

分类号: R684  
学号: 2011109113

密级:  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### MMP-14 及 MMP-9 mRNA 在 OA 患者滑膜组织 中的表达及意义

学位申请人	郑伟
指导教师	史晨辉 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	外科学
研究方向	关节外科
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子

2014年5月

分类号: R684  
学 号: 2011109113

密 级:  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### MMP-14 及 MMP-9 mRNA 在 OA 患者滑膜组织 中的表达及意义

学 位 申 请 人	郑 伟
指 导 教 师	史晨辉 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	外科学
研 究 方 向	关节外科
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子  
2014 年 5 月

**The Expression and Clinical Significance of MMP-14 mRNA、MMP-9  
mRNA in osteoarthritis patients synovium of knee joint**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Medicine**

**By**

Zheng Wei

**(Joint Surgery)**

Dissertation Supervisor: Prof. Shi Chen-hui

May, 2014

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：郑伟

时间：2014年6月13日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：郑伟

时间：2014年6月13日

导师签名：

时间：2014年6月13日

# 目 录

中文摘要.....	I
Abstract .....	II
缩 略 语 表.....	III
第一章 前 言.....	1
1.1 骨关节炎的现状.....	1
1.2 骨关节炎的研究进展.....	1
1.3 关于 MMP-14/MMP-9 与骨关节炎 .....	2
第二章 研究对象、材料和方法.....	4
2.1 研究对象（临床资料） .....	4
2.2 主要实验仪器和试剂.....	5
2.3 技术路线图.....	7
2.4 研究方法.....	7
2.5 统计学处理.....	11
第三章 实验结果.....	12
3.1 PCR 方法检测结果 .....	12
3.2 统计学分析.....	13
第四章 讨论.....	16
4.1 骨关节炎与 MMPs.....	16
4.2 关节软骨、滑膜与 MMPs.....	17
4.3 MMP-14 与骨性关节炎 .....	18
4.4 MMP-9 与骨性关节炎 .....	20
4.5 MMP-14、MMP-9 在骨性关节炎患者滑膜组织中的表达及相关性.....	20
第五章 结论.....	22
参考文献.....	23
综 述.....	27
致 谢.....	37
作 者 简 介.....	38
导师评阅表.....	39

# 中文摘要

## 目的:

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种多因素引起的慢性退行性关节疾病, 常见于中老年人群, 迄今为止发病机制仍不清楚。而随着社会老龄化高峰的来临, 诸多不良影响也日渐突显。作为病变累积整个关节结构的一种骨骼肌肉疾病, 关节各结构的生物化学改变备受人们的关注; 同时, 随着生物医学技术的发展, 基质金属蛋白酶家族(MMPs)成为国内外学者研究 OA 发病机制的热点。本研究拟从基因水平检测探讨基质金属蛋白酶-14 和-9 (MMP-14/-9) 在 OA 与非 OA 患者滑膜组织中的表达量差异及相关性, 探讨二者在 OA 发生发展过程中的作用。

## 方法:

选择 2011 年 11 月~2013 年 8 月在石河子大学第一附属医院骨一科行关节置换术、膝关节镜手术、单纯膝关节半月板损伤或截肢手术的患者 68 例(OA 组 39 例和非 OA 组 29 例), 所有病例均经本院骨科医生和影像学检查确诊(根据 1995 年美国风湿病学会关于 OA 的诊断标准)。两组患者关节滑膜均于手术中收集, 滑膜组织在术后 1 小时内用生理盐水反复冲洗 3 次后锡箔纸包裹迅速置入液氮罐中速冻, 后置于-80℃冰箱保存备用。采用 Trizol 一步法提取总 RNA, 半定量 RT-PCR 方法检测 68 例患者滑膜组织中 MMP-14/-9 的表达情况。将所得的数据应用 SPSS17.0 统计软件处理, 所有计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用 t 检验, 相关性采用 Pearson 相关性分析, 以  $P < 0.05$  确定为差异有统计学意义。

## 结果:

RT-PCR 结果显示 MMP-14 mRNA 和 MMP-9 mRNA 在 OA 与非 OA 患者滑膜组织中均表达, 并且发现 MMP-14/-9 mRNA 在 OA 患者滑膜组织中 ( $0.9887 \pm 0.075 / 0.742 \pm 0.069$ ) 中表达显著高于非 OA 组 ( $0.244 \pm 0.0614 / 0.176 \pm 0.05$ ,  $P < 0.05$ ); 二者进行 Pearson 相关性分析( $r = 0.863$ ,  $P < 0.05$ ), 说明 MMP-14 和 MMP-9 两基因在 OA 患者滑膜组织中的表达呈正相关关系。

## 结论:

MMP-14 mRNA 和 MMP-9 mRNA 在 OA 组滑膜组织中表达量均明显高于非 OA 组, 且二者的表达量正相关, 表明 MMP-14 和 MMP-9 均参与骨关节炎的发生发展, 并且在一定条件下协同作用促进 OA 的病程进展。

**关键词:** 骨性关节炎, MMP-14, MMP-9, RT-PCR

## Abstract

### Objective:

Osteoarthritis (OA) is the most common of the musculoskeletal disease. It is characterized structurally by articular cartilage degradation. The pathophysiology of the process by which whole joint degeneration of osteoarthritis remains poorly understood. The disease affects millions of individuals aged 45 years and above, and is increasing in frequency and severity within the context of the ageing population. In recent years, with the development of biomedical technology, more and more domestic and foreign scholars are beginning to focus on the relationship between the family of matrix metalloproteinases (MMPs) and OA in order to clarify the pathogenesis of OA. In this experiment, we studied the expression and correlation of MMP14/-9 at the level of gene in the patients' synovial tissues with OA and non-OA, to explore the role of MMP-14/-9 in the development of OA.

### Methods:

68 surgically removed synoviums were obtained from the patients with consent in the department of orthopedics of the first affiliated hospital of Shi He-Zi University from the Nov, 2011 to the August, 2013, which operation include the knee joint of arthroscopy, arthroplasty, amputation et al. All of the patients were diagnosed by the doctor of orthopedics combine with clinical symptoms and imaging (According to the American Rheumatic Association (ARA) 1995 revised criteria for OA).The synovium were washed three times with saline in one hours after surgery, quick-frozen in liquid nitrogen and stored in -80°C refrigerator for experiment. Finally, Trizol reagent to extracted RNA and semi-quantitative RT-PCR to detected the expression of MMP-14 mRNA and MMP-9 mRNA in 68 cases of synovium. The results of measurement data adopt mean  $\pm$  standard deviation ( $\bar{x}\pm s$ ), the statistical significance was determined by Student's t-test and Pearson correlation analysis using the SPSS 17.0 program, P value less than 0.05 were considered to be statistically significant.

### Results:

We observed the expression of MMP-14 mRNA and MMP-9 mRNA in all of patients' synovium (OA and Non-OA patients); and the expression of MMP-14/MMP-9 mRNA were significantly higher in OA group ( $0.9887\pm 0.075/0.742\pm 0.069$ ) compared with Non-OA group ( $0.244\pm 0.0614/0.176\pm 0.05, P<0.05$ ); Pearson correlation analysis indicates that the expression of MMP-14 and MMP-9 genes were positively correlated with OA synovium ( $r=0.863, P<0.05$ ).

### Conclusion:

The expression of MMP-14 mRNA and MMP-9 mRNA was significantly higher in OA group synovial tissue compared with Non-OA group, and positively correlated with each other in OA synovium. The results indicated that MMP-14 and MMP-9 involve in the pathogenesis of OA; and to a certain extent synergy to promote the progression of osteoarthritis.

**Key Words:** Osteoarthritis, MMP-14, MMP-9, Semi-quantitative RT-PCR

## 缩 略 语 表

英文缩写	英文全名	中文译名
OA	Osteoarthritis	骨性关节炎
KOA	Knee Osteoarthritis	膝骨性关节炎
RA	Rheumatoid Arthritis	类风湿关节炎
ECM	Extracellular Matrix Components	细胞外基质
SM	Synovial Membrane	滑膜
SF	Synovial Fluid	关节滑液
NSAID	Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs	非甾体类抗炎药
MMPs	Matrix Metalloproteinases	基质金属蛋白酶家族
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs	解整链蛋白金属蛋白酶
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases	金属蛋白酶组织抑制因子
MMP-14	Matrix Metalloproteinases-14	基质金属蛋白酶-14
MMP-9	Matrix Metalloproteinases-9	基质金属蛋白酶-9
DEPC	Diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
IPA	Isopropanol	异丙醇
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	逆转录聚合酶链反应
TBE	Tetra Bromo Ethane	Tris 硼酸
IPP	Image-ProPlus	分析测量图像软件
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
ARA	American Rheumatic Association	美国风湿病学会

# 第一章 前言

## (Introduction)

### 1.1 骨关节炎的现状

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种多因素引起的慢性退行性关节疾病,是骨科最常见的疾病之一。主要临床表现为关节的疼痛、肿胀、僵硬,随着疾病的进展进一步发展发展为关节痉挛、肌肉萎缩、关节的功能障碍直至关节畸形丧失关节功能。而膝关节则是最常受累关节之一,主要影响着中老年人群<sup>[1]</sup>。根据流行病学统计调查显示:在美国 60 岁以上人群中大约有 10%男性和 13%女性表现出膝关节骨性关节炎的症状<sup>[2]</sup>,并且随着全球老龄化及肥胖问题的加剧,预计在 2025 年 OA 的患病率将达到 40%;而在我国约有 3%的人患有 OA,而大部分比例为膝关节骨性关节炎(KOA),其中 65 岁以上的人群中出现骨性关节炎 X 线表现的患者更是高达 85%<sup>[3-4]</sup>。这严重影响人们的生活水平和质量,同时也增加了个人与社会的经济负担和压力,并且在未来几十年将成为主要的医疗问题和社会问题。

目前针对骨关节炎的治疗方式多种多样,大多数是以减缓临床体征和症状为主,各有其利弊。其中主要治疗分为三种:包括非药物治疗,药物治疗;手术治疗<sup>[5]</sup>。非药物治疗主要是指 OA 的预防,如减轻体重、护具支撑等物理疗法;药物治疗,主要针对 OA 的早期治疗,通过服用镇痛药、非甾体类抗炎药物(NSAID)及关节腔类注射透明质酸或糖皮质激素类固醇类药物采取的对症治疗,但这并不能阻止 OA 疾病的进展,并且长期使用会产生机体耐药、细菌性关节炎等一系列副作用,可见其疗效的显著性及药物的安全性仍不确定<sup>[6]</sup>;手术治疗主要针对晚期的 OA 患者在保守治疗无效的情况下行人工关节置换术,虽然关节置换术是目前认为最有效的治疗 OA 的方法<sup>[7]</sup>,但是由于人工关节这类生物材料寿命有限并且老年患者(>70 岁)围手术期并发症风险较高,对年轻患者的远期疗效及年长者的术后康复仍是一个严峻的挑战<sup>[8]</sup>;同时手术本身所带来生理和心理上的创伤也使得许多患者望而却步。所有这些方法中唯有预防治疗一直被认为是最好的治疗骨关节炎的手段<sup>[9]</sup>,而寻找 OA 的干预靶点就变得更加重要,因此世界卫生组织(WHO)将 2000-2010 定为国际“骨与关节的十年”,旨在呼吁世界各国继续关注和深化骨关节炎的病因及发病机制的早期研究。而中华医学会骨科学分会也代表中国于 2002 年加入这一国际性活动,并将 2002-2012 定为“中国骨骼与关节健康十年”<sup>[10]</sup>。

### 1.2 骨关节炎的研究进展

在过去的数十年间对骨性关节炎病因及防治的研究有了重大的科学进展,但 OA 的

发病机制仍然不完全清楚,通常认为是机械性与生物性因素的共同作用结果,常与生物力学改变、软骨代谢异常、组织相关酶失衡等多种因素有关,其中与 OA 密切相关的基质降解酶主要包括解整链蛋白金属蛋白酶 (ADAMTS) 和基质金属蛋白酶 (MMPs),它们促进软骨细胞外基质 (ECM) 及基底膜成分降解,从而造成软骨细胞的丢失,关节软骨的破坏消失。近些年的研究已逐渐认识到 OA 是一个累积整个关节结构 (包括关节软骨、软骨下骨、半月板、关节滑膜及滑液) 的疾病<sup>[11]</sup>,因此关节各组成结构中相关的生理、生化改变受到研究者的关注。而基质金属蛋白酶 (MMPs) 作为主要的细胞外基质降解酶,在 OA 各组织结构中的表达及相互关系也日益受到研究者的关注。基质金属蛋白酶 (MMPs) 是酶催化活性依赖锌离子的蛋白酶超家族,在炎症性和退行性关节疾病组织结构破坏中起着重要的调节作用<sup>[12-13]</sup>,研究表明在各类关节病变中,无论是软骨的退行性变还是滑膜的无菌性炎症都不能脱离蛋白降解酶的病理作用而独立存在;同时它们在正常组织发育和重塑过程中也必不可少;另外在一定的条件下还可以通过调节特异靶器官的蛋白水解作用而参与启动或终止某些生物信号传导的过程。

