

血清 MMP-3、TIMP-1 与单核细胞 CD147 在湿热痹阻及寒湿痹阻型类风湿关节炎中的意义

王志中^{1,2} 王 勇¹ 李军梅³ 牟方详¹ 吴 红¹

摘要 **目的** 探讨血清基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)与单核细胞 CD147 分子在湿热痹阻及寒湿痹阻型类风湿关节炎(RA)中的意义。**方法** 收集 22 例住院和门诊 RA 患者的临床数据及外周血,进行 28 个关节疾病活动度评分[DAS 28(4)],双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 MMP-3 及 TIMP-1 水平,流式细胞术检测单核细胞表面 CD147 的平均荧光强度及表达的百分率,分析各指标在湿热痹阻型与寒湿痹阻型 RA 间的差异。**结果** 湿热痹阻型 RA 血清 MMP-3 水平、单核细胞表面 CD147 平均荧光强度显著高于寒湿痹阻型 RA 组与正常对照组($P < 0.05$)。湿热痹阻型 RA 血清 TIMP-1 水平明显高于正常对照组($P < 0.05$),而两中医证型组间差异无统计学意义。湿热痹阻型 RA 患者单核细胞 CD147 的表达率显著低于寒湿痹阻型 RA 组与正常对照组($P < 0.05$)。**结论** 湿热痹阻型 RA 血清高水平的 MMP-3 可能会导致关节软骨及骨质的破坏,其单核细胞 CD147 平均荧光强度的增高与表达率的下降可能是 RA 疾病活动度增高,单核细胞迁移入滑膜组织的结果。

关键词 类风湿关节炎;湿热痹阻型;寒湿痹阻型;基质金属蛋白酶-3;金属蛋白酶抑制剂-1;单核细胞

Significance of Serum MMP-3, TIMP-1, and Monocyte CD147 in Rheumatoid Arthritis Patients of Damp-heat Bi-syndrome and of Cold-damp Bi-syndrome WANG Zhi-zhong^{1,2}, WANG Yong¹, LI Jun-mei³, MOU Fang-xiang¹, and WU Hong¹ 1 Department of Integrative Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing (400038), China; 2 Department of CM Rehabilitation, The 474 Hospital of the PLA, Urumqi (830013), China; 3 Division 5, Internal Medicine Department, The 474 Hospital of the PLA, Urumqi (830013), China

ABSTRACT **Objective** To explore the clinical significance of serum matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and monocyte CD147 in rheumatoid arthritis (RA) patients of damp-heat Bi-syndrome (DHBS) and of cold-damp Bi-syndrome (CDBS). **Methods** The clinical data of 22 patients from inpatients and outpatients with RA were collected, and their peripheral blood was withdrawal. The disease activity scores [DAS28(4)] were assessed. The serum levels of MMP-3 and TIMP-1 were detected by double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mean fluorescence intensity (MFI) and the expression percentage of CD147 on CD₁₄⁺ monocytes were detected by flow cytometry. The difference of each index between RA patients of DHBS and RA patients of CDBS was analyzed. **Results** The level of serum MMP-3 and the MFI of CD147 on the monocyte surface were obviously higher in RA patients of DHBS than in those of CDBS and the normal control group ($P < 0.05$). The concentration of serum TIMP-1 was obviously higher in RA patients of DHBS than in those of the normal control group ($P < 0.05$), while there was no statistical difference between the two syndrome types. The percentage of CD147 expression was obviously lower in DHBS than in those of CDBS and the normal control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Increased serum MMP-3 level of RA patients of DHBS might result in destroy of joint cartilages and sclerotin. The significant increase of MFI and decreased expression percentage of monocyte CD147 might be the results of increased disease activity of RA and monocyte migration to the synovial membrane tissue.

KEYWORDS rheumatoid arthritis; damp-heat Bi-syndrome; cold-damp Bi-syndrome; matrix metalloproteinase-3; tissue inhibitor of metalloproteinase-1; monocyte

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30973827);重庆市卫生局中医药科研项目(No. 2008-1-15)

作者单位:1.中国人民解放军第三军医大学西南医院中西医结合科(重庆 400038);2.中国人民解放军 474 医院中医康复科(乌鲁木齐 830013);3.中国人民解放军 474 医院内五科(乌鲁木齐 830013)

通讯作者:王 勇, Tel: 023-68765206, E-mail: wangyongjhy@tom.com

类风湿关节炎(RA)是一种慢性自身免疫性疾病,主要病理改变为关节滑膜炎,滑膜衬里层增生,血管翳形成,关节软骨和骨破坏,最终导致关节结构改变,功能丧失^[1]。RA 属中医学“痹证”范畴,与古籍中“历节病”、“风湿”、“鹤膝风”等病的描述相似。对于 RA 的中医证型客观化研究,目前国内学者已作了一些初步探讨,取得了一些可喜的结果,但缺乏系统化的深入研究^[2,3]。

