

膝骨关节炎关节液和滑膜中IL-18与MMP-13的表达及临床意义

朱振标,张 寿,刘亦恒,金旭红,林之斌

(海口市人民医院骨科中心,海南 海口 570208)

【摘要】 目的 探讨膝骨关节炎(KOA)患者的关节液和滑膜中白细胞介素(IL)-18与基质金属蛋白酶(MMP)-13的表达及其临床意义。方法 选取2011年1月至2013年12月期间我院收治的76例KOA患者作为观察组,76例患者中,轻度30例,中度26例,重度20例。所有受试者软骨损伤分度为Ⅱ度26例,Ⅲ度28例,Ⅳ度22例;另选择32例膝关节半月板损伤患者为对照组。检测受试者膝关节关节液、滑膜中IL-18、MMP-13表达情况。结果 观察组患者的膝关节关节液和膝关节滑膜中的IL-18、MMP-13水平均高于对照组,差异均有显著统计学意义($P<0.01$);随着KOA程度的加重,关节液和滑膜中的IL-18、MMP-13水平呈上升趋势,差异均有显著统计学意义($P<0.01$);随着KOA分度的增加,关节液和滑膜中的IL-18、MMP-13水平呈上升趋势,差异均有显著统计学意义($P<0.01$);关节液IL-18、MMP-13水平与滑膜IL-18、MMP-13水平分别呈正相关($r=0.361, 0.371, P=0.021, 0.016$);关节液IL-18水平与关节液MMP-13水平呈正相关($r=0.369, P=0.019$);滑膜IL-18水平与滑膜MMP-13水平呈正相关($r=0.378, P=0.015$);关节液和滑膜中IL-18、MMP-13水平与KOA程度、KOA分度均呈正相关($P<0.05$)。结论 MMP-13、IL-18在KOA关节液和滑膜中均高表达;两者呈现出显著正相关,共同在KOA的发病及病情进展中起作用。

【关键词】 骨性关节炎;白细胞介素;基质金属蛋白酶;关节液;滑膜

【中图分类号】 R684.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)15-2227-04

Expression and clinical significance of IL-18 and MMP-13 in synovial and joint fluid in knee osteoarthritis.

ZHU Zhen-biao, ZHANG Shou, LIU Yi-heng, JIN Xu-hong, LIN Zhi-bin. Department of Orthopaedics, Haikou People's Hospital, Haikou 570208, Hainan, CHINA

【Abstract】 Objective To study expression and clinical significance of IL-18 and MMP-13 in synovial and joint fluid in knee osteoarthritis (KOA). **Methods** From January 2011 to December 2011, 76 patients of KOA admitted in our hospital were selected as observation group, including 30 mild cases, 26 moderate cases and 20 severe cases. According to the cartilage damage degree, the patients were divided into 26 cases of Ⅱ degree, 28 cases of Ⅲ degree, and 22 cases of Ⅳ degree. Thirty-two patients of knee joint meniscus injury were selected as the control group. The expression levels of IL-18, MMP-13 in synovial and joint fluid in knee joint of patients were tested. **Results** The levels of IL-18, MMP-13 in synovial and joint fluid in knee joint were significantly higher in the observation group than the control group ($P<0.01$). As the degree of the KOA was aggravating, IL-18, MMP-13 levels in synovial and joint fluid were on the rise, and there was statistically significant difference ($P<0.01$). With the increase of KOA dividing, IL-18, MMP-13 levels in synovial and joint fluid were on the rise, and there was statistically significant difference ($P<0.01$). The levels of IL-18, MMP-13 in joint fluid were positively correlated with those in synovial fluid ($r=0.361, 0.371, P=0.021, 0.016$). IL-18 level of joint fluid had positive correlation with MMP-13 level of joint fluid ($r=0.369, P=0.019$), and synovial IL-18 and synovial MMP-13 levels were positively related ($r=0.378, P=0.378$). In joint fluid, synovial IL-18, MMP-13 levels showed a positive correlation with the degree of the KOA, KOA dividing ($P<0.05$). **Conclusion** MMP-13, IL-18 are highly expressed in the synovial and joint fluid of KOA, and there is a significant positive correlation between the two, which play a role in the pathogenesis of KOA.

