

引用本文:冯利君,张允帅,王宸.基质金属蛋白酶-1 mRNA、A-2巨球蛋白 mRNA 在创伤性关节炎病人软骨中的表达及与病情严重程度的相关性[J].安徽医药,2021,25(6):1208-1211.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.06.036.

◇临床医学◇



基质金属蛋白酶-1 mRNA、A-2巨球蛋白 mRNA 在创伤性关节炎病人软骨中的表达及与病情严重程度的相关性

冯利君,张允帅,王宸

作者单位:开封市中心医院骨科,河南 开封 475000

摘要: 目的 探究基质金属蛋白酶-1(MMP-1)mRNA、A-2巨球蛋白(A2M)mRNA在创伤性关节炎(PTOA)病人软骨中的表达及与病情严重程度的相关性。方法 前瞻性选取开封市中心医院2018年1月至2019年6月收治的PTOA病人76例作为PTOA组,另选取同期该院类风湿性关节炎(RA)病人72例作为RA组,比较两组、不同病情分级病人软骨中MMP-1 mRNA、A2M mRNA表达量,受试者工作特征曲线(ROC曲线)及曲线下面积(AUC)分析两者对PTOA、RA鉴别诊断价值,采用logistic回归分析探究MMP-1 mRNA、A2M mRNA与病情严重程度的关系,Pearson分析MMP-1 mRNA、A2M mRNA表达量与膝关节评分法(KSS)、美国特种外科医院(HSS)评分相关性。结果 PTOA组软骨中MMP-1 mRNA为 (0.52 ± 0.13) ,A2M mRNA为 (1.06 ± 0.35) ,分别低于RA组的 (0.67 ± 0.16) 、 (1.53 ± 0.51) ($P < 0.05$);鉴别诊断PTOA、RA的AUC:MMP-1 mRNA+A2M mRNA>A2M mRNA>MMP-1 mRNA;MMP-1 mRNA随病情分级增加呈逐渐升高趋势,A2M mRNA表达量、KSS、HSS评分呈下降趋势 ($P < 0.05$);MMP-1 mRNA、A2M mRNA与PTOA病情程度显著相关 ($P < 0.05$);MMP-1 mRNA与KSS、HSS评分呈负相关,A2M mRNA表达量与KSS、HSS评分呈正相关 ($P < 0.05$)。结论 软骨中MMP-1 mRNA、A2M mRNA在PTOA中较RA呈低表达;且前者与病情呈正相关,与关节功能呈负相关,后者则完全相反。调控MMP-1 mRNA、A2M mRNA表达可能为PTOA的治疗提供了一个潜在思路。

关键词: 关节炎; 创伤和损伤; 创伤性关节炎; MMP-1 mRNA; A2M mRNA; 病情严重程度; 受试者工作特征曲线; 关节功能

Expression of MMP-1 mRNA and A2M mRNA in cartilage of patients with traumatic arthritis and its correlation with the severity of disease

FENG Lijun,ZHANG Yunshuai,WANG Chen

Author Affiliation:Department of Orthopaedics, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng, Henan 475000, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) mRNA and A-2 macroglobulin (A2M) mRNA in cartilage of patients with traumatic arthritis (PTOA) and their correlation with the severity of disease.**Methods** Prospective selection 76 patients with PTOA admitted to Kaifeng Central Hospital from January 2018 to June 2019 were selected as the PTOA group, and 72 patients with rheumatoid arthritis (RA) in the hospital during the same period were selected as the RA group. The expression levels of MMP-1 mRNA and A2M mRNA in cartilage of two groups of patients with different disease levels were compared; the receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the curve (AUC) analysis were valuable for the differential diagnosis of PTOA and RA; Logistic regression analysis was used to explore the relationship between MMP-1 mRNA, A2M mRNA and the severity of disease; Pearson analysis of the correlation between MMP-1 mRNA and A2M mRNA expression and Knee Score (KSS) and American Special Surgery Hospital (HSS) scores.**Results** MMP-1 mRNA in cartilage in PTOA group was (0.52 ± 0.13) and A2M mRNA was (1.06 ± 0.35) , which were lower than those in RA group [(0.67 ± 0.16) and (1.53 ± 0.51)] ($P < 0.05$); differential diagnosis of PTOA, RA AUC: MMP-1 mRNA+A2M mRNA>A2M mRNA>MMP-1 mRNA; MMP-1 mRNA showed a gradual increase trend with the increase of disease grade, A2M mRNA expression, KSS, HSS score showed a downward trend ($P < 0.05$); MMP-1 mRNA and A2M mRNA were significantly correlated with the severity of PTOA ($P < 0.05$); MMP-1 mRNA was negatively correlated with KSS and HSS scores, and A2M mRNA expression was positively correlated with KSS and HSS scores ($P < 0.05$).**Conclusion** MMP-1 mRNA and A2M mRNA in cartilage can be used to diagnose PTAA and RA, and it is significantly related to the disease and joint function of PTOA, regulation of MMP-1 mRNA and A2M mRNA expression may provide a potential idea for the treatment of PTOA.

