文章编号:1000-5404(2012)19-1957-04

论著

MMP-3在强直性脊柱炎棘上韧带退变中的作用

许红飞,初同伟,张 超,张 莹,黄 晨,刘栓得 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[摘要] **目的** 探讨基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase3,MMP-3)在强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis,AS)棘上韧带中的表达及在韧带退变中的作用。**方法** 免疫组化检测MMP-3、Ⅰ型胶原在韧带中的表达,酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测韧带中蛋白聚糖(proteoglycan)的含量,扫描电镜及透射电镜对棘上韧带进行形态学观察。Image-Pro Plus(IPP)量化分析胶原原纤维分布密度及胶原阳性染色面积百分比。**结果** MMP-3在研究组韧带血管平滑肌细胞及内皮细胞中高表达,对照组未见表达;蛋白聚糖含量对照组为(19.462±2.174) μg/mg,研究组为(7.477±2.512) μg/mg;电镜下对照组胶原纤维排列规律,研究组胶原原纤维裸露明显,大量基质降解;对照组胶原原纤维分布密度为(218.02±10.39)/μm^2,研究组为(122.47±22.42)/μm^2;对照组Ⅰ型胶原的阳性染色面积百分比为(60.23±3.41)%,研究组为(43.37±5.96)%,2组差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 活动期AS患者棘上韧带血管中MMP-3高表达,可能通过促进血管生长、降解蛋白聚糖、破坏韧带正常的微观结构,从而参与韧带退变骨化的病理过程。

[关键词] 强直性脊柱炎;基质金属蛋白酶3;蛋白聚糖;Ⅰ型胶原
[中图法分类号] R322.73; R329.24; R593.23 [文献标志码] A

Role of matrix metalloproteinase 3 in supraspinal ligament degeneration due to ankylosing spondylitis

Xu Hongfei, Chu Tongwei, Zhang Chao, Zhang Ying, Huang Chen, Liu Shuande (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) and its effect on supraspinal ligament degeneration due to ankylosing spondylitis (AS). **Methods** Expression of MMP-3 and type Ⅰ collagen in ligaments was detected by immunohistochemistry. Proteoglycan level in ligaments was measured by ELISA. Supraspinal ligament morphology was observed under scanning electron microscope and transmission electron microscope, respectively. Collagen fibril distribution density and positively-stained collagen area were analyzed by Image-Pro Plus (IPP). **Results** MMP-3 was highly expressed in vascular smooth muscle cells and endothelial cells in AS group but not in control group. The proteoglycan level was significantly higher in control group than in AS group (19.462±2.174 *vs* 7.477±2.512 μg/mg). The collagen fibrils were regularly arranged in control group and apparently exposed with massive degradation of matrix in AS group. The distribution density of collagen fibrils was 218.02±10.39/μm^2 and 122.47±22.42/μm^2 in control group and AS group, respectively. The proportion of positively-stained collagen area was significantly higher in control group than in AS group [(60.23±3.41)% *vs* (43.37±5.96)%, $P<0.05$]. **Conclusion** MMP-3 is highly expressed in supraspinal ligament blood vessels of active AS patients by promoting the growth of blood vessels, activating the degradation of proteoglycan, and destroying the normal ultra-structure of ligaments, and is thus involved in the degenerative ossification process of ligaments.

[**Key words**] ankylosing spondylitis; matrix metalloproteinase3; proteoglycan; type Ⅰ collagen

Supported by the Natural Science Foundation of China (81071523) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BA5009). Corresponding author: Chu Tongwei, Tel: 86-23-68774080, E-mail: chtw@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81071523);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2011BA5009)
[通信作者] 初同伟,电话:(023) 68774080,E-mail:chtw@sina.com

