

肢体缺血再灌注后 MMP-3 在关节软骨中的表达

赵程¹, 王成琪², 王继芳¹, 孙新君², 张伟旭²

(1. 解放军总医院骨科, 北京 100853; 2. 解放军八九医院骨科研究所)

摘要 目的: 了解肢体缺血再灌注后关节软骨内基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinase 3, MMP-3) 的表达情况。方法: 35 只成年健康新西兰大白兔, 体重为 (3.0±0.5) kg, 随机分为 7 组, 行左侧后肢缺血 8 h (右侧为对照), 于再灌注后 1、3 d 及 1、2、4、8 和 12 周取膝关节胫骨平台软骨组织, 石蜡切片, 免疫组化 SP 法检测关节软骨内 MMP-3 的表达。结果: 肢体缺血再灌注早期, MMP-3 在关节软骨出现强阳性表达, 肢体缺血再灌注后 3 d 组阳性细胞较对照侧明显增多, 至 2 周组达峰值 ($P < 0.01$), 之后逐渐回落, 12 周组仍高于对照侧 ($P < 0.05$)。结论: 肢体缺血再灌注后, 关节软骨内合成并分泌了 MMP-3, 在软骨基质的降解中发挥重要作用。

关键词 缺血再灌注损伤; 基质金属蛋白酶; 膝关节; 软骨, 关节

Expression of matrix metalloproteinase 3 in articular cartilage after limbs ischemia reperfusion ZHAO Cheng*, WANG Cheng-qi, WANG Jifang, SUN Xinjun, ZHANG Weixu.* Department of Orthopaedics, the General Hospital of PLA, Beijing, 100853, China

Abstract Objective: To observe the expression of matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) in articular cartilage after limbs ischemia reperfusion. **Methods:** In this investigation, 35 adult New Zealand white rabbits (Weight: (3.0±0.5) kg) were randomly divided into 7 groups. After 8 hours of ischemia, the left hind limbs were reperfused (right side as control). After 1, 3 and 1, 2, 4, 8, 12 weeks, the group rabbits were killed respectively. The articular cartilage were excised from the knee joints. Using paraffin section, the expressions of MMP-3 of articular cartilage were observed by immunohistochemistry (SP). **Results:** During the early period of ischemia reperfusion, strong expression of MMP-3 were examined in articular cartilage, which increased at 3 day and reached maximum at 2 weeks ($P < 0.01$), then decreased slightly and sustained at higher level compared with control side until 12 weeks ($P < 0.05$). **Conclusion:** Strong expression of MMP-3 is detected in articular cartilage following ischemia reperfusion of limbs, which plays some roles in degradation of articular cartilage.

Key words Ischemia reperfusion injury; Matrix metalloproteinases; Knee joint; Cartilage, articular

肢体缺血再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 可引起关节软骨和滑膜发生病理性变化^[1,2], 导致关节功能障碍。研究发现基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 在软骨基质的降解中起着重要作用, 其中基质溶解素-1 (MMP-3) 的降解作用已经得到证实^[3]。肢体缺血再灌注后关节软骨中 MMPs 是怎样变化的? 本实验拟通过检测肢体 IR 后关节软骨内 MMP-3 的表达, 旨在揭示其在肢体 IR 后关节软骨损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康新西兰大白兔 35 只, 体重 (3.0±0.5) kg, 雌雄不限, 根据缺血后再灌注时间的不同, 随机分为 7 组, 每组 5 只。分别为再灌注后 1、3 d 及 1、2、4、8 和 12 周。左侧后肢为实验侧; 右侧为自身对照侧, 不施手术。

1.2 动物模型 实验动物用 3% 的异戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 耳缘静脉麻醉, 常规手术准备。在左侧膝关节近侧约 3 cm 处环形切开, 游离出股动静脉、股神经及坐骨神经。保留这些重要组织, 于股骨中段逐层结扎切断肌肉组织。环形游离 0.5 cm 长的骨膜, 股骨前侧用牙科钻开窗, 明胶海绵堵塞髓腔,

阻断血流。用血管夹夹闭股动静脉造成远端肢体缺血, 每 2 h 换血管夹位置, 预防血栓形成。8 h 后松开血管夹, 恢复肢体血运, 逐层缝合。术后伤口定期消毒, 注射抗生素, 防止感染。

