

文章编号:1004-7220(2009)03-0162-04

· 骨科生物力学 ·

前交叉韧带扭转损伤后关节腔内后交叉韧带中 基质金属蛋白酶-II 活性的研究

张瑾¹, 罗自维¹, 陈文琦¹, 钱宇娜¹, 汤振宇¹, 薛茹月¹, 王业全¹, 宋国立^{1,2}, 吕永钢¹, 杨力¹

(1. 重庆大学生物工程学院国家“111 计划”基地 & “生物流变科学与技术”教育部重点实验室, 重庆 400044;

2. Departments of Orthopaedics and Bioengineering, University of California, San Diego, CA 92093-0412, USA)

摘要: 目的 初步探索前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL) 损伤后后交叉韧带 (posterior cruciate ligament, PCL) 中基质金属蛋白酶 (MMP-2) 的表达量变化情况。方法 用已获专利的大鼠前交叉韧带瞬时扭转损伤装置将大鼠 ACL 损伤后在体外用酶谱分析的方法检测 PCL 组织中 MMP-2 的表达量。结果 ACL 损伤后的第 1, 2, 3 d 后, PCL 组织培养上清液中的 MMP-2 表达量呈时间依赖性递增趋势。结论 ACL 急性损伤后, PCL 组织释放大量的 MMP-2 至关节液中。

关键词: 扭转; 前交叉韧带; 后交叉韧带; 基质金属蛋白酶; 大鼠

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

Study about the activity of MMP-2 in intra-articular PCL after ACL injury

ZHANG Jin¹, LUO Zi-wei¹, CHEN Wen-qi¹, QIAN Yu-na¹, TANG Zhen-yu¹, XUE Ru-yue¹, WANG Ye-quan¹, SUNG KL- Paul^{1,2}, LÜ Yong-gang¹, YANG Li¹ (1. '111' Project Laboratory of Biomechanics and Tissue Repair & Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. Departments of Orthopaedics and Bioengineering, University of California, San Diego, CA 92093-0412, USA)

Abstract: Objective To detect the expression of MMP-2 of posterior cruciate ligament (PCL) tissue after anterior cruciate ligament (ACL) injury. **Method** The rat knee injury apparatus designed by our lab was used to make rat instantaneous injured ACL. Then, the expression of MMP-2 in PCL was detected in vitro with zymography. **Result** The expression of MMP-2 in PCL cultured supernatant fluid increased in a time dependent way after ACL injury. **Conclusions** PCL contributed to the accumulation of MMP-2 in the joint fluid after acute ACL injury.

Key words: Rotary; Anterior cruciate ligament (ACL); Posterior cruciate ligament (PCL); Matrix metalloproteinase (MMP); Rat

前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL)、后交叉韧带 (posterior cruciate ligament, PCL) 和内

收稿日期: 2009-05-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2005CB522703), 高等学校学科创新引智计划 (国家“111 计划”) (B06023), the OREF Award (USA), NIH AR45635 (USA) 项目。

作者简介: 张瑾 (1984-), 女, 研究方向: 生物力学与组织修复。

通讯作者: 杨力, 教授, 博士生导师。Tel: 13068312997; Fax: (023) 65111802; E-mail: liyang@cqu.edu.cn

侧副韧带 (medial collateral ligament, MCL) 是稳定膝关节的主要结构,这些韧带的损伤常导致膝关节失稳和功能丧失,甚至发生骨关节炎。韧带损伤以 MCL、ACL 和 PCL 居多。MCL 的中央实质完全断裂后,能自然愈合,有时不需手术治疗。而 ACL 与 PCL 的损伤(如撕裂甚至断裂)却难以自愈,即使手术将断端缝合,其愈合率也很低。目前临床上对于 ACL 的修复主要集中在 ACL 的重建术上,但其远期效果往往差强人意。越来越多的学者将目光集中在寻求更好的修复 ACL 方法上,对 ACL 不能进行自主修复的原因进行深入研究。已有研究发现 ACL 损伤后关节腔内基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的过量表达有可能是 ACL 不能自我修复的主要原因。我们课题组之前的研究结果也证实了 ACL 机械损伤后 ACL 自身大量表达 MMP^[1]。本文将通过模拟体内 ACL 损伤的病理生理条件,进一步考察与 ACL 组织特性相似的 PCL 是否也参与贡献关节液中 MMP 的大量累积。