Key words: Arthritis; Wounds and injuries; Traumatic arthritis; MMP-1 mRNA; A2M mRNA; Disease severity; Receiver operating characteristic curve; Joint function

创伤性关节炎(Post-traumatic osteoarthritis, PTOA)主要以关节软骨退化、变性及继发性关节软骨增生与硬化为病理特点,可引起关节疼痛与功能障碍,严重降低病人生活质量^[1-2]。基质金属蛋白酶-1(Matrix metalloproteinase-1, MMP-1)作用底物主要是Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原和蛋白多糖,在大鼠骨性关节炎、类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)中呈高表达^[3-4]。A-2巨球蛋白(A-2 macroglobulin, A2M)是一种广谱的蛋白酶抑制剂,在股骨头坏死者关节囊滑膜组织中呈低表达^[5]。现阶段关于MMP-1 mRNA、A2M mRNA在PTOA病人软骨中的表达及与病情严重程度相关性的报道较少,是否有助于鉴别PTOA、RA仍不明确。本研究对此进行探讨,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 前瞻性选取开封市中心医院2018年1月至2019年6月收治的PTOA病人76例作为PTOA组,另选取同期该院RA病人72例作为RA组。两组性别、年龄等一般资料均衡可比($P>0.05$),见表1。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

表1 两组创伤性关节炎病人临床资料对比

项目	PTOA组 (n=76)	RA组 (n=72)	$\chi^2(t)$ 值	P值
年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	41.09±4.23	40.86±6.21	(0.265)	0.792
病程/(月, $\bar{x} \pm s$)	16.79±5.26	17.25±6.01	(0.496)	0.621
体质量指数/(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	22.84±1.45	23.01±0.93	(0.844)	0.400
性别(女/男)/例	32/44	27/45	0.327	0.567
饮酒史/例(%)	23(30.26)	24(33.33)	0.161	0.688
吸烟史/例(%)	36(47.37)	30(41.67)	0.487	0.486
合并疾病/例(%)				
高脂血症	9(11.84)	5(6.94)	1.036	0.309
糖尿病	3(3.95)	7(9.72)	1.148	0.284
心脏病	2(2.63)	4(5.56)	0.235	0.628
高血压	6(7.89)	2(2.78)	1.025	0.311

1.2 纳排标准 纳入标准:PTOA、RA分别符合PTOA、RA诊断标准^[6-7];以往无PTOA、RA手术治史;入组前1个月无相关药物应用史;无血液系统疾病。排除标准:合并膝关节结核者;合并骨折者;妊娠期、哺乳期病人。

1.3 方法

1.3.1 软骨中MMP-1 mRNA、A2M mRNA表达的检测 (1)主要试剂、仪器:Trizol(武汉科昊佳生物科技有限公司);RNase-free ddH₂O(上海索宝生物科技);Prime Script™ RT Enzyme Mix[宝生物(大连)工程有限公司];5×PrimeScript Buffer[宝生物工程(大

连)有限公司];Nuclease-Free Water(北京冬歌博业生物科技有限公司);荧光定量PCR仪(美国ABI-7300)。(2)检测方法:治疗前,均在病人知情同意条件下,采集适量胫骨平台软骨组织,液氮保护下研磨成碎末,加入含有1 mL Trizol的EP管中,冰上静置15 min,加入0.2 mL三氯甲烷,充分混匀,室温放置5 min,12 000 r/min离心15 min,转移上层水相500 μL至新的EP管中,加入等体积的异丙醇,混匀,室温静置20 min,12 000 r/min离心10 min,上清弃之,可见细小白色胶状沉淀。加入1 mL预冷的用RNase-free ddH₂O与100%乙醇配置的75%冰乙醇,8 000 r/min离心5 min,管内液体弃之,室温放置0.5 h,加入RNase-free ddH₂O 20 μL混匀,分光光度计检测总RNA纯度与质量。按以下逆转录反应体系进行逆转录反应,条件37 ℃ 15 min,95 ℃ 5 s,4 ℃ 60 min,得到互补DNA(cDNA),采用实时荧光定量PCR检测各基因表达,引物序列、PCR反应体系如下,反应条件95 ℃ 15 min预变性,95 ℃ 5 s变性,55 ℃ 30 s退火,72 ℃ 30 s延伸,溶解曲线95 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s,循环1次,4 ℃保存,用相对内参的表达量表示各目的基因表达量。由该院检验室统一完成,以上检验过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 PTOA病情评估 采用X线ellgren&Lawrence分级标准,Ⅰ级:轻微骨赘;Ⅱ级:明显骨赘,但未累及关节间隙;Ⅲ级:关节间隙中度变窄;Ⅳ级:关节间隙明显变窄,软骨下骨硬化。