本研究拟将 RA 中的常见证型湿热痹阻证与寒湿痹阻证进行归类分析,通过对 RA 患者血清基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)及单核细胞膜分子 CD147 平均荧光强度与表达率的检测,比较上述指标在湿热痹阻型及寒湿痹阻型 RA 间的差异,探索其在 RA 两中医证型中的意义。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 RA 诊断标准

参照 2010 年美国风湿病学会联合欧洲抗风湿病联盟制定的 RA 分类标准^[4]。

1.2 中医辨证分型标准

参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[5],属寒湿痹阻型及湿热痹阻型。

2 纳入标准

(1)符合 RA 诊断及中医分型标准;(2)采血留样前 24 h 内未使用过糖皮质激素等免疫抑制剂和细胞毒药物;(3)签署知情同意书。

3 排除标准

重叠其他风湿类疾病如系统性红斑狼疮、干燥综合征、严重的膝骨关节炎等,或合并心、脑、肝、肾和造血系统等严重疾病者,或妊娠、哺乳期妇女、精神病患者等。

4 一般资料

收集 2009 年 11 月—2010 年 11 月第三军医大学西南医院中西医结合科住院和门诊 RA 患者 22 例,其中男性 4 例,女性 18 例,年龄 37~72 岁,平均(51.00±9.68)岁,DAS 28(4)评分为 2.72~8.07 分,平均(5.80±2.12)分。其中湿热痹阻型 11 例,男性 1 例,女性 10 例;平均年龄(50.60±7.20)岁,DAS 28(4)评分为 2.74~9.02 分,平均(5.75±1.42)分;寒湿痹阻型 11 例,男性 3 例,女性 8 例;年龄(51.33±11.66)岁,DAS 28(4)评分为 2.62~6.06 分,平均(3.18±1.82)分;收集同期第三军医大学西南医院健康志愿者 10 名为正常对照组,其中男性 5 名,女性 5 名;年龄 23~35 岁,平均(27.70±4.00)岁。

5 研究方法

清晨空腹收集健康志愿者及 RA 患者外周静脉血 2~3 mL,采血 1 h 内离心(2 000 r/min,5 min),分离血清 400 μL,分装后置于-70℃低温冰箱保存;采血 8 h 内完成细胞流式标本处理及检测。

6 观察指标及检测方法

6.1 DAS 28(4)评分

计算公式 $DAS\ 28(4) = 0.56 \times \sqrt{T28} + 0.28 \times \sqrt{SW28} + 0.7 \times \ln(ESR) + 0.014 \times GH$ (其中 $\sqrt{}$ 是开平方; $\ln$ 是自然对数;T28:28 个关节触痛个数;SW28:28 个关节肿胀个数;GH:患者对疾病总体状况的自我评分)^[6]。DAS 28(4) > 5.1 时属高活动度,DAS 28(4)在 2.6~5.1 是属中、低活动度。

6.2 MMP-3 及 TIMP-1 检测

应用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)同批检测血清 MMP-3 及 TIMP-1 水平(试剂盒购自 RayBiotech 公司,批号:171051;191051)。

6.3 单核细胞表面 CD147 平均荧光强度与表达率的测定

采用双标法(CD147,CD14),用常规流式细胞术测定 CD147。每管全血 100 μL,加入 FITC 标记的单克隆抗体 CD147(美国 Biolegend 公司)及 PE 标记的抗体 CD14(美国 Biolegend 公司)各 10 μL,设空白对照管及单标对照管,4℃避光孵育 30 min。加入 2 mL 红细胞裂解液(美国 Biolegend 公司),震荡混匀后室温避光孵育 15 min。用磷酸盐缓冲液(PBS)洗两次,最后加 400 μL PBS,FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测,用 Cell Quest 软件分析。

7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 或中位数表示。3 组样本资料正态分布采用单因素方差分析,偏态分布采用非参数 Kruskal-Wallis H 法检验各组总体分布差异,各组多重比较采用非参数单变量(Univariate)分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两证型 RA 患者与正常对照组血清 MMP-3 及 TIMP-1 比较(表 1)

湿热痹阻型 RA 患者血清 MMP-3 水平明显高于寒湿痹阻与正常对照组($P < 0.05$),而寒湿痹阻与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。湿热痹阻与寒湿痹阻型 RA 患者血清 TIMP-1 水平显著高于正常对照组($P < 0.05, P < 0.01$),而两中医证型组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 两证型 RA 患者与正常对照组血清 MMP-3 及 TIMP-1 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MMP-3 (ng/mL)	TIMP-1 (pg/mL)
正常对照	10	52.57±40.04	76 255.30±22 787.28
湿热痹阻型 RA	11	204.13±136.04 [*]	150 075.50±59 807.59 ^{**}
寒湿痹阻型 RA	11	73.68±66.20 [△]	125 202.58±55 932.78 [*]