### 1.3 关于 MMP-14/MMP-9 与骨关节炎

MMP-14 作为膜型-基质金属蛋白酶的主要成员之一,在 OA 中的功能研究备受关注。以往的对 MMP-14 的研究多集中在肿瘤细胞的浸润和转移上,认为它的上调能促进肿瘤的发展恶化。近些年来在 OA 软骨中的研究表明它具有调节和促进其他基质金属蛋白酶活化而间接参与降解软骨细胞外基质的作用。据报道 MMP-14 能够激活 MMP-13 酶原 (Pro-MMP-13) 和 MMP-3 酶原 (Pro-MMP-3),促使 MMP-13 和 MMP-3 酶原的活化;而 MMP-13 和 MMP-3 在 OA 软骨细胞细胞外基质的合成和分解代谢中起着重要作用,当 OA 发生时,关节微环境中 MMP-13 和 MMP-3 高表达<sup>[14]</sup>,表明二者参与骨关节炎的发生发展。同时, MMP-14 激活的 Pro-MMP-13 能够裂解 Pro-MMP-9,直接产生活化的 MMP-9 或在 MMP-3 的协同作用下产生活化的 MMP-9;最终促使活化的 MMP-9 与软骨中大量表达。MMP-9 属于明胶酶 B,又称 IV 型胶原,它是炎症性和退行性关节病中的关键酶,它对变性的胶原蛋白及细胞外基质大分子结构表现出了广泛的底物特异性,这将有助于降解胶原纤维、基底膜以及细胞外基质的其他结构<sup>[15]</sup>;另外,研究显示<sup>[16]</sup> OA 患者血浆和血清中 MMP-9 的表达水平也升高并且与关节软骨及软骨下骨的破坏严重程度呈正相关性。这一系列证据表明 MMP-14、MMP-9 在关节软骨中的表达存在一定的关联且产生正反馈效应加重了关节软骨的破坏,最终导致关节软骨完整性的丧失。长期以来研究者对 OA 的研究多集中在关节软骨的病理改变,较少注意滑膜性状的改变。通常认为滑膜出现炎症表现是骨关节炎 (OA) 的一种继发性改变,系软骨细胞外基质降解产物刺激所致而不被其所重视,直至逐渐认识 OA 是一个累积整个关节结构的骨骼肌肉紊乱性疾病。近年来研究<sup>[17-18]</sup>认为 OA 患者滑膜的炎症性改变在某种程度上类似于类风湿性关节炎 (RA),虽然炎症程度相对 RA 较轻,但其症状轻重与临床表现

密切相关；并且研究发现滑膜发生炎症反应时，大量炎症细胞浸润至滑膜囊并刺激周围的滑膜细胞分泌多种组织蛋白酶，从而使滑膜增厚并形成侵蚀性血管翳；反之，增厚的滑膜又产生大量的细胞因子、炎性因子、组织蛋白酶释放进入关节腔，使整个关节微环境内稳态失衡，最终参与关节软骨的分解代谢使关节软骨表现异常，由此可见，滑膜性状的相应改变亦是引起 OA 病程进展的一个重要的因素。

目前国内外对 OA 的病因研究已从组织分子水平逐渐深化到基因水平，欲求从基因水平更早的了解和控制 OA 的发生并干预病程进展<sup>[4]</sup>。前期研究已经证实在组织水平和蛋白水平 MMP-14、MMP-9 在 OA 患者滑膜组织中高表达且存在正相关关系，但基因水平 MMP-14 和 MMP-9 的表达情况仍然不清，因此为了深化探讨滑膜组织的性状改变在 OA 发生及发展过程中的作用机理，本研究采用半定量 RT-PCR 技术从基因水平检测和观察 MMP-14/-9 在 OA 与非 OA 患者滑膜组织中的表达情况，并探讨其在 OA 发生发展中的相互作用，进一步为骨关节炎患者的早期诊断与预防干预提供一定的实验依据和理论基础，以期待为骨关节炎（OA）的临床治疗寻找有效的干预靶点。

## 第二章 研究对象、材料和方法

### (Subjects & Materials & Methods)

#### 2.1 研究对象 (临床资料)

本研究中滑膜标本取自于2011年11月-2013年8月在石河子大学第一附属医院骨一科行膝关节镜手术、膝关节置换术、单纯膝关节半月板损伤或截肢手术的患者,共计68例,(其中病例组选择膝关节OA患者39例,男:女=1:1.3,年龄为43-79岁,平均病程为12.6个月;对照组选择29例非OA患者,男:女=1.2:1,年龄为19-67岁),所有病例均经本院骨科医生和影像科医生检查确诊(根据美国风湿病学会1995年制定的关于诊断骨性关节炎的标准)。

纳入及排除对象标准:(1)所有患者年龄 $\geq 18$ 周岁;(2)肝肾功能正常并排除恶性肿瘤和全身感染性疾病;(3)所有患者查抗“O”、类风湿因子阴性,血沉及C反应蛋白正常,无皮下结节,除外风湿、类风湿性关节炎、感染性关节炎及其他反应性关节炎等关节疾病;(4)在手术前两周内未使用糖皮质激素类药物。

美国风湿病学会1995年提出的膝关节骨关节炎诊断标准:

- 临床表现:
1. 前一个月大多数日子出现膝关节疼痛;
  2. 关节活动时有骨擦感(骨弹响);
  3. 晨僵小于30分钟/日;
  4. 年龄 $\geq 38$ 岁;
  5. 检查膝关节有骨性肥大。

满足1+2+3+4或1+2+5或1+4+5说明骨关节炎存在。

临床及放射学检查:

1. 前一个月内反复出现膝关节疼痛;
2. X线片(站立位或负重位)示关节间隙变窄,软骨下骨硬化和(或)囊性变,关节边缘骨赘形成;
3. 实验室检查符合骨关节炎指标;
4. 年龄 $\geq 40$ 岁;
5. 晨僵 $< 30$ 分钟;
6. 关节活动时有骨擦音(感)。

具备1+2或1+3+5+6或1+4+5+6说明骨关节炎存在。

结合临床表现、实验室检查及影像学检查可确诊膝关节骨关节炎。

本研究取样均征得患者本人同意并获得医院伦理委员会批准。

## 2.2 主要实验仪器和试剂

### 2.2.1 试剂与仪器

- 1) RNA Trizol Regent RNA 裂解液 (美国 Invitrogen 公司)
- 2) 氯仿 chloroform(北京天根生物公司)
- 3) 异丙醇 Isopropanol (北京天根生物公司)
- 4) DEPC (上海生物工程有限责任公司)
- 5) 无水乙醇、70%乙醇
- 6) 逆转录试剂盒 (Lot:K1622,美国 Thermo Scientific)
- 7) PCR-Mix (北京天根生物公司)
- 8) 琼脂糖(上海生工生物工程股份有限公司)
- 9) 电泳缓冲液 TAE
- 10) 溴化乙锭 (EB)
- 11) 加样缓冲液 (6X Loading Buffer)
- 12) PCR Marker
- 13) GAPDH (内参基因) (上海生物工程有限责任公司)
- 14) MMP-14/MMP-9 引物合成 (上海生物工程有限责任公司)
- 15) 液氮
- 16) 超净工作台 (美国 Thermo Electron Corporation)
- 17) 研钵、组织剪
- 18) 移液器 (1ml/200ul/20ul/10ul/2.5ul) (美国 eppendorf 公司)
- 19) 电子天平 (上海精密电器有限公司)
- 20) 涡旋振荡器 (上海精科实验有限公司)
- 21) 三洋-80℃低温冰箱 (日本三洋公司)
- 22) 组织破碎仪 (上海鸿威试验设备有限公司)
- 23) 高速离心机 (美国 Thermo Electron Corporation)
- 24) 分光光度计(美国 Thermo scientific)
- 25) PCR 仪 (美国 Bio-Rad 生物工程公司)
- 26) 电泳仪, 电泳槽及灌胶模具等
- 27) 凝胶图像系统 (美国 Bio-Rad 公司)

### 2.2.2 实验器具的处理与准备及主要溶液配制

- 1) 塑料制品的准备及处理 (包括枪头、EP管等)

将塑料制品逐个浸泡在已备好的DEPC水中, 完全浸泡37℃过夜, 然后送至高压3次, 后置于60℃烘烤箱中烘干, 实验前将枪头、EP管放入无菌台。

## 2) 玻璃制品的准备及处理

玻璃制品清洗干净烘干后泡酸过夜，冲洗干净后烘干，然后DEPC水浸泡过夜，锡箔纸包裹高压后备用。

## 3) 器械及研钵

包括剪刀、镊子洗干净后高压，不需泡DEPC水，研钵洗净后锡箔纸包裹高压后使用或是在每次使用前倒入无水乙醇火烧，垫数层锡箔纸置于4℃冰箱冷却待用，避免灼伤或烫伤。

## 4) DEPC 水（无酶水）

泡实验器具的 DEPC 水的配置：1000ml 的双蒸水加 1mlDEPC 试剂，静置于 1000ml 的容量瓶中 4 小时后备用；逆转录所用 DEPC 水的配置：100ml 的盐水瓶内装 50ml 双蒸水，1000:1 加入 50ulDEPC，室温静置过夜后高压，后分装至 DEPC 水处理的 EP 管中，-20℃保存备用。

## 5) 70%乙醇

用无水乙醇+DEPC 水配置,70ml 无水乙醇+30ml DEPC 水(其中 DEPC 水需先高压), 后置于-20℃备用。

## 6) 异丙醇、氯仿

均于北京天根生物公司购买生物成品，置于棕色瓶中避光保存备用。

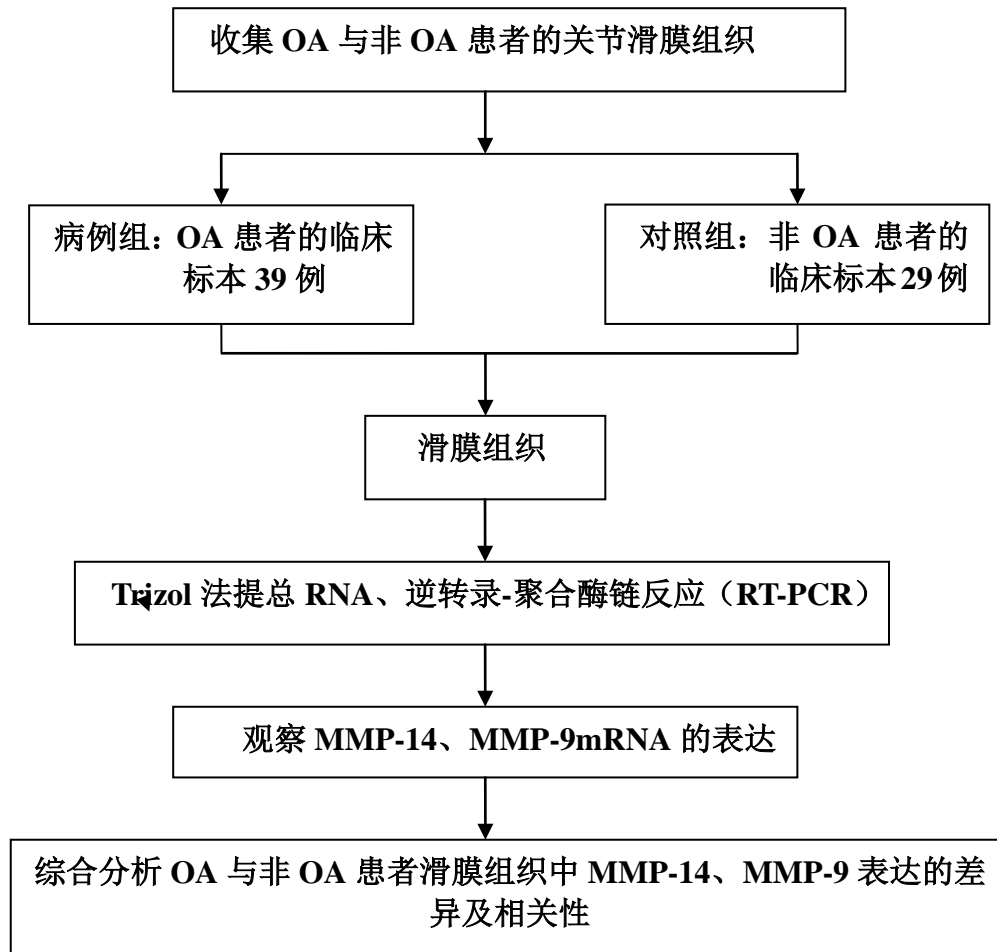
## 7) 电泳缓冲液（TBE）

将5XTBE原液稀释10倍成0.5XTBE即可于电泳时使用（此为电泳时的工作液浓度）

## 8) 琼脂糖凝胶的配制

根据目的基因引物大小决定配制琼脂糖凝胶的浓度，通常引物越大，琼脂糖凝胶浓度越小；反之则琼脂糖凝胶浓度越大。本实验主要采用 2%的琼脂糖凝胶：电子天平准确称量 2g 琼脂糖加入 100ml0.5XTBE 工作液，置于 250ml 锥形瓶中，锡箔纸封口，开小口，微波炉中中火 3min 至沸腾透明，然后冷却至 40-50℃时加入 EB（核酸染料）5ul,避免温度过高加入 EB 染料，因为会破坏 EB 的结构，使核酸基因无法探测，然后充分混匀，避免产生气泡，将温热的凝胶倒入已经置好梳子的制胶膜型中，可用枪头赶走胶膜中少许的气泡，室温放置至凝固后即可进行凝胶电泳，也可制备好后存放于 0.5XTBE 缓冲液中，最好现配现用。

