

研究论文

基于FRET技术MMP-9生物传感器的构建及鉴定

王琰¹ 饶烽¹ 崔钢华¹ 刘伟² 曹薇薇² 史晨辉^{1,2} 王维山^{1,2*}¹石河子大学医学院第一附属医院骨科, 石河子 832000; ²新疆民族与地方病教育部重点实验室, 石河子 832000

摘要 为了构建包含有增强青色荧光蛋白-MMP-9-黄色荧光蛋白(ECFP-MMP-9-YPet)融合蛋白的真核表达质粒MMP-9生物传感器, 利用原有质粒Src biosensor和通用载体pMD-18T, 通过基因工程的方法构建ECFP-MMP-9-YPet生物传感器并进行鉴定, 转染293T细胞24 h后观察转染效率, 然后加MMP-3刺激293T细胞, 运用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术在荧光显微镜下观察MMP-9生物传感器的荧光共振能量转移现象。PCR和双酶切鉴定显示, ECFP-MMP-9-YPet生物传感器构建成功, 293T细胞转染效率约40%。用免疫荧光法检测MMP-9生物传感器融合蛋白在293T细胞表面膜表达, 用MMP-3刺激转染细胞可以检测到FRET现象。结果表明, 基于FRET构建的MMP-9生物传感器可以敏感而准确地监测活细胞中MMP-9的表达情况。

关键词 荧光共振能量转移; MMP-9; 生物传感器; 构建; 骨关节炎

Construction and Identification of FRET-based MMP-9 Biosensor

Wang Yan¹, Rao Feng¹, Cui Ganghua¹, Liu Wei², Cao Weiwei², Shi Chenhui^{1,2}, Wang Weishan^{1,2*}¹Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, China;²Ministry of Education Key Laboratory of Xinjiang Endemic Diseases, Shihezi 832000, China)

Abstract The objective is to construct the eukaryotic expression vector matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) biosensor, which was composed of the fusion protein enhanced cyan fluorescent protein-MMP-9-yellow fluorescent protein variant (ECFP-MMP-9-YPet). By the template Src-biosensor and the intermediate vector pMD-18T, ECFP-MMP-9-YPet biosensor was constructed by genetic engineering and identified. The MMP-9 biosensor was transfected into the 293T cells. The efficiency of transfection was observed at 24 h after transfection. The MMP-9 biosensor was observed by inversion fluorescence microscope based fluorescence resonance energy transfer (FRET). MMP-9 biosensor vector was confirmed by the fragment of PCR and double restriction endonuclease digestion. The efficiency of transfection was nearly 40%. The results by immunofluorescence detection showed that MMP-9 biosensor fusion protein expressed in the 293T cells membrane and the FRET of MMP-9 biosensor in the transfected cell was observed after stimulation with MMP-3. The MMP-9 biosensor can monitor the MMP-9 activation sensitively and reliably in living cells.

Keywords FRET; matrix metalloproteinase-9; biosensor; construction; osteoarthritis

收稿日期: 2015-12-28 接受日期: 2016-03-01

国家自然科学基金(批准号: 81160225、81260453、81360451)、新疆兵团医药卫生专项资助(批准号: 2013BA020)、兵团国际交流与合作专项(批准号: 2012BC002、2011BC004)和兵团科技创新团队专项基金(批准号: 2014CC002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13399931115, E-mail: wwsmc2002@sina.com

Received: December 28, 2015 Accepted: March 1, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81160225, 81260453, 81360451), Xinjiang Corps Special Medical and Health Fund (Grant No.2013BA020), the Corps International Exchanges and Cooperation Projects Fund (Grant No.2012BC002, 2011BC004) and the Corps Special Fund for Science and Technology Innovation Team (Grant No.2014CC002)

*Corresponding author. Tel: +86-13399931115, E-mail: wwsmc2002@sina.com

网络出版时间: 2016-04-08 16:45:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160408.1645.004.html>

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是最常见的关节疾病,其主要特征是关节软骨退化、软骨下骨反应性增生、关节功能障碍。OA病变的主要机制之一是蛋白酶对软骨的降解,其中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)^[1-2]、尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type plasminogen activator, uPA)^[3]对软骨的降解作用最为显著。MMPs涉及到正常组织的发育与再塑型、胚胎种植、骨骼塑型、创伤修复及肿瘤的侵袭和转移等生理病理过程^[4]。MMP-9也被称为明胶酶B,是由毛细血管内皮细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等间质细胞分泌的一种糖基化蛋白酶、参与成纤维细胞、内皮细胞、基质角质细胞和上皮细胞的核迁移。它可以使I、II、III型胶原明胶降解变性,也能切割IV、V、VII、XI型胶原^[5]。研究表明,人血清和关节液中MMP-9水平与骨关节炎病情严重程度正相关^[6];同时,MMP-9在血清和关节液中的水平有显著相关性^[7]。而MMP-9通过何种途径调控软骨组织的降解及其在体内的表达受到何种信号通路的调控都需要深入研究。

