

- and antibody binding sites[J]. *Biology direct*, 2009, 20(4):18
- 6 Van Der Vries E, Jonges M, Herfst S, *et al.* Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2009 Oct 24 [Epub ahead of print]
- 7 Jain R, Goldman RD. Novel influenza A (H1N1): clinical presentation, diagnosis, and management[J]. *Pediatric Emergency Care*. 2009, 25(11):791-796
- 8 Turbelin C, Pelat C, Boëlle PY. Early estimates of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus activity in general practice in France: incidence of influenza-like illness and age distribution of reported cases[J]. *Eurosurveillance*, 2009, 14(39) pii:19341
- 9 沃恩康, 吴海波, 王怡婷, 等 H1N1 流感病毒基因组序列分析及其特性研究[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2009, 36(3):149-153
- (收稿:2009-12-30)
(修回:2009-12-31)

基质金属蛋白酶与绝经后骨质疏松症

谢金珍 卜淑敏

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是指绝经引起的全身性骨疾病, PMOP在临床上主要表现为腰腿疼和病理性骨折, 其发生与骨量丢失有关。据统计结果表明, 大约1/3的绝经后妇女患骨质疏松症, 严重影响老年人的生活质量, 已成为重要的公共健康问题。因此, 世界卫生组织将21世纪的前10年确定为“骨质疏松与骨关节病年”^[1]。骨胶原的代谢与骨的代谢密切相关, 骨胶原的过度降解或合成的减少皆可以引起骨弹性或韧性降低, 骨盐丢失依附, 溶解增多及易导致骨质疏松症(osteoporosis, OP)^[2]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类锌依赖的降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的胞外蛋白水解酶, 近年来的研究发现, MMP通过降解骨基质而参与PMOP的发生^[3]。本文在查阅国内外文献的基础上综述了MMP在PMOP发病机制中作用的最新研究进展。

一、MMPs

1. MMPs概述: MMPs是一组结构相似、依赖 Zn^{2+} 水解ECM的蛋白水解酶类, 在多种降解ECM的蛋白水解酶家族中, MMPs被认为是最重要的一类, 该家族中的一些酶是迄今为止已发现的唯一能分解纤维类胶原的酶类^[1,2]。现已发现的MMPs有20余种, 按作用底物不同分5大类^[3]: ①胶原酶(MMP-1, 8, 13), 主要降解I型、II型和III型胶原; ②明胶酶(MMP-2, 9), 主要降解IV型胶原以及大量的变性

胶原蛋白; ③基质水解酶(MMP-3, MMP-10, 11), 显示广谱的底物特异性, 主要剪切基质蛋白, 如纤粘连蛋白和层粘连蛋白; ④膜型金属蛋白酶(MMP-14, 15, 16, 17); ⑤其他金属蛋白酶。MMPs的生物活性受基因转录、酶原活化和酶抑制剂等多因素调控, 其中基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMP)是MMP的特异性生理抑制剂, 目前发现的TIMPs分4型, 包括TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, 它以1:1的比例与活化的MMPs结合形成稳定的复合体后扰乱MMPs的激活或直接抑制MMPs酶原活性^[2]。

2. MMPs的生物学功能: MMPs的主要功能: ①降解ECM; ②激活生长因子、化学增殖素和其他MMPs, 形成级联效应, 在维持正常组织自身稳定方面发挥重要作用^[2]。

二、PMOP

1. PMOP概述: PMOP是指发生于绝经后妇女的以低骨量及骨组织微结构退行性病变为特征的一种全身性骨骼疾病。PMOP患者的发病年龄主要在50~70岁之间, 表现为骨量迅速丢失, 易发生骨折, 骨折多发生在以骨松质为主的椎体、股骨上端及桡骨远端。PMOP属于原发性骨质疏松症的一种, 表现为高转换型骨质疏松, 即骨吸收与骨形成均活跃, 但以骨吸收为主^[3]。

