

# 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 蛋白在骨关节炎患者中的表达及临床价值

赵丽莉<sup>1\*</sup> 高宇<sup>1</sup> 梁湏<sup>2</sup> 罗毅<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的** 探究滑膜组织半乳糖凝集素 3(Galectin-3)、骨形成蛋白-2(BMP-2)在骨关节炎(OA)患者中的表达及临床价值。**方法** 选取本院2017年6月至2019年8月收治的OA患者126例作为观察组,另选取同期因膝关节韧带损伤或半月板损伤行关节镜诊治患者124例作为对照组。采用免疫组化染色法检测两组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2,采用 Logistic 分析两者与 OA 发病的关系,对比不同病情程度患者滑膜组织 Galectin-3、BMP-2、关节液炎症标记物[白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]水平,采用 Pearson 分析滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与关节液炎症标记物相关性。**结果** 观察组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 发病显著相关,差异有统计学意义( $P<0.05$ );滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率随病情程度增加呈升高趋势;关节液 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  水平随病情程度增加呈升高趋势,差异有统计学意义( $P<0.05$ );滑膜组织 Galectin-3 与关节液 IL-6( $r=0.515$ )、IL-8( $r=0.635$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.620$ )呈正相关,滑膜组织 BMP-2 与关节液 IL-6( $r=0.602$ )、IL-8( $r=0.499$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.634$ )呈正相关,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 在 OA 患者中呈高表达,与 OA 的发病和病情显著相关,并与关节液炎症因子表达呈正相关,提示检测滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 可辅助 OA 及其严重程度诊断和预后的判断。

**[关键词]** 滑膜组织;半乳糖凝集素 3;BMP-2 蛋白;骨关节炎;炎症因子

## Expression of Galectin - 3 and BMP - 2 in synovial tissues in patients with osteoarthritis and their clinical application

ZHAO Lili<sup>1\*</sup>, GAO Yu<sup>1</sup>, LIANG Yun<sup>2</sup>, LUO Yi<sup>1</sup>

(1. Second Department of bone, The first hospital of zhangjiakou, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000;

2. Laboratory Department, The first hospital of zhangjiakou, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the expression and clinical application of galectin-3 and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in synovial tissues in patients with osteoarthritis (OA). **Methods** A total of 126 OA patients admitted in our hospital from June 2017 to August 2019 were enrolled as the observation group, another 124 patients who underwent arthroscopy for knee ligament injury or meniscus injury during the same period were selected as the control group. Immunohistochemical staining was used to detect Galectin-3 and BMP-2 in the synovial tissues of the two groups. Logistic analysis was used to analyze the relationship between the two and the incidence of OA. The levels of Galectin-3, BMP-2 and joint fluid inflammation markers [interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] in synovial tissues were measured and compared. The Pearson was used to analyze the correlation between synovial tissue Galectin-3, BMP

基金项目:张家口市科技指导性计划项目(1521034D)

作者单位:1. 河北省张家口市第一医院医院骨二科,河北,张家口 075000

2. 河北省张家口市第一医院医院检验科,河北,张家口 075000

\*通信作者:赵丽莉, E-mail: lijinhong1509@163.com

-2 and synovial inflammation markers. **Results** The positive expression rate of Galectin-3 and BMP-2 in the synovial tissue of the observation group was higher than that of the control group ( $P<0.05$ ). Galectin-3 and BMP-2 in synovial tissues were significantly related to the incidence of OA ( $P<0.05$ ). The positive expression rates of Galectin-3 and BMP-2 in synovial tissues increased with the increase of disease severity ( $P<0.05$ ). The levels of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in synovial fluid increased with the increase of disease severity ( $P<0.05$ ). Galectin-3 of synovial tissue is positively correlated with IL-6 ( $r=0.515$ ), IL-8 ( $r=0.635$ ), and TNF- $\alpha$  ( $r=0.620$ ) in synovial fluid. BMP-2 in synovial tissue was positively correlated with IL-6 ( $r=0.602$ ), IL-8 ( $r=0.499$ ) and TNF- $\alpha$  ( $r=0.634$ ) in synovial fluid ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Galectin-3 and BMP-2 in synovial tissues are highly expressed in patients with OA, which is related to the pathogenesis of OA. Interestingly, both of Galectin-3 and BMP-2 are positively correlated with the expression of inflammatory factors in synovial fluid, suggesting that the detection of synovial tissue Galectin-3, BMP-2 could be assist in the diagnosis and prognosis of OA.

