抑制剂(TIMP-1)对骨关节炎发病作用机理研究。方法 对 46 例膝关节骨性关节炎患者,20 例正常人血清标本,以及 8 例正常人关节液标本中的 MMPs, TIMP 及细胞因子进行了研究。MMP-3、MMP-1、TIMP-1 的检测均采用双抗体夹心 ELISA 法。结果 OA 患者血清中 MMP-3、MMP-1 的水平没有性别差异,患者关节液中的 MMP-3 含量男性显著高于女性,约为 1~2.5 倍。患者关节液中 MMP-3、MMP-1、TIMP-1 的含量均显著高于血清中的含量。患者血清中只有 MMP-3 的水平显著高于正常对照组,MMP-1、TIMP-1 的水平与正常对照组无显著性差异;而关节液中 MMP-3、MMP-1、TIMP-1 的水平均显著高于正常对照组。本研究结果还显示 MMP-3、MMP-1 和 TIMP-1 与病程成正相关。结论 OA 患者关节液中 MMP-3 水平增高的幅度比 TIMP-1 要大,由于二者间的相对平衡被破坏而促进了关节软骨的降解,导致关节软骨进行性破坏。

【关键词】 骨关节炎; 金属蛋白酶类; 病理过程

Serum and synovial fluid levels of matrix metalloproteinases and its tissue inhibitor in patients with osteoarthritis LI De-da, ZHANG Kai, WANG Yi, et al. Tianjin Hospital (Tianjin, 300211)

【Abstract】 Objective To measure serum and synovial fluid levels of matrix metalloproteinases(MMP-3, MMP-1), and tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMP-1) for the investigation of the mechanism of osteoarthritis (OA) **Methods** 46 patients with knee osteoarthritis were studied and 20 specimens of normal serum and 8 specimens of normal synovial fluid were used for the measurements. Serum and synovial fluid levels of MMPs(MMP-3, MMP-1), TIMP(TIMP-1) were measured by enzyme immunoassays. **Results** In the OA patients, the synovial fluid levels of MMP-3, MMP-1, TIMP-1 were both significantly higher than that in the serum, MMP-3 was approximately 200 times higher than in serum. Only the synovial fluid level of MMP-3 was higher in males than in females. The synovial fluid levels of MMP-1, MMP-3, TIMP-1 were elevated in OA when compared with normal, with only higher levels of MMP-3 in serum found in OA. The synovial fluid concentration of MMP-3, MMP-1 and TIMP-1 were related to the degree of OA. **Conclusion** These findings demonstrate that the balance between the synovial fluid level of MMP-3 and TIMP-1 is broken and might promote cartilage degradation.

【Key Words】 Osteoarthritis; Metalloproteinases; Pathologic processes

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteases, TIMPs)与其对应的组织基质金属蛋白酶抑制因子(tissue inhibitor of matrix metalloproteases, TIMPs)之间的关系失衡,是 OA 软骨降解的重要机制^[1,2]。二者间相对平衡的破坏,MMPs 的相应升高,所导致软骨破坏是研究 OA 发病机理的热点之一^[3,4]。为此我们收集检测了 OA 患者关节液与相应病人血清,进

行了 MMP-3、MMP-1 及 TIMP-1 检测,结合关节镜下病人软骨破坏表现及临床资料分析 OA 患者病情活动与关节软骨破坏之间的关系,以探讨关节软骨酶在 OA 发病中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 临床资料 本研究收集了 1999~2000 年间收治确诊为骨性关节炎的住院病人 46 例,所有被检测病例均要求符合 OA 诊断标准(1987 年美国风湿病学会标准)。所有病例均为在作关节镜检时抽取关节液及采集相对应病人血清。另外,还收集了 20 例