【Key words】 Osteoarthritis; Interleukin; Matrix metalloproteinases; Joint fluid; Synovial

膝骨关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)是骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)的一种,为一种慢性退行性骨关节病变,随着人口老龄化程度的加剧,其发病有

上升趋势^[1]。65岁以上人群KOA发病率高达50%以上,在美国,其发病仅次于心血管疾病,给社会及家庭带来沉重负担^[2]。研究显示,细胞因子、酶类与KOA

的发病关系密切,在 KOA 进展过程中起重要作用^[3-6]。白细胞介素(Interleukin, IL)为研究较多的细胞因子,在多种炎症反应中起作用;基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase, MMP)为近期研究热点之一^[7]。本研究通过检测 KOA 关节液、滑膜中 IL-18、MMP-13 的水平,旨在探讨 IL-18、MMP-13 在膝关节 KOA 中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 1 月至 2013 年 12 月期间被我院骨科收治的 76 例 KOA 患者为观察组,所有患者均符合 KOA 的诊断标准^[1]。患者年龄 56~81 岁,中位年龄 51 岁;体重指数(BMI) $(22.58 \pm 3.27) \text{ kg/m}^2$;男性 36 例,女性 40 例;左侧 37 例,右侧 39 例。依据综合 ISOA 及 K-L 放射线分级标准^[1],76 例患者中,轻度 30 例,中度 26 例,重度 20 例。对所有受试者行关节镜检查并对软骨损伤分度^[1]: II 度 26 例,III 度 28 例,IV 度 22 例;另选择同期被我院骨科收治的 32 例膝关节半月板损伤患者为对照组,患者年龄 57~85 岁,中位年龄 52 岁;左侧 16 例,右侧 16 例。四组受试者的年龄、性别、吸烟状况和 BMI 比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。所有受试者均知情并签署知情同意书。本研究已通过我院伦理委员会审核批准。

表 1 四组受试者的基本资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	年龄(岁)	男/女(例)	吸烟/不吸烟(例)	BMI (kg/m^2)
轻度组($n=30$)	49±5	14/16	12/28	21.98±2.18
中度组($n=26$)	51±6	12/14	8/18	22.58±3.27
重度组($n=20$)	50±5	10/10	6/14	22.81±3.35
对照组($n=32$)	50±6	15/17	12/30	23.09±4.05
F/χ^2 值	0.1269	0.5591	1.3581	0.0689
P 值	0.8772	0.7561	0.5071	0.9108

1.2 纳入排除标准

1.2.1 纳入标准^[1] 符合相关疾病的诊断标准;近 1 个月内未注射过激素类药物;无严重肝肾疾病;无其他严重脑部器质性病变;依从性佳;知情同意。

1.2.2 排除标准^[1] 骨肿瘤者;风湿性关节炎患者;类风湿性关节炎者;膝关节严重感染者;有其他严重精神疾病者;有酒精药物滥用史;1 周内应用非甾体类药物者;不配合接受临床检查者;不愿意接受治疗者。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 于关节镜检查时收集受试者关节液、滑膜标本,术中用注射器抽取关节囊中关节液 3 ml,注入离心管保存。切取关节滑膜组织放入标

本袋保存。将存放关节液的离心管 1 500 g/min,离心 15 min,将上清液吸进 EP 管,于 -80°C 保存待测。用生理盐水多次冲洗滑膜组织,用刀片切成小块,用 4% 中性多聚甲醛固定,石蜡包埋待测。

1.3.2 关节液、滑膜组织 IL-18、MMP-13 检测 采用双抗体夹心 ELISA 法检测关节液 IL-18、MMP-13 含量,试剂盒购自于上海华大科技有限公司,严格按照说明书操作^[6]。滑膜标本切片行 HE 染色,使用免疫组化 SP 法检测滑膜组织 IL-18、MMP-13 的表达情况。采用 Image Pro-Plus 6.0 检测分析免疫组化结果,分析滑膜组织 IL-18、MMP-13 表达的积分光密度(IOD)。

1.4 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间两两比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用 Pearson 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组受试者的关节液、滑膜中 IL-18、MMP-13 水平比较 观察组膝关节液 IL-18、MMP-13 水平均高于对照组,差异均有显著统计学意义($P < 0.01$);观察组膝关节滑膜 IL-18、MMP-13 水平均高于对照组,差异均有显著统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