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis,AS)是一种慢性炎症性疾病,病因不明,主要累及中轴骨骼关节,棘上韧带是该病的重要靶点,后期退变骨化,因其位置表浅,术中易获取,是较好的研究对象。本课题组前期研究发现,在AS棘上韧带中基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase3,MMP-3) mRNA表达上调[1],提示MMP-3可能参与韧带的退变过程。有实验表明MMP-3参与了AS关节软骨的退变[2],但MMP-3在韧带退变中可能起什么样的作用目前还不十分清楚。棘上韧带是由少量的细胞成分及大量的细胞外基质构成,MMP-3的主要生物学功能是降解蛋白聚糖等细胞外基质,它是否在AS棘上韧带中表达并参与破坏细胞外基质尚少见相关报道。本研究通过检测MMP-3在AS棘上韧带中的表达,分析它对蛋白聚糖含量及胶原超微结构变化的影响,探讨MMP-3在AS韧带退变过程中可能发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本获取 选取第三军医大学新桥医院骨科2008年1月至2012年3月收治患者的腰椎棘上韧带,研究组为15例活动期AS患者,男性,诊断符合1984年修订的纽约标准,平均年龄38(21~49)岁,其中14例行经后路腰椎截骨矫形手术,1例为腰椎骨折内固定术;对照组为16例腰椎骨折手术患者,男性,平均年龄41(20~50)岁。两组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。每例标本分成3部分,分别用于免疫组化、ELISA、电镜观察。

1.1.2 主要试剂及器械 兔抗人MMP-3(武汉博士德公司,BA1272),兔抗人collagen I(武汉博士德公司,BA0325),免疫组化试剂盒(康为世纪公司,CW2035),人多功能蛋白聚糖ELISA试剂盒由上海沪尚生物科技公司提供,酶标仪Tecan Sunrise(奥地利),日立S-3400N型扫描电子显微镜、Philips Tecnai-10透射电子显微镜观察由第三军医大学生物医学分析测试中心协助完成。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 标本离体后切成1.5 cm×1.2 cm×0.2 cm小块,立即投入4%多聚甲醛固定,常规脱水石蜡包埋、切片。脱蜡至水后,3% H_2O_2 37 ℃孵育10 min,PBS冲洗3×5 min;置0.01 mol/L枸橼酸缓冲液(pH=6.0)中用微波煮沸(95 ℃,15~20 min),自然冷却20 min,再用冷水冲洗缸子,加快冷却至室温,PBS冲洗3×5 min。正常山羊血清工作液封闭,37 ℃ 15 min,倾去勿洗。滴加兔抗人MMP-3、Ⅰ型胶原抗体(1∶200稀释)4 ℃冰箱孵育过夜,PBS冲洗3×5 min(用PBS缓冲液代替一抗作阴性对照)。滴加生物素化山羊抗兔IgG,37 ℃孵育15 min,PBS冲洗3×5 min。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素工作液,37 ℃孵育15 min,PBS冲洗3×5 min。DAB反应染色,镜下控制反应时间在30 s左右,自来水充分冲洗后,苏木精复染,常规脱水,透明,干燥,封片。

1.2.2 蛋白聚糖含量检测 称取100 mg,加入1 ml的PBS(pH=7.4),匀浆器充分匀浆,3 000 r/min离心20 min,仔细收集上清,分装2份,1份冷冻备用,1份稀释10倍体积待测。在96孔板上分别设空白孔、标准品孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品孔中加入稀释好的标准品50 μl;在待测样品孔中先加样品稀释液40 μl,然后再加待测样品10 μl。轻轻晃动混匀,封板膜封板后37 ℃温育30 min。弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,振荡30 s后弃去,重复5次,拍干。每孔加入酶标试剂50 μl,空白孔除外。轻轻晃动混匀,封板膜封板后37 ℃温育30 min。洗板同前。每孔加入显色剂50 μl,轻轻震荡混匀,37 ℃避光显色10 min。每孔加终止液50 μl,终止反应(此时蓝色立转黄色),以空白孔调零,在450 nm波长依序测量各孔的光密度值[$D(450)$]。建立标准曲线,计算样品浓度。

1.2.3 扫描电镜观察 切取组织用生理盐水冲洗,修剪成3 mm×1 mm×1 mm的组织块,浸泡于2.5%戊二醛中前固定,1%锇酸后固定,pH=7.4磷酸缓冲液冲洗后,酒精逐级脱水,真空干燥,喷金后置入扫描电镜观察。

1.2.4 透射电镜观察 生理盐水冲洗后,修剪成1 mm×1 mm×1 mm的组织块,浸泡于2.5%戊二醛中前固定,1%锇酸后固定,pH=7.4磷酸缓冲液冲洗后,酒精逐级脱水,包埋切片后醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,后行透射电镜观察。