正常人血清标本(正常献血员血清),和 8 例正常人关节液标本(意外死亡时间在 6 小时之内抽取膝关节液,平均年龄 27.5 岁)。

46 例 OA 患者中,男 20 例,女 26 例。年龄 50~66 岁,平均年龄 57.8 岁。病程 6 个月~5 年,平均 2.2 年。46 例 OA 病人用 Outerbridge 改良分度法分度^[5], I 度 5 例, II 度 9 例, III 度 14, IV 度 18 例。所有患者均排除在检测前 1 个月内服用过非甾体抗炎药和激素。

1.2 标本的采集保存

1.2.1 关节液的采集 在关节镜术中抽取关节腔内积液,将其离心后取上清液 5 ml 分装 Eppendorf 管,-30℃ 低温冰箱保存待测。

1.2.2 血清的收集 抽取关节液的同时抽取患者静脉全血 2 ml,离心分离血清置-30℃ 保存待测。

1.2.3 正常关节液的采集 尸检标本(死亡 6 小时之内)经消毒使用 9 号针头,由膝关节上外侧穿刺进入关节腔后抽取关节积液,离心后取上清液,同一标本分为原液、1 倍生理盐水稀释液分别装于 Eppendorf 管,-30℃ 保存待测。

1.3 实验检测方法 基质溶解素(stromelysin-1, MMP-3)、胶原酶(collagenase, MMP-1)、TIMP-1 含量测定均采用英国 R&D SYSTEMS EUROPE 公司提供的酶免试剂盒。将关节液标本先用双蒸蒸馏水做 1:100 稀释,然后用标准稀释液再做 1:21 稀释;血清标本则直接用标本稀释液做 1:21 稀释,将标准液、质控液、稀释后的样本分别加入 96 孔反应板中,室温孵育 60 分钟。用冲洗液洗 3 次后加入生物标记抗体,室温孵育 60 分钟。冲洗 3 次后,加入过氧化物酶,室温孵育 30 分钟。再冲洗 2 次后,加入 TMB,室温静置 10 分钟,最后加入终止液,在 450 nm 下测 OD 值。所有数据均使用美国 MRX-HD II 型全自动酶标分析仪进行。

1.4 统计方法 所有结果均采用均值($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用组间 *t* 检验或 F 与 *q* 检测方法,数据均经 SPSS8.0 for Windows 进行统计学处理。

2 结果

2.1 OA 患者性别与血清及关节液中 MMP-3 和 MMP-1 差异对比结果见表 1。

表 1 OA 男与女性患者血清及关节液中 MMP-3 和 MMP-1 含量对比表($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

项目	例数	MMP-3	MMP-1	
OA 患者血清	男	20	176.19 ± 15.96	33.20 ± 2.32
	女	26	170.75 ± 9.80	33.63 ± 0.99
<i>t</i> 值			1.425	0.851
OA 患者关节液	男	20	49758.10 ± 5752.83	2565.25 ± 911.96
	女	26	20050.38 ± 8178.30*	2304.9 ± 511.53
<i>t</i> 值			6.42	1.23

* *P* < 0.01

表 1 提示不同性别之间,血清中的 MMP-3、MMP-1 含量水平没有差异(*P* > 0.05),但在关节液中的 MMP-3 含量则男性显著性高于女性,约为 1~

2.5 倍,具有统计学意义(*P* < 0.01)。

2.2 OA 患者关节液与血清中 MMP-3、MMP-1 和 TIMP-1 含量差异比较 结果见表 2。

表 2 OA 患者关节液与血清中 MMP-3、MMP-1 和 TIMP-1 含量对比($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

项目	MMP-3	MMP-1	TIMP-1
OA 患者关节液中含量	32966.78 ± 6965.56	2418.09 ± 711.74	667.38 ± 88.90
OA 患者血清中含量	173.11 ± 12.88**	33.44 ± 1.66*	281.50 ± 41.00*
<i>t</i> 值	31.84	21.46	26.74