1.4 观察指标 (1)比较两组软骨中MMP-1 mRNA、A2M mRNA表达量。(2)分析MMP-1 mRNA、A2M mRNA鉴别诊断PTOA、RA的截断值、灵敏度、特异度。(3)不同病情病人软骨中MMP-1 mRNA、A2M mRNA及膝关节评分法(Knee society score, KSS)、美国特种外科医院(Hospital for special surgery, HSS)评分:KSS、HSS评分满分100分,分值与均膝关节功能呈正比。(4)分析MMP-1 mRNA、A2M mRNA与PTOA病情程度的相关性。(5)分析MMP-1 mRNA、A2M mRNA表达量与KSS、HSS评分相关性。

1.5 统计学方法 采用SPSS 22.0处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组定量数据的比较采用成组t检验,多组定量数据间比较以单因素方差分析,多组间两两比较采用LSD-t检验,定性资料用例(%)表示、 χ^2 检验,以logistic多元回归方程分析MMP-1 mRNA、A2M mRNA与PTOA病情程度的关系,采用Pearson进行相关性分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组软骨中 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 表达量比较 PTOA 组软骨中 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 低于 RA 组 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 两组关节炎病人软骨中 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 表达量比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	MMP-1 mRNA	A2M mRNA
PTOA 组	76	0.52±0.13	1.06±0.35
RA 组	72	0.67±0.16	1.53±0.51
<i>t</i> 值		6.274	6.567
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: MMP-1 为基质金属蛋白酶-1, A2M 为 A2-巨球蛋白, PTOA 为创伤性关节炎, RA 为类风湿性关节炎。

2.2 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 对 PTOA、RA 鉴别诊断价值 ROC 分析显示, MMP-1 mRNA+A2M mRNA 鉴别诊断 PTOA、RA 的 AUC 为 0.909, 大于单一的 MMP-1 mRNA、A2M mRNA, 灵敏度为 89.47%, 特异度为 80.56%。见表 3。

2.3 不同病情病人软骨中 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 及 KSS、HSS 评分 MMP-1 mRNA、随病情分级增加呈逐渐升高趋势, A2M mRNA 表达量、KSS、HSS 评分呈下降趋势 ($P<0.05$), 见表 4。

表 4 不同创伤性关节炎病情病人软骨中 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 及 KSS、HSS 评分/ $\bar{x} \pm s$

病情分级	例数	MMP-1 mRNA	A2M mRNA	KSS 评分/分	HSS 评分/分
I 级	21	0.37±0.10	1.33±0.27	63.52±7.91	65.59±8.02
II 级	22	0.50±0.13	1.07±0.16	54.80±7.33	56.74±6.41
III 级	18	0.59±0.15	0.93±0.14	45.71±6.12	48.24±5.86
IV 级	15	0.68±0.14	0.82±0.12	33.04±5.36	36.90±5.10
<i>F</i> 值		18.883	25.621	62.813	61.429
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: MMP-1 为基质金属蛋白酶-1, A2M 为 A2-巨球蛋白, KSS 为膝关节评分法, HSS 为美国特种外科医院评分。

2.4 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 与 PTOA 病情程度的关系 logistic 回归分析显示, MMP-1 mRNA、A2M mRNA 与 PTOA 病情程度显著相关 ($P<0.05$), 见表 5。

2.5 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 表达量与 KSS、HSS 评分相关性 Pearson 相关性分析, MMP-1

表 5 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 与创伤性关节炎 (PTOA) 病情程度的关系

变量	β 值	<i>SE</i> 值	Wald χ^2 值	<i>P</i> 值	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>
MMP-1 mRNA	0.975	0.322	9.167	<0.001	2.651	1.746~4.025
A2M mRNA	-0.686	0.237	8.371	<0.001	0.504	0.281~0.903

注: MMP-1 为基质金属蛋白酶-1, A2M 为 A2-巨球蛋白。

mRNA 与 KSS、HSS 评分呈负相关 ($r=-0.575$ 、 -0.541 , 均 $P<0.05$), A2M mRNA 表达量与 KSS、HSS 评分呈正相关 ($r=0.592$ 、 0.610 , 均 $P<0.05$)。