[KEY WORDS] Synovial tissue; Galectin-3; BMP-2 protein; Osteoarthritis; Inflammatory factors

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种滑膜关节退行性疾病,在病程中滑膜组织可通过分泌致炎因子,造成软骨下骨硬化、关节软骨丢失、疼痛等,影响关节正常功能,致残率较高,严重降低患者生活质量,因此加强对OA的研究具有重要意义<sup>[1]</sup>。半乳糖凝集素3(Galectin-3)可调控细胞生长、凋亡等,在人工椎间盘病变患者标本中可检测到阳性表达,与椎间盘退变有关,并具有体外诱导炎症因子表达的功能,故推测其可能与OA有关<sup>[2]</sup>。骨形成蛋白-2(Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)能促进成骨细胞分化,加速前十字韧带重建后的骨愈合,但在OA中的研究较少<sup>[3]</sup>。本研究探究滑膜组织Galectin-3、BMP-2在OA患者中的表达及临床价值,报告如下。

## 1 资料和方法

### 1.1 主要试剂

兔抗人Galectin-3单克隆一抗、生物素化的二抗(美国Santa Cruz公司);兔抗人BMP-2单克隆一抗、生物素化的二抗(北京百奥莱博科技有限公司);DAB显色剂(上海信裕生物科技有限公司)。

### 1.2 一般资料

选取本院2017年6月至2019年8月收治的OA患者126例作为观察组,另选取同期因膝关节韧带损伤或半月板损伤行关节镜诊治术患者124例作为对照组。两组性别、年龄、体质指数、患病侧、饮酒史、吸烟史、合并疾病等资料比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但有可比性。

纳入标准:①OA组均符合OA诊断标准<sup>[4]</sup>;②临床资料完整;③无认知、精神障碍;④单侧病变者;⑤所有患者及家属均已签署知情同意书。

表1 两组临床资料对比 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]

Table 1 Comparison of clinical data between the 2 groups [ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]

资料	观察组 ( $n=126$ )	对照组 ( $n=124$ )	$t/\chi^2$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	55.49 $\pm$ 4.10	55.18 $\pm$ 4.42	0.575	0.566
性别(男/女)	66/60	59/65	0.576	0.448
体质指数 ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	22.25 $\pm$ 1.79	22.31 $\pm$ 1.73	0.269	0.788
患病侧				
左侧	58(46.03)	63(50.81)	0.571	0.450
右侧	68(53.97)	61(49.19)		
饮酒史	57(45.24)	52(41.94)	0.277	0.599
吸烟史	51(40.48)	56(45.16)	0.560	0.454
合并疾病				
高脂血症	20(15.87)	16(12.90)	0.447	0.504
糖尿病	9(7.14)	11(8.87)	0.254	0.615
心脏病	5(3.97)	3(2.42)	0.113	0.737
高血压	6(4.76)	4(3.23)	0.088	0.767

排除标准:①合并系统性红斑狼疮者;②伴有血液系统疾病者;③存在恶性肿瘤者;④合并严重凝血功能障碍者;⑤伴有急性感染类疾病者。根据WOMAC骨关节炎指数<sup>[5]</sup>评估判断病情程度研究经本院伦理委员会同意批准。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 滑膜组织Galectin-3、BMP-2表达