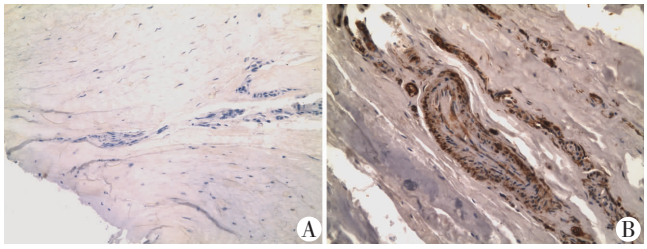
1.3 统计学分析

利用IPP 7.0分析胶原原纤维的分布密度、Ⅰ型胶原的阳性染色面积百分比。数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件对蛋白聚糖含量、胶原原纤维的分布密度、Ⅰ型胶原的阳性染色面积百分比进行独立样本t检验。

2 结果

2.1 MMP-3蛋白的检测

免疫组织化学检查显示对照组血管数量少,管径小,未见明显阳性染色;研究组棘上韧带中血管数量较多,管径大小不等,血管平滑肌细胞、内皮细胞、细胞间质中均可见阳性染色(图1)。



A:对照组;B:研究组

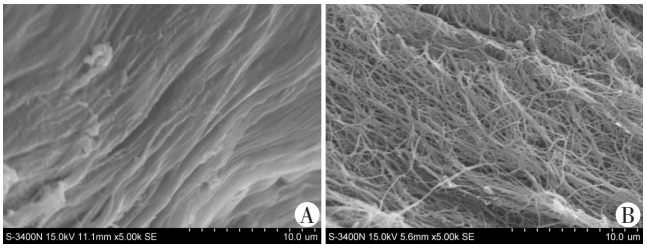
图1 2组患者腰椎棘上韧带组织MMP-3免疫组化染色观察 (S-P ×200)

2.2 蛋白聚糖含量检测

ELISA法检测对照组蛋白聚糖含量为(19.462±2.174)μg/mg,研究组为(7.477±2.512)μg/mg,经独立样本t检验,2组差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 扫描电镜观察

对照组见基质均匀的填充于胶原束间，胶原原纤维排列整齐有序；研究组的胶原原纤维大量裸露，排列杂乱无序，纤维束间基质成分丢失（图 2）。

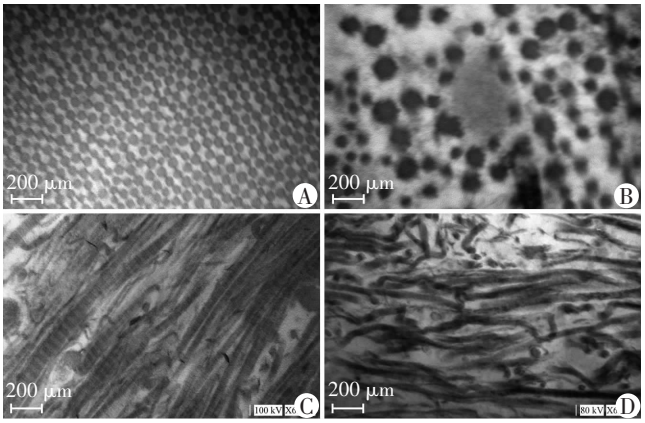


A：对照组；B：研究组

图 2 2 组患者棘上韧带扫描电镜观察 （×5 000）

2.4 透射电镜观察

横切面：对照组横切面见胶原原纤维排列紧密、规律，分布密度为（218.02 ± 10.39）/μm²；研究组横切面见胶原原纤维排列松散，部分胶原原纤维肿胀，胶原原纤维的分布密度为（122.47 ± 22.42）/μm²。纵切面：对照组 64 nm 周期性横纹清晰可见；研究组周期性横纹模糊不清。见图 3。

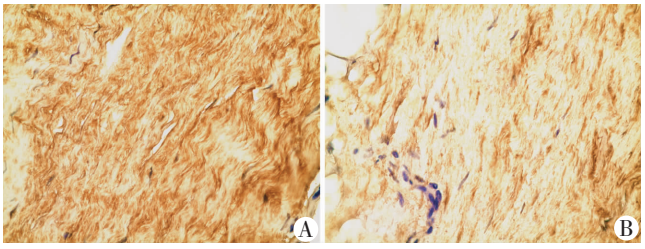


A：对照组横切面；B：研究组横切面；C：对照组纵切面；D：研究组纵切面

图 3 2 组患者腰椎棘上韧带组织胶原原纤维透射电镜观察

2.5 Ⅰ型胶原定量检测

对照组Ⅰ型胶原蛋白的阳性染色面积百分比为（60.23 ± 3.41）%，研究组为（43.37 ± 5.96）%，研究组Ⅰ型胶原蛋白的含量较对照组明显减少，经独立样本 t 检验，两组差异有统计学意义（$P<0.05$）。见图 4。



