

骨关节炎滑膜纤溶酶原激活物抑制因子的表达及意义

李茂强 朱六龙 边振宇 季 成 陆 凯

摘 要 **目的** 探讨两种纤溶酶原激活物抑制因子(PAI)在骨关节炎的发生发展中的意义。**方法** 采用免疫组化方法检测滑膜组织中尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA),组织型纤溶酶原激活物(tPA),PAI-1,PAI-2的表达。**结果** 骨关节炎滑膜中 PAI-1,PAI-2 的阳性表达比例高于正常滑膜($P < 0.05$),骨关节炎滑膜中 PAI-1 与 uPA、tPA 蛋白表达阳性细胞百分比呈直线正相关关系。**结论** PAI 可能与骨关节炎软骨退变表现为长期慢性过程有关。

关键词 骨关节炎 滑膜 纤溶酶原激活物抑制因子

Expression and Significance of Plasminogen Activator Inhibitor in Osteoarthritis Synovial Membrane. Li Maoqiang, Zhu Liulong, Bian Zhenyu, et al. Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To investigate the significance of plasminogen activator inhibitor (PAI) in genesis and development of osteoarthritis (OA). **Methods** Immunohistochemical analysis technique was used to detect the expression of uPA, tPA and PAI in synovial tissues in 40 OA patients and 10 normal individuals. **Results** Compared with the control group, the ratio of PAI-1, PAI-2 positive staining increased in the OA group. There was a positive correlation between PAI-1 and uPA, PAI-1 and tPA positive staining cell percent in osteoarthritis synovial membrane. **Conclusion** The PAI may play an important role in the chronic process of degradation of cartilage extracellular matrices of OA.

Key words Osteoarthritis; Synovial membrane; PAI

骨关节炎的发病机制非常复杂,往往由多种因素引起。研究表明尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)及其受体可能与骨关节炎软骨降解有关,而组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen actor, tPA)可能只参与局部纤溶平衡^[1]。纤溶酶原激活物抑制因子(plasminogen activator inhibitor, PAI)对 uPA、tPA 有明显的抑制作用,但 PAI 在骨关节炎发生发展中的作用尚不明确,我们对滑膜中的两种 PAI 进行检测,结合相关文献,探讨其在骨关节炎的发病机制中的作用。

材料与方法

1. 材料:选取 2008 年 1 月~2010 年 1 月在笔者医院行关节镜清理术的 40 例骨关节炎患者,其中男性 11 例,女性 29 例,年龄 37~74(59.6 ± 6.40)岁;所有患者均经临床及关节镜确诊,符合 Altman 诊断标准。10 例膝关节创伤后行关节镜诊治术的患者做为对照组,既往无骨关节炎病史,关节镜下无骨关节炎表现,其中男性 8 例,女性 2 例,年龄 36~64(50.7 ± 9.87)岁。两组患者均于关节镜术中用髓核钳取关节滑膜 3~5 片,每片约 2mm×3mm×1mm。

2. 试剂和仪器:①一抗兔抗人 PAI-1、PAI-2、uPA、tPA

多克隆抗体均购自武汉博士德公司,SP 免疫组化试剂盒和 DAB 显色剂购自福州迈新公司;②主要仪器:关节镜(Stryker 597T 型)、石蜡切片机(Leica2135 型)、恒温干燥箱(HG303 型)、显微镜(OlympusCX31RBSF 型)、微波炉(NNK 653S 型)。

3. 方法:所有组织标本一经取下立即用 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,5μm 连续切片,分别行 HE 染色和 PAI-1、PAI-2、uPA、tPA 蛋白 SP 法免疫组化染色。结果判断:①结合 HE 染色切片,根据苏木素复染后的细胞形态,鉴别滑膜中的不同细胞类型;②用乳腺癌作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。细胞质和(或)细胞膜上出现明显的棕色或棕黄色颗粒为阳性;③参照 Szekanecz 等^[2]方法,根据 10×40 倍高倍镜视野下滑膜组织中的阳性细胞占全部细胞(包括滑膜衬里细胞、滑膜下层单核细胞、巨噬细胞及血管内皮细胞)的比例计算百分比,阳性细胞数占总细胞数>20%为阳性,对标本取 5 个不同视野计数,取其平均值。