## 2.3 技术路线图



## 2.4 研究方法

滑膜组织取自于行膝关节镜手术、关节置换术、单纯半月板损伤手术或截肢手术的患者，共计 68 例，所有样本均于手术中获取，切除部位为髌上囊处滑膜组织，切除的滑膜组织于术后 1 小时内用生理盐水反复冲洗三遍后用提前准备好的锡箔纸包裹，注明样本的病例信息（包括年龄、病程、诊断及相关临床检查等），然后迅速置于液氮罐中速冻过夜，保持其结构的完整性，后转入 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存，待样本集齐后严格按照 Trizol 法提取总 RNA，逆转录试剂盒说明逆转单链 RNA 为双链 cDNA，最后 PCR 仪扩增，凝胶电泳观察和检测目的基因的表达情况。

### 2.4.1 Trizol 法抽提总 RNA

Trizol 法是最常用的提取 RNA 的方法。基本原理是基于 Trizol 试剂中苯酚和异硫氰酸胍混合试剂的作用液相提取总 RNA。因为此方法能使不同种属不同分子量大小的多种 RNA 析出,并且得到的总 RNA 中蛋白质及 DNA 的污染较少,所以常用来做 RT-PCR,分离 mRNA,做体外翻译等。而在抽提及操作 RNA 的过程中,最关键的因素是尽量减少 RNA 酶的污染,因此操作 RNA 的试剂及器皿都要进行无酶处理,并且全程佩戴一次性手套和口罩,手套勤换,低温操作。

- 1) 匀浆化处理: 取滑膜标本约 50-100mg 置于研钵中,可提前用高压灭菌的剪刀剪碎组织,然后倒入液氮低温下充分研磨成粉末状,转移至 1.5ml 离心管,加入 1ml Trizol 振荡混匀,室温静置 5-10min;
- 2) 分离阶段: 每 1ml Trizol 中加 200ul 氯仿,剧烈振荡 15s,冰上孵育 10min,然后置于 4℃, 12000rpm 离心机离心 15min,离心后样品分三层: 上层: 无色水相 (RNA); 中间层: 白色; 下层: 粉红色有机相 (蛋白质和 DNA);
- 3) RNA 的沉淀: 小心吸取上层无色水相并转移至新的 1.5ml EP 管中(约 400ul),加入等体积冷冻的异丙醇 (IPA),室温孵育 10min 或 -20℃ 冰箱静置过夜,然后 12000rpm, 4℃ 离心 15min,在管底可见颜色较浅,很少量的半透明胶状沉淀,即为 RNA 沉淀;
- 4) RNA 的洗脱: 小心的倒掉上清,留取沉淀,加入 1ml 70% 预冷的乙醇 (无酶水配置),剧烈振荡 RNA 沉淀一次,然后 4℃, 7500rpm 离心 5-10min;
- 5) RNA 的溶解: 小心弃上清,留取沉淀置于超净工作台开风机吹干(约 10min,此时 RNA 沉淀变透明),为尽快晾干沉淀,也可在弃上清后短暂离心,用枪头吸除残留的液体,尽可能避免接触沉淀,注意不要让 RNA 沉淀完全干燥,这样会极大地降低 RNA 的可溶性。然后在 EP 管中加入 20ul DEPC 水溶解 RNA 沉淀,在 55-60℃ 下孵育 3-5min 或手握 5min 助其溶解;
- 6) RNA 的浓度测定: 采用分光光度仪测定 RNA 的浓度,并观察其分光光度值 OD260/OD280 是否在 1.8-2.0 之间,此区间之间说明 RNA 纯度较高,可进行后续试验,同时记录总 RNA 的浓度(单位为 ng/ul)及对应的标本编号,为下一步逆转录合成 cDNA 提供相应的数据。
- 7) RNA 的保存: 抽提的 RNA 置于 -80℃ 超低温冰箱中长期保存,或立即用于下一步逆转录合成双链 cDNA。

#### 2.4.2 逆转录合成 cDNA 双链

在逆转录前根据先前测定的总 RNA 浓度,对其进行一定调整,加入一定量的 DEPC 水使所要进行逆转录的 RNA 稀释到统一浓度,尽量保证所取的总 RNA 的量一致,这样才能够各不同样本总 RNA 中检测目的基因信使 RNA 的表达差异。

- 1) 严格按照 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 的操作说明逆转录合成第一链 cDNA,依次于 100ul 的无酶 EP 管中加入等量 (1ug) 的总 RNA,随机引物,无酶水,5X Reaction Buffer, RNA 酶的抑制剂,10mM dNTP mix,逆转

录酶，总体系 20ul。具体反应体系如下：

总 RNA (Template RNA)	1ug	2ul
随机引物 Oligo(dT) <sub>18</sub> primer		1ul
无酶水(water,nuclease-free)		9ul
5X Reaction Buffer		4ul
RNA 酶抑制剂 (RiboLock RNase Inhibitor)		1ul
逆转录酶 (ReverAid M-Mul V RT)		1ul
总体积 (Total volume)		20ul

2) 依次加好各反应试剂后,轻轻混匀,短暂离心后置于设定好的 PCR 仪中进行逆转录,设定反应条件依次如下:

孵育	37℃	5min 1 循环
逆转录	45℃	60min 1 循环
灭活逆转录酶	70℃	5min 1 循环
保存	4℃	

3) 逆转录合成的 cDNA 可直接进行 PCR 聚合酶连反应,或是-20℃冰箱保存以备短期(一周)内使用,长期保存应置于-80℃超低温冰箱保存。

### 2.4.3 PCR 聚合酶链式反应

PCR 的基本原理类似于 DNA 的天然复制的过程,其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物,其基本反应步骤包括:模板 DNA 的变性——模板 DNA 与引物的退火——引物的延伸。

1) 引物的处理和稀释:干粉引物由生工生物工程(上海)有限公司设计合成。引物序列如下表(表 1)。收到引物后,在打开引物管前离心机 4000rpm 转速下离心 1min,避免开启时干粉引物的散失。稀释终浓度为 100pmol/ul,根据引物报告单上 OD 值,按比例加入无核酸酶的双蒸水即可溶解干粉引物并达到恒定的终浓度。

稀释时引物的加水量计算公式如下:

终浓度 100pmol/ul 1OD 加水量 (ul) = 1OD 相当于 umol 数 x 10000

稀释的引物分装-20℃保存,尽量避免反复冻融。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The PCR primers sequences

目的基因	引物序列	产物长度 (bp)	PCR 条件
Target genes	Primer sequence	PCR products(bp)	PCR conditions
MMP-14	(F) 5'-CATGGCCTAAACTGTGCATG-3' (R) 5'- GCAGGCCATAGGACTAGCC-3'	126	58°C, 35cycle
GAPDH <sup>①</sup>	(F) 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3' (R) 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	496	
MMP-9	(F)5'- GCCTGCACCACGGACGGTCGCTCC-3' (R)5'- GAGGTGCCGGATGCCATTCACGTC-3'	564	55°C,35cycle
GAPDH <sup>②</sup>	(F) 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3' (R) 5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTCCATG-3'	325	

2) 按 25ul PCR 反应体系, 依次于 100ul PCR 管中加入如下反应试剂 (冰上操作):

模板 cDNA	2ul
MMP-14/ GAPDH <sup>①</sup> ;MMP-9/GAPDH <sup>②</sup> 上游引物	0.5ul
MMP-14/ GAPDH <sup>①</sup> ;MMP-9/GAPDH <sup>②</sup> 下游引物	0.5ul
2X Mix	12.5ul
ddH <sub>2</sub> O	9.5ul
总体积	26ul

如上加完相应试剂后轻轻混匀, 短暂离心后置于 PCR 仪上进行扩增。

3) PCR 反应条件: 在进行最终 PCR 前主要是摸索合理的退火温度及循环梯度, 根据引物报单上的相关信息计算 MMP-14 和 MMP-9 的退火温度, 并以 1°C 为增减量, 逐一增减退火温度进行 PCR 并凝胶电泳检测目的基因的表达与否, 最终确定 MMP-14 的合理退火温度为 58°C, MMP-9 的最佳退火温度为 55°C, 循环次数均为 35 个循环。最终反应体系如下:

①95°C	5min
变性 ②95°C	30s
退火 ③58°C/55°C	30s
延伸 ④72°C	30s (从②-④步进行 35 个循环)
⑤72°C	10min
⑥4°C	∞

4) PCR 产物: PCR 结束后可直接电泳, 亦或是-20°C短暂保存。

#### 2.4.4 琼脂糖凝胶电泳鉴定

琼脂糖凝胶电泳是一种非常快速、简便、最常用的分离纯化和鉴定核酸的方法

- 1) 琼脂糖凝胶及电泳液的配置如前所述, 将凝胶置于电泳槽中, 加入适量电泳液, 刚好没过凝胶为宜, 过多过少均不宜电泳的顺利进行 (过多会使琼脂凝胶于电泳液中飘动不定导致电流不均, 核酸在凝胶中的迁移速率不一致而出现条带歪斜或大小不一致的结果; 过少会影响电流于凝胶中的传导率)。
- 2) 加样: Marker 孔: 取 5ulMarker  
    样本孔: 上样缓冲液 6X Loading Buffer 1ul+PCR 产物 5ul 混合均匀后依次加入样本孔中。
- 3) 电泳: 待点样全部完成, 接通电源进行电泳, 对不同大小的目的基因采用不同的电压: 引物较小, 采用低电压, 本实验对 MMP-14 恒定电压 80V, 引物较大时可适当增加电压, 本实验中 MMP-9 的检测恒定电压 100V, 最后根据跑胶情况决定电泳时间, 两目的基因电泳时间均约 1 小时左右。
- 4) 电泳鉴定: 电泳结束后, 于 Bio-Rad 凝胶图像系统下观察目的基因 (MMP-14/MMP-9) 的表达情况。
- 5) 图像的采集和分析: 琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪中观察并采集图像, 然后通过 Quantity One 4.62 软件对电泳条带进行灰度值分析。

## 2.5 统计学处理

将所得的数据采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析, 所有的计量资料均采用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间两两比较采用 t 检验, 计数资料采用  $\chi^2$  检验, 相关性采用 Pearson 积矩相关分析, 以  $P < 0.05$  确定为差异有统计学意义。

## 第三章 实验结果

### (The Experiment Results)

#### 3.1 PCR 方法检测结果

##### 3.1.1 PCR 结果判定

使用 Bio-Rad 数码凝胶成像仪观察目的基因表达的情况，初步判定是否为目的基因表达条带；再采集相应的凝胶图像，然后运用 Quantity One 4.62 软件对目的条带进行灰度值扫描分析，结果以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

$$\text{目的基因相对表达量} = \frac{\text{目的基因条带灰度值}}{\text{同一样本GAPDH灰度值}}$$

##### 3.1.2 PCR 结果分析

Bio-Rad 凝胶成像仪下观察发现 68 例患者滑膜组织中目的基因 MMP-14、MMP-9 均有表达 (M, Marker; 1、2、3 代表非 OA 组; 4、5、6 代表 OA 组), 且产物大小与引物大小基本一致 (MMP-14, 126bp; MMP-9, 564bp), 无非特异性杂带, 说明目的基因在滑膜组织中特异性表达。仔细观察发现 OA 组两目的基因 (MMP-14 和 MMP-9) 的表达条带相比非 OA 组目的条带更明亮清晰, 初步判定病例组 (OA) 患者滑膜组织中 MMP-14 mRNA、MMP-9 mRNA 表达水平高于非 OA 对照组。(图 1、2 所示, Figure 1,2)。

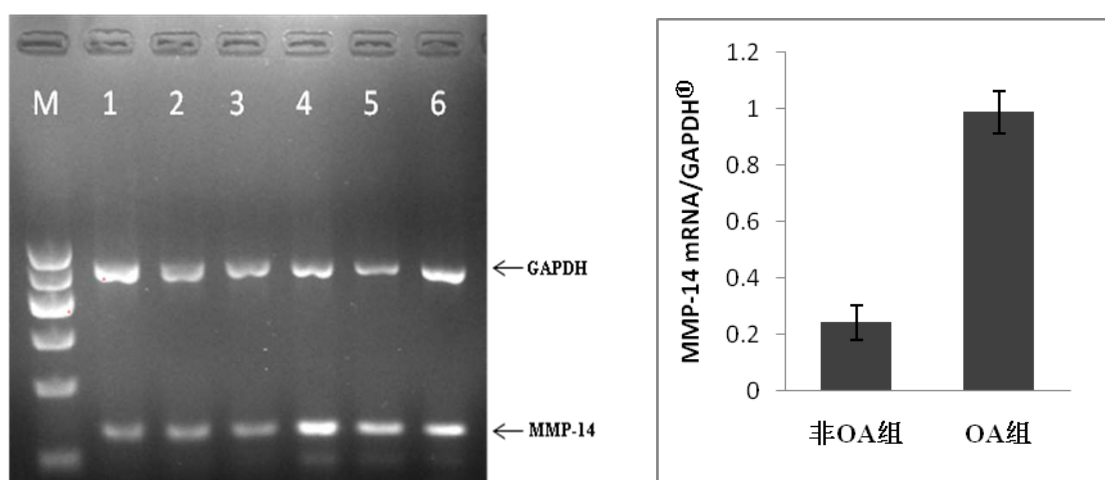


图 1: MMP-14 mRNA 在非 OA (1、2、3) 与 OA (4、5、6) 滑膜组织中的表达情况

Figure 1: The expression of MMP-14 mRNA in Non-OA (1, 2, 3) and OA (4, 5, 6) synovial tissue by PCR