* *P* < 0.01, ** *P* < 0.001

表 2 显示 OA 患者关节液中的 MMP-3、MMP-1、TIMP-1 含量均显著高于血清中的含量(*P* < 0.01)。

2.3 OA 患者血清与正常对照血清中 MMP-3、MMP-1 和 TIMP-1 含量对比 结果见表 3。

表 3 OA 患者对照组血清中 MMP-3、MMP-1 和 TIMP-1 含量对比($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

项目	MMP-3	MMP-1	TIMP-1
OA 患者血清	173.11 ± 12.88*	33.44 ± 1.66	281.50 ± 41.00
正常对照血清	84.99 ± 9.54	32.85 ± 1.60	256.78 ± 64.08
<i>t</i> 值	24.13	1.34	1.88

* *P* < 0.01

表 3 表明 OA 患者血清中只有 MMP-3 的水平显著高于正常对照组, 而 MMP-1、TIMP-1 的水平与正常对照组无显著性差异。

2.4 OA 患者与正常对照关节液中 MMP-3、MMP-1 和 TIMP-1 含量对比 结果见表 4。

表 4 OA 患者与对照关节液中 MMP-3、MMP-1 和 TIMP-1 含量对比($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

项目	MMP-3	MMP-1	TIMP-1
OA 患者关节液	32966.78 ± 6965.56**	2418.09 ± 711.74*	667.38 ± 88.90**
正常对照关节液	3233.17 ± 188.63	1685.78 ± 966.37	333.40 ± 16.17
t 值	11.98	2.54	10.52

*P<0.05 **P<0.01

结果表明 OA 患者关节液中 MMP-3、MMP-1、TIMP-1 的含量水平均显著高于正常对照组。

2.5 不同病程分度的患者关节液中 MMP-3、MMP-1、TIMP-1 含量比较 F 检验结果见表 5。

表 5 不同病程分度关节液中 MMP-3、MMP-1 和 TIMP-1 含量对比($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

分度	例数	MMP-3	MMP-1	TIMP-1
I 度	5	18078.7 ± 1407.71	985.69 ± 136.90	370.31 ± 22.84
II 度	9	18706.58 ± 979.75	1126.61 ± 89.94	397.75 ± 53.51
III 度	14	34113.63 ± 1302.18	2261.86 ± 118.35	652.2 ± 192.90
IV 度	18	43340.46 ± 3032.56	3583.23 ± 445.23	896.46 ± 82.47
组间变异		4.8971 × 10 ⁹	5.0047 × 10 ⁷	2.0436 × 10 ⁶
组内变异		6.636 × 10 ⁹	4.0432 × 10 ⁷	2.0349 × 10 ⁶
总变异		1.1533 × 10 ¹⁰	9.0479 × 10 ⁷	4.0785 × 10 ⁶
F 值		10.32	9.27	14.06
P		<0.05	<0.05	<0.05

通过比较观察发现, 在采用 Outerbridge 改良关节镜下分度法分度上, 3 个指标在各度间均存在显著

性差异(P<0.05)。

2.6 不同病程分度间两两比较 q 检验, 结果见表 6。

表 6 不同病程分度间两两比较 q 检验结果

对比	MMP-3				MMP-1				TIMP-1			
	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	a	q 值	P	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	a	q 值	P	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	a	q 值	P
4 与 1	25261.76	4	5.62	<0.05	2597.54	4	7.41	<0.05	526.15	4	6.69	<0.05
4 与 2	24633.88	3	6.79	<0.05	2456.62	3	8.67	<0.05	498.71	3	7.85	<0.05
4 与 3	9926.83	2	2.91	<0.05	1321.37	2	5.34	<0.05	244.18	2	4.40	<0.05
3 与 1	16034.93	3	3.46	<0.05	1276.17	3	3.53	<0.05	281.97	3	3.48	<0.05
3 与 2	15407.05	2	4.06	<0.05	1135.25	2	3.83	<0.05	254.53	2	3.83	<0.05
2 与 1	627.88	2	0.13	>0.05	140.92	2	0.36	>0.05	27.44	2	0.32	>0.05