荧光能量共振转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)是距离很近(小于10 nm)的两个荧光分子间产生的一种能量转移现象。当供体和受体荧光分子的距离在10 nm以内时,供体受到激发,会通过偶极子之间的相互作用将能量以无放射性的方式转移,称为FRET现象^[8]。FRET是通过荧光供体与荧光受体之间的能量转移效率来测量荧光供体与荧光受体之间的距离的光谱技术^[9]。FRET能够在不损伤活细胞的前提下研究蛋白质之间的相互作用。本研究采用基因工程方法^[10]构建MMP-9的生物传感器,运用FRET技术实时动态观察MMP-9在活细胞生理状态中的时空信息,为研究MMP-9在OA病变中信号转导通路上的作用提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂及仪器

人胚肾上皮293T细胞、大肠杆菌菌株DH5 α 由本室保存。Src生物传感器质粒由美国霍普金斯大学曹旭教授惠赠。pMD-18T Fast Ligation Kit、Pfu聚合酶无内毒素质粒大提试剂盒购自TaKaRa公司。DNA聚合酶、核酸相对分子质量Marker、限制性核酸内切酶、T4连接酶购自天根生化科技有限公司。Lipofectamine 2000、DMEM、胎牛血清购自Invitrogen公司。倒置

荧光显微镜型号为Zeiss Axiovert 200M(Zeiss公司)。

1.2 MMP-9底物引物的设计合成

根据MMP-9的碱基基因序列,用Primer Premier 6.0软件设计并加入合适的酶切位点和保护碱基,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。P1: 5'-ACA TGC ATG CAT AAG GGC CCC CGC AGC CTG AGC GGC AAG GGC GGC AGC GGC GGC ACC ATG TCT AAA GGT GAA GAA TTA TTC-3', P2: 5'-GAA TTC TTA CTA TTT GTA CAA TTC ATT C-3'。单下划线表示酶切位点*Sph* I和*Eco* R I,双下划线表示MMP-9底物(MMP-9-substrate),虚线表示起连接作用的无意义的DNA序列。

1.3 MMP-9生物传感器载体的构建

以Src-pcDNA3.1质粒为载体,克隆出包含有上下游片段的MMP-9的基因全长序列。PCR反应(20 μ L体系): 20 μ mol/L的引物P1和P2各0.15 μ L, DNA模板1 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.2 μ L, 5 mol/L Taq酶0.2 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, 去离子水16.3 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 循环35次; 最后再72 $^{\circ}$ C延伸10 min。把通用载体pMD-18T和Src生物传感器载体进行*Hind* III/*Eco* R I双酶切处理,得到酶切产物ECFP-substrate-YPet, 将之插入pMD-18T的相应位点,获得Src-pMD-18T中间重组子(约5 Kb); 再将Src-pMD-18T与MMP-9-substrate-linker-YPet用*Sph* I/*Eco* R I双酶切处理,将MMP-9-substrate-linker-YPet插入相应位点,得到MMP-9-pMD-18T中间重组子(约4.67 Kb); 最后,通过双酶切(*Hind* III/*Eco* R I)处理MMP-9-pMD-18T,将ECFP-MMP-9-YPet片段插入pcDNA3.1载体上,获得MMP-9生物传感器(MMP-9 biosensor)载体(约6.9 Kb)。MMP-9生物传感器构建的技术路线图见图1。

1.4 细胞培养和细胞转染

293T细胞培养在37 $^{\circ}$ C、含5% CO₂的培养箱中,DMEM培养基中加入10% FBS。在转染前约24 h把293T细胞用0.25%胰蛋白酶充分消化后铺入Petri培养皿中,每皿约3 \times 10⁴细胞,共12皿。当细胞生长覆盖Petri培养皿达到50%~70%时,把7 μ L Lipofectamine 2000和3 μ g MMP-9生物传感器载体转染入细胞,继续培养24 h后用倒置荧光显微镜Zeiss Axiovert 200M观察。