4. 统计学方法: χ^2 检验相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PAI-1 在关节滑膜中的表达:PAI-1 阳性表达反应定位于细胞质,呈黄色或棕黄色颗粒。40 例骨关节炎滑膜中,PAI-1 蛋白表达阳性 26 例,阳性表达率 65%;10 例对照滑膜中,PAI-1 阳性 1 例(10%)。两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),阳

性细胞主要分布在滑膜衬里细胞,亦可见于滑膜下层单核细胞和血管内皮细胞(图1A)。

2. PAI-2 在关节滑膜中的表达:PAI-2 阳性表达反应定位于细胞质,呈黄色或棕黄色颗粒。40 例骨关节炎滑膜中,PAI-2 蛋白阳性 25 例,阳性表达率 62.5%。10 例对照滑膜中,PAI-2 阳性 1 例(10%),并且着色较淡。两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),阳性细胞主要分布在滑膜衬里细胞

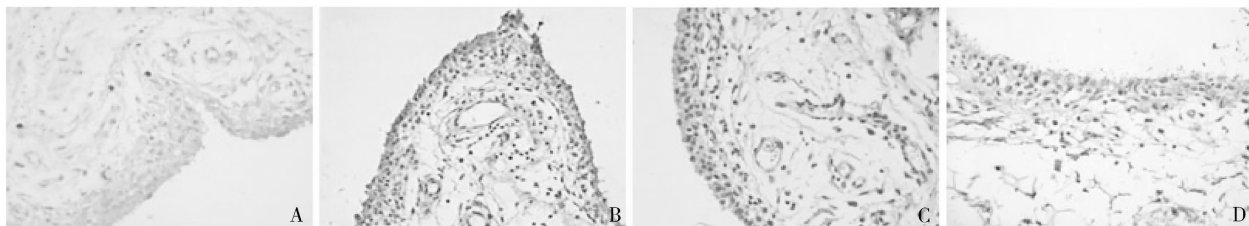


图1 骨关节炎滑膜免疫组织化学染色(SP法,×400)

A. PAI-1 阳性表达;B. PAI-2 阳性表达;C. uPA 阳性表达;D. tPA 阳性表达

5. PAI-1 与 uPA 蛋白表达:阳性细胞百分比呈直线正相关($r = 0.630, P < 0.01$); PAI-1 与 tPA 蛋白表达阳性细胞百分比呈直线正相关($r = 0.417, P < 0.01$); PAI-2 与 uPA、tPA 蛋白表达阳性细胞百分比无直线相关关系。

讨 论

丝氨酸蛋白酶通过多种方式促进细胞外基质和基膜的降解,参与纤溶、炎症、细胞迁移等多种生理病理过程,uPA、tPA 均属于丝氨酸蛋白酶。在骨关节炎中,uPA 对软骨的降解在骨关节炎的发生发展中具有重要作用,而 PAI 是 uPA、tPA 的天然抑制因子,我们通过免疫组化的方法,观察 PAI 在骨关节炎滑膜中的表达,探讨其在骨关节炎发生发展中的作用。

PAI-1 和 PAI-2 是正常血浆中纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA)的主要抑制因子,以 PAI-1 更为重要。PAI-1 是由 379 个氨基酸组成的糖蛋白,分子质量约 50kDa,能快速与 uPA、tPA 结合,抑制其活性,是人体纤溶系统的主要调节因子。关节滑膜成纤维细胞、内皮细胞、软骨细胞等均能合成 PAI-1 和 PAI-2,主要作用是维持局部 PA/PAI 系统的平衡^[3]。IL-1、IL-6、TNF- α 、粒细胞-巨噬细胞集落因子(GM-CSF)可在局部影响 PAI 产生^[4]。