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与湿热痹阻型 RA 组比较,[△] $P < 0.05$ 。

表 2 两证型患者与正常对照组单核细胞 CD147 平均荧光强度及表达率比较

组别	例数	CD147 平均荧光强度		CD147 表达的百分率	
		平均秩次($\bar{x} \pm s$)	中位数	平均秩次($\bar{x} \pm s$)	中位数
正常对照	10	14.35 $\pm$ 6.00	230.32(179.23,259.82)	20.45 $\pm$ 5.96	4.89(3.62,5.50)
湿热痹阻型 RA	11	23.05 $\pm$ 7.75 *	312.37(265.32,361.78)	9.15 $\pm$ 6.63 **	3.27(2.49,3.71)
寒湿痹阻型 RA	11	12.83 $\pm$ 10.56 $\Delta\Delta$	196.39(153.92,266.33)	19.33 $\pm$ 10.53 $\Delta\Delta$	4.57(3.44,8.58)
F 值			7.235		9.008
P 值			0.027		0.011

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与湿热痹阻型 RA 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2 两证型 RA 患者与正常对照组单核细胞 CD147 平均荧光强度及表达率比较(表 2) 湿热痹阻型 RA 血单核细胞 CD147 平均荧光强度的中位数及平均秩次均显著高于寒湿痹阻型 RA 与正常对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 CD147 表达的百分率却低于寒湿痹阻型 RA 与正常对照组($P < 0.01$)。寒湿痹阻型 RA 与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

RA 属中医学“痹证”范畴,其中医证型的客观化是目前研究的热点之一。笔者前期对 RA 急性炎症、相关免疫指标在中医证型中的意义和作用已作了较为深入的探讨^[7]。由于 RA 为一慢性进行性骨侵蚀疾病,在病变关节部位增高的炎性细胞因子和 MMPs,可降解关节骨及软骨中的胶原蛋白多糖及其他基质大分子^[8]。故探讨骨质破坏的相关因子具有重要意义。

MMP-3 是迄今已发现的 20 余种基质金属蛋白酶之一,能够降解多种细胞外基质组分。研究发现,RA 患者血清中 MMP-3 水平与关节损害密切相关,是系统性的炎症标志物,可作为 RA 患者滑膜损害和预后的参数^[9]。在 RA 滑液中,MMP-3 被认为是引起细胞外基质降解及最终导致软骨、韧带及骨破坏的最重要的蛋白酶,在 RA 软骨和骨的破坏中起重要作用。TIMP-1 由巨噬细胞和结缔组织细胞产生,广泛存在于组织和体液中,可特异性地以 1:1 的分子比例与活化的 MMP-3 结合形成复合物,从而抑制 MMP-3 的活性及血管增殖^[10]。前期研究表明 RA 两中医证型在疾病活动度上有显著差异,湿热痹阻型 RA 多为高疾病活动度,而寒湿痹阻型多见于中低活动度^[11]。我们的研究结果显示,湿热痹阻型 RA 患者血清 MMP-3 浓度明显高于寒湿痹阻型与正常对照组,说明在湿热痹阻型 RA 呈高疾病活动度,机体内各种炎症因子表达上调,对关节软骨及骨质的侵蚀增强。研究已证明 MMP-3 是骨破坏重要指标之一,其血清与关节积液浓度的升高与滑膜炎症、软骨及骨破坏密切相关^[9]。因此,我们推测湿热痹阻型 RA 血清高浓度 MMP-3 可能更易造成关节软骨

及骨的破坏。TIMP-1 是 MMP-3 的抑制物,研究结果显示湿热痹阻与寒湿痹阻型 RA 外周血 TIMP-1 浓度显著高于正常对照组,表明 RA 疾病活动时,由于机体 MMP-3 的分泌增加,软骨与骨的破坏增强,可反馈性引起机体保护性作用增强,继而引起 TIMP-1 分泌增加以抑制 MMP-3 的破坏作用。

CD14 是一个分子量为 53 ~ 55 KD,结合了脂多糖受体的糖基磷脂酰肌醇,其高水平表达于单核细胞与巨噬细胞,较低水平存在于粒细胞表面,属细胞表面糖蛋白家族成员之一,在流式细胞分析中常被作为外周血单核细胞的标记物^[12]。因此,我们用 CD14 作为外周血单核细胞的特异性分类标记。