1 材料和方法

1.1 大鼠 ACL 损伤模型的建立

选用 3 个月的 SD 大鼠,采用已获得国家发明专利的大鼠瞬时扭转损伤装置^[2](图 1)将大鼠固定在托盘上并固定其胫骨与股骨,并按一定角度(120°)进行瞬时扭转损伤。

1.2 组织培养

采用 EXPLANT CULTURE 的方法对 ACL 损伤后 PCL 向关节腔内释放的 MMP-2 的量进行半定量检测。

分别在大鼠 ACL 损伤后的第 1,2,3 d 提取膝关节内的后交叉韧带组织,于无菌条件下提取大鼠 PCL 组织,置于 24 孔培养板中,每孔中加入含 1% 小牛血清的 DMEM 培养液 250 μ L。以正常大鼠膝关节的 PCL 组织作为对照组。组织培养上清液分别于培养后的 12,24,36,48 h 内收集。将所收集的上清液于 4 °C 离心 10 min (14000 r/min),采用 BCA 法进行蛋白质定量。

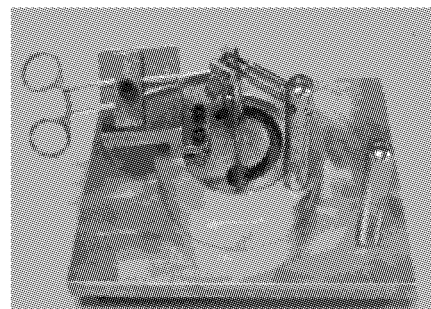
1.3 明胶酶谱分析

选取 MMP 家族中最具代表性的 MMP-2 作为研究对象。样品中的 MMP-2 蛋白质活性用含有 0.05% 的明胶的 SDS-PAGE 分析。样品的 MMP-2 活

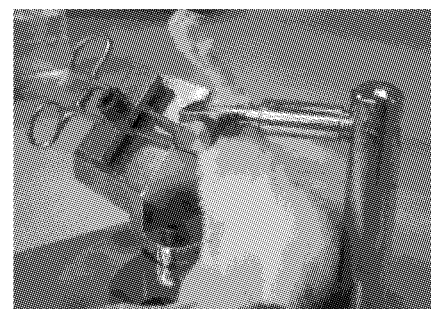
性用明胶酶谱检测,样品与上样缓冲液以 1:1 的比例混合并在含有 10% 明胶 SDS-PAGE 中分离,在 110 V 恒压条件下电泳 150 min。电泳结束后,将凝胶置于洗脱液(2.5% TritonX-100)中震荡洗脱 3 次,每次 20 min;随之用孵育液(50 mmol/L Tris-HCl, 1 μ mol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 0.02% Brij35, pH7.6)在 37 °C 的环境下孵育 14 h,接着用考马斯亮蓝 R-250 染色 1 h。最后,用脱色液(30% 甲醇, 10% 乙酸)脱色 30 min, MMPs 显示为位于蓝色背景上的透明带。

1.4 数据分析

采用 SPSS13.0 统计分析软件以及单因素方差分析进行数据分析检测各组之间是否存在差异,各组数据分析时显著水平的临界值均为 $P=0.05$ 。



(a)



(b)

图 1 大鼠瞬时扭转损伤装置

Fig.1 Rat ACL instantaneous rotary injury apparatus

2 结果

图 2 中的白色条带区域代表着 MMP-2 的活性。72kD 与 62kD 分别代表着 MMP-2 的酶原形式和活化形式。凝胶中的白色区域的密度由凝胶成像仪进行拍照并用相关软件进行分析。

在 ACL 损伤后的第 1 天, PCL 组织培养上清液中 MMP-2 的酶原形式及活性形式的表达量在 48 h 内的变化呈递增趋势, 且在 48 h 时 MMP-2 的活化形式的表达量达到最大。

在 ACL 损伤后的第 2, 3 d 时, PCL 组织培养上清液中的 MMP-2 的酶原及活化形式在四个时间点内的表达量变化与第 1 d 的变化趋势一致, 均随着时间的推移而递增, 都在第 48 h 达到峰值。

与正常对照组的 PCL 相比, ACL 损伤后的第 1, 2, 3 d, PCL 组织培养上清液中的 MMP-2 的酶原及活化形式的表达量呈递增趋势, 且在第 3 d 的增加尤为明显。

