

激素性股骨头坏死中MMP2作用的研究

纪志华¹, 贾丙申¹, 于鹏¹, 付昆¹, 孟志斌², 云大科¹

(海南医学院第一附属医院关节创伤科¹、脊柱骨病科², 海南 海口 570102)

【摘要】 目的 观察家兔激素性股骨头坏死股骨头中基质金属蛋白酶2 (MMP2)的表达,探讨MMP2在股骨头坏死中的作用。方法 将12只家兔按随机数表法分为模型组和对照组,每组6只。模型组采用静脉注射内毒素和肌肉注射甲基强的松龙的方法造模。对照组则应用等量的生理盐水。10周后,检测股骨头的空骨陷窝率,髓腔脂肪面积和MMP2。结果 模型组的空骨陷窝率、髓腔脂肪面积和MMP2分别为(20.26±9.83)%、(236.30±34.78) μm²和67.3%,均明显高于对照组的(3.12±1.05)%、(178.80±21.82) μm²和21.1%,差异均有统计学意义(P<0.05)。结论 激素性股骨头坏死中MMP2的高表达与其发生发展密切相关。

【关键词】 激素性股骨头坏死;基质金属蛋白酶;家兔

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2017)14-2245-02

Role of MMP2 in glucocorticoid-induced necrosis of the femoral head. JI Zhi-hua¹, JIA Bing-shen¹, YU Peng¹, FU Kun¹, MENG Zhi-bin², YUN Da-ke¹. Department of Joint Injury¹, Department of Spine Bone Disease², Haikou 570102, Hainan, CHINA

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of matrix metalloproteinase2 (MMP2) in glucocorticoid-induced necrosis of the femoral head by observing the expression of MMP2 in rabbits. **Methods** A total of 12 rabbits were randomly divided into the model group and the control group. The model group was modeled by intravenous injection of endotoxin and intramuscular injection of methylprednisolone. And the control group was injected with equal volume of saline solution. After 10 weeks, the rate of empty lacuna rate in the femoral head, the area of fat in the medullary cavity and the expression of MMP2 were measured. **Results** The rate of empty lacuna rate in the femoral head, the area of fat in the medullary cavity and the expression of MMP2 were (20.26±9.83)%, (236.30±34.78) μm² and 67.3% in the model group, which were significantly higher than (3.12±1.05)%, (178.80±21.82) μm² and 21.1% in the control group (P<0.05). **Conclusion** The high expression of MMP2 is closely related to the occurrence of glucocorticoid-induced necrosis of the femoral head.

【Key words】 Glucocorticoid-induced necrosis of the femoral head; Matrix metalloproteinase (MMP); Rabbit

激素性股骨头坏死 (glucocorticoid-induced necrosis of femoral head, GNFH) 是一种常见的骨坏死疾病^[1]。基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinase, MMPs)属于金属蛋白酶家族,其在组织降解、修复等过程具有重要作用^[2]。MMP2是MMPs中重要成员,其表达程度对骨组织的降解吸收具有重要作用,可能是骨坏死吸收的关键环节。

TIMP2和MMP2的对比变化在激素性股骨头坏死中发生发展中具有重要作用。前期研究发现,TIMP2的低表达与股骨头坏死发生密切相关。MMP2作为TIMP2的拮抗剂,其在股骨头中的表达程度亦可能对激素性股骨头坏死的发生产生影响。因此,我们检测了MMP2在激素性股骨头坏死中的表达程度,进而探究激素性股骨头坏死中MMP2的作用。

1 材料与方法

1.1 试验动物 家兔12只,雌雄各半,按照随机

数表法分为模型组和对照组,每组6只。家兔均由我单位动物试验中心提供,平均体质量为(3.7±0.3) kg。

1.2 主要仪器与试剂 MMP2试剂盒(武汉博士德公司),显微镜(奥林巴斯),甲强龙注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(比利时辉瑞公司),内毒素(Sigma)。

1.3 造模方法 按照纪志华等^[3]研究的方法造模。具体为6只家兔均经耳缘静脉注射10 μg/(mL·kg)的内毒素(LPS)一次;次日,再臀部肌肉注射40 mg/kg甲基强的松龙,并同时给予臀部肌肉注射青霉素钠40万U,预防感染。连续用药3 d。对照组则注射等剂量的生理盐水。

1.4 指标测定 10周后,以40 mg/kg的3%戊巴比妥过量腹腔注射法处死家兔,无菌操作状态下取出股骨头,剔除多余软组织,纵行锯开股骨头,经过固定、脱钙等HE染色程序处理后,在显微镜下观察后计算:①髓腔中脂肪面积:观察50个视野,经过图像采

基金项目:海南省自然科学基金(编号:814357)

通讯作者:贾丙申。E-mail:jbs123@163.com

集,图像分析仪定量分析测定髓腔脂肪面积。②空骨陷窝率:高倍镜下随机选择20个视野,每个视野计数50个骨陷窝及总的空骨陷窝,空骨陷窝率=空骨陷窝数/50×100%。

1.5 免疫组化检测 将股骨头组织脱钙后切片并浸入0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液,微波炉加热15 min,冷却后0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,滴加第二抗体及血清封闭液,室温20℃,滴加稀释第一抗体,4℃冰箱保存过夜,滴加SABC试剂,DAB显色,苏木素轻度复染,脱水、透明、封片,显微镜观察。