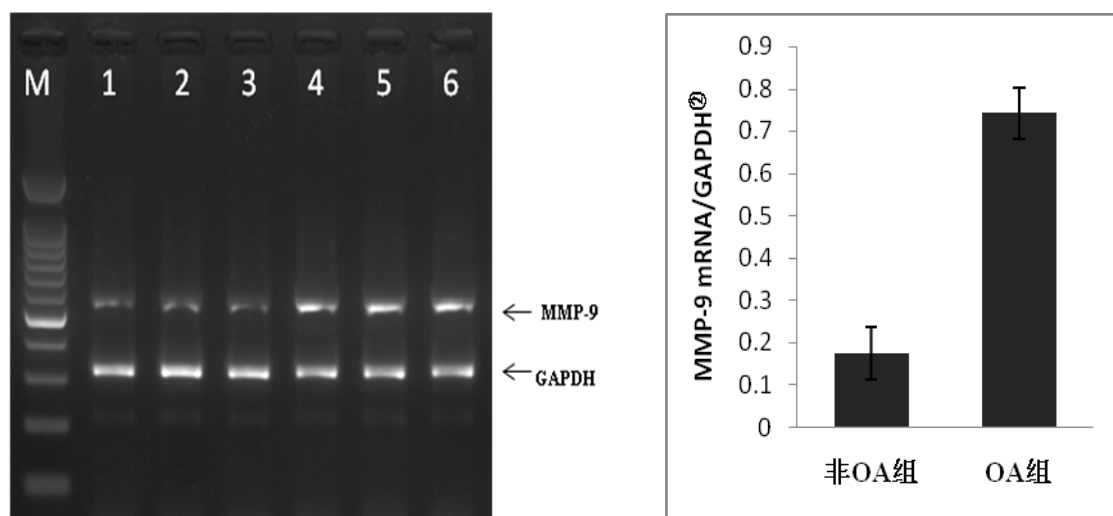


图 2:MMP-9 mRNA 在非 OA (1、2、3) 与 OA (4、5、6) 滑膜组织中的表达情况

Figure 2:The expression of MMP-9 mRNA in Non-OA(1、2、3) and OA(2、3、4) synovial tissue

## 3.2 统计学分析

### 3.2.1 OA 组与非 OA 组患者一般资料的比较

采用 SPSS17.0 统计软件对两组性别、年龄及体重指数进行统计学分析, 两组性别进行  $\chi^2$  检验, 两组年龄、体重指数分别进行 t 检验, 结果显示: 两组患者性别、年龄及体重指数之间差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 说明两组患者一般资料相匹配。(见表 3-2-1a, 3-2-1b, 3-2-1c)

表 3-2-1a OA 组与非 OA 组性别比较

Table 3-2-1a Compare the gender between OA group and Non-OA group

组别	男性	女性
OA 组	17	22
非 OA 组	16	13
$\chi^2$		0.893
P 值		0.462

表 3-2-1b OA 组与非 OA 组年龄的比较

Table 3-2-1b Compare the age between OA group and Non-OA group

组别	例数	年龄 (岁)
OA 组	39	62.4±8.6
非 OA 组	29	51.2±12.9
t 值		3.476
P 值		0.067

表 3-2-1b OA 组与非 OA 组体重指数的比较

Table 3-2-1b Compare the body mass index(BMI) between OA group and Non-OA group

组别	例数	体重指数 (kg/m <sup>2</sup> )
OA 组	39	24.43±1.84
非 OA 组	29	23.89±2.13
t 值		0.168
P 值		0.672

### 3.2.2 OA 组与非 OA 组滑膜组织中 MMP-14 mRNA 相对表达量的比较

运用 Quantity One 4.62 软件对所有 68 例患者滑膜组织中目的基因条带进行灰度值扫描分析, 所得相对表达量采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, MMP-14 mRNA 的相对表达量采用两独立样本 t 检验进行统计分析, 结果显示 OA 组滑膜组织中 MMP-14 mRNA 的相对表达量高于非 OA 对照组 ( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。(见表 3-2-2)

表 3-2-2 OA 组与非 OA 组滑膜组织中 MMP-14 mRNA 表达量之间的比较

Table 3-2-2 Compare the expression of MMP-14 mRNA between OA group and Non-OA group

组别	例数	MMP-14/ GAPDH <sup>①</sup>
OA 组	39	0.9887±0.075
非 OA 组	29	0.244±0.06147
t 值		32.90
P 值		<0.05

### 3.2.3 OA 组与非 OA 组滑膜组织中 MMP-9 mRNA 相对表达量的比较

采用 SPSS 统计学软件对 MMP-9 mRNA 相对表达量进行两独立样本 t 检验, 结果显示: OA 组中 MMP-9 mRNA 的表达量显著高于非 OA 对照组 ( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。(见表(3-2-3))

表 3-2-3 OA 组与非 OA 组滑膜组织中 MMP-9 mRNA 表达量之间的比较

Table 3-2-3 Compare the expression of MMP-9 mRNA between OA group and Non-OA group

组别	例数	MMP-9/GAPDH <sup>②</sup>
OA 组	39	0.742±0.069
非 OA 组	29	0.176±0.05
t 值		32.789
P 值		<0.05

### 3.2.4 MMP-14 与 MMP-9 相关性分析

将 OA 组滑膜组织中 MMP-14 mRNA 和 MMP-9 mRNA 的相对表达量进行 Pearson 相关性分析, 结果显示: 相关系数  $r=0.863$  ( $P < 0.05$ ), 表明二者在 OA 滑膜组织中的表达呈正相关关系。

将非 OA 组滑膜组织中 MMP-14 mRNA 与 MMP-9 mRNA 的相对表达量进行 Pearson 相关性分析, 结果示: 相关系数  $r=0.272$  ( $P > 0.05$ ), 无统计学意义, 不能认为二者在非 OA 滑膜组织中的表达存在正相关。

## 第四章 讨论

### (Discussion)

#### 4.1 骨关节炎与 MMPs

在骨关节炎（Osteoarthritis, OA）的发展过程中，关节软骨细胞外基质（ECM）的降解是其主要的病理改变，但是随着研究的不断深入扩展，已逐渐认识到OA是一个累积整个关节的疾病<sup>[11]</sup>，其中除了涉及软骨的退化消失，还包括软骨下骨、半月板、关节滑膜及滑液等的各种（生理、生化、生物力学）改变：如软骨下骨骨化增厚；关节边缘骨赘形成；关节滑膜炎充血，炎性细胞浸润等均促使OA这一慢性、渐进性、退行性关节疾病进一步恶化。虽然它不像肿瘤一样威胁患者的生命，其致残率也不如类风湿或风湿性关节炎高，但因其在老年人群中的患病率较高，严重影响患者的生活质量，并且随着全球老龄化问题的加剧，社会经济负担也随之加重，因此对OA的全面研究不容忽视。而到目前为止，尚无任何一种学说能完全阐明OA的病因及发病机制，通常认为是生物性和机械性因素共同作用的结果，包括遗传、自身免疫反应、代谢异常、创伤、生物力学的改变等，这些均与OA的发生密切相关；与此同时，年龄、性别、肥胖问题及生活习惯等在OA的发生过程中也存在差异，可见OA是一种多因素导致的骨骼肌肉疾病。目前针对OA的诊断主要是依据临床表现结合一定的影像学检查<sup>[5]</sup>，但当影像学检查表现出异常时通常已经进入OA的进展期；而治疗主要以对症治疗为主，以缓解疼痛来改善关节功能，从而达到提高患者生活质量的目的，暂未发现能够完全阻止疾病进展的治疗措施<sup>[19]</sup>。因此从基因水平深入研究OA的病因及相关调节因子的表达情况对早期探寻其在OA发生发展过程中的作用及可能的作用机制具有十分重要的意义，因为这对于全面阐明OA的发病机制，探索有效的干预靶点提供了一个新的视角和研究方向。

近年来随着分子生物学技术的发展，研究者发现基质金属蛋白酶家族（MMPs）与骨关节炎的发展有着密切的关系。MMPs 是由 24 个成员组成的酶活性依赖钙离子、锌离子的蛋白酶超家族，广泛存在于结缔组织中，前期的研究<sup>[20-21]</sup>表明其在组织的重构、器官的发生、炎症的调控及肿瘤疾病等多种生理过程中发挥着作用。而在骨关节炎中的研究表明 MMPs 家族成员参与降解关节软骨细胞外基质及基底膜成分，并导致软骨细胞外基质合成与分解代谢失衡，这可能是 OA 病变的主要机制，因此认为关节软骨退变是骨性关节炎疾病进展的中心环节。而随着 OA 作为骨骼肌肉疾病这一整体概念被逐渐认识后，研究者开始关注整个关节的结构（软骨下骨、半月板、关节韧带、关节滑膜及滑液等），并发现关节软骨及滑膜细胞能产生不同的基质金属蛋白酶，比如 MMP-13 是由软骨细胞产生分泌<sup>[22]</sup>，MMP-1 和 MMP-3 是由滑膜细胞产生，MMP-2 是由滑膜衬里下方的间质细胞分泌<sup>[23]</sup>。而这些基质金属蛋白酶在关节滑液中也高表达<sup>[24]</sup>，表明它们从软骨

或滑膜细胞中激活并迁移释放至关节滑液中，促使整个关节微环境中 MMPs-TIMPs 的平衡失调，周而复始，形成恶性循环，加速骨关节炎的进展恶化。

本研究对患者一般资料进行统计学分析，结果显示两组患者性别、年龄及体重指数差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )，表明两组患者一般资料相匹配，排除其对 OA 的影响，而选择 MMPs 进行研究，是因为基质金属蛋白酶降解学说被认为是研究 OA 发病机制的主要学说之一，而基因水平的研究可以为 OA 的预防治疗提供更早期的观察指标。

## 4.2 关节软骨、滑膜与 MMPs

然而就关节软骨和滑膜的组成成分来讲，关节软骨主要是由软骨细胞和大量水合性的软骨细胞外基质组成。软骨外基质是由胶原、蛋白多糖和水组成，其中以 II 型胶原为主，构成关节软骨的网状微结构；蛋白多糖通过水分子结合成多聚体的形式存在，常与一个核心蛋白链聚集形成聚蛋白多糖，使关节软骨具有抵抗负荷和分散压力的能力；水合性使得各组成成分间紧密连接形成凝胶，从而具有良好地弹性和缓冲性，对关节起一定的保护作用。关节软骨本身无血管或淋巴管，主要依赖软骨周围组织（软骨下骨和滑膜）提供营养物质来维持关节软骨及软骨细胞的正常功能；而软骨的代谢废物也主要通过滑膜组织代谢分解和转化吸收，关节滑液则作为主要的媒介参与构成和维持整个关节微环境的动态平衡，协同完成关节的正常功能。因此滑膜组织作为一种半渗透性的膜成分在关节微环境的调控过程中起着重要的作用。

滑膜 (Synovium, SM) 组织是由滑膜细胞和成纤维细胞等形成一层薄层的衬里层而构成关节腔的壁层，其本身又可分为 A、B、C 型细胞，其中以 B 型细胞（成纤维细胞）为主，约占滑膜总细胞的 70%-80%，主要功能是调节细胞外基质的合成和分解代谢，也是滑膜发挥其功能作用的主要组成部分；其次是 A 型细胞，又被称为滑膜巨噬细胞，主要功能是分解吞噬进入关节腔内的异物；最后是 C 型细胞，数量不足滑膜总细胞数的 1%，但在启动免疫应答非过程中起着重要作用。正常生理条件下，关节滑液 (Synovial fluid, SF) 主要来源于滑膜组织，其中最重要的两个分子产物是透明质酸和润滑剂，它们在保护关节软骨的完整性和维持关节正常生理功能上起着重要作用；而 OA 发生时，两种的成分在关节滑液中的浓度发生了改变，影响了关节软骨的完整性和功能。这说明滑膜组织在维持关节正常生理功能中起着十分重要的作用；另外，随着 OA 研究的不断深入，研究者还发现滑膜组织能够产生一些促炎因子和代谢产物，从而促进关节软骨的退行性变，可见滑膜性状的改变导致了软骨保护因子的减少，而增加了软骨细胞外基质降解产物。以往研究者认为骨关节炎患者滑膜的炎症反应是一种继发性的改变，认为是软骨细胞外基质的裂解产物所致，但是近年来学者认为<sup>[17-18]</sup>OA 患者滑膜的炎症改变在某种程度上类似于类风湿性关节炎 (RA)，虽然炎症程度相比 RA 较低，但其症状的轻重与临床表现趋于一致，即与软骨的改变一致；甚至认为滑膜的炎症改变要早于软骨细胞的改变<sup>[25]</sup>，这增加了 OA 的发病风险。因此深入研究骨关节炎滑膜组织的改变具有重

要的意义。

临床上对骨关节炎滑膜炎的判定主要集中在组织学水平,包括影像学辅助性检查(MRI和US),关节镜下大体观察以及组织病理,一直以来因为缺乏滑膜炎的金标准诊断这些方法备受争议<sup>[26]</sup>,而滑膜的改变对OA的影响也备受关注。其中,临床关节镜下的大体观察我们观察到OA患者滑膜组织表现为早期广泛的充血水肿,晚期出现纤维结缔组织絮状增生、肥厚,并形成大小不等,性状不一的滑膜皱襞,甚至向软骨面延伸发展导致软骨表面剥脱外露;而非OA组患者滑膜组织则无这些表现,关节镜下呈粉红色,表面平滑无增厚,并紧贴关节囊的内面附着于光滑而有光泽的关节软骨边缘;由此可见滑膜组织性状的改变与OA密切相关。而滑膜发生炎症反应后不仅本身出现一系列的异常表现,其渗透性的改变也破坏关节内环境各成分的平衡和稳定,引起关节微环境中MMPs-TIMPs失衡,最终造成关节软骨细胞外基质的降解退变消失,因此从细胞分子水平进一步研究与骨关节炎相关的滑膜炎就显得十分重要,这可以为临床OA的多相性提供更多的视角和观点。