采用免疫组化染色法检测,滑膜组织标本固定,脱水,包埋,连续切片,60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烤片过夜,脱腊至水。3%双氧水冲洗载玻片,PBS液冲洗3次 $\times$ 5 min,复合酶37 $^{\circ}\text{C}$ 修复标本10 min,按照1:100比例滴加兔抗人Galectin-3、BMP-2单克隆一抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育1.5 h,室温下复温0.5 h,PBS冲洗3次 $\times$ 5 min。滴加生物素化的二抗,室温静置

0.5 h, PBS 洗 3 次×5 min。滴加 DAB 显色剂显色 5 min, 苏木精复染, 脱水透明, 中性树胶封片。显微镜下观察, 细胞膜、细胞核或细胞质有棕色颗粒附着为阳性, 仅有片状、黄染或无颗粒附着为阴性, 通过 Image-Pro Plus6.0 软件分析, 200 倍镜下随机选取 5 个视野, 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率为滑膜组织阳性染色面积占视野下组织总面积的平均光密度。

### 1.3.2 关节液炎症标记物检测

严格无菌操作, 抽取患膝关节液 1 mL, 3 000 r/min 离心 10 min 采用酶联免疫吸附法检测上清白介素-6(Interleukin-6, IL-6)、白介素-8(Interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) 表达, IL-6 试剂盒购于艾美捷科技有限公司, IL-8 购于武汉赛培生物科技有限公司, TNF- $\alpha$  购于齐一生物科技(上海)有限公司。

### 1.4 观察指标

①比较两组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 水平/浓度的差异。②分析滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 诊断的关系。③比较不同 OA 严重程度患者滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 表达。④比较不同 OA 严重程度患者关节液炎症标记物(IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ )水平。⑤分析滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与关节液炎症标记物相关性。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理, 计数资料用  $n(\%)$  表示、 $\chi^2$  检验, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 多组间比较以单因素方差分析, 两两比较以 LSD-t 检验, 采用 Logistic 分析滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 发病的关系, 采用 Pearson 分析滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与关节液炎症标记物相关性。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率比较

观察组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2、图 1。

### 2.2 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 发病的关系

Logistic 回归分析显示, 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 诊断显著相关, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

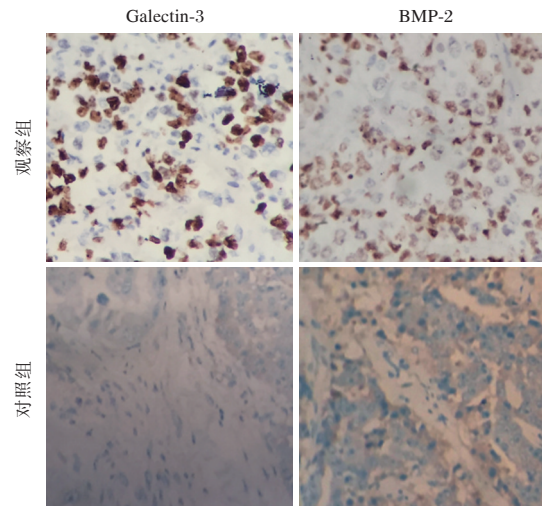


图 1 两组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 ( $\times 400$ )

Figure 1 Galectin-3 and BMP-2 of 2 groups of synovial tissue ( $\times 400$ )

表 2 两组滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of Galectin-3 and BMP-2 in 2 groups of synovial tissues ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Galectin-3(%)	BMP-2(%)
观察组	126	42.47±6.78	28.63±5.26
对照组	124	5.82±1.39	8.72±2.14
t 值		58.985	39.086
P 值		<0.001	<0.001

表 3 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与 OA 发病的关系

Table 3 Relationship between galectin-3, BMP-2 and the incidence of OA in synovial tissue

变量	$\beta$ 值	S.E. 值	Wald/ $\chi^2$ 值	P 值	OR 值	95%CI
Galectin-3	1.901	0.517	13.526	<0.001	6.695	3.441~13.028
BMP-2	1.720	0.463	13.800	<0.001	5.584	2.695~11.572