1.3 标本制备及指标检测 再灌注后 1、3 d 及 1、2、4、8 和 12 周分批活杀动物, 取胫骨平台软骨。生理盐水冲洗, 4% 多聚甲醛(PFA)固定 24 h, 浸入 20% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)中, 微波炉内脱钙(温度保持在 50℃左右, 每 3 d 换脱钙液 1 次, 共脱钙 2 周)。系列酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 切片厚度为 5 μm。

免疫组化 SP 法(SP-9002 北京中山公司)检测关节软骨内 MMP-3 的表达: ①切片常规脱蜡至水。②3% 过氧化氢孵育 10 min。③蒸馏水洗涤, PBS 浸泡 5 min。④10% 羊血清(PBS 稀释)室温孵育 15 min,

倾去, 勿洗。⑤滴加 1: 50 稀释的 MMP-3 单克隆抗体(ONCOGENE-IM45L 美国), 4℃过夜。⑥PBS 冲洗, 3 min×3 次。⑦滴加生物素标记的二抗(用 1% BSA-PBS, 1: 100 稀释), 37℃孵育 10 min。⑧PBS 冲洗, 3 min×3 次。⑨滴加辣根酶标记链霉卵白素(用 1% BSA-PBS, 1: 100 稀释), 37℃孵育 10 min。⑩PBS 冲洗, 3 min×3 次。⑪DAB 显色: 显色 10 min, 充分水洗。⑫酒精脱水、二甲苯透明, DPX 封片。光学显微镜下观察结果, 阳性着色为棕黄色颗粒。将结果用 Tiger 920 软件测定积分光密度值(IOD)。IOD: 反映被测个体截面或投影轮廓内总的吸光程度, 由各像素点光密度值直接加和, 表示组织细胞截面或投影轮廓内被染色的深浅总量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 软件, 运用配对资料的 *t* 检验进行数据处理。