比较发现, 除临床 I 度与 II 度间 3 项检测指标不存在差别外, 其他各度间均存在有显著性差别(P<0.05)。

3 讨论

骨性关节炎为骨科临床最常见老年退行性的骨关节炎, 其病理过程以关节软骨的退变软骨基质降解为主要特征, 软骨细胞功能的改变是 OA 病理演变的关键。在正常状态下, 关节软骨基质的分解与合成代谢维持着动态平衡, 这一过程受多种细胞内外的蛋白分子(如生长因子和细胞因子)及关节软骨酶类的调控^[4,6]。近年来一些研究表明金属蛋白酶及其抑制剂和细胞因子在关节软骨降解中的作用, 在 OA 发病机制中尤为重要^[7]。在正常情况下, MMP-3 与 TIMP-1 相对平衡对维持软骨细胞正常功能十分重要, 如果失去相对平衡则发生相应病理改变。

Naito 等人^[8]在观察分析 83 名女性 OA 患者及 19 例正常志愿者血清, 用酶联免疫方法测量血清中 MMP-3、MMP-1 和 TIMP-1 水平浓度。结果发现 MMP-3 和 TIMP-1 血清浓度在 OA 患者明显升高。同时发现 TIMP-1 血清水平与按 Kellgren 临床病程分度具有显著性相关。我们本次研究发现, 在正常血清与 OA 病人血清对比中, MMP-3 浓度显著升高(OA 病人为 173.11 ± 12.88, 正常人 84.99 ± 9.54, P<0.01), TIMP-1 的升高未能达到显著性差异(见表 3)。这一结果在本次关节液的检测中更为明显。OA 患者关节液中 MMP-3 和 TIMP-1 分别为 32966.78 ± 6965.56、667.38 ± 88.90, 正常关节液仅为 3233.17 ± 188.63、333.40 ± 16.17, 可见血清中的 MMP-3 和 TIMP-1 的升高正是源于关节中的升高的

表达。也可以说关节液检测 MMPs 和 TIMP-1 对于判断 OA 病程的进展是非常有用的指标。由此可见,检测关节液当中的 MMPs 和 TIMP-1 比血清的检测更加具有临床意义^[8]。

在 Outerbridge 改良关节镜下分级中,关节软骨破坏依关节镜检过程中病变的范围程度进行。即 I 度:关节镜下见关节软骨软化,或轻度剥起;II 度:软骨浅表溃疡纤维化,软骨开裂小口;III 度:关节软骨深度溃疡、纤维化、裂开,或关节软骨裂开深度为大于 50% (含 50%) 的关节软骨下骨尚未外露者;IV 度:关节软骨全层穿破,关节软骨下骨外露。除在 I 度与 II 度间不存在差异外,在 IV 度与 I、II、III 度间、III 度与 I、II 间均存在显著性差异($P < 0.05$)。这就证实了 OA 患者的软骨破坏程度与 MMPs 含量多少呈正比例关系,也使临床分度有了一种可靠的分度手段与定量检测指标成为可能。

近年来发现,基质金属蛋白酶是一个 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 依赖的蛋白水解酶家族,参与体内细胞外基质的降解,在 OA 关节软骨基质及软骨细胞破坏的病理过程中起着重要作用^[2]。关节软骨细胞外基质主要成分是 II 型胶原,其次为蛋白聚糖。研究认为,胶原酶类能直接降解 I、II、III 型胶原,且对蛋白聚糖有高度的裂解活性^[1]。MMP-1 分布广泛,主要由成纤维细胞性分泌,可使 I、II 型胶原变性、裂解。MMP-3 主要来源于软骨细胞,主要作用底物为 II 型胶原。两种酶都可在胶原分子 α 链的 Gly-Ile/Leu 键处降解胶原,产生 3/4 和 1/4 原长的片段。这些片段易被其他 MMPs 如明胶酶降解,从而加强了软骨吸收,最终导致关节软骨进行性破坏^[3]。TIMPs 为 MMPs 的特异性抑制因子,能抑制其生物活性的发挥^[9]。从本次实验表 4 的数据中分析,OA 组与正常对照组相比,MMP-3 升高约 10 倍,而 TIMP-1 则升高了 5 倍,即 MMP-3 增高的幅度比 TIMP-1 要大,由此推断 MMP-3 的作用超过了 TIMP-1 的作用,二者间的平衡被破坏而促进了关节软骨的降解。这也再次证明