A：对照组；B：研究组

图 4 2 组患者腰椎棘上韧带组织Ⅰ型胶原免疫组化染色观察 （S-P ×400）

3 讨论

MMP-3 是一种对基质起广泛作用的蛋白酶[3-4]，多种细胞可以合成其前体。文献[5]报道，在正常情况下，MMP-3 的表达水平和活性均较低，在病理情况下才会升高。我们在 AS 棘上韧带中发现有较多的血管生成，血管平滑肌细胞及内皮细胞大量表达 MMP-3，而对照组血管数量少，未见该蛋白表达。据此分析，MMP-3 与血管生成密切相关。血管的生成主要受低氧诱导因子（HIF-1α）、血管内皮生长因子（VEGF）的调节。Cramer 等[6]发现，在低氧条件下的生长板软骨细胞中 VEGF 的表达明显升高，当 HIF-1α 基因被敲除后，VEGF 表达明显受抑。Vincent 等[7]将 HIF-1α 转染到兔后肢缺血的模型中，观察到 VEGF 基因转录水平明显升高，血管重建能力增强，缺血肢体的血供得到了明显改善。我们前期研究[1]发现，AS 棘上韧带中 HIF-1α、VEGF 的 mRNA 水平上调，这与局部组织的代谢有关，因 AS 患者脊柱后突畸形，棘上韧带持续处于高张力的拉伸状态，韧带内部压力增大，血液循环势必受到影响，呈现一个低氧环境，韧带的代谢程度相应降低。故在低氧的情况下，韧带需要新的血管长入来改善低氧的环境，这是 AS 棘上韧带骨化的必要条件。血管平滑肌细胞及内皮细胞表达 MMP-3，降解血管基底膜蛋白，启动了平滑肌细胞及内皮细胞的迁移和进一步分裂，血管周围细胞外基质被降解后，韧带内部压力也相应降低，为新的血管生长提供空间，血管生成后，又将带入更多的成骨因子，进一步促进韧带的骨化。一些与细胞外基质结合的生长因子如碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、转化生长因子 β1（TGF-β1）等，因基质的降解而被释放出来，它们既能促进 MMPs 酶原的合成，又上调 VEGF 的表达[8-9]。已有研究证实 VEGF 有强大的成骨作用[10-11]。Zucker 等[12]发现，VEGF 调节内皮表面尿激酶性纤溶酶原激活因子及其受体的表达，提高单核、巨噬细胞的细胞外基质金属蛋白酶诱导分子（CD147）的表达，间接促进 MMP-3 的产生并提高活性，可以看出，MMP-3 与血管关系密切，为血管的生长创造条件，血管生成后，MMP-3 的大量表达又促进血管的增殖，这个过程逐步导致了韧带退变骨化的发展。

韧带的细胞外基质主要由Ⅰ型胶原纤维及蛋白聚糖构成，成熟的胶原原纤维在透射电镜下可见间距约为 64 nm 的周期性横纹。蛋白聚糖埋置于胶原原纤维网络之间，可以作为营养物、代谢产物、激素、气体分子

等物质的扩散媒介,便于血液与细胞之间进行物质交换,它和胶原原纤维以特殊方式连接,构成基质的特殊结构,可以影响胶原纤维的生成速率和稳定性,当韧带受力发生形变移位时,可以维持胶原纤维的聚集和有序的排列。Cornelissen 等[13]发现蛋白聚糖对基质的矿化有明显的抑制作用。另有研究证实,在骨关节炎的关节软骨、退变椎间盘、骨化的后纵韧带中,蛋白聚糖的含量明显减少[14-18],提示蛋白聚糖在维持基质生理功能及防止骨化方面都起到一定的作用。本研究发现,蛋白聚糖在 AS 棘上韧带中含量减少,MMP-3 表达异常增高,MMP-3 又是蛋白聚糖的主要分解代谢酶[19],提示蛋白聚糖的减少与降解增加有关。在脊柱骨化强直的发展过程中,韧带处于拉伸紧张状态,内部持续高压,影响血管的长入,蛋白聚糖在基质中为不定型凝胶状,具有高度的亲水性,使其在基质中占有较大的空间,MMP-3 的大量表达,降解了蛋白聚糖,减低内部压力,有利于血管生长。由于胶原纤维失去了蛋白聚糖的填充与支持,故在电镜下出现胶原裸露,空间排列纵横交错甚至断裂,营养物质的扩散又因为蛋白聚糖的降解而变得困难,胶原合成更新变慢,含量明显下降,并出现老化,故周期性横纹模糊,部分纤维肿胀,分布密度降低。胶原结构的破坏使填充于其间的蛋白聚糖暴露,更易于被 MMP-3 降解,这样进一步加重韧带细胞外基质的破坏程度,加剧韧带的退变。