CD147 分子是细胞表面黏附分子,又称细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer,EMMPRIN),是由 269 个氨基酸组成的,相对分子质量为 50 000 ~ 60 000 的单链跨膜糖蛋白,属免疫球蛋白超家族成员,其功能主要参与细胞与细胞、细胞与基质的黏附^[13]。研究证实 RA 滑膜高表达 EMMPRIN/CD147 分子,其表达的主要细胞是成纤维样滑膜细胞与粒细胞,可在局部诱导产生大量 MMP-1、2、3 等蛋白水解酶,提示与 RA 的软骨和骨的侵蚀密切相关^[14]。我们采用细胞流式法检测 RA 两中医证型患者与正常对照组外周血单核细胞膜 CD147 荧光表达。研究结果显示,湿热痹阻型 RA 的 CD147 平均荧光强度显著高于寒湿痹阻型 RA 与正常对照组,而湿热痹阻型 RA 外周血表达 CD147 单核细胞的百分率明显低于寒湿痹阻型 RA 与正常对照组,提示在湿热痹阻型 RA 在疾病呈高活动度时,存在大量单核细胞活化,膜表面 CD147 分子表达增加。由于 RA 的病理效应组织是关节滑膜,外周血单核-巨噬细胞迁移入滑膜组织是 RA 滑膜炎演变的过程,单核细胞的活化及膜表面 CD147 分子表达增加有利于单核细胞的黏附迁移,因此,我们推断外周血单核细胞膜 CD147 蛋白表达增加与表达 CD147 的单核细胞百分率的下降可能是 RA 炎症高活动及单核细胞迁移入滑膜组织的结果。

参 考 文 献

- [1] Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction [J]. Clin Immunol, 2005, 115(2): 118 - 128.
- [2] 肖敬, 谢丽萍, 史伟. 类风湿关节炎的中医证候学研究进展[J]. 中国中医急症, 2007, 16(4): 476 - 477.
- [3] 姜泉, 蒋红, 曹炜, 等. 475 例类风湿关节炎患者中医临床证候分析[J]. 中医杂志, 2007, 48(3): 253 - 255.
- [4] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative Initiative [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(9): 2569 - 2581.
- [5] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 115 - 117.
- [6] Prevoo ML, van' Hof MA, Kuper HH, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(1): 44 - 48.
- [7] 王志中, 方勇飞, 罗彦, 等. 322 例湿热痹阻及寒湿痹阻型类风湿关节炎中医证候的客观化研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(4): 466 - 470.
- [8] 周筠, 朱平, 蒋建利, 等. CD147 在单核-巨噬细胞促进成纤维细胞分泌活化基质金属蛋白酶中的作用及意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2005, 9(5): 269 - 272.
- [9] Murphy G, Knauper V, Atkinson S, et al. Matrix metalloproteinases in arthritic disease [J]. Arthritis Res, 2002, 4(Suppl 3): S39-S49.
- [10] Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2000, 59(6): 455 - 461.
- [11] 王志中, 王勇, 张疆瑾, 等. 血清抗环瓜氨酸肽抗体等对湿热痹阻及寒湿痹阻型类风湿关节炎的诊断意义 [J]. 中医杂志, 2011, 52(20): 1741 - 1744.
- [12] Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein [J]. Science, 1990, 249(4975): 1431 - 1433.
- [13] Schmidt R, Bultmann A, Fischel S, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes [J]. Circ Res, 2008, 102(3): 302 - 309.
- [14] Tomita T, Nakase T, Kaneko M, et al. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(2): 373 - 378.

(收稿: 2012-04-18 修回: 2012-08-10)

第十七次全国中西医结合儿科学术会议征文通知

中国中西医结合学会儿科专业委员会拟于 2013 年 9 月 4 - 6 日在杭州萧山召开第十七次全国中西医结合儿科学术会议, 届时将邀请知名专家进行中西医结合专题报告和学术交流, 现征文如下。

征文内容 (1) 中西医结合、中医、西医防治儿童呼吸系统疾病的临床论著、实验研究和专题综述; (2) 中西医结合、中医、西医防治儿童常见病的临床、实验研究; (3) 临床疑难、重症、少见病例报道; (4) 中西医结合理论及方法研究等; (5) 对儿科中西医结合工作的建议等。

征文要求 (1) 尚未公开发表的论文; (2) 稿件应有全文及 400 ~ 800 字摘要; (3) 稿件一律采用 Microsoft Word 文档格式; (4) 稿件请注明作者单位、详细通信地址、邮政编码、电话及 E-mail 等信息; (5) 稿件及参会者信息请发至电子邮箱: dingxiangnr@yahoo.com.cn; (6) 截稿日期: 2013 年 8 月 10 日。

联系人 吴慧芬, 电话: 18072737877, 13867135533; 杨惠静, 电话: 010 - 63138554, 13621146657。