了 TIMP-1 与 MMPs 之间失衡是引起软骨分解的主要机制^[10,11]。

另外研究发现,除 MMP-3 关节液中水平,男、女性别间存在差别外,其余指标不论血清还是关节液中均不存在性别差异。这有利于今后临床实验室的检查。但同时我们注意到,在病人关节液与血清之间的各项检测指标浓度差距非常之巨大,在 MMP-3 达到数量级,这一结果与文献报道相一致。

参考文献

- 1 管剑龙,施桂英. 基质金属蛋白酶与骨关节炎. 中华风湿病学杂志, 2000, 4(1): 54-56.
- 2 Jain A, Nanchahal J, Troeberg L, et al. Production of cytokines, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 by tenosynovium demonstrates its potential for tendon destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(8): 1754-1760.
- 3 Conway JG, Andrews RC, Beaudet B, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α (TNF- α) production and arthritis in the rat by GW3333, a dual inhibitor of TNF- α -converting enzyme and matrix metalloproteinases. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298(3): 900-908.
- 4 Johanne Martel-Pelletier. Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis metalloproteinases and TIMP in arthritic cartilage. *Laboratory Investigation*, 1994, 70(6): 94.
- 5 Hollis G P. Magnetic resonance imaging of articular cartilage in the knee. *The Bone and Joint Surg (Am)*, 1998, 80(9): 9.
- 6 Pelletier JP, Dibattista JA, Routhley P, et al. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheum Dis Clin North Am*, 1993, 19: 545-568.
- 7 Cawston T, Billington C, Cleaver C, et al. The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 878: 120-129.
- 8 Naito K, Takahashi M, Kushida K, et al. Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: Comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 1999, 38(6): 510-554.
- 9 孙传海,吕刚. 基质金属蛋白酶及其抑制剂与椎间盘退变、突出及吸收的关系. *中华骨科杂志*, 2001, 21(10): 630-632.
- 10 Fearon U, Reece R, Smith J, et al. Synovial cytokine and growth factor regulation of MMPs/TIMPs: Implications for erosions and angiogenesis in early rheumatoid and psoriatic arthritis patients. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 878: 619-621.
- 11 Kubota T, Kubota E, Matsumoto A, et al. Identification of matrix metalloproteinases (MMPs) in synovial fluid from patients with temporomandibular disorder. *Eur J Oral Sci*, 1998, 106(6): 992-998.

(收稿 2001-12-30 编辑:李为农)

关于一稿两投和抄袭等现象的处理声明

文稿的一稿两投、抄袭、假署名、弄虚作假等现象属于科技领域的不正之风,我刊历来对此加以谴责和制止。为防止类似现象的发生,我刊一直严把投稿时的审核关,要求每篇文章必须经作者单位主管学术的机构审核,附单位推荐信(并注明资料属实、无一稿两投等事项)。希望引起广大作者的重视。

为维护我刊的声誉和广大读者的利益,凡核实属于一稿两投和抄袭等现象者,我刊将择期在杂志上提出批评,刊出其作者姓名和单位,并对该文的第一作者所撰写的一切文稿 2 年内拒绝在本刊发表,同时通告相关杂志。欢迎广大读者监督。

(本刊编辑部)