近年来对MMPs的研究证实MMP-3和MMP-13对软骨ECM的降解作用较为显著,其中MMP-3主要是通过降低纤溶酶原的激活作用而下调与之相关的纤溶酶的活性,继而促进纤溶酶介导的一些蛋白聚糖(如纤维连接蛋白、糖蛋白、层连蛋白等)的水解<sup>[27]</sup>。而MMP-13主要是降解II型胶原纤维,还有蛋白聚糖以及软骨中一些较大的蛋白多糖<sup>[28]</sup>。而MMP-14作为一种膜型-基质金属蛋白酶,在软骨中能够激活其他的基质金属蛋白酶,其中就包括激活Pro-MMP-13和Pro-MMP-3酶原;而前期的研究发现MMP-3在OA的软骨组织中呈高表达并且与关节软骨退变程度呈正相关<sup>[29]</sup>;进一步研究显示MMP-3能够激活Pro-MMP-9酶原,继而产生活化的MMP-9发挥级联放大效应促使软骨基质的裂解加剧。因此我们推测在OA滑膜组织中MMP-14/MMP-9也可能参与了这一系列病理过程而最终促进软骨细胞外基质的降解。前期的研究已经证实MMP-14、MMP-9蛋白表达水平在OA滑膜组织中明显高于非OA组,并且两种蛋白表达量呈正相关<sup>[30]</sup>。本研究在前期实验的基础上采用RT-PCR的方法从基因水平检测滑膜组织中MMP-14 mRNA/MMP-9 mRNA的表达并分析其相关性,结果发现MMP-14 mRNA和MMP-9 mRNA在OA组与非OA组滑膜组织中均有表达,并且OA组的相对表达量明显高于非OA组,两种基因的表达量之间存在正相关关系,表明两种基因都参与组织的重构,并且通过在滑膜组织中的高表达参与OA的发生发展过程,此外MMP-14和MMP-9在一定的条件下协同作用促进骨关节炎的病程进展。

### 4.3 MMP-14 与骨性关节炎

MMP-14是基质金属蛋白酶超家族中的主要成员之一,是一种膜型蛋白酶,由Sato<sup>[31]</sup>等人从人胚胎cDNA文库中鉴别出来,染色体主要定位在14q11-q12,具有前肽区、催化区以及C末端三个结构域,编码由582个氨基酸组成的蛋白质,相对分子量为66KDa。研究

表明MMP-14除了能够降解不同的细胞外基质成分,比如I/II/III型胶原以及纤连蛋白和层粘连蛋白外<sup>[32]</sup>,MMP-14作为细胞表面的脱落酶还能够裂解许多膜型蛋白,比如E-钙粘蛋白和N-钙粘蛋白,整合素、透明质酸受体CD44,破骨细胞分化因子(RANKL)以及其他一些细胞表面的蛋白聚糖及受体<sup>[33]</sup>,而导致滑膜的增生,软骨和骨的破坏。目前研究的热点主要集中于MMP-14能够激活其他的基质金属蛋白酶,其中主要包括激活Pro-MMP-13和Pro-MMP-3。MMP-13在OA软骨细胞的合成和分解代谢中起着重要的作用,主要参与降解II型胶原纤维,还有蛋白聚糖以及软骨中一些较大的蛋白多糖<sup>[28]</sup>,MMP-3则分解软骨中其他的一些蛋白聚糖,包括链接蛋白、糖蛋白,这些蛋白在维持蛋白聚糖和透明质酸形成的非共价键稳定结构中起着重要作用,而MMP-14的激活过程在一定条件下促进了关节微环境中MMP-13和MMP-3的高表达,进一步加速了关节软骨的破坏。最新的研究表明,MMP-14在软骨细胞的表面表达并且能够激活Pro-MMP-2,通过MMP-14激活的MMP-2可以腐蚀软骨细胞周围所有的细胞外基质成分,包括蛋白聚糖。以往对MMP-14的研究多集中在风湿性关节炎,认为MMP-14的高表达可以促使类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞侵入至关节软骨,导致关节结构的破坏<sup>[34]</sup>,而在OA中的研究较少。前期研究已表明OA滑膜组织中MMP-14的蛋白表达水平升高,并主要于滑膜衬里细胞胞浆中表达<sup>[35]</sup>,说明滑膜组织中MMP-14的表达参与OA的发病过程。而随着转基因动物技术的发展,基因敲除动物的研究从基因水平更好的发现和阐明目的基因的各种生理病理作用及与疾病的关系,成为了基因研究的主要生物技术。比如有研究表明MMP-13基因敲除的小鼠表现出骨关节炎的进展明显减慢,直接说明MMP-13基因在OA的发展过程中起着重要作用<sup>[36]</sup>。而MMP-14基因水平的直接证据在OA中研究较少的其中一个主要原因就是MMP-14基因敲除的小鼠在短期内均死亡,虽然表现出与细胞外基质处理缺失相关的严重发育畸形,比如侏儒症、骨骼发育异常及血管形成缺陷,但却无法与OA的病理改变形成明显或更直接的关系,因为OA是一种渐进性、退行性的发生在中老年人群的关节疾病,是一个慢性的发病过程,而基因敲除小鼠的过早死亡缺失了这样一个发展的过程和阶段,因此缺乏更直接的MMP-14基因与OA疾病的关系;那么从OA疾病再到MMP-14的研究方向就成为了更为直接有效的研究方式。因此从OA标本中检测MMP-14的基因表达能更好的发现其与骨关节炎的作用。

本研究中采用RT-PCR的方法检测发现MMP-14在OA组与非OA组患者的滑膜组织中均有表达,说明MMP-14是参与细胞外基质组成的重要基因,因此基因敲除MMP-14的小鼠表现出严重的细胞外基质处理的缺失并过早死亡;同时检测结果显示MMP-14 mRNA在OA组患者滑膜组织中的表达明显高于非OA组,说明MMP-14从基因水平即对骨关节炎具有一定的调控,可能与遗传有关,也有可能与后天外界环境的各种诱导刺激有关,促使其在某一阶段过高表达,继而发挥其相关作用。因此特异性的寻找MMP-14的干预靶点可能治疗干预OA的病程进展具有十分重要的意义。

## 4.4 MMP-9 与骨性关节炎

MMP-9是第一个从人类的巨噬细胞中分离纯化得到的基质金属蛋白酶,染色体定位在20q11.2-q13.1,分子量92kDa,属于明胶酶B,又称IV型胶原酶,可见MMP-9的表达受限于巨噬细胞的数量,并且能够溶解细胞外基质,裂解IV, V, VII, X型胶原以及胶原酶水解后的I, II, III型胶原和弹力蛋白<sup>[37]</sup>。另外, MMP-9还来源于中性粒细胞、迁移的角质细胞及破骨细胞,特别是在破骨细胞中大量表达不仅表明MMP-9能降解细胞外基质还能导致骨质的破坏<sup>[38]</sup>。MMP-9首先以无活性的酶原的形式(Pro-MMP-9)分泌并与TIMP-1和TIMP-3形成紧密联系的复合物存在;而它的活化形式则受到生长因子、细胞因子及其他的刺激信号的调控,比如血纤维蛋白溶酶、血纤维蛋白溶酶原/MMP-3复合物均是Pro-MMP-9的催化剂<sup>[39]</sup>。反之, MMP-9一样能够作用于一些细胞因子和趋化因子,比如MMP-9可以裂解IL-8,激活IL-1 $\beta$ 和TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ 又能够诱导软骨细胞产生炎症介质,如PGE2和NO,并且能够促进蛋白酶的水解<sup>[40]</sup>。因此,当关节微环境中这些刺激信号发生改变时,将诱导MMP-9性状的改变,这进一步导致MMPs-TIMPs之间动态平衡的失衡,最终在生物性及机械性因素的共同作用下加剧关节软骨的破坏。

研究<sup>[15]</sup>已经证实MMP-9在骨关节炎软骨细胞中高表达,但是表达量相对于MMP-2(明胶酶A)较低;研究者<sup>[41]</sup>在骨关节炎动物模型中检测了MMP-9的最低表达量并发现MMP-9在OA的晚期软骨中表达下降甚至未检测到MMP-9阳性细胞,可能与软骨减少有关。另外研究表明MMP-9在软骨下骨中的活性相比软骨细胞外基质中明显增加<sup>[42]</sup>,这可能与软骨下骨中有大量的破骨细胞有关,因为MMP-9部分来源于破骨细胞。而在OA关节滑液中MMP-9表达升高并且与VEGF的表达水平呈正相关,表明MMP-9能够从细胞外基质中调节并释放血管内皮生长因子(VEGF),促进血管的形成和侵入,因此我们在关节镜手术中见OA患者关节滑膜组织局部充血,而局部的血管侵入也促使MMP-9表达升高,前期的研究已经证实MMP-9蛋白在OA患者滑膜组织中表达升高,并且与MMP-14蛋白表达正相关共同促进骨关节炎的病理改变。

本研究为完善MMP-9在OA中的作用,从基因水平检测滑膜组织中MMP-9的表达:检测发现MMP-9 mRNA在正常滑膜和OA患者滑膜组织中均有表达,并且OA组滑膜组织中表达水平高于非OA组,表明MMP-9的调节除了涉翻译后蛋白水平的调节还涉及转录水平的调节;并且我们认为,滑膜的炎症及软骨的降解是刺激诱导MMP-9基因高表达的其中一个主要原因,而MMP-9表达升高进一步导致关节腔微环境内稳态的紊乱,最终促成骨关节炎的病程进展恶化。因此, MMP-9也有可能成为控制症状和减缓骨关节炎病程进展的靶点基因,

## 4.5 MMP-14、MMP-9 在骨性关节炎患者滑膜组织中的表达及相关性

在骨关节炎软骨细胞中, MMP-14能够激活Pro-MMP-13和Pro-MMP-3以及

Pro-MMP-2, 在一定程度上, 可以说明MMP-14的表达与MMP-13、MMP-3以及MMP-2呈正相关; 另外, 最新研究表明在OA滑液中MMP-9的表达水平与MMP-13存在正相关<sup>[43]</sup>, 说明在OA的发生发展过程中, 基质金属蛋白酶相互之间存在一定的关联, 共同参与促进OA的发展。而在OA滑膜组织中, 前期研究以及本研究从组织、分子、基因水平全面检测和分析了MMP-14以及MMP-9的表达水平及相关性, 研究表明, MMP-14/MMP-9在非OA患者和OA患者滑膜组织中均有表达, 并且OA组中的表达水平明显高于非OA组, 说明两种基因对正常组织的生长发育必不可少, 共同参与细胞外基质的处理, 而OA滑膜组织中的高表达可能是多因素共同作用的结果(生物性因素和机械性因素等)。已证实滑膜的炎症反应与OA的发生发展密切相关, 研究发现可见附着于软骨面的内层滑膜炎较外层明显严重, 内层滑膜组织表现为广泛增粗的絮状纤维, 局部甚至发生粘连增厚, 炎症的强弱程度一定程度上与所分泌的蛋白酶类共同影响着骨性关节炎的进展。而MMP-14/MMP-9在炎症性和退行性关节疾病中起着重要作用, 这两种酶在细胞外基质中表现出了广泛的底物特异性, 从而在降解细胞外基质、胶原纤维、基底膜及其他关节超微结构起着关键性作用。

MMP-14作为主要的膜型蛋白, 除了自身的分泌在OA中裂解细胞外基质成分的作用外, 它的激活途径对促进OA的进展恶化也十分重要。而在激活途径中前肽区及催化区之间存在的蛋白酶识别靶点可能是其激活途径的促发点, 而C-末端的结构区域被认为可能与自身的酶对底物的特异性有关。MMP-9正常情况下是以稳定的、无活性的酶原形式分泌的并常形成相关的复合物, 只有在转变成有活性的蛋白酶后才能够参与细胞外基质成分的分解代谢, MMP-9酶原或复合物的有效活化需要相关可溶性的软骨细胞及滑膜细胞分泌的蛋白酶的参与。在酶原的激活途径中MMP-14的蛋白水解级联效应可以激活一系列的MMPs前体, 表明基质金属蛋白酶-14在酶原的激活过程中作用更为突出。因此MMP-14与MMP-9之间是否存在一种关联, 我们对两种基因的相对表达量进行了Pearson积矩相关性分析, 分析表明OA滑膜组织中MMP-14与MMP-9 mRNA的表达之间存在正相关关系, 结合前期蛋白水平的研究表明两者协同作用于滑膜组织, 共同促进OA的发生发展。而滑膜的炎症反应可能在骨关节炎中占重要地位, 不仅通过周围的各种刺激产生破坏性的蛋白酶类, 还在一定程度上调节各种酶类的释放进一步促进炎症细胞的产生, 形成恶性循环。因此我们认为滑膜的炎症反应是OA发生的必要条件, 而滑膜组织中上调的MMP-14和MMP-9 mRNA及蛋白是导致骨关节炎病程进展的重要因素之一, 它们共同作用于关节微环境, 破坏细胞外基质合成与分解代谢之间的动态平衡, 加速关节软骨外基质的分解, 最终导致关节软骨退化消失。