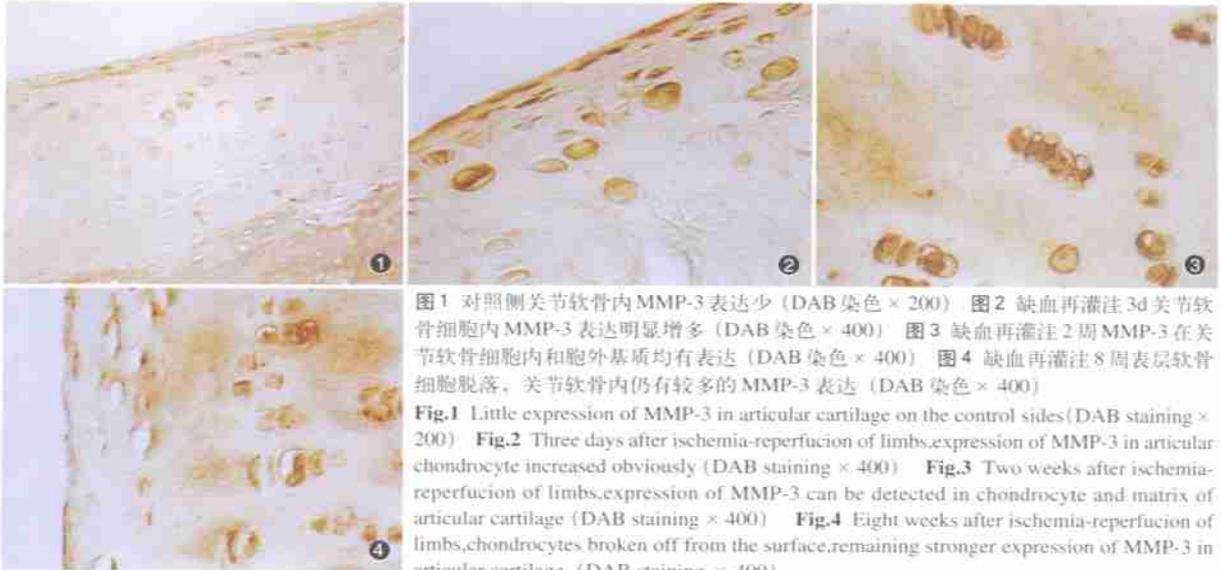


图1 对照侧关节软骨内MMP-3表达少(DAB染色×200) 图2 缺血再灌注3d关节软骨细胞内MMP-3表达明显增多(DAB染色×400) 图3 缺血再灌注2周MMP-3在关节软骨细胞内和胞外基质均有表达(DAB染色×400) 图4 缺血再灌注8周表层软骨细胞脱落, 关节软骨内仍有较多的MMP-3表达(DAB染色×400)
Fig.1 Little expression of MMP-3 in articular cartilage on the control sides(DAB staining × 200) Fig.2 Three days after ischemia-reperfusion of limbs,expression of MMP-3 in articular chondrocyte increased obviously (DAB staining × 400) Fig.3 Two weeks after ischemia-reperfusion of limbs,expression of MMP-3 can be detected in chondrocyte and matrix of articular cartilage (DAB staining × 400) Fig.4 Eight weeks after ischemia-reperfusion of limbs,chondrocytes broken off from the surface,remaining stronger expression of MMP-3 in articular cartilage (DAB staining × 400)

2 结果

对照侧关节软骨基质基本不着色, 阳性细胞少, 染色淡(图 1)。肢体缺血再灌注后 1 d 组, 关节软骨内阳性颗粒较少, 主要分布在胞浆内; 3 d 组阳性细胞较对照侧明显增多($P < 0.01$) (图 2); 至 1 周和 2 周组渐升高达峰值, 阳性着色在胞浆和胞外基质中均有分布(图 3); 之后表达逐渐回落, 但 8、12 周组仍高于对照侧($P < 0.05$) (图 4, 5)。实验侧和对照侧 MMP-3 比值在 1 d 组是 150%, 3 d 组是 280%, 之后出现一平台期, 4 周后开始回落, 到 12 周组 IR 侧是对照侧的 160% (图 6)。

3 讨论

Flannelly 等^[4]的研究发现, 关节软骨退变与金属蛋白酶(MMPs)对胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解作用有关。正常情况下, MMPs 和基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)之间保持一种动态平衡^[4], 而一旦平衡破坏, 则可引发各种病理过程。本研究结果说明, 在肢体缺血再灌注后, 关节内 MMP-3 的合成较正常增多, 并在软骨内广泛分布。关于肢体缺血再灌注后刺激 MMP-3 表达的因素目前尚未清楚。考虑其原因可能是肢体缺血再灌注后释放大量的自由基和炎症细胞因子, 如: NO、IL-1、

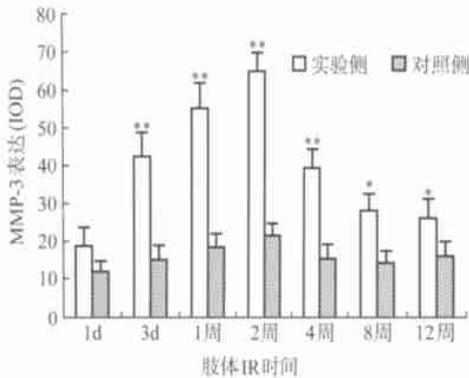


图5 肢体IR后关节软骨内MMP3的表达(与对照侧比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

Fig. 5 Expression of MMP-3 in articular cartilage after ischemia-reperfusion of limbs (compared with the control side: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

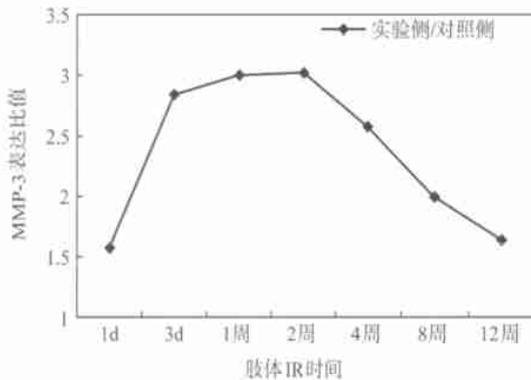


图6 实验侧和对照侧关节软骨内MMP3表达比值。

Fig. 6 Expression ratio of MMP-3 in articular cartilage between experimental sides and control sides.