2. PMOP的发病机制: PMOP的发生主要是由于卵巢功能衰退导致雌激素(estradiol, E_2)水平下降, 继发甲状旁腺功能亢进使降钙素分泌不足, 从而导致骨吸收量大于骨形成量, 出现低骨量和骨组织微结构退行性病变。此外, PMOP的发病还与遗传因

基金项目: 国家自然科学基金(30771046)、北京市教委科技发展规划项目(KM200710029001)

作者单位: 100088 北京, 首都体育学院

素、内分泌、营养状况、体格锻炼等多种因素有关^[3]。

三、MMPs 与 PMOP

骨是一种特殊的结缔组织,由多种细胞和 ECM 组成。ECM 在骨组织中又称为骨基质,与骨组织内细胞和组织的结构完整性密切相关。正常组织中 ECM 处于不断产生和降解的动态平衡中。ECM 的降解主要依赖蛋白水解酶,而 MMP 被认为是最重要的一种。骨组织表面覆盖一层成骨细胞和未矿化的 I 型胶原屏障,阻止破骨细胞与矿化骨基质接触,当成骨细胞受到促骨吸收因子的刺激后,分泌 MMPs,降解成骨细胞下的 I 型胶原,从而激活破骨细胞,启动骨吸收^[4]。 E_2 是维持人体骨吸收和骨形成平衡的重要因素, E_2 直接或间接通过骨细胞调节正常骨代谢,作为 E_2 靶细胞的成骨细胞能分泌多种参与骨重塑的 MMPs。已经证明 E_2 缺乏诱导的骨丢失和成骨细胞多种 MMPs 不正常表达有关,主要包括 MMP - 1, 2, 9, 13 和 14^[4~9]。下面分别综述他们在 PMOP 发生中的作用。

1. 明胶酶与 PMOP:明胶酶是唯一能够降解 ECM 和基膜(basement membrane, BM)中 IV 型胶原三螺旋结构的酶,包括明胶酶 A (MMP - 2) 和明胶酶 B (MMP - 9)。(1)MMP - 2 与 PMOP:MMP - 2 是明胶酶的重要亚家族,是一种非糖化的明胶酶,相对分子质量为 72kDa,主要作用底物包括 I、II、III 型明胶、IV、V、VII、X 型胶原、层粘连蛋白、弹性蛋白及纤维连接蛋白。MMP - 2 主要在成骨细胞及部分破骨细胞的细胞质中表达,在正常和病理性(破骨细胞性)骨吸收中发挥重要作用^[5]。成骨细胞表达的 MMP - 2 可更新骨基质,促进成骨细胞移行,增强成骨细胞存活,促进骨形成。已知成骨细胞 MMP - 2 表达可被骨吸收抑制剂 - 二磷酸盐等抑制。成骨细胞分泌的 MMP - 2 水平可反映骨代谢过程,因为随着骨转换的增快,成骨细胞分泌的 MMP - 2 以及释放入血液循环中的 MMP - 2 水平也会增加。Bachmeier 等人的研究认为,MMP - 2 在骨重建过程中通过降解成骨细胞下的 I 型胶原屏障,激活破骨细胞,启动骨吸收,同时推动成骨细胞移行成活,促进骨形成^[6]。研究表明,MMP - 2 可能与绝经后妇女骨密度和骨代谢指标相关^[7]。Luo 等人报道,在绝经后中国妇女中,MMP - 2 与骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BAP),骨钙素(osteocalcin, OC), I 型胶原氮端肽(NTX), Ca^{2+} 等骨转换指标有相关性^[8]。沈霖等人的研究发现,血清 MMP - 2 与骨密度(bone mineral