3 讨论

PTOA 好发于年轻人群, 严重影响病人生活质量, 且由于年轻人不适合行关节融合或置换术, 给家庭、社会带来较大负担, 故加强对 PTOA 的研究意义重大^[8]。

3.1 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 鉴别诊断 PTOA、RA 的价值 RA 是与 PTOA 相似的一种关节疾病, 两者临床特征相似, 鉴别诊断存在一定难度。MMP-1 是基质金属蛋白酶家族成员之一, A2M 主要由肝脏等产生, 具有广谱蛋白酶抑制作用^[9-10]。但目前关于 MMP-1、A2M 在 RA、PTOA 中表达水平比较的报道较少。本研究结果显示, PTOA 病人软骨中 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 低于 RA 病人, 可能与 RA 病人基质金属蛋白酶/金属蛋白酶组织抑制因子失衡严重有关。且 MMP-1 mRNA+A2M mRNA 鉴别诊断 PTOA、RA 的 AUC 为 0.909, 大于单一的 MMP-1 mRNA、A2M mRNA, 灵敏度为 89.47%, 特异度为 80.56%, 呈现出较高价值, 可为临床鉴别诊断 PTOA、RA 提供量化参考。

3.2 MMP-1 mRNA 在 PTOA 软骨中表达及与病情的相关性 MMP-1 可降解细胞外基质中的胶原纤维和明胶, 改变细胞的微环境, 破坏细胞外基质, 不利于损伤细胞的修复^[11]。本研究发现, MMP-1 mRNA 与 PTOA 病情程度、KSS、HSS 评分显著相关, 提示检测 MMP-1 mRNA 表达可评估 PTOA 病人病情严重程度与关节功能。根据 Xu 等^[12]研究, MMP-1 基因多态性与骨关节炎的发病密切相关。动物学研究表明, MMP-1 在 RA 大鼠模型中呈高表达, 与病

表 3 MMP-1 mRNA、A2M mRNA 对 PTOA、RA 鉴别诊断的 ROC 分析结果

指标	AUC	95% <i>CI</i>	<i>Z</i> 值	<i>P</i> 值	截断值	灵敏度/%	特异度/%
MMP-1 mRNA	0.709	0.629~0.781	4.888	<0.001	≤0.57	68.42	68.06
A2M mRNA	0.780	0.704~0.844	7.280	<0.001	≤1.58	94.74	55.56
两者联合	0.909	0.851~0.950	16.850	<0.001		89.47	80.56

注: MMP-1 为基质金属蛋白酶-1, A2M 为 A2-巨球蛋白, PTOA 为创伤性关节炎, RA 为类风湿性关节炎。

情的改善有关,支持本研究结论^[13]。PTOA病人关节存在炎症反应,诱导白介素-1、肿瘤坏死因子- α 等炎性因子,并介导细胞外基质过度降解,对软骨细胞保护作用减弱,导致软骨细胞受损、坏死,软骨层变薄等退变现象,因此可引起疼痛、关节活动受限等症状体征,且MMP-1水平越高,基质金属蛋白酶/金属蛋白酶组织抑制因子失衡越明显,软骨破坏越严重,故病人病情越严重^[14]。表明抑制MMP-1表达可能有助于PTOA病人病情及关节功能的改善。

3.3 A2M mRNA在PTOA软骨中表达及与病情的相关性 A2M是血浆中分子量最大的蛋白质,能结合多种离子、分子、蛋白水解酶^[15]。本研究结果显示,随病情分级增加呈逐渐升高趋势,A2M mRNA表达量呈下降趋势,A2M mRNA与PTOA病情程度、KSS、HSS评分显著相关,提示检测A2M可评估PTOA病人病情与关节功能。Li等^[16]报道显示,早期补充A2M能通过抑制胶原蛋白II诱导的关节炎模型中的炎症来减轻软骨和骨骺损伤,从侧面论证了本研究A2M mRNA表达量与KSS、HSS评分呈正相关的结论。Liu等^[17]研究指出,下调软骨细胞中miR-146b的表达,可抑制白介素-1 β 诱导的胱天蛋白酶活化和蛋白水解酶的表达,起到软骨保护与抑制骨关节炎进展作用,采用萤光素酶报告基因测定证实,软骨细胞中A2M mRNA是miR-146b的靶基因,提示调控A2M mRNA表达,可能为PTOA的保守治疗提供一个潜在思路。分析其原因可能是,A2M能通过抑制MMP-1等基质金属蛋白酶,保护细胞外基质,促进基质金属蛋白酶/金属蛋白酶组织抑制因子动态平衡的恢复与软骨细胞微环境的改善,防止软骨细胞的破坏,故是PTOA病人病情的保护因素,与KSS、HSS评分呈正相关^[18-19]。本研究不足之处在于,纳入病例数较少,可能会影响数据,且软骨组织标本的采集具有一定创伤,仍需后续的进一步完善。