表 2 两组受试者的关节液、滑膜中 IL-18、MMP-13 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	关节液 IL-18 (pg/ml)	关节液 MMP-13 (ng/ml)	滑膜 IL-18 (IOD)	滑膜 MMP-13 (IOD)
观察组($n=76$)	142.61±20.16	219.61±22.81	143.58±12.61	149.28±15.61
对照组($n=32$)	38.29±6.71	35.62±7.21	100.29±8.78	96.29±10.57
t 值	7.0182	8.9639	6.0872	6.8728
P 值	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000

2.2 四组受试者膝关节液、滑膜中 IL-18、MMP-13 水平 四组受试者膝关节液、滑膜 IL-18、MMP-13 水平比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$);随着 KOA 程度的加重,关节液 IL-18、MMP-13 水平呈上升趋势($P < 0.01$);随着 KOA 程度的加重,滑膜 IL-18、MMP-13 水平也呈上升趋势($P < 0.01$),见表 3。

2.3 四组受试者膝关节液、滑膜中 IL-18、MMP-13 水平 四组受试者膝关节液、滑膜 IL-18、MMP-13 水平比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$);随着 KOA 分度的增加,关节液 IL-18、MMP-13 水平呈上升趋势($P < 0.01$);随着 KOA 分度的增加,滑膜 IL-18、MMP-13 水平也呈上升趋势($P < 0.01$),见表 4。

表3 四组受试者膝关节液、滑膜中IL-18、MMP-13水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	关节液IL-18 (ng/ml)	关节液MMP-13 (pg/ml)	滑膜IL-18 (IOD)	滑膜MMP-13 (IOD)
重度组(n=20)	149.61±28.27	287.62±35.89	150.72±27.81	288.67±36.81
中度组(n=26)	136.29±21.56	201.62±29.28	141.56±22.92	202.58±26.97
轻度组(n=30)	130.08±11.21	181.76±12.71	126.21±11.02	178.98±12.53
对照组(n=32)	38.29±6.71	35.62±7.21	100.29±8.78	96.29±10.57
F值	6.7219	7.8062	7.9868	7.2737
P值	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

表4 四组受试者膝关节液、滑膜中IL-18、MMP-13水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	关节液IL-18 (ng/ml)	关节液MMP-13 (pg/ml)	滑膜IL-18 (IOD)	滑膜MMP-13 (IOD)
对照组(n=32)	38.29±6.71	35.62±7.21	100.29±8.78	96.29±10.57
Ⅱ度(n=26)	128.16±9.16	178.29±19.37	125.39±9.09	176.26±4.49
Ⅲ度(n=28)	135.37±20.35	204.91±30.12	142.72±23.31	201.62±26.78
Ⅳ度(n=22)	152.53±29.32	290.71±36.91	152.78±27.92	292.75±36.93
F值	6.3782	7.3721	7.8981	7.2637
P值	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

2.4 IL-18、MMP-13与年龄、KOA程度、KOA分度、吸烟状况、BMI的相关性 对KOA关节液、滑膜中IL-18、MMP-13水平与年龄、KOA程度、KOA分度、吸烟状况、BMI等因素进行相关性分析,结果显示,关节液IL-18、MMP-13水平与滑膜IL-18、MMP-13水平分别呈正相关($r=0.361, 0.371, P=$

$0.021, 0.016$);关节液IL-18水平与关节液MMP-13水平呈正相关($r=0.369, P=0.019$);滑膜IL-18水平与滑膜MMP-13水平呈正相关($r=0.378, P=0.015$);关节液、滑膜中IL-18、MMP-13水平与KOA程度、KOA分度均呈正相关($P<0.05$),而与年龄、吸烟状况、BMI等因素无明显相关性,见表5。

表5 IL-18、MMP-13与年龄、KOA程度、KOA分度、吸烟状况、BMI的相关性

指标	关节液IL-18		关节液MMP-13		滑膜IL-18		滑膜MMP-13	
	r值	P值	r值	P值	R值	P值	R值	P值
年龄	0.312	0.065	0.019	0.897	0.158	0.312	0.059	0.692
KOA程度	0.298	0.035	0.302	0.031	0.295	0.037	0.351	0.018
KOA分度	0.302	0.031	0.305	0.029	0.297	0.033	0.369	0.015
吸烟状况	0.202	0.096	0.051	0.912	0.198	0.307	0.115	0.581
BMI	0.049	0.749	0.061	0.691	0.098	0.516	0.029	0.916