density, BMD)、骨保护蛋白(osteoprotegerin, OPG)、骨保护蛋白配体(OPGL)和 OPG/OPGL 比值等指标也存在相关性^[10]。此外,Zhang 等人的研究认为, 17β - 雌二醇(17β - estradiol, E_2) 和黄体酮(progesterone, P)可以通过抑制成骨细胞内 MMP - 2 的活性促进骨形成,减慢骨基质降解的进程和骨重吸收^[9]。(2)MMP - 9 与 PMOP:MMP - 9 是 1994 年由 Reponen 和 Sahlberg 首先在小鼠胚胎发育的破骨细胞内发现的,依据其发现的顺序被命名为 MMP - 9,根据其作用底物又被命名为明胶酶 B。MMP - 9 的相对分子质量为 92kDa,活化后为 84kDa,是已发现的 MMPs 中相对分子质量最大的酶。MMP - 9 在破骨细胞中高表达,在破骨性骨吸收中发挥着重要作用。秦健等通过比较绝经后骨质疏松骨折组、骨质疏松组、低骨量组与正常对照组血清 MMP - 9 后发现,绝经后妇女血清 MMP - 9 水平随骨密度降低呈现升高趋势,尤其是骨质疏松骨折组 MMP - 9 水平明显升高,说明 MMP - 9 与 PMOP 有关联^[11]。提示,PMOP 的形成可能与 MMP - 9 活性升高使 ECM 被迅速降解有关。后来,Hill 等发现,MMP - 9 与 TIMP - 1 比例失调可能为 PMOP 发生的重要原因之一^[12]。MMP - 9/TIMP - 1 比值在正常对照组、骨量降低组及骨质疏松组依次升高。推测这是因为破骨细胞分泌的 MMP - 9 增多,而成骨细胞分泌的 TIMP - 1 没有相应增加,致使 MMP - 9 与 TIMP - 1 的比率失调。推测女性在绝经后,由于内源性 E_2 分泌减少,骨吸收与骨形成之间的偶联出现破坏,破骨细胞活性增强,与此同时成骨细胞活性相对减弱,骨形成速度减慢,出现不可逆的骨丢失,从而造成 OP。

2. 胶原酶与 PMOP:胶原酶是 MMPs 中第 1 个被发现的酶系,目前所发现的 3 种胶原酶都在骨组织中表达,它们以胶原酶原的形式分布在各自所特异性降解的胶原周围,在受到刺激时表达上调,激活并降解这些胶原。MMP - 1 又称为间质胶原酶,分布广泛,主要是由成纤维细胞分泌。可以直接降解 I、II 和 III 型胶原,并且对蛋白多糖有高度的裂解活性。在骨组织中,成骨样细胞分泌的 MMP - 1、MMP - 2 与 TIMP - 1 相互作用使骨基质的降解与生成处于动态平衡中。在正常情况下, MMP - 1 降解 I 型胶原等骨基质。当 MMP - 1 分解 I 型胶原后,其分解片段被 MMP - 2 进一步降解,而 TIMP - 1 则可抑制 MMP - 1、MMP - 2 的活性,抑制骨基质的降解。MMP - 8,即中性粒细胞胶原酶。其作用是在 ASn341