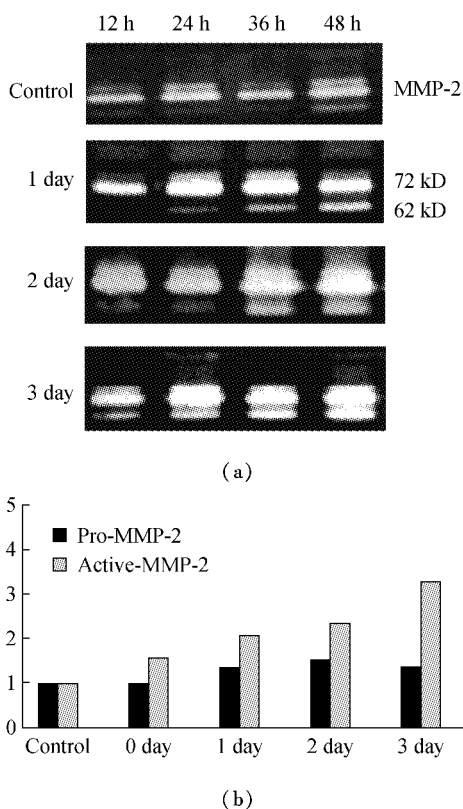


图2 ACL 损伤后 PCL 组织培养液中 MMP-2 活性表达增加 a: 明胶酶谱分析图; b: 酶谱结果统计分析图

Fig.2 MMP-2 increased in PCL cultured media after ACL injury in a time-dependent manner. a: The activity of MMP-2; b: Statistical analysis result

3 讨论

在正常生理状态和受损伤的组织中, 组织的更新重塑都是持续发生的: 旧的, 或是损伤的组织结构

降解, 新合成的分子则代替旧的与损伤的组织^[4], 从而参与到新一轮的新陈代谢中。组织降解与合成的动态平衡由 MMP 及其天然抑制剂 TIMP 共同参与调节^[5, 6]。ACL 损伤后关节液中 MMP 的表达量急剧增高, 损伤后的 ACL 组织与 MCL 组织相比, MMP-2 的表达量增高更为显著^[3], 这可能是 ACL 不可自我修复的主要原因。研究还发现 MMP 在组织降解与重新生成的动态平衡过程中的影响要大于 TIMP 的影响^[7]。

以往研究主要集中在对 ACL 本身的性质改变进行分析, 及相应的检测, 而 ACL 损伤多数属于复合损伤, 也即关节腔内多种组织的损伤, 极少研究关注 ACL 损伤后关节腔内的其他组织相应的变化。本文所建立的大鼠前交叉韧带急性损伤的模型更加真实的模拟了体内 ACL 损伤的病理生理条件, 对 ACL 损伤后大鼠提取的 PCL 培养上清液中的 MMP-2 活性进行检测, 发现随着时间的推移, MMP-2 无论从活化形式或是酶原形式都成时间依赖性的递增趋势。

由上述结果可以得出一个值得讨论的研究点, 即 ACL 损伤后关节腔内 MMP 的过量累积除了 ACL 自身之外, 与其力学性质相似的 PCL 也会向关节腔中释放过量 MMP, 这说明急性 ACL 损伤后不仅其自身的 MMP 过量释放导致 MMP 在关节液中大量累积从而致使 ACL 组织的大量降解而不能及时自我修复, 而且关节腔内的其他组织也可能受到了影响, 与 ACL 组织性质相似的 PCL 组织也发生了相应的变化, 并释放大量 MMP 至关节液中, 更进一步加剧了关节腔中 MMP 的大量累积。

ACL 组织处于相对较封闭的关节腔内环境中, 而 ACL 损伤后伴随着 MMP 的过量释放, 从而打破了组织自行降解与重新合成的动态平衡, 关节腔的内环境也发生相应的改变, 这种变化仍然影响关节腔内的其他组织也发生相应的变化, 从而可能被刺激产生释放更多的 MMP 至关节腔中。在 ACL 损伤后, MCL 处于关节腔之外, 未受到关节腔内环境的影响, 这有可能是 MCL 可以自愈而 ACL 不能自我修复的主要原因之一。本研究为进一步从 ACL 损伤后整个关节腔内的所有组织着手更深入研究 ACL 损伤的机理及修复方法提供了有力的理论基础。

(下转第 168 页)