3 讨论

KOA为退行性病变,发病原因复杂,与多种因素相关;老龄、遗传、内分泌紊乱均可引发KOA^[8]。近年来大量研究发现,IL、MMP亦参与了KOA的发病,在其发病机制中起重要作用^[9-15]。Ravi等^[10]研究发现,和正常人群比较,IL家族在KOA患者中可异常表达。本研究显示,KOA患者关节液、滑膜中IL-18水平明显高于非KOA组患者。表明IL家族成员之一IL-18在KOA中亦起重要作用,IL-18具有促软骨细胞分解代谢的作用。研究发现IL-18可通过激活蛋白-1促进KOA滑膜增生,且IL-18表达水平与KOA严重程度相关^[10]。本研究亦显示,随着KOA程度和分度的增加,滑膜IL-18、MMP-13的表达呈增强趋势。提示IL-18不仅在KOA发病中起重要作用,其表达与KOA的严重程度及病情进展亦呈现出正相关

的趋势。IL-18作为精细调节因子,可促软骨细胞分解代谢,增强关节炎症、促进关节软骨退变,进而导致KOA的发病^[11]。

MMP家族(MMPs)为一种重要酶类,可有效降解软骨中细胞外基质;MMP-13为MMPs一员,可对各种胶原进行有效降解,可分解胶原三螺旋结构^[16]。Bozic等^[4]研究发现,OA患者关节液中MMPs表达明显较正常人群不同。Hauser等^[6]亦发现,OA患者滑膜中存在MMPs过量表达现象,MMPs可能在OA发病及滑膜增生过程中起重要作用。本研究通过免疫组化方法检测滑膜组织中MMP-13的表达,通过ELISA方法检测关节液中该酶类的含量,检测显示,KOA患者关节液、滑膜中MMP-13表达强度明显高于非OA者,与文献报道基本一致。提示MMP-13参与了KOA的发病,且与滑膜增生密切相关。Kneer等^[1]研究

发现, MMP-13 在 OA 关节软骨损害中起一定的作用, 通过免疫组化方法可以检测到 MMP-13 在 OA 组织中存在高表达现象, 且 MMP-13 表达水平与 OA 严重程度相关。本研究亦显示, 重度 KOA 患者关节液、滑膜 MMP-13 检测含量明显高于中度和轻度患者, 随着 KOA 严重程度和分度的增加, 关节液、滑膜 MMP-13 表达呈增强趋势。表明 MMP-13 不仅在 KOA 发病中起重要作用, 且其表达状况与 KOA 的严重程度及病情进展亦呈现出明显的相关性。生理情况下 MMP-13 表达低, 而在 KOA 等病理状况下, 软骨细胞释放的 MMP-13 含量上升, 可引起软骨细胞外基质降解, 进而导致软骨细胞外架构受损, 引起软骨细胞和软骨组织受损, 软骨细胞显露于炎症环境中并进一步遭到破坏, 引发 KOA, 其中, MMP-13 的高表达在 KOA 的发病中起重要作用^[17]。

MMPs 以组织特异性的方式合成, 其表达受细胞因子、激素等因素调节, MMPs 在正常人群中表达极低, 但在 OA 等病理情况下可高表达^[18]。本研究中 KOA 关节液中 MMP-13、IL-18 含量明显高于对照组, 且关节液中 MMP-13、IL-18 水平呈现出明显的正相关。在研究中我们通过免疫组化方法检测关节滑膜组织中 MMP-13、IL-18 的表达情况, 检测结果显示, KOA 滑膜组织中 MMP-13、IL-18 表达强度明显强于正常对照组, 且滑膜组织中 MMP-13、IL-18 的表达之间呈现出显著正相关。表明 MMP-13、IL-18 两者共同参与了 KOA 的发病及进展, 两者相互作用, 导致 KOA 关节受损并发病, 但 MMP-13、IL-18 调控 KOA 发病的具体过程仍然需要更加深入的基础研究验证。