-PHe342 和 GLu373 - Ala374 位点降解蛋白多糖以及降解基质胶原。目前的研究表明, MMP - 8 可能与 PMOP 的发生无关。MMP - 13 又称为胶原酶 3, 最早是在肿瘤细胞中发现的, 后来证明人的成骨细胞可合成表达此酶, 胶原酶 3 是所知的酶中最有效的 II 型胶原纤维降解酶, 其降解能力是胶原酶 2 的 10 倍, 是目前 PMOP 研究中较多的 MMPs 之一。Varghese 等人采用妊娠 22 天的胎鼠颅骨原代成骨细胞, 观察了不同浓度的阿仑磷酸钠对 MMP - 3、MMP - 13 和 TIMP - 1、-2、-3 的影响^[13]。结果发现, 浓度高于 10 μmol/L 的阿仑磷酸钠明显刺激成骨细胞 MMP - 13 mRNA 和免疫反应性蛋白质的合成。因为阿仑磷酸钠是一种用于治疗 PMOP 的含氮的双磷酸盐类似物, 能通过减少破骨细胞数量和活性来抑制骨吸收, 提示 MMP - 13 与 PMOP 的发生有关。进一步, Breckon 等人利用转基因小鼠的研究认为, MMP - 13 表达的减少可能会减少破骨细胞介导的骨吸收, 导致转基因小鼠体内大量的骨形成^[14]。性类固醇激素是骨细胞功能的重要调节因素。为了研究 E₂ 缺乏导致骨丢失的机制, Breckon 等人研究了 E₂ 对成骨细胞合成 MMPs 和 TIMPs 的影响^[14]。免疫组化结果显示, 小鼠去卵巢后, 远端股骨头和腰椎体 MMP - 13 表达显著增加, 而 MMP - 3、MMP - 2 和 MMP - 9 的表达没有发生变化。反转录聚合酶链反应证明, 在培养的小鼠成骨细胞中, 当 E₂ 耗尽时, 合成 MMP - 13 的细胞显著增加, 此增加可被白细胞介素 - 1 和白细胞介素 - 6 进一步加强。Northern blot 显示, E₂ 耗尽只能轻微增加 MMP - 13 基因表达。总之, 体内外试验都证明, 缺乏 E₂ 能刺激成骨细胞合成 MMP - 13。虽然体外实验并不支持 MMP - 13 基因的显著变化, 但证据表明, MMP - 13 在骨质疏松症骨丢失的早期阶段应该发挥一定的作用。Li 等人采用去卵巢骨质疏松大鼠模型, 观察了 17β-estradiol (E₂) 处理对骨组织形态学参数的影响^[15]。免疫组化和原位杂交结果表明, MMP - 13 蛋白和骨小梁分离、类骨质表面面积正相关, 而与骨小梁数目、松质骨体积/总组织体积的百分比负相关。结果提示, MMP - 13 在 E₂ 缺乏诱导的骨丢失中发挥重要的作用, E₂ 通过下调成骨细胞 MMP - 13 的表达能抑制骨吸收、减少骨反转化率。

3. 膜型基质金属蛋白酶与 PMOP: 膜型基质金属蛋白酶(membrane - type matrix metalloproteinase, MT - MMP)是 MMPs 家族的新成员, 其中 MMP - 14 是发现的第 1 个 MT - MMP, 现在也称为膜型基质金属