综上所述, 骨关节炎的发生及病程进展是多种因素(生物性和机械性因素)共同作用的结果, 它们协同作用于滑膜、软骨、滑液之间乃至整个关节结构, 促使细胞外基质成分及化学性状的改变, 最终导致OA软骨丧失其固有生物学特性。而滑膜组织中相关的基质金属蛋白酶的合成和分解代谢异常与关节软骨的破坏密切相关。通过基因水平的

检测进一步说明了MMP-14和MMP-9在这一退行性病变过程中起着重要的作用。因此对MMP-14/MMP-9的检测也有可能作为早期诊断骨关节炎的生物指标，而选择性的干预MMP-14/MMP-9的表达及信号转导通路可能为OA的治疗提供一个新的、有效的干预靶点。虽然我们发现OA的病程与MMP-14/MMP-9密切相关，但全面阐明骨关节炎的发病机制仍待进一步完善，基因水平的研究对寻找切实有效地干预治疗仍将是未来骨关节炎研究的重点。

## 第五章 结论

### (Conclusion)

本实验通过对 OA 患者和非 OA 患者滑膜组织中 MMP-14 mRNA 和 MMP-9 mRNA 的表达情况研究得出以下结论：

1. MMP-14 和 MMP-9 mRNA 在 OA 滑膜组织中表达量明显高于非 OA 组，表明二者在骨关节炎的发生过程中起着重要的作用。
2. OA 组患者滑膜组织中 MMP-14 mRNA 与 MMP-9 mRNA 的表达量之间存在正相关性，表明二者可能协同作用共同促进 OA 的发展。

## 参考文献

### (Reference)

- [1] Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. Osteoarthritis-an untreatable disease? *Nature Review Drug Discovery*.2005,4(4):331-344.
- [2] Yuqing Zhang, Joanne M.Jordan. Epidemiology of Osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*.2010, 26(3):355-369.
- [3] 张乃崢,施金旺,张雪哲等.膝骨性关节炎的流行病学调查[J].中华内科杂志,1995, 34(2):84-85.
- [4] 陆艳红,石晓斌.膝骨关节炎国内外流行病学研究现状及进展[J].中国中医骨伤科杂志,2012,20(6):81-84.
- [5] Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice.*Lancet*.2011,377(9783):2115–26.
- [6] Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. *Osteoarthritis Cartilage*.2007,15(9): 981– 1000.
- [7] Bachmeier CJ, March LM, Cross MJ, et al. A comparison of outcomes in osteoarthritis patients undergoing total hip and knee replacement surgery. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001,9(2):137–46.
- [8] NIH Consensus Panel. NIH Consensus Statement on total knee replacement December 8-10, 2003.*J Bone Joint Surg Am*.2004, 86-A(6):1328–35.
- [9] Joern W.P.Michael, Klaus U Schlüter-Brust, Peer Eysel. The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int*.2010,107(9): 152-162.
- [10] 邱贵兴.骨关节炎流行病学和病因学进展[J].继续医学教育.2005,19(7):68-69.
- [11] Loeser RF,Goldring SR,Scanzello CR,Goldring MB. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*.2012,64(6):1697-1707.
- [12] TH.Vu, Z.Werb, Matrix metalloproteinase: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*.2000,14(17):2123-2133.
- [13] H Nagase, J.F.Woessner Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol.Chem*.1999,274(31): 21491-21494.
- [14] Ala-aho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. *Biochimie*.2005, 87(3-4):273–286.
- [15] Söder S, Roach HI, Oehler S, Bau B, Haag J, Aigner T. MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage.

- Clinical and Experimental Rheumatology.2006, 24(3):302–304.
- [16]K. Masuhara, T. Nakai, K. Yamaguchi, S. Yamasaki, Y. Sasaguri. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.*2002,46 (10):2625 -2631.
- [17]Pearle AD, Scanzello CR, George S, et al. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.*2007,15(5):516-523.
- [18]Scanzello CR, McKeon B, Swaim BH, DiCarlo E, Asomugha EU, Kanda V, et al. Synovial inflammation in patients undergoing arthroscopic meniscectomy: molecular characterization and relationship to symptoms.*Arthritis Rheum.*2011;63:391–400.
- [19]Megumi Hashimoto, Tomoyuki Nakasa, Tomohiro Hikata, Hiroshi Asahara. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Med Res Rev.*2008,28(3):464-481.
- [20]Back M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog Cardiovasc Dis.*2010,52(5):410-428.
- [21]Li X, Wu JF.Recent developments in patent anti-cancer agents targeting the matrix metalloproteinases ( MMPs).*Recent Pat Anticancer Drug Discov.*2010,5(2):109-141 .
- [22]Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.*2000, 59(6):455–461.
- [23]Minond D, Lauer-Fields JL, Cudic M.et al. The roles of substrate thermal stability and P2 and P1' subsite identity on matrix metalloproteinase triple-helical peptidase activity and collagen specificity. *J Biol Chem.*2006, 281(50):38302–13.
- [24]Roman Krawetz, Bryan J Heard, Liam Martin.et al. Matrix Metalloproteinase protein expression profiles cannot distinguish between normal and early osteoarthritis synovial fluid. *BMC Musculoskelet Disord.*2012, 13:126.
- [25]Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.*2005;64(9):1263–7.
- [26]Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis.*Nat Rev Rheumatol.*2010;6:625–35.
- [27]Blom AB, van Lent PL, van den Berg WB. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum.*2007, 56(1):147–157.
- [28]Kenneth B Marcu, Rosa MB, Eleonora O.et al. MMP-13 loss associated with impaired ECM remodeling disrupts chondrocyte differentiation by concerted effects on multiple regulatory factors. *Arthritis Rheum.*2010, 62(8):2370-2381.

- [29] Nah SS, Choi IY, Yoo B. et al. Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF- $\alpha$  in human osteoarthritis chondrocytes. *FEBS Lett.* 2007, 581(9):1928-1932.
- [30] 张杰, 史晨辉. 基质金属蛋白酶-9/-14 与骨关节炎的研究进展[J]. 中国老年学杂志
- [31] Sato H, Takino T, Okada Y, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature.* 1994, 370(6468):61-65.
- [32] Giantin M, Aresu L, Benali S, et al. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. *J Comp Pathol.* 2012, 147(4):419-429.
- [33] Barbolina MV, Stack MS. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis. *Semin Cell Dev Biol.* 2008, 19(1):24-33.
- [34] Osenkowski P, Toth M, Fridman R. Processing, shedding and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Cell Physiol.* 2004, 200(1):2-10.
- [35] 张杰, 王维山, 史晨辉等. 膜型基质金属蛋白酶-1 (MT1-MMP/MMP-14) 在骨性关节炎患者滑膜中的表达及意义[J]. 南京医科大学学报自然科学版. 2013, 33(4):116-119.
- [36] Meina Wang, Erik R Sampson Di Chen, et al. MMP-13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2013, 15(1):R5.
- [37] Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovascular Research.* 2003, 59(4):812-823.
- [38] Logar DB, Komadina R, Prezelj J. et al Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2007, 25(4):219-225.
- [39] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research.* 2006, 69(3):562-573.
- [40] Krasnokutsky S, Attur M, Palmer G, et al. Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008, 16 Suppl3:S1-S3.
- [41] Wang GW, Wang MQ, Wang XY, et al. Changes in the expression of MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and aggrecan in the condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. *Archives of Oral Biology.* 2010, 55(11):887-895.
- [42] Hulejová H, Barešová V, Klézl Z, etc. et al. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine.* 2007, 38(3):151-156.
- [43] Kim KS, Lee YA, Choi HM, et al. Implication of MMP-9 and urokinase plasminogen activator (uPA) in the activation of pro-matrix metalloproteinase (MMP)-13. *Rheumatol Int.* 2012, 32(10):3069-75.
- [44] Loeuille D, Chary VI, Champigneulle J. et al. Macroscopic and microscopic features of synovium membrane inflammation in the osteoarthritis knee: correlating magnetic

resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum.* 2005, 52(11):3492-3501.

## 综述

### 骨关节炎相关酶学研究进展

**摘要:** 骨关节炎是一种常见的慢性退行性关节疾病, 病因及发病机制复杂, 关节软骨细胞外基质的降解退化是该疾病的主要病理特点。而随着骨关节炎是一个累积整个关节的骨骼肌肉疾病这一概念被认识后, 研究者开始着重关注造成持续性关节损伤和关节疼痛的关节微环境的改变和特点。其中金属基质蛋白酶 (MMPs)、聚蛋白多糖酶(Aggreganase) 以及组织金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)之间的动态失衡成为研究骨关节炎关节微环境改变的热点。深入了解其在骨关节炎中的作用对阐明骨关节炎的发病机制, 寻找特异性的诊断指标并发现有效地干预治疗靶点具有重要意义。本文主要就骨关节炎的研究进展及相关蛋白酶在骨关节炎中的表达调控及调节机制做如下综述。

**关键词:** 骨关节炎; 金属基质蛋白酶; 聚蛋白多糖酶; 组织金属蛋白酶抑制剂

**Abstract:** Osteoarthritis (OA) is the most common form of the chronic degenerative joint disease. It is characterized by articular cartilage degradation, and the etiology and pathogenesis is multifactorial and to date not yet fully understand. With the recognition that osteoarthritis is a disease of the whole joint, attention has focused increasingly on features in the joint environment which cause ongoing joint damage and pain. And dynamic changes among the matrix metalloproteinases (MMPs), Aggreganase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases(TIMPs) are now acknowledged as key players in the regulation of joint microenvironment. It is great significance to completely understand its role and pathogenesis in osteoarthritis for seeking special biomarker and effective interventions target for the clinical treatment of OA. This review mainly discussed the progress of OA and the expression, regulation mechanism of these proteinase associated with osteoarthritis .

**Key Words:** Osteoarthritis, MMPs, Aggreganase, TIMPs

骨关节炎是一种多因素引起的慢性退行性关节疾病, 涉及整个关节结构的病理生理改变<sup>[1]</sup>, 常见于中老年人群。主要病理改变为: 进行性的关节软骨的破坏消失; 软骨下骨的骨化增厚; 关节边缘骨赘的形成; 关节滑膜的充血炎症细胞浸润<sup>[2-3]</sup>; 临床表现为慢性的关节疼痛、肿胀、僵硬, 随着疾病的进展逐渐发展为关节的功能障碍直至关节畸形丧失关节功能。因其在中老年人群中致病、致残率较高, 且目前暂无长期有效的治疗措施; 加之全球老龄化问题的日益加剧, OA 患者的数量也随之增加, 这不仅影响了人们的生活水平和质量, 也带来了一系列的医疗问题和社会问题。目前, 研究者普遍认为软

骨细胞外基质的合成和分解代谢失衡是导致 OA 发生的主要原因，而细胞外基质的过度降解被认为是导致 OA 发生及病程进展的直接因素。其中参与这一分解代谢的降解酶主要包括聚蛋白多糖酶（Aggrecanase）和基质金属蛋白酶（MMPs），并且发现这一改变累积整个关节结构，造成关节微环境的改变，最终加速骨关节炎的病程进展。本文就骨关节炎的研究进展及两种酶和相关因子在 OA 中的表达调控和作用机制做如下综述。

## 1. 骨关节炎的研究现状

骨关节炎是骨科最常见的一种关节疾病，关节软骨的退行性变被认为是它的主要病理改变。然而随着研究扩展，骨关节炎被定义为是一种累积整个关节结构的骨骼肌肉紊乱性疾病<sup>[4]</sup>，认为除了关节软骨的退行性改变外，软骨下骨的骨化增厚，关节边缘的骨赘形成，不同程度的滑膜炎以及退变的关节韧带、半月板和肥厚的关节囊等均有助于骨关节炎的发生并产生一系列的临床症状。因此，研究者开始关注关节各个结构的病理改变并探寻相互之间的关联，力求全面的阐明 OA 的病因及发病机制。

骨关节炎常见于中老年人群，据流行病学调查显示：在美国 60 岁以上人群中约有 10% 的男性和 13% 的女性会出现膝关节骨关节炎的症状<sup>[5]</sup>，并且随着全球老龄化高峰的来临，预计在 2025 年 OA 的患病率将达到 40%；而在我国约有 3% 的人患有 OA，而大部分比例为膝关节骨关节炎（KOA），其中 65 岁以上的人群中出现骨性关节炎 X 线表现的患者更是高达 85%<sup>[6]</sup>。这严重影响到人们的生活质量，庞大的患病人群也增加了社会的经济负担，并且将成为未来几十年主要的医疗问题和社会问题。而就个体而言，Murphy L 等人通过评估表明男性和女性在一生中出现有症状的膝关节骨关节炎的概率分别是 40% 和 47%，而其中肥胖者的发病风险会更高<sup>[7]</sup>。可见 OA 的发病率和患病率如此之高，已不容忽视；另外，还表明年龄、性别和肥胖是导致骨关节炎发生的危险因素之一。除此之外，遗传、创伤及生物力学改变等因素均是造成关节软骨破坏消失的危险因素。因此研究者普遍认为骨关节炎是生物性和机械性因素共同作用的结果。关节软骨破坏的重要病理表现为软骨细胞外基质（ECM）的减少，其中以胶原和聚蛋白多糖的丢失为其主要的病理表现。正常的关节软骨是由软骨细胞和大量水合性的软骨细胞外基质组成，软骨细胞外基质又是由各类胶原、蛋白多糖和水分子构成。其中胶原纤维构成了关节软骨的微结构，蛋白多糖则以多聚体的形式存在于软骨微结构中维持关节软骨的弹性和缓冲功能。因此，胶原和蛋白多糖的大量丢失破坏了关节的结构，影响了关节的功能。