研究表明,骨关节炎滑膜中 uPA 的表达与软骨降解的程度密切相关,而 PAI 作为 uPA 的抑制因子,与软骨降解之间的关系还未完全阐明^[5]。本研究观

(图1B)。

3. uPA 在关节滑膜中的表达:uPA 阳性表达反应定位于细胞质,呈黄色或棕黄色颗粒(图1C)。40 例骨关节炎滑膜中,uPA 蛋白阳性 31 例,阳性表达率 77.5%。

4. tPA 在关节滑膜中的表达:tPA 阳性表达反应定位于细胞质,呈黄色或棕黄色颗粒(图1D)。40 例骨关节炎滑膜中,tPA 蛋白阳性 37 例,阳性表达率 92.5%。

观察到骨关节炎滑膜衬里层细胞可见 PAI-1 和 PAI-2 阳性表达,滑膜下层细胞、血管内皮细胞及单核-吞噬细胞亦出现阳性表达。虽然对照滑膜也检测到其阳性表达,但强度较弱,并且阳性率与骨关节炎滑膜差异有显著统计学意义。提示 PAI 和骨性关节炎关系密切,可能在骨关节炎发生发展中具有重要作用。

通过相关性分析,PAI-1 与 uPA、tPA 蛋白表达阳性细胞百分比呈直线正相关;PAI-2 与 uPA、tPA 蛋白表达阳性细胞百分比无直线相关关系。提示 PAI,尤其是 PAI-1 在骨关节炎滑膜中维持 PA/PAI 平衡具有重要作用。PAI 的增加是与 PA 系统相互作用的结果,骨关节炎滑膜中 PA/PAI 系统失去平衡后,PA 增高,通过机体的反馈,导致 PAI 的增高,以适应局部的 PA 增高,在高水平达到新的平衡。PAI 也对 uPA 有重要调节作用,与 uPA 和 uPAR 结合成复合物,通过细胞内吞作用,使 uPA 在溶酶体中降解,uPAR 再次循环至细胞表面表达,通过此途径可调节 uPA 的分泌和 uPAR 的表达。PAI 和 PA 的相互作用,使 PA/PAI 处于一种动态平衡,致使组织降解不至于过于剧烈,骨关节炎的软骨降解表现为长期慢性的过程可能与此有关。

研究表明,PAI 具有许多独立于 PA 的功能,如对血管生成的调节等。PAI 在骨关节炎中表达的调控,亦可能有其独立的激活机制,参与骨关节炎的形成及发展。

参考文献

- 1 Matucci - cerinic M, Lombardi A, Lotti T, *et al.* Fibrinolytic activity in the synovial membrane of osteoarthritis [J]. *Br J Rheumatol*, 2005, 29 (4): 253 - 294
- 2 Szekaneca Z, Haines GK, Koch AE. Differential expression of the urokinase receptor (CD87) in arthritic and normal synovial tissues [J]. *J Clin Pathol*, 1997, 50: 314 - 319
- 3 Cevinie MM, Generini S, Partsch G, *et al.* Synovocytes from osteoarthritis and rheumatoid arthritis produce plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor - 1 and display u - PA receptors on their surface [J]. *Life Sci*, 2008, 63: 441 - 453
- 4 Mandl - Weber S, Haslinger B, Lederer SR, *et al.* Heat - killed microorganisms induce PAI - 1 expression in human peritoneal mesothelial cells: role of interleukin - 1 alpha [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37 (4): 815 - 819
- 5 李茂强, 李宽新, 史晨辉, 等. 骨关节炎滑膜的 uPA 表达与关节软骨破坏程度的相关研究 [J]. *中国内镜杂志*, 2006, 12 (24): 29 - 31

(收稿: 2011 - 06 - 24)

(修回: 2011 - 07 - 08)