蛋白酶 - 1 (membrane - type 1 matrix metalloproteinase, MT1 - MMP), 主要表达于骨细胞的膜表面。近年研究显示, MT1 - MMP 与 PMOP 的发生、发展有密切关系。Liao 等人的研究表明, E₂ 能刺激成骨细胞 MT1 - MMP 的产生, 但不影响 MMP - 2 和 TIMP - 2 的合成^[16]。最近研究发现, 成骨细胞来源的 MT1 - MMP 通过降解肿瘤坏死因子 - α (TNF - α)、分解 ECM、激活酶原 MMP - 2 在骨代谢中发挥重要的作用, 这一过程需要细胞表面的 MT1 - MMP/TIMP - 2 复合体介导的激活过程。为了研究由于 E₂ 缺乏而导致的骨丢失机制, Liao 等人观察了 E₂ 对成骨细胞合成 MT1 - MMP、MMP - 2 和 TIMP - 2 的影响^[16]。原位杂交和免疫组化证明, 与去卵巢组相比, 假手术组和 E₂ 组大鼠股骨远端成骨细胞 MT1 - MMP mRNA 和蛋白质合成显著增加, 而 MMP - 2 和 TIMP - 2 mRNA 及蛋白质的合成没有变化。结果表明, E₂ 缺乏下调成骨细胞 MT1 - MMP 的合成而补充 E₂ 则诱导 MT1 - MMP 的合成。提示 MT1 - MMP 在 PMOP 骨丢失中发挥一定的作用。在大鼠前成骨细胞早期分化中, MT1 - MMP 被诱导而 MMP - 2 酶原被上调。当前成骨细胞黏附到内源性 ECM、纤粘连蛋白(fibronectin, FN)和 I 型胶原(collagen type I, CI)上 6h 后, MMPs 被诱导, 同时伴有酶原 MMP - 2 的激活。当黏附到 III 型胶原、玻连蛋白(vitronectin, VN)或牛血清清蛋白(bovine serum albumin, BSA)上时, 这些事件不发生。在诱导底物和塑料上作用的第 1h, FAK 没有变化, ERK(1,2)被激活, 但是激活对诱导 MT1 - MMP 是不充分的。被 MMPs 的底物诱导并不需要 p38 MAPK 和 PTKs 的功能。前成骨细胞在 MMP 诱导底物上种植 6h, 可发现 beta1 整合素和 MT1 - MMP 形成复合体。成骨发生中, MT1 - MMP 的诱导和表达调节碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)的表达。在分化中, 前成骨细胞形成的克隆体和过表达 MMPs 的成骨细胞同时显示高水平的 MT1 - MMP 和 AP。同样抑制 MMPs 伴随出现 AP 抑制。通过转录或抑制酶活性上调或下调 AP, 对 MT1 - MMP 和 Pro - MMP - 2 的表达没有影响。分化中 MT1 - MMP 和 AP 的持续表达以及它们的抑制都破坏矿化结节的形成和矿物质的贮存。结果提示 MT1 - MMP 的短暂表达是矿化结节形成所需, 且 MT1 - MMP 下降是结节矿化所允许。因为 AP 表达是结节形成所需, AP 水平调节矿化, 所以推测 MT1 - MMP 在分化过程中的多个环节都能调节成骨分化的稳态^[17]。

4. TIMP 与 PMOP:TIMP 是体内细胞分泌的一类蛋白酶抑制剂,已证实 TIMP - 1、- 2、- 3 在骨细胞中表达。Schiltz 等人切除成骨细胞过表达 TIMP - 1 的转基因小鼠和野生型小鼠后代的卵巢,1 个月后,检测骨密度和骨显微结构^[18]。同时用野生型和转基因小鼠的原代细胞确定 TIMP - 1 如何影响成骨和破骨细胞。结果发现,卵巢切除导致正常小鼠 BMD 下降但不引起转基因小鼠 BMD 下降,转基因小鼠破骨细胞表面积和 D - 尿吡啶啉并不增加。体外细胞培养实验证明,转基因小鼠骨髓破骨细胞的分化不受去卵巢和激素处理的影响。过表达 TIMP - 1 减少和延迟转基因小鼠成骨细胞增生和分化,减少成骨细胞表面活性 TGF - β 的产生。提示体内抑制 MMPs 能阻止 E₂ 诱导的骨丢失且显著降低骨吸收。这些效应一方面可能是由于 TIMP - 1 能直接抑制破骨吸收活性,另一方面可能与细胞外信号分子,如 TGF β 1 和 OPG/RANKL 比值局部激活的改变有关。Varghese 等人采用妊娠 22 天的胎鼠颅骨原代成骨细胞,观察了不同浓度的阿仑磷酸钠对 TIMP - 1、- 2、- 3 的影响^[13]。结果发现,浓度高于 10 μ mol/L 的阿仑磷酸钠没有改变 TIMP - 1 和 - 2 的表达,但适当刺激了 TIMP - 3 的表达。提示 TIMP - 3 在 PMOP 中可能具有潜在的作用。

随着人口老龄化,PMOP 将成为目前和将来一段时间内的主要公共健康问题之一。研究表明,MMPs 在骨生长尤其是破骨细胞骨吸收中发挥重要作用。深入研究 MMPs 及其抑制剂在 PMOP 中的作用及机制,无疑会深化人们对 PMOP 发病机制了解。