软骨中MMP-1 mRNA、A2M mRNA可诊断鉴别PTOA、RA,并与PTOA病人病情、关节功能显著相关,调控MMP-1 mRNA、A2M mRNA表达可能为PTOA的治疗提供了一个潜在思路。

参考文献

- [1] DING L, AMENDOLA A, WOLF B, et al. Association of chemokine expression in anterior cruciate ligament deficient knee with patient characteristics: implications for post-traumatic osteoarthritis[J]. *Knee*, 2020, 27(1): 36-44.
- [2] BROCKMAN BS, MAUPIN JJ, THOMPSON SF, et al. Complication rates in total knee arthroplasty performed for osteoarthritis and post-traumatic arthritis: a comparison study[J]. *J Arthroplasty*, 2020, 35(2): 371-374.

- [3] 贾庆运,王拥军,梁倩倩,等.槲皮素对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子和基质金属蛋白酶的表达的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(6): 738-741.
- [4] 张峰,刘庆春,王春成.补肾活血汤对大鼠骨性关节炎TNF- α 、IL-1 β 、MMP-1表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(8): 1999-2003.
- [5] 方善鸿,李泳峰,陈鹏. α 2-巨球蛋白在不同时相的激素性股骨头坏死组织中的表达[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(10): 1955-1958.
- [6] 中华医学会骨科学分会关节外科学组.骨关节炎诊疗指南(2018年版)[J]. *中华骨科杂志*, 2018, 38(12): 705-715.
- [7] 中华医学会风湿病学分会.2018中国类风湿关节炎诊疗指南[J]. *中华内科杂志*, 2018, 57(4): 242-251.
- [8] 顾文奇,徐宏威,王晓康,等.踝关节牵开成形联合富血小板血浆注射治疗创伤性踝关节炎[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2019, 21(4): 321-327.
- [9] GHAFARZADEH A, BAGHERI M, KHADEM-VATANI K, et al. Association of MMP-1 (rs1799750) -1607 2G/2G and MMP-3 (rs3025058) -1612 6A/6A genotypes with coronary artery disease risk among iranian turks [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 74(5): 420-425.
- [10] GENG R, XU Y, HU W, et al. The association between MMP-1 gene rs1799750 polymorphism and knee osteoarthritis risk [J/OL]. *Biosci Rep*, 2018, 38(5): BSR20181257. DOI: 10.1042/BSR20181257.
- [11] WANG M, ZHOU Y, HUANG W, et al. Association between matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) protein level and the risk of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a meta-analysis [J/OL]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 54(2): e10366. DOI: 10.1590/1414-431X202010366.
- [12] XU B, XING RL, ZHANG L, et al. Effects of MMP-1 1G/2G polymorphism on osteoarthritis: A meta-analysis study [J]. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2019, 53(2): 129-133.
- [13] 王蓉,苏杉,孙少伯,等.秦艽寒热不同配伍药对对风湿热痹RA大鼠踝关节MMP-1、TIMP-1表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(6): 1331-1335.
- [14] 周华茂,杨艳,邓淑文,等.普瑞巴林联合硫酸软骨素治疗膝骨性关节炎疼痛疗效观察[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2019, 25(7): 552-555.
- [15] 詹先林,房萌,肖潇,等.核心岩藻糖基化 α 2巨球蛋白在肝癌中的诊断价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(3): 193-197.
- [16] LI S, XIANG C, WEI X, et al. Early supplemental α 2-macroglobulin attenuates cartilage and bone damage by inhibiting inflammation in collagen II-induced arthritis model [J]. *Int J Rheum Dis*, 2019, 22(4): 654-665.
- [17] LIU X, LIU L, ZHANG H, et al. MiR-146b accelerates osteoarthritis progression by targeting alpha-2-macroglobulin [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(16): 6014-6028.
- [18] 陆向东,朱孟博,王少伟.A-2巨球蛋白对骨关节炎软骨细胞的作用[J]. *中国矫形外科杂志*, 2019, 27(16): 1507-1511.
- [19] 何继晨,严君逸,程琢玉,等.诱导多能干细胞来源间充质干细胞对大鼠骨关节炎的治疗作用[J]. *安徽医药*, 2019, 23(8): 1496-1500,后插1-后插2.

(收稿日期:2020-01-08,修回日期:2020-02-10)