吸烟对氯吡格雷抗血小板活化作用的影响

徐 鹏 王宁夫 周 亮 叶显华 童国新 冷建杭

摘 要 **目的** 验证吸烟能否使冠心病患者冠状动脉介入治疗 (PCI) 术后近期氯吡格雷抗血小板活化的作用增强。**方法** 入选择期行冠脉造影并成功行冠脉介入治疗 (PCI) 的不稳定心绞痛患者 42 例, 分为吸烟组 (22 例) 和非戒烟组 (20 例)。各组入院后均给予氯吡格雷 300mg 顿服, 术后继续每日给予氯吡格雷 75mg 口服。服药前以流式细胞仪测定各组 CD61、CD62p 的阳性表达率; 术后 24、72h 再次测定 CD61、CD62p 的阳性表达率。**结果** PCI 术后 24h 两组的 CD61、CD62p 表达较术前无显著变化 (CD61: $-1.16\% \pm 19.06\%$ vs $-0.98\% \pm 22.19\%$, $P=0.36$; CD62p: $-1.93\% \pm 10.80\%$ vs $-2.07\% \pm 15.49\%$, $P=0.96$); PCI 术后 72h 吸烟组 CD61、CD62p 表达较术前有下降趋势, 而非吸烟组无下降趋势 (CD61: $-2.19\% \pm 21.72\%$ vs $5.27\% \pm 26.58\%$, $P=0.46$; CD62p: $-6.13\% \pm 18.74\%$ vs $0.12\% \pm 12.78\%$, $P=0.25$), 但是这些差异无统计学意义。**结论** 吸烟未增强冠心病患者 PCI 术后近期氯吡格雷的抗血小板活化作用。本实验未能验证吸烟能增强冠心病患者 PCI 术后近期氯吡格雷的抗血小板活化作用这一结论。

关键词 吸烟 冠心病 活化血小板 氯吡格雷

Impact of on Clopidogrel Against Platelet Activation. Xu Peng, Wang Ningfu, Zhou Liang, Ye Xianhua, Tong Guoxin, Leng Jianhang. Hanzhou First People's Hospital and Hangzhou affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To confirm if cigarette smoke could enhance the role of clopidogrel against platelet activation in early post - PCI patients. **Methods** Totally 42 patients with unstable coronary artery disease undergoing elective coronary angiography and successful intervention (PCI), were selected, and divided into smoking group (22 cases) and non - smoking cessation group (20 cases). Each group as given 300mg clopidogrel at once after admission and followed with 75mg daily. CD61, CD62p positive rate of expression were determined by flow cytometry before the medication and re - determined after 24, 72h of PCI. **Results** The changes of CD61, CD62p expression in both groups after 24h PCI had no significant difference (CD61: $-1.16\% \pm 19.06\%$ vs $-0.98\% \pm 22.19\%$, $P=0.36$; CD62p: $-1.93\% \pm 10.80\%$ vs $-2.07\% \pm 15.49\%$, $P=0.96$). In smoking group 72h after PCI, CD61, CD62p expression was still lower than before, while the non - smoking group had no longer the performance (CD61: $-2.19\% \pm 21.72\%$ vs $5.27\% \pm 26.58\%$, $P=0.46$; CD62p: $-6.13\% \pm 18.74\%$ vs $0.12\% \pm 12.78\%$, $P=0.25$), but these differences were not statistically significant. **Conclusion** Smoking doesn't significantly increase the antiplatelet of clopidogrel in early post - PCI. This study failed to verify the conclusion that smoking could increase the antiplatelet of clopidogrel in early post - PCI.

Key words Smoking; Coronary heartdisease; Activated platelet; Clopidogrel

作者单位: 310006 南京医科大学附属杭州医院暨杭州市第一人民医院心内科 (徐鹏、王宁夫、周亮、叶显华、童国新); 检验科 (冷建杭)
通讯作者: 王宁夫, 电子信箱: wangningfu@hotmail.com

最近有研究报告, 由于吸烟具有促进氯吡格雷向活性产物转化的作用, 故吸烟可以使氯吡格雷抑制血小板聚集和活化的作用增强, 而且冠心病的预后也显著得到改善^[1]。对这些研究结果的解释和一些专家