综上所述,MMP-3 在 AS 棘上韧带血管平滑肌细胞及内皮细胞中高表达,促进韧带内部血管生长,大量降解韧带中的蛋白聚糖等基质成分,破坏胶原网络的正常空间结构,在韧带退变骨化过程中扮演了重要角色,如能有效抑制其病理性的表达,可能为 AS 的治疗提供新途径。

参考文献:

[1] 张莹, 初同伟. 基因表达谱芯片筛选强直性脊柱炎差异表达基因的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 1044-1047.

[2] 初同伟, 钱奕铭, 周跃, 等. 强直性脊柱炎滑膜组织破骨细胞表型、TNF-α 及 MMP-3 的表达及对软骨破坏作用的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(5): 437-441.

[3] 尤巧娟. HIF1α、MMP3 与 VEGF 对软骨骨化过程中血管侵入的作用机制的影响[D]. 武汉: 武汉体育学院, 2009.

[4] 林建清, 林若柏. 基质金属蛋白酶及其抑制剂与食管癌浸润转移的研究进展[J]. 肿瘤防治杂志, 2003, 10(6): 663-666.

[5] Park K H, Chaiworapongsa T, Kim Y M, *et al*. Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity[J]. J Perinat Med, 2003, 31(1): 12-22.

[6] Cramer T, Schipani E, Johnson R S, *et al*. Expression of VEGF isoforms by epiphyseal chondrocytes during low-oxygen tension is HIF-1 alpha dependent[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12(6): 433-439.

[7] Vincent K A, Shyu K G, Luo Y, *et al*. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 alpha/VP16 hybrid transcription factor[J]. Circulation, 2000, 102(18): 2255-2261.

[8] Waas E T, Hendriks T, Lomme R M, *et al*. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 correlate with disease stage and survival in colorectal cancer patients[J]. Dis Colon Rectum, 2005, 48(4): 700-710.

[9] Hofmann U B, Westphal J R, Van-Muijen G N, *et al*. Matrix metalloproteinases in human melanoma[J]. J Invest Dermatol, 2000, 115(3): 337-344.

[10] 初同伟, 王正国, 朱佩芳, 等. 血管内皮生长因子在骨折愈合中的作用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16(2): 75-78.

[11] 王哲, 王全平, 张俊华, 等. 骨形成蛋白在黄韧带骨化中的表达定位[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(4): 341-343.

[12] Zucker S, Mirza H, Conner C E, *et al*. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation[J]. Int J Cancer, 1998, 75(5): 780-786.

[13] Cornelissen M, de-Ridder L. Electron microscopic study of proteoglycan aggregates sythesized by embryonic chick sternal chondrocytes *in vitro*[J]. Eur J Morphol, 1993, 31(1/2): 17-20.

[14] Cs-Szabo G, Melching L I, Roughley P J, *et al*. Changes in messenger RNA and protein levels of proteoglycans and link protein in human osteoarthritic cartilage samples[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(6): 1037-1045.

[15] Melrose J, Fuller E S, Roughley P J, *et al*. Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratocan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): R79.

[16] O'Driscoll S W. The healing and regeneration of articular cartilage[J]. J Bone Joint Surg Am, 1998, 80(12): 1795-1812.

[17] 郑洪军, 胡有谷, 吕振华, 等. 人腰椎间盘蛋白多糖聚合体分布的研究[J]. 中华骨科杂志, 1998, 18(8): 460-462.

[18] 吴小涛, 许勇, 陈晓钢. 颈椎后纵韧带胶原、蛋白多糖、钙含量变化的研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(15): 1169-1171.

[19] Hamacher S, Matern S, Roeb E. Extracellular matrix: from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2004, 129(38): 1976-1980.

(**收稿**:2012-03-30;**修回**:2012-04-04)

(编辑 龙 亮)