1.6 统计学方法 应用SPSS20.0软件包进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两样本均数比较采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况 模型组逐渐出现食量减少、精神差、体质量降低,无死亡。模型组HE染色可观察到骨小梁出现稀疏、断裂和空骨陷窝发生,见图1。而对照组骨小梁形态正常。显微镜下观察模型组MMP2表达明显高于对照组,见图2。

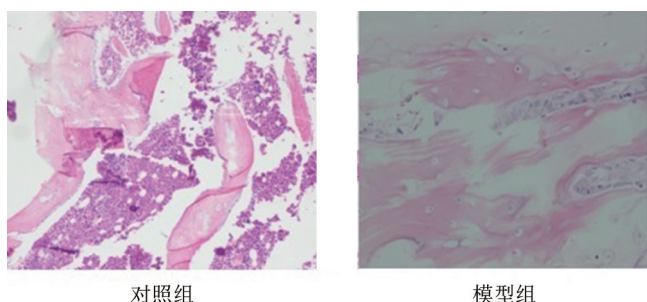


图1 HE染色($\times 100$)

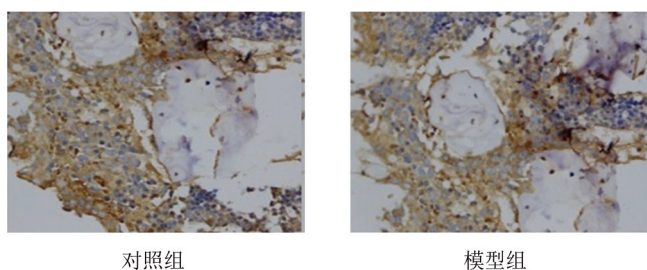


图2 MMP2表达($\times 200$)

2.2 空骨陷窝率及髓腔脂肪面积情况 对照组和模型组的空骨陷窝率分别为 $(3.12\pm 1.05)\%$ 和 $(20.26\pm 9.83)\%$;而髓腔脂肪面积分别为 $(178.80\pm 21.82)\mu\text{m}^2$ 和 $(236.30\pm 34.78)\mu\text{m}^2$,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 MMP2表达情况 经过免疫组化方法,检测两组的MMP2阳性表达并转化成百分比,模型组为67.3%,对照组为21.1%,差异有统计学意义($\chi^2=5.353$, $P=0.020<0.05$)。

3 讨论

基质金属蛋白酶家族(MMPs)是细胞外基质降解重要的一类蛋白水解酶。MMPs也是骨组织细胞外的一种蛋白水解必需酶,主要降解骨细胞外基质。MMPs基于分子结构和底物的异同分为明胶酶、胶原酶、基质溶解素等。MMP2作为基质金属蛋白酶家族中重要的一种酶,属于明胶酶范畴,可以降解各型胶原蛋白、多糖和粘连蛋白等^[3]。MMP2直接参与降解骨细胞外基质。MMP2在骨坏死细胞外基质降解过程中,具有独特而重要的作用。具体表现在当MMP2高表达时,I型胶原屏障被其降解,从而激活破骨细胞,启动破骨细胞介导的骨吸收过程^[4-5],其活性越高,骨吸收过程越强烈,从而导致骨坏死等骨病的发生。

前期研究中证实,兔激素性股骨头坏死后,股骨头内出现空骨陷窝,髓腔中脂肪细胞明显增多^[6],微观上符合激素性股骨头坏死病理学诊断标准。经过免疫组化检测,模型组的MMP2表达明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。家兔激素性股骨头坏死中MMP2出现异常的高表达,与空骨陷窝率和髓腔脂肪面积具有明显的相关性。

本研究表明激素性股骨头坏死的发生与MMP2的高表达有密切关系。MMP2可能通过降解骨基质内特定的底物,激活了破骨细胞,从而诱导了异常增多的股骨头内骨吸收发生,出现了激素性股骨头坏死。需要指出的是,本实验研究经费有限,样本量小,可能存在一定的误差,在今后的研究中需要更加深入研究。

参考文献

- [1] Zhao Z, Xue Y. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and associations with glucocorticoid-induced avascular osteonecrosis of the femoral head [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2017, 27(10): 1089.
- [2] Deng X, He G, Levine A, et al. Adenovirus-mediated expression of Timp-1 and TIMP-2 in bone inhibits osteolytic degradation by human prostate cancer [J]. Int J Cancer, 2008, 122(1): 209-218.
- [3] Sousa LH, Linhares EV, Alexandre JT. Effects of atorvastatin on periodontitis of rats subjected to glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. J Periodontol, 2016, 87(10): 1206-1216.
- [4] Bian Y, Qian W, Li H, et al. Pathogenesis of glucocorticoid-induced avascular necrosis: A microarray analysis of gene expression in vitro [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(3): 678-684.
- [5] Pan B, Farrugia AN. The nitrogen-containing bisphosphonate zoledronic acid influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE) [J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(1): 147.
- [6] 纪志华, 贾丙申, 于鹏, 等. TIMP2在激素性股骨头坏死中的作用的实验研究[J]. 海南医学, 2016, 27(18): 2925-2926.

(收稿日期:2017-04-13)