基质金属蛋白酶（MMPs）和聚蛋白多糖酶（Aggrecanase）是降解胶原和蛋白多糖的主要蛋白酶。近些年来，研究者认为 MMPs 和聚蛋白多糖酶代谢失衡可能是造成 OA 病理改变的主要机制，关节软骨的降解消失则是骨关节炎病程进展的中心环节。

## 2. 基质金属蛋白酶(MMPs)与骨关节炎

基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）是一类广泛存在于结缔组织中的结构相似、酶催化活性依赖  $Zn^{2+}$  的蛋白酶超家族，在组织重构和器官发生、炎症调控、

肿瘤疾病等多种生理过程中发挥作用<sup>[8-9]</sup>。目前已发现24种,传统的分类根据其结构域分布及底物特异性至少分成五个亚型<sup>[10]</sup>,分别包括胶原酶,明胶酶,膜型(MT)-MMPs,间质溶解素,基质溶解酶及其他基质蛋白酶。而最新研究采用生物信息的方法比对MMPs的主要基因序列,依此将MMPs分为六个亚群<sup>[11]</sup>,分别是A亚群: MMP-19,-26, -28; B亚群: MMP-11,-21, -23; C亚群: MMP-17, MMP-25; D亚群: MMP-1, -3, -8, -10, -12, -13和-27; E亚群: MMP-14, -15, -16, -24; F亚群: MMP-2, -7, -9, -20。可见MMPs的基因研究亦成为研究者了解其功能完整性的一种重要方法。

基因水平的研究除了在生物表型出现或疾病发生后对异常的组织器官进行基因检测外,基因敲除技术则从进化发育根源为研究特定基因的功能提供了更直接的技术方法,并且在一定程度上验证了与目的基因相关的生物表型和临床作用。而基因敲除MMPs,为研究MMPs的相关功能和寻找MMPs特异性的裂解产物提供了更直接的证据。目前至少有14种MMPs基因突变的小鼠被构建产生用以研究MMPs的功能,而这些敲除的基因也不同程度的表现出与胚胎的发育、组织的重构、炎症调控、肿瘤疾病等生理病理过程存在直接关系,验证了之前得出的MMPs功能作用的同时,也扩展了MMPs其它的相关作用。另外,体外研究表明MMPs之间存在许多重叠区域<sup>[12]</sup>,因此体内MMPs基因可能存在基因冗余,所以当敲除某一目的基因时可能缺乏或未完全出现某些生物表型而忽略目的基因的其它功能。为此研究者还常采用双基因或多基因突变模型用以研究目的基因特定片段的功能。比如MMP-9和MMP-13双基因的突变导致软骨内骨形成严重受损,表现为减少细胞外基质的重塑、减少了血管的形成以及成骨形成的缺失等<sup>[13]</sup>;MMP-2和MT1-MMP共同缺失会导致小鼠出生后立即死亡<sup>[14]</sup>,单独敲除时并未出现这一表型。

骨关节炎主要的病理改变为软骨细胞外基质的降解,而基质金属蛋白酶(MMPs)则是参与这一改变的主要降解酶之一。正常关节软骨是由软骨细胞和大量的软骨细胞外基质组成,细胞外基质又是由各种胶原、蛋白多糖和水组成,其中以构成软骨微结构的II型胶原为主,当任何一组成成分发生改变时将会导致关节炎的出现。研究发现与骨关节炎密切相关的基质金属蛋白酶有MMP-1, MMP-8, MMP-3, MMP-13, MMP-2, MMP-9和MMP-14。而MMP-1, MMP-8和MMP-13是最为经典的胶原酶,它们对I,II,III型胶原分别表现出不同的底物特异性,其中在OA病变中MMP-13被认为是最主要的胶原酶,它主要作用于II型胶原<sup>[15]</sup>。有研究表明,在原发性骨关节炎及骨关节炎动物模型中关节软骨内MMP-13高表达是导致软骨细胞外基质减少、关节结构破坏的主要原因<sup>[16]</sup>;而国外研究采用MMP-13基因敲除的小鼠构建骨关节炎模型则直接表现出抑制软骨基质的降解和侵蚀<sup>[17]</sup>,这一技术方法更好的阐明了MMP-13在OA病程进展中的作用。MMP-1作为成纤维型胶原酶,主要裂解II型胶原。文献报道<sup>[18]</sup>在骨关节炎中MMP-1表达上调,与软骨细胞外基质降解密切相关,而MMP-8除了在底物的特异性上与MMP-1有微妙的差别外,其结构与生理功能均与MMP-1相似,主要降解软骨细胞外基质,破坏胶原成分。MMP-3是参与OA关节软骨降解作用最强的基质金属蛋白酶。研究显示,早期

OA 软骨外基质的降解可能是 MMP-3 和 ADAMTS-5 的作用的结果, 尽管 OA 晚期软骨中 MMP-3 的表达减少<sup>[19]</sup>。这表明 MMP-3 与骨关节炎密切相关, 参与胶原的分解和蛋白多糖的水解。而 MMP-3 基因敲除的小鼠在一定程度上减少了胶原的丢失和聚蛋白多糖的分解, 表明了 MMP-9 在软骨细胞外基质中促进作用。

MMP-2 和 MMP-9 属于明胶酶, 生化结构上在其催化区域插入三个重复的 II 型纤连蛋白修饰, 使其具有相似的蛋白水解活性。它们能够水解变性的胶原、明胶以及大量的软骨细胞外基质成分, 包括降解 I,IV 和 V 型胶原、弹性蛋白和粘连蛋白<sup>[20]</sup>。在正常关节软骨中, MMP-2 常以酶原的形式存在于细胞表面, 而在 OA 发生时, MMP-14 能够激活 MMP-2 酶原, 使其在软骨细胞中活化表达而发挥其蛋白水解的作用; MMP-9 在正常及 OA 关节软骨中均有表达, 但在 OA 关节软骨中呈高表达<sup>[21]</sup>, 可见 MMP-2 和 MMP-9 在 OA 关节软骨破坏、细胞外基质降解的过程中起着重要作用。最新研究表明, MMP-2 和 MMP-9 在 OA 软骨下骨中的表达高于软骨细胞外基质<sup>[22]</sup>, 说明明胶酶参与骨关节炎软骨下骨的改变, 这可能是导致软骨下骨骨化的其中一个因素; 另外, MMP-9 还参与免疫细胞的迁移以及血管的形成<sup>[23]</sup>, 因此在 OA 患者中我们观察到滑膜的炎症改变, 表现为滑膜充血, 炎症细胞的浸润, 这与细胞因子(IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子)刺激诱导 MMP-9 的过多分泌有关<sup>[24]</sup>, 也与 MMP-9 裂解激活 IL-8 有关。此外, MMP-9 在骨的吸收, 伤口的愈合及血栓的形成过程中也有着重要的作用<sup>[25]</sup>, 可见 MMP-9 在整个骨组织发育重建过程中起着重要作用。而基因敲除 MMP-9 除了验证与它相关的一系列生理病理作用外, 还进一步表明 MMP-9 主要在早期 OA 的软骨细胞中高表达, 另外在 OA 滑膜、滑液及血清中表达也有升高, 表明 MMP-9 在 OA 中的重要地位。因此, 文献报道 MMP-2 和 MMP-9 可以作为骨关节炎的生物标志物<sup>[26]</sup>。

MMP-14 是一种位于细胞表面的膜型基质金属蛋白酶, 最初是作为激活 MMP-2 酶原形式细胞外蛋白酶被研究者所认识, 这也更好的解释了膜型 MMPs 在蛋白水解中作用。因为, 基质金属蛋白酶在体内大多是以酶原 (Pro-form) 的形式存在, 而骨关节炎中诸多 MMPs 的活化状态常常与 MMP-14 有关<sup>[27]</sup>。比如, 在 OA 中, MMP-14 能够激活细胞表面 MMP-2 酶原形式, 使 MMP-2 活化高表达<sup>[28]</sup>; MMP-14 能够在 OA 软骨细胞中激活 Pro-MMP-3 和 Pro-MMP-13, 使的 MMP-3 和 MMP-13 过量分泌, 从而加速细胞外基质的降解, 此过程中, Pro-MMP-9 也可以通过 MMP-3 或者 MMP-14/MMP-13 的级联放大效应被激活<sup>[29]</sup>, 进一步加速关节软骨的退化。最新的研究表明, MMP-14 自身也能够使特定的胶原蛋白裂解<sup>[30]</sup>。MMP-14 在 OA 中的生物作用不断的扩展, 但一直缺乏与 OA 的直接证据, 因为 OA 是一个慢性的中老年性关节疾病, 而 MMP-14 基因敲除的小鼠出生 3 周内均死亡, 缺乏 OA 发生发展的渐进性过程, 但却表现出与细胞外基质处理缺失相关的严重的发育畸形, 比如侏儒症、骨骼发育异常以及血管形成的缺陷。这验证了前期研究的结果, 也因此可见 MMP-14 在整个细胞外基质处理过程中的重要作用。此外, MMP-14 作为细胞表面的脱落酶还能够裂解许多膜型蛋白, 比如 E-钙粘蛋白和 N-钙粘蛋白, 整合素、透明质酸受体 CD44, 破骨细胞分化因子 (RANKL) 以及其他一些

细胞表面的蛋白聚糖及受体<sup>[29]</sup>。综上所述, MMP-14 除了自身能够降解细胞外基质外, 还能参与其它基质金属蛋白酶活性的调节, 以及细胞外基质以外其它蛋白的活性调节。

MMPs 与骨关节炎关系密切, 随着骨关节炎被定义为一种骨骼肌肉紊乱性疾病后, 关节各结构中的研究也不容忽视, 协调其在机体内的表达调控及相互作用可能为临床干预治疗 OA 提供新的视角。

### 3. 聚蛋白多糖酶(Aggrecanase)与骨关节炎

聚蛋白多糖是构成软骨细胞外基质的另一个重要组成成分, 它通过水分子与其他蛋白多糖结合成多聚体形式而维持关节软骨功能(抵抗负荷和分散压力)。而参与它降解的主要蛋白酶是聚蛋白多糖酶(Aggrecanase), Aggrecanase 参与骨关节炎细胞外基质合成和分解代谢, 属于金属基质蛋白酶 ADAMTSs 家族, 目前发现有 19 种<sup>[31]</sup>, 其中 ADAMTS-2, ADAMTS-3, ADAMTS-14 作为胶原的前肽酶参与胶原的合成<sup>[32]</sup>; 而其它的成员作为蛋白聚糖酶则在特定的区域水解蛋白多糖。其中, 与骨关节炎密切相关, 参与关节软骨降解的聚蛋白多糖酶主要是 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5<sup>[33]</sup>, 它们作用于聚蛋白多糖 IGD 的 Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup> 位点而发挥裂解聚蛋白多糖的作用<sup>[34]</sup>。另外体外研究表明, ADAMTS-5 是仅次于 ADAMTS-4 存在的一种最活跃的聚蛋白多糖酶; ADAMTS-5 基因敲除的小鼠则从体内体外两方面表明了它在处理软骨细胞外基质的中作用, 防止软骨细胞外基质的降解, 避免了骨关节炎的发生<sup>[35-36]</sup>。而 ADAMTS-4 基因敲除鼠在骨关节炎模型中未表现出明显的蛋白聚糖酶活性的抑制, 同时敲除 ADAMTS-4/ADAMTS-5 基因的小鼠能够在 IL-1 $\alpha$  的刺激诱导下避免软骨基质的破坏, 而在视黄酸的刺激下有一定的软骨基质降解<sup>[37]</sup>, 表明除了 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5, 其它的蛋白多糖酶在 OA 软骨外基质降解过程中也起着一定的作用。

### 4. 金属蛋白酶抑制剂与骨关节炎

$\alpha_2$  巨球蛋白和组织金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)作为基质金属蛋白酶和蛋白聚糖酶活性的内源性抑制剂, 在骨关节炎的发病机制中起着重要的作用<sup>[38]</sup>。研究认为, MMPs-TIMPs 在关节微环境中的代谢失衡是造成关节软骨破坏的主要原因。目前发现 TIMPs 家族包括 4 个成员, TIMP-1, -2, -3, -4。TIMP-1 能够抑制 ADAM-10, 但对膜型 MMPs 的抑制作用较弱<sup>[39]</sup>; TIMP-2 能够特异性的与 MMP-2 结合, 在化学剂量适宜的情况下形成一种酶联复合物保持 MMP-2 酶原的形式, 同时也作为 MMP-14 的反应底物, 因此当 TIMP-2 表达异常时, MMP-2 酶原形式激活, 释放活化的 MMP-2 进入关节微环境促进细胞外基质的降解; TIMP-3 则表现出广泛的金属蛋白酶抑制作用, 除了抑制 MMPs, 还抑制 ADAMTSs(ADAMTS-1, -2, -4, -5)<sup>[40]</sup>。TIMP-3 基因敲除的小鼠表现出随着年龄增长而日益加重的关节软骨的破坏<sup>[41]</sup>, 这进一步表明了其在抑制软骨细胞外基质降解中的作用。