1.5 荧光成像及FRET检测

用倒置荧光显微镜Zeiss Axiovert 200M上的

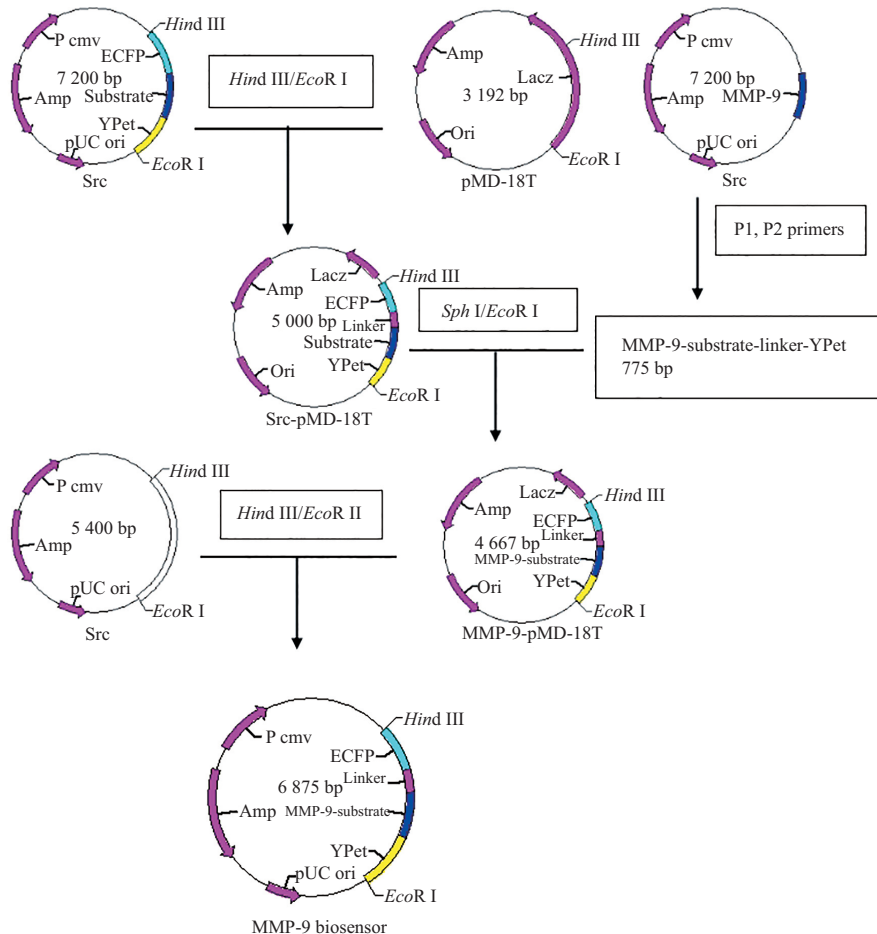


图1 构建MMP-9生物传感器载体的技术路线图

Fig.1 Technology roadmap of constructing MMP-9 biosensor

100×油镜观察蛋白质表达情况。青色荧光蛋白(cyan fluorescence protein, CFP)滤光片观察供体通道, 黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)滤光片观察受体通道, 青色荧光蛋白-黄色荧光蛋白-荧光能量共振转移(CFP-YFP-FRET)滤光片观察能量共振转移通道。通过检测, 只有青色荧光蛋白(CFP)增强表达的细胞, 算出供体的校正因子A(correction factor A); 通过检测, 只有黄色荧光蛋白(YFP)的增强表达细胞, 算出受体的校正因子B; 再用MetaFlour FRET 4.6软件计算供体受体的串色常数, 得到校正后的FRET^[9-10]。先用CFP通道滤光片选定待测细胞, 再用FRET通道滤光片拍摄细胞。圈定待测细胞若干感兴趣区域, 同时选定背景区域去除背景噪点。设置采图50张, 每隔1 min采图1张。分别采集CFP、YFP和FRET三个通道的图片; 将供体校正因子A和受体校正因子B输入MetaFlour FRET 4.6软件自带的校正公式, 计算出校正FRET。计算FRET效率=YFP值/CFP值。细胞分为对照组($n=6$)和实验组($n=6$),

确认CFP、YFP和YFP/CFP三条基线基本平稳时, 实验组加入2 ng/mL MMP-3, 对照组加入PBS液, 实时动态观察FRET变化。

2 结果

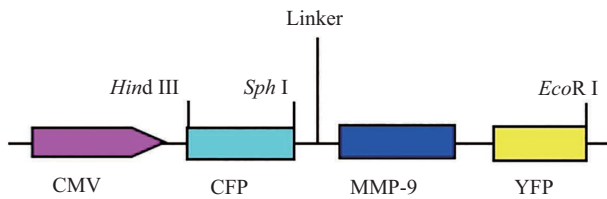
2.1 MMP-9生物传感器载体的构建及鉴定

利用高保真PCR扩增, 以引物P1和P2得到含酶切位点和保护碱基的MMP-9-substrate-linker-YPet PCR产物。利用pMD-18T为中间载体, 改造Src生物传感器质粒, 依次获得了中间重组子Src-pMD-18T、MMP-9-pMD-18T, 最后获得ECFP-MMP-9-YPet-pcDNA3.1(MMP-9 biosensor)重组质粒, 主要部分结构见图2。PCR鉴定: ECFP-MMP-9-YPet全长775 bp(图3); 双酶切鉴定: pcDNA3.1载体约3.9 Kb, ECFP-MMP-9-YPet 775 bp(图4)。同时, 测序验证。