### 2.3 不同 OA 严重程度患者滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 的比较

滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 阳性表达率随病情程度增加呈升高趋势, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

### 2.4 不同 OA 严重程度患者关节液炎症标记物

关节液 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  水平随病情程度增加呈升高趋势, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 5。

### 2.5 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与关节液炎症标记物相关性

Pearson 相关性分析, 滑膜组织 Galectin-3 与关

表4 不同病情程度患者滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of Galectin-3 and BMP-2 in synovial tissues of patients with different levels of disease ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Galectin-3 (%)	BMP-2 (%)
轻度患者	38	31.77±5.83	20.05±4.16
中度患者	56	42.08±6.29	27.44±5.27
重度患者	32	55.86±7.10	40.90±6.74
F 值		124.278	132.326
P 值		<0.001	<0.001

表5 不同病情程度患者关节液炎症标记物比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Comparison of synovial inflammation markers in patients with different disease levels ( $\bar{x} \pm s$ )

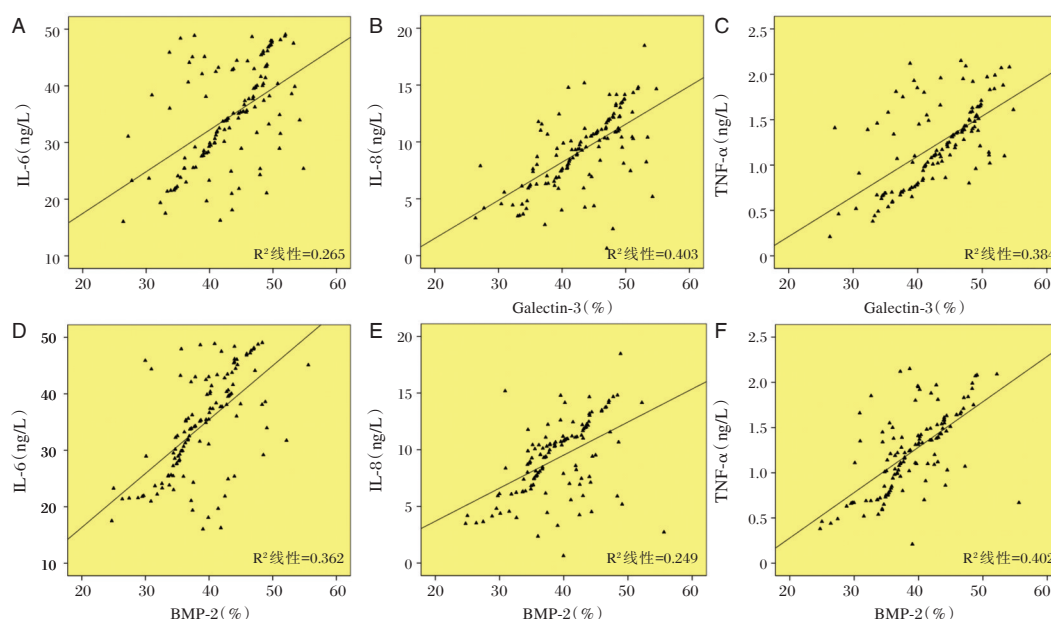
组别	n	IL-6 (ng/L)	IL-8 (ng/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)
轻度患者	38	13.15±3.82	6.01±1.80	0.52±0.20
中度患者	56	35.94±10.20	9.53±3.04	1.23±0.57
重度患者	32	61.08±16.33	14.29±4.11	2.14±0.68
F 值		169.027	63.706	83.291
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

节液 IL-6 ( $r=0.515$ )、IL-8 ( $r=0.635$ )、TNF- $\alpha$  ( $r=0.620$ )呈正相关,滑膜组织 BMP-2 与关节液 IL-6 ( $r=0.602$ )、IL-8 ( $r=0.499$ )、TNF- $\alpha$  ( $r=0.634$ )呈正相关,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),见图2。