研究发现, 在 OA 的软骨中 TIMP-1 和 TIMP-4 表达减少, TIMP-2 和 TIMP-3 未见明显变化; 而在 OA 滑膜组织中 TIMP-2 的表达量明显增加, 其余抑制剂未见明显变化

<sup>[42]</sup>。这种差异表明 TIMPs 在骨关节炎各组织结构中存在广泛的表达和抑制作用，与 MMPs 和 ADAMTS 之间的仍然存在未知的区域联系，而寻找明确的区域位点对抑制 OA 软骨外基质的降解具有重要研究意义。

## 5. 其它因素

与骨关节炎相关的组织蛋白酶类还包括细胞因子、生长因子以及趋化因子，尽管骨关节炎通常不被认为是一种炎症性疾病，但是炎症相关因子却在骨关节炎软骨基质降解过程中起着重要作用<sup>[43]</sup>，比如软骨细胞产生的细胞因子、前列腺素类物质能够促进软骨的降解，而滑膜细胞分泌的 IL-1、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NO 除了造成局部的滑膜炎，还能够释放到关节间隙刺激和上调相关 MMPs 和 ADAMTSs 的表达<sup>[44]</sup>，造成关节微环境内稳态的失衡，加速关节软骨的破坏；而选择性的抑制炎症因子，在一定程度上可以抑制骨关节炎的进展<sup>[45]</sup>。另外，miRNAs 以及机械刺激等因素也不同程度的参与 MMPs 和 ADAMTS 的表达调控<sup>[46]</sup>，再加上关节各结构之间的相互影响，最终导致骨关节炎的病理改变。可见，骨关节炎是一种多因素引起的退行性关节疾病。

## 结语：

随着骨关节炎患者人数的日益增多，所出现的社会问题和医疗问题也日渐加剧，寻找并发现有效地干预治疗靶点对控制和延缓骨关节炎的发展变得尤为重要。虽然近些年来应用各类生物医学技术逐渐阐明了与骨关节炎相关酶（MMPs、ADAMTSs、TIMPs）及相关因子的作用及功能，但确切的 OA 发病机制仍然不完全清楚，而基因技术的发展为明确 OA 的发病过程提供了更早、更客观的依据，对探索发现直接的作用位点创造了一种可能；另外，骨关节炎作为一个累积整个关节的结构的骨骼肌肉紊乱性疾病，其构成关节各组织结构之间的相互关系及复杂作用仍然有待进一步澄清。而目前对于 OA 的治疗虽然有一定的疗效，减缓了患者的不同症状，不良作用仍不容忽视，所以预防治疗仍然是解决 OA 问题的主要目的。对研究者而言，寻找早期有效地干预靶点将是未来 OA 研究的重点，而保持 OA 认识的全局观，充分结合局部与整体的作用关系则是达成这一目的的基础。

## 参考文献

- [1] Loeser R F, Goldring S R, Scanzello C R, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ[J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2012, 64(6): 1697-1707.
- [2] Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci*.2010;1192:230–237.
- [3] Felson DT. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*.2009;11(1):203.
- [4] Cyrus Cooper, Jonathan D.Adachi, Thomas Bardin et al. How to define responders in osteoarthritis. *Curr Med Res Opin*.2013,29(6):719-729.
- [5] Yuqing Zhang, Joanne M.Jordan. Epidemiology of Osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*.2010, 26(3):355-369.
- [6] 陆艳红,石晓斌.膝骨关节炎国内外流行病学研究现状及进展[J].*中国中医骨伤科杂志*,2012,20(6):81-84.
- [7] Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, et al. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*.2008;59(9):1207–13.
- [8] Back M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog Cardiovasc Dis*.2010;52 ( 5):410-428.
- [9] Li X,Wu JF.Recent developments in patent anti-cancer agents targeting the matrix metalloproteinases(MMPs).*Recent Pat Anticancer Drug Discov*.2010;5(2):109-141 .
- [10] Gillian Murphy, Vera Knäuper, Susan Atkinson, et al, Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Research* 2002;4(suppl3):s39-49.
- [11] Huxley-Jones J, Clarke TK, Beck C, Toubaris G, Robertson DL, Boot-Handford RP. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol Biol*.2007;7:63.
- [12] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev Cancer*.2002;2(3):161–174.
- [13] Stickens D, et al. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development*.2004;131(23):5883–5895.
- [14] Oh J, et al. Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice. *Oncogene*.2004;23(29):5041–5048.
- [15] Knäuper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem*.1996;271(3):1544–1550.
- [16] Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SM, Edwards DR, Parker AE, Clark IM. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum*.2004;50(1):131–141.
- [17] Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith S, Fosang A, Werb Z, Shah M, Thompson E.

- Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum.* 2009;60(12):3723–3733.
- [18] Guo D, Tan W, Wang F, et al. Proteomic analysis of human articular cartilage: identification of differentially expressed proteins in knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2008;75(4):439–444.
- [19] Swingle TE, Waters JG, Davidson RK, Pennington CJ, Puente XS, Darrah C, Cooper A, Donell ST, Guile GR, Wang W, Clark IM. Degradome expression profiling in human articular cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R96.
- [20] Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res.* 2005;31(6):599–621.
- [21] Söder S, Roach HI, Oehler S, Bau B, Haag J, Aigner T. MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(3):302–304.
- [22] Hulejová H, Barešová V, Klézl Z, Polanská M, Adam M, Šenolt L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine.* 2007; 38(3):151–156.
- [23] Galis ZS, et al. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res.* 2002;91:852–859.
- [24] Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2003;253(1-2):269–285.
- [25] Colnot C, Thompson Z, Micalau T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development.* 2003;130(17):4123–4133.
- [26] De Ceuninck F, Sabatini M, Pastoureaux P. Recent progress toward biomarker identification in osteoarthritis. *Drug Discovery Today.* 2011;16(9-10):443–449.
- [27] De Croos JN, Jang B, Dhaliwal SS, Grynblas MD, Pilliar RM, Kandel RA. Membrane type-1 matrix metalloproteinase is induced following cyclic compression of in vitro grown bovine chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(11):1301–1310.
- [28] Osenkowski P, Toth M, Fridman R. Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Cell Physiol.* 2004; 200(1):2–10.
- [29] Rita Dreier, Susanne Grassel, Susanne Fuchs, Jens Schaumburger and Peter Bruckner. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Exp Cell Res.* 2004; 297(2):303–312
- [30] Barbolina MV, Stack MS. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity

- in pericellular proteolysis. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(1):24–33.
- [31] Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* 2005;386(pt1):15–27.
- [32] Colige A, Vandenberghe I, Thiry M, Lambert CA, Van Beeumen J, Li SW, Prockop DJ, Lapiere CM, Nusgens BV. Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J Biol Chem.* 2002; 277(8):5756–5766.
- [33] Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):94–103.
- [34] Little CB, Meeker CT, Golub SB, Lawlor KE, Farmer PJ, Smith SM, Fosang AJ. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair. *J Clin Invest.* 2007;117(6):1627–1636.
- [35] Gendron C, Kashiwagi M, Lim NH, Enghild JJ, Thøgersen IB, Hughes C, Caterson B, Nagase H. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. *J Biol Chem.* 2007;282(25):18294–18306.
- [36] Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature.* 2005;434(7033): 644–648.
- [37] Rogerson FM, Stanton H, East CJ, et al. Evidence of a novel aggrecan-degrading activity in cartilage. Studies of mice deficient in both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1664–1673.
- [38] Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):55–71.
- [39] Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt19):3719–3727.
- [40] Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem.* 2001;276(16): 12501–12504.
- [41] Sahebjam S, Khokha R, Mort JS. Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of *Timp3*<sup>-/-</sup> mice. *Arthritis Rheum.* 2007;56(3):905–909.
- [42] Davidson RK, Water JG, Kevorkian L, Darrah C, Adele C, Donnell ST, Clark LM. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(4):R124.
- [43] Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002;39(1-2):237–246.
- [44] Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, Feige U, Poole

- AR. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.*2005;52(1):128–135.
- [45]Malemud C. Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date. *Drugs Aging.*2010;27(2): 95–115.
- [46]Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, Tsezou A. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks.*PLoS One.*2008;3(11):e3740.

## 致 谢

光阴似箭，时间如梭，三年的研究生求学生活即将结束，站在毕业的门槛回首往昔，难以置信成为了三年最美的节点，信任坚守成为了对我最大的祝福，而感谢和祝福则是我此时此刻最想表达的心绪。

首先，我衷心的感谢我的母校石河子大学为我提供了优越的学习生活环境，让我以优异的成绩进入保研行列，意外之喜，我进入了骨科师从史晨辉教授门下学习。本论文是在史晨辉教授的悉心指导和谆谆教诲下完成，从论文的选题到顺利完成，每一步都离不开他耐心的帮助和指导。恩师为人随和谦逊，工作热情踏实，治学严谨细致，他用言行举止影响指引着我，不仅使我学到了专业知识，更学会了待人谦和、做事踏实、处事平易之道，恩师的点点滴滴言传身受使我终身受益匪浅。正是源于恩师热情耐性的帮助和指导，本研究才得以顺利进行，值此论文完成之际我谨向辛勤培育我的恩师史晨辉教授表示最诚挚的谢意和最真诚的祝福。

感谢董金波主任医师、王维山副主任医师、王永明副主任技师在实验设计、病例收集以及实验进展过程中给予的帮助和指导。感谢骨一科王彦护士长及全体医护人员在病例收集工作中给予的鼎力支持。谨在此对他们的默默关心和大力帮助表以最真诚的谢意。

感谢石河子大学医学院中心实验室刘伟老师、曹薇薇老师及各位师哥、同门师兄弟在实验过程中给予的帮助和鼓励，本实验的顺利完成，离不开他们的无私奉献。

诚挚感谢三年来给予我难以置信最美节点的所有人，曹旭教授、史晨辉教授、王维山副教授、肖国芝副教授、赖老师你们的信任和支持让我有了去美国交流学习的机会，让我感受了不一样的文化，经历了不一样的人生，最重要的是开阔了我对整个世界的认知和感悟。再次感谢你们，你们的信任和坚守给了我研究生三年以来最难以置信的一段美好回忆和成长经历。

在此，还要感谢我的父母家人以及女朋友罗倩，感谢你们的陪伴，感谢你们对我在外求学的关心、理解和默默支持，千言万语难以表达我对你们的感恩之心和感激之情，谨在此祝你们身体健康，永远幸福！

最后，感谢百忙中抽出宝贵时间审阅我论文的各位专家，感谢您们对我论文所提出的宝贵意见。

再次向曾经信任、鼓励和支持帮助我的所有老师、家人和朋友致以最诚挚的感谢和最真诚的祝福，祝你们永远健康！一生平安！

## 作者简介

郑伟, 男, 汉族, 1986 年 11 月出生于新疆阿克苏, 2011 年 7 月毕业于新疆石河子大学医学院临床医学系本科, 获得医学学士学位。同年保送入石河子大学医学院外科学专业, 攻读关节外科方向硕士研究生。

### 在学期间主要参与的研究项目

1. 参与了国家自然科学基金(项目编号: 30960387)、石河子大学科学技术研究发展计划项目(ZRKXYB-16)的研究工作

### 在学期间发表的文章

1. 郑伟, 史晨辉等. MMP-14 在骨关节炎滑膜、滑液中的表达及研究意义. [J]重庆医学杂志. (录用待发表)

## 石河子大学硕士研究生学位论文

## 导师评阅表

研究生姓名	郑伟	学制	三年制
专业	外科学	研究方向	关节外科

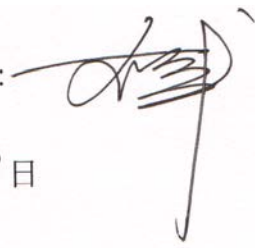
学术评语:

骨关节炎是一种常见的慢性退行性关节疾病，常见于中老年人群，其患病率、致残率高，严重影响人们的生活质量；而伴随老龄化问题的日益加剧，它已逐渐成为全球关注的公共健康卫生问题之一。一直以来，预防治疗被认为是干预骨关节炎进展的最好方法。而骨关节炎基因水平的研究成为探寻早期干预靶点实现这一目标的最新方案。

MMP-14、MMP-9 是基质金属蛋白酶家族的主要成员，参与细胞外基质降解的同时，也常参与许多组织蛋白酶之间的激活途径，它们的改变在关节微环境中产生一系列的 MMPs-TIMPs 的失衡，导致骨关节炎的病理改变。骨关节炎是一个累积整个关节结构的骨骼肌肉疾病，而关节各结构的病理生理改变是产生一系列临床表现的主要原因。针对滑膜性状改变采取的对症治疗是目前临床常用的减缓骨关节炎进展的治疗方案，本研究着眼于骨关节炎滑膜组织中 MMP-14 和 MMP-9 基因水平的表达研究，力求为预防骨关节炎探寻到早期的干预靶点，研究二者在骨关节炎滑膜组织中表达的相关性，有助于提高对骨关节炎的联合干预及诊断，同时为二者激活途径及信号传导通路的干预治疗提供了新的视角。

本论文研究结合临床常见问题，选题新颖，实验设计合理，实验结果真实可靠。论文结构科学合理，逻辑性强，思路清晰，语言通顺，整体性较强，达到了硕士学位论文的水平，整体上符合外科学专业培养的目标要求。

同意郑伟同学申请参加毕业论文答辩。

指导教师签字: 

2019年6月13日