2.2 MMP-9生物传感器的表达

把转染MMP-9生物传感器载体质粒的293T细胞用430 nm激光激发, 用515 nm的绿色荧光蛋白

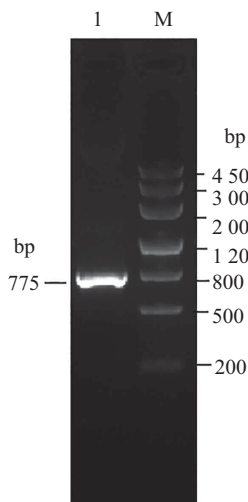
(green fluorescent protein, GFP)通道观察发现, 细胞发出明显的绿色荧光, 分布均匀, 整体细胞转染率约40%(图5)。在CFP通道中观察到青色荧光, 在YFP通道中观察到黄色荧光, 而在FRET通道中没观察到黄色荧光, 没有发生FRET现象(图6)。



CMV: CMV启动子; CFP: 增强青色荧光蛋白; YFP: 黄色荧光蛋白; Linker: 一段无义DNA序列。
 CMV: CMV promoter; ECFP: enhanced cyan fluorescent protein; YPet: yellow fluorescent protein; Linker: a nonsense DNA sequence.

图2 MMP-9生物传感器载体主要部分结构示意图

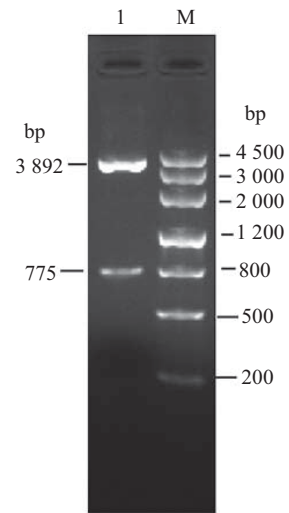
Fig.2 Domain structure of MMP-9 biosensor



1: MMP-9生物传感器质粒PCR结果; M: DNA相对分子质量标记。
 1: MMP-9 biosensor vector PCR production; M: DNA marker.

图3 MMP-9生物传感器载体PCR鉴定结果

Fig.3 Identification of MMP-9 biosensor vector by PCR

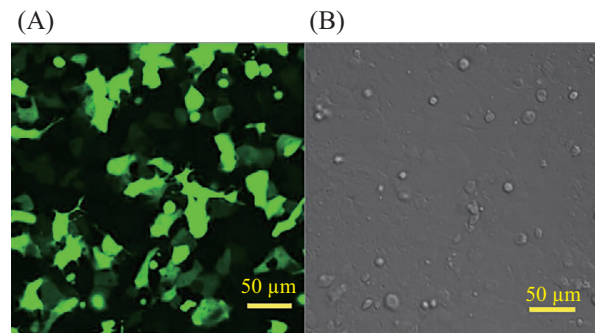


1: MMP-9生物传感器载体Hind III和EcoR I双酶切; M: DNA相对分子质量标记。

1: MMP-9 biosensor vector by double restriction enzymes digestion Hind III and EcoR I; M: DNA marker.

图4 用双酶切鉴定MMP-9生物传感器载体的结果

Fig.4 Identification of MMP-9 biosensor by double restriction enzyme digestion

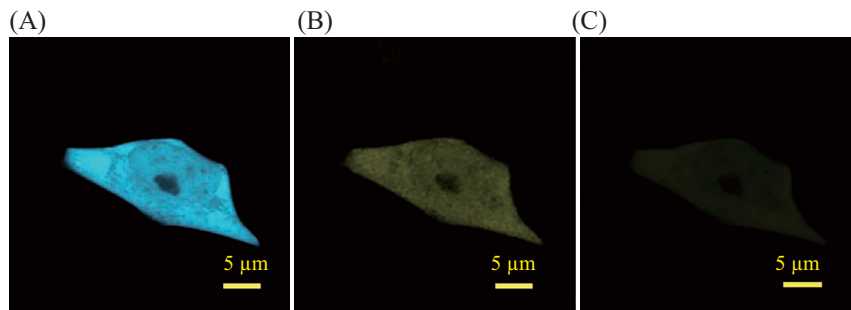


A: 荧光图像; B: 明场图像。

A: fluorescence image; B: bright field image.

图5 MMP-9生物传感器在293T细胞中的表达情况

Fig.5 MMP-9 biosensor expression situation in 293T cells