### 3 讨论

目前普遍认为,OA 是一种由滑膜、软骨、骨等参与的炎症性疾病,其炎症通路是由 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  等多种细胞因子参与的,各炎症因子水平被证实与 OA 患者病情有关,能持续刺激滑膜、软骨等,造成组织损伤,并诱导成纤维细胞、基质金属蛋白酶分泌,导致滑膜增生、边缘骨赘形成、关节间隙变窄等,从而诱发 OA<sup>[6-7]</sup>。

Galectin-3 是半乳糖凝集素家族中一个结构独特的成员,在多种组织中均有表达<sup>[8]</sup>。抑制 Galectin-3 表达能明显下调基质金属蛋白酶3 表达,抑制核因子- $\kappa$ B 信号通路,减轻脂多糖诱导的软骨细胞炎症损伤,呈现出软骨保护特性<sup>[9]</sup>。本研究显示,OA 患者滑膜组织 Galectin-3 表达高于因膝关节韧带损伤或半月板损伤行关节镜诊治术患者,与 OA 诊断显著相关,并随病情严重程度增加呈升高趋势。分析其原因,Galectin-3 可刺激成纤维细胞生长,被激活的成纤维细胞可附着于骨组织和软骨,逐渐破坏关节结构,并介导细胞黏附、白细胞趋化,参与炎症反应、组织纤维化,造成关节损伤,故在 OA 中高表达,与 OA 发病及患者病情有关<sup>[10-11]</sup>。Weinmann 等<sup>[12]</sup>报道显示,Galectin-3 可诱导人骨关节炎中的 IL-6、TNF- $\alpha$  等,是 OA 进展的分子开关,



注: A. Galectin-3 与 IL-6 相关性; B. Galectin-3 与 IL-8 相关性; C. Galectin-3 与 TNF- $\alpha$  相关性; D. BMP-2 与 IL-6 相关性; E. BMP-2 与 IL-8 相关性; F. BMP-2 与 TNF- $\alpha$  相关性。

图2 滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 与关节液炎症标记物相关性

Figure 2 correlation between synovial galectin-3, BMP-2 and inflammatory markers of synovial fluid



支持本研究中滑膜组织 Galectin-3 与关节液 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  呈正相关的观点,佐证了 Galectin-3 能通过炎症因子参与 OA 的发病。可见从基因水平靶向 Galectin-3,沉默或抑制 Galectin-3 表达,可能有助于改善 OA 的炎症反应情况,缓解或控制 OA 病情,但这一结论仍需更多研究的论证。

BMP-2 是驱动成骨细胞分化和活性的必不可少的生长因子,对骨形成至关重要<sup>[13]</sup>。本研究显示,OA 患者滑膜组织 BMP-2 表达高于因膝关节韧带损伤或半月板损伤行关节镜诊治术患者,与 OA 发病显著相关,与 Weidner 等<sup>[14]</sup>报道相似,可能是由于 OA 滑膜组织的炎症反应刺激及退行性变化,导致 BMP-2 升高,进而参与关节软骨的修复。且本研究还发现,滑膜组织 BMP-2 阳性表达率随病情程度增加呈升高趋势,表明 BMP-2 与 OA 患者病情有关,推测病情越严重,软骨破坏可能更明显,机体为修复软骨产生适应性或应激性变化更大,分泌更多的 BMP-2,以发挥修复作用<sup>[15]</sup>。同时滑膜组织 BMP-2 与 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  呈正相关,这一现象是由于 OA 局部的激烈炎症反应可能通过细胞因子网络系统启动了滑膜组织的成骨性能,从而使 BMP-2 与促炎因子呈现出正相关变化<sup>[16]</sup>。而根据以往报道,IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  均与 OA 临床症状严重程度、关节功能显著相关,佐证了 Galectin-3、BMP-2 与 OA 发病和病情有关<sup>[17]</sup>。提示治疗 OA 时,不仅应重视关节炎症反应的控制,亦应从软骨修复等角度干预,双管齐下,可能有助于提高临床治疗效果。