TNF等。这些因子可刺激关节软骨细胞和滑膜细胞产生和分泌金属蛋白酶类^[5], 促进软骨的降解, 同时IL-1还可直接干扰及抑制软骨细胞代谢。酶类增多

使得和抑制剂间的平衡被打破, 引起蛋白多糖和胶原的降解, 裂解碎片和坏死的细胞脱落到关节腔内, 可引起关节的慢性炎症; 又由于肢体缺血再灌注后期滑膜增厚、血管闭塞、代谢废物不能有效的排出, 加重了关节炎的发生^[1]。关节炎势必会有大量的细胞因子参与, 这些因子又可诱导金属蛋白酶类的合成与分泌, 进一步导致软骨基质的降解, 以至于形成恶性循环。基质的损伤造成软骨生物力学的变化, 在外力负荷下, 基质损伤进一步加重, 软骨处于慢性退行性改变。

由此我们推断, 在肢体缺血再灌注后关节功能障碍的各种复杂因素之中, MMP-3的强表达及对关节软骨基质降解是引起软骨损伤的重要原因之一。若能有效阻止MMP-3和其他蛋白酶类的合成及激活, 将对延缓肢体缺血再灌注后关节软骨退变有积极意义。

参考文献

- 1 孙新君, 王成琪, 周继红, 等. 缺血再灌注损伤对再植体关节滑膜的早期影响. 第三军医大学学报, 2001, 23(10): 1191-1193.
- 2 陈建常, 史振满, 王乐农, 等. 肢体缺血再灌注后关节软骨及滑膜损伤的组织学观察. 中国矫形外科杂志, 2001, 8(2): 156-157.
- 3 Posthumus MD, Limburg PC, Westra J, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase 3 in relation to the development of radiological damage in patients with early rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford), 1999, 38(11): 1081-1087.
- 4 Flannelly J, Chambers MG, Dudhia J, et al. Metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in the murine STR/ort model of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 10(9): 722-733.
- 5 Liacini A, Sylvester J, Li WQ, et al. Inhibition of interleukin 1 stimulated MAP kinases, activating protein 1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF kappa B) transcription factors down regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. Matrix Biol, 2002, 21(3): 251-262.

(收稿日期: 2004-09-10 本文编辑: 李为农)

2005 全国中西医结合期刊读者·作者·编者学术交流会征文通知

中国中西医结合学会编辑工作委员会拟于 2005 年 10 月中旬在上海召开“2005 全国中西医结合期刊读者·作者·编者学术交流会”。会议正在全国范围内征文, 现将具体征文事宜通知如下。1. 征文内容: ①怎样写好论文的中文摘要; ②怎样写好论文的英文摘要; ③中西医结合科研设计方法; ④医学论文的统计学方法; ⑤中西医结合系列期刊中存在的统计学问题; ⑥中西医结合系列期刊中存在的中医英语翻译问题; ⑦中西医结合系列期刊中存在的问题分析; ⑧如何提高期刊的编辑质量; ⑨如何在市场化环境下办好中西医结合类期刊; ⑩中西医结合系列期刊如何实现国际化; ⑪中西医结合系列期刊如何充分利用网络技术; ⑫中西医结合系列期刊如何加强读者、作者、编者之间的交流; ⑬办刊经验介绍。2. 来稿要求: 只需提交论文全文, 无需中英文摘要。应列出每一位作者的工作单位, 具体到科室、部门, 并列作者所在城市名及其邮政编码。第一作者应提供联系电话, 有条件者请提供 E-mail。论文首页注明会议征文, 用 Word 格式以 A4 纸打印 1 份, 连同软盘一起邮寄, 或用 Word 格式编辑以电子邮件附件形式发送。3. 论文提交地址: 上海市长海路 174 号科技楼 1105 室《中西医结合学报》杂志社殷惠霞收。邮政编码: 200433; 电话及传真: 021-25074637; E-mail: jcim@smmu.edu.cn。录用论文将编入学术交流论文集, 优秀论文将在大会报告, 并授予优秀论文奖。提交论文的参会代表可获论文证书及国家继续教育学分 8 分。4. 截稿时间: 2005 年 8 月 31 日。