参考文献

- 1 Luo XH, Liao EY, Zhou HD, *et al.* Effects of estril on metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases of human osteoblastic cells [J]. J Chin Intern Med, 2000, 39: 243 - 246
- 2 Luo XH, Liao EY, Zhou HD, *et al.* Expression of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human osteoblastic MG263 cells and normal human osteoblasts [J]. Bull Hunan Med Univ, 2001, 26: 206 - 210
- 3 周力学. 绝经后骨质疏松症[J]. 新医学, 2007,38(9):9
- 4 罗湘杭,廖二元,周后德,等. 雌二醇对成人成骨样细胞基质金属蛋白酶及其抑制因子的作用[J]. 中华内科杂志, 2000, 39:243 - 246
- 5 王度. 绝经后妇女基质金属蛋白酶 - 2 水平及其与骨密度和骨代谢指标的关系[J]. 中国康复, 2008,23(4):8
- 6 Bachmeier BE, Iancu CM, Jochum M, *et al.* Matrix metalloproteinas-

- es in cancer: comparison of known and novel aspects of their inhibition as a therapeutic approach [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2005;5
- 7 郭丽娟,罗湘杭,伍贤平,等. 绝经后妇女血清基质金属蛋白酶 - 1、- 2 和组织金属蛋白酶抑制因子 - 1 水平及其与骨密度及骨转换生化指标的关系[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(11):734 - 737
- 8 Luo XH, Guo LJ, Shan PF, *et al.* Relationship of circulating MMP - 2, MMP - 1, and TIMP - 1 levels with bone biochemical markers and bone mineral density in postmenopausal Chinese women[J]. Osteoporos Int, 2006, 17(4): 521 - 526
- 9 Zhang P, Zhong M. Effects of 17 β - estradiol and progesterone on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in rat osteoblasts [J]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(12): 929 - 931
- 10 沈霖. 血清基质金属蛋白酶 - 2 和抑制因子与绝经后骨质疏松症的相关性[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007,13(4):4
- 11 秦健,杨乃龙. 绝经后妇女血清基质金属蛋白酶 - 9 和基质金属蛋白酶抑制因子 - 1 与骨密度的关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008,14(4):4
- 12 Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, *et al.* The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP - 1 in isolated osteoclasts [J]. J Cell Sci (S0022 - 3549), 1994, 107(11): 3055 - 3064
- 13 Varghese S, Canalis E. Alendronate stimulates collagenase 3 expression in osteoblasts by posttranscriptional mechanisms[J]. J Bone Miner Res, 2000,15(12): 2345 - 2351
- 14 Breckon J, Papaioannou S, Kon LW, *et al.* Meikle MC Stromelysin (MMP - 3) synthesis is up - regulated in estrogen - deficient mouse osteoblasts in vivo and in vitro [J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(11):1880 - 1890
- 15 Li J, Liao EY, Dai RC, *et al.* Effects of 17 β - estradiol on the expression of interstitial collagenases - 8 and - 13 (MMP - 8 and MMP - 13) and tissue inhibitor of metalloproteinase - 1 (TIMP - 1) in ovariectomized rat osteoblastic cells[J]. J Mol Histol, 2004, 35(8 - 9):723 - 731
- 16 Liao EY, Liao HJ, Guo LJ, *et al.* Membrane - type matrix metalloproteinase - 1 (MT1 - MMP) is down - regulated in estrogen - deficient rat osteoblast in vivo [J]. J Endocrinol Invest, 2004, 27(1): 1 - 5
- 17 Manduca P, Castagnino A, Lombardini D, *et al.* Role of MT1 - MMP in the osteogenic differentiation[J]. Bone, 2009, 44(2): 251 - 265
- 18 Schiltz C, Marty C, de Vernejoul MC, *et al.* Inhibition of osteoblastic metalloproteinases in mice prevents bone loss induced by oestrogen deficiency [J]. J Cell Biochem, 2008,104(5): 1803 - 1817

(收稿:2009 - 11 - 04)

(修回:2009 - 11 - 17)