综上所述,滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 在 OA 患者中呈高表达,与 OA 的发病和病情严重程度显著相关,并与关节液炎症因子表达呈正相关,提示检测滑膜组织 Galectin-3、BMP-2 可辅助 OA 及其严重程度诊断和预后的判断。

## 参考文献

- [1] Jiang L, Xu K, Li J, et al. Nesfatin-1 suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation, apoptosis, and cartilage matrix destruction in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis in rats [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(2):1760-1777.
- [2] Elshamly M, Kinslechner K, Grohs JG, et al. Galectins-1 and -3 in Human Intervertebral Disc Degeneration: Non-Uniform Distribution Profiles and Activation of Disease Markers Involving NF- $\kappa$ B by Galectin-1 [J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(10):2204-2216.
- [3] Crispim JF, Fu SC, Lee YW, et al. Bioactive Tape With BMP-2 Binding Peptides Captures Endogenous Growth Factors and Accelerates Healing After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction [J]. *Am J Sports Med*, 2018, 46(12):2905-2914.
- [4] 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南(2007年版) [J]. *中华骨科杂志*, 2007, 27(10):793-796.
- [5] 羊鹏飞,高鹏,李跃军,等. 骨关节炎患者滑膜组织中基质金属蛋白酶3和半乳糖凝集素3的表达及相关性[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(23):3616-3622.
- [6] Laavola M, Leppänen T, Hämäläinen M, et al. IL-6 in Osteoarthritis: Effects of Pine Stilbenoids [J]. *Molecules*, 2018, 24(1):E109.
- [7] Latourte A, Cherifi C, Maillot J, et al. Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(4):748-755.
- [8] Salamanna F, Giavaresi G, Parrilli A, et al. Effects of intra-articular hyaluronic acid associated to Chitlac (arty-duo) in a rat knee osteoarthritis model [J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(4):867-876.
- [9] Wang JS, Xiao WW, Zhong YS, et al. Galectin-3 deficiency protects lipopolysaccharide-induced chondrocytes injury via regulation of TLR4 and PPAR- $\gamma$ -mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6):10195-10204.
- [10] 谭敏枝,刘俊. 独活寄生汤对膝骨关节炎模型大鼠 Wnt/catenin 信号通路的作用研究 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2019, 21(5):8-12.
- [11] 范少鹏. 慢病毒介导 BMP-2 过表达质粒转染骨髓间充质干细胞联合丝素蛋白支架向成骨细胞转化的实验研究 [J]. *中国骨伤*, 2019, 32(9):853-860.
- [12] Weinmann D, Kenn M, Schmidt S, et al. Galectin-8 induces functional disease markers in human osteoarthritis and cooperates with galectins-1 and -3 [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(22):4187-4205.
- [13] Shirakura M, Kram V, Robinson J, et al. Extracellular Matrix Mediates BMP-2 in a Model of Temporomandibular Joint Osteoarthritis [J]. *Cells Tissues Organs*, 2017, 204(2):84-92.
- [14] Weidner H, Yuan Gao V, Dibert D, et al. CK2.3, a Mimetic Peptide of the BMP Type I Receptor, Increases Activity in Osteoblasts over BMP2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23):E5877.
- [15] Legendre F, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, et al. [J]. Enhanced chondrogenesis of bone marrow-derived stem cells by using a combinatory cell therapy strategy with BMP-2/TGF- $\beta$  1, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs, *Sci Rep*, 2017, 7(1):3406.
- [16] Rakic R, Bourdon B, Hervieu M, et al. RNA Interference and BMP-2 Stimulation Allows Equine Chondrocytes Redifferentiation in 3D-Hypoxia Cell Culture Model: Application for Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9):E1842.
- [17] Ruan G, Xu J, Wang K, et al. Associations between serum IL-8 and knee symptoms, joint structures, and cartilage or bone biomarkers in patients with knee osteoarthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 38(12):3609-3617.