本研究不足之处是入组对象较少、规模较小, 因此在一定程度上可能影响研究的结果和精确性。因此, 仍然需要更大规模的临床研究进一步验证。MMP-13、IL-18 在 KOA 关节液、滑膜中均高表达; 两者呈现出显著正相关, 共同在 KOA 的发病及病情进展中起作用。

参考文献

[1] Kneer W, Rother M, Mazgareanu S, et al. A 12-week randomized study of topical therapy with three dosages of ketoprofen in Transfersome[®] gel (IDEA-033) compared with the ketoprofen-free vehicle (TDT 064), in patients with osteoarthritis of the knee [J]. *J Pain Res*, 2013, 6: 743-753.

[2] Fischer J, Geurts J, Valderrabano V, et al. Educational quality of YouTube videos on knee arthrocentesis [J]. *J Clin Rheumatol*, 2013, 19(7): 373-376.

[3] 尹薇, 丁艳, 刘凡, 等. 幼年特发性关节炎患儿基质金属蛋

白酶及细胞因子的改变及意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2013, 17(9): 601-605.

[4] Bozic KJ, Belkora J, Chan V, et al. Shared decision making in patients with osteoarthritis of the hip and knee: results of a randomized controlled trial [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95(18): 1633-1639.

[5] 董馨, 郑毅, 刘洪彦, 等. 骨关节炎患者血清与膝关节滑液中骨桥蛋白和凝血酶切割的骨桥蛋白水平及其意义[J]. *中华内科杂志*, 2013, 52(12): 1023-1027.

[6] Hauser RA, Orlofsky A. Regenerative injection therapy with whole bone marrow aspirate for degenerative joint disease: a case series [J]. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*, 2013, 6: 65-72.

[7] 高万里, 吴立生, 訾金花, 等. 女性膝骨性关节炎与雌二醇及其代谢产物的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(3): 662-665.

[8] Blumenfeld TJ. CORR Insights[®]: Is TKA using patient-specific instruments comparable to conventional TKA? A randomized controlled study of one system [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2013, 471(12): 3996-3997.

[9] 贺占坤, 沈杰威. MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 评价膝关节骨性关节炎的临床研究[J]. *重庆医学*, 2013, 42(32): 3872-3874.

[10] Ravi B, Croxford R, Austin PC, et al. The relation between total joint arthroplasty and risk for serious cardiovascular events in patients with moderate-severe osteoarthritis: propensity score matched landmark analysis [J]. *BMJ*, 2013, 347: f6187.

[11] 王书雅, 梅轶芳, 郑一宁, 等. 间质细胞衍生因子-1 在骨关节炎中的作用[J]. *中华内科杂志*, 2014, 53(4): 327-329.

[12] Jokar M, Mirfeizi Z, Keyvanpajouh K. The effect of hydroxychloroquine on symptoms of knee osteoarthritis: a double-blind randomized controlled clinical trial [J]. *Iran J Med Sci*, 2013, 38(3): 221-226.

[13] Gokeler A, Benjaminse A, van Eck CF, et al. Return of normal gait as an outcome measurement in acl reconstructed patients. A systematic review [J]. *Int J Sports Phys Ther*, 2013, 8(4): 441-451.

[14] Brand E, Nyland J, Henzman C, et al. Arthritis self-efficacy scale scores in knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis comparing arthritis self-management education with or without exercise [J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2013, 43(12): 895-910.

[15] Suantawee T, Tantavisut S, Adisakwattana S, et al. Oxidative stress, vitamin e, and antioxidant capacity in knee osteoarthritis [J]. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7(9): 1855-1859.

[16] Hamamura K, Zhang P, Zhao L, et al. Knee loading reduces MMP13 activity in the mouse cartilage [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2013, 14: 312.

[17] Weiner DK, Moore CG, Morone NE, et al. Efficacy of periosteal stimulation for chronic pain associated with advanced knee osteoarthritis: a randomized, controlled clinical trial [J]. *Clin Ther*, 2013, 35(11): 1703-1720.

[18] Davis EM, Lynd LD, Grubisic M, et al. Responsiveness of health state utility values in knee osteoarthritis [J]. *J Rheumatol*, 2013, 40(12): 2075-2082.

(收稿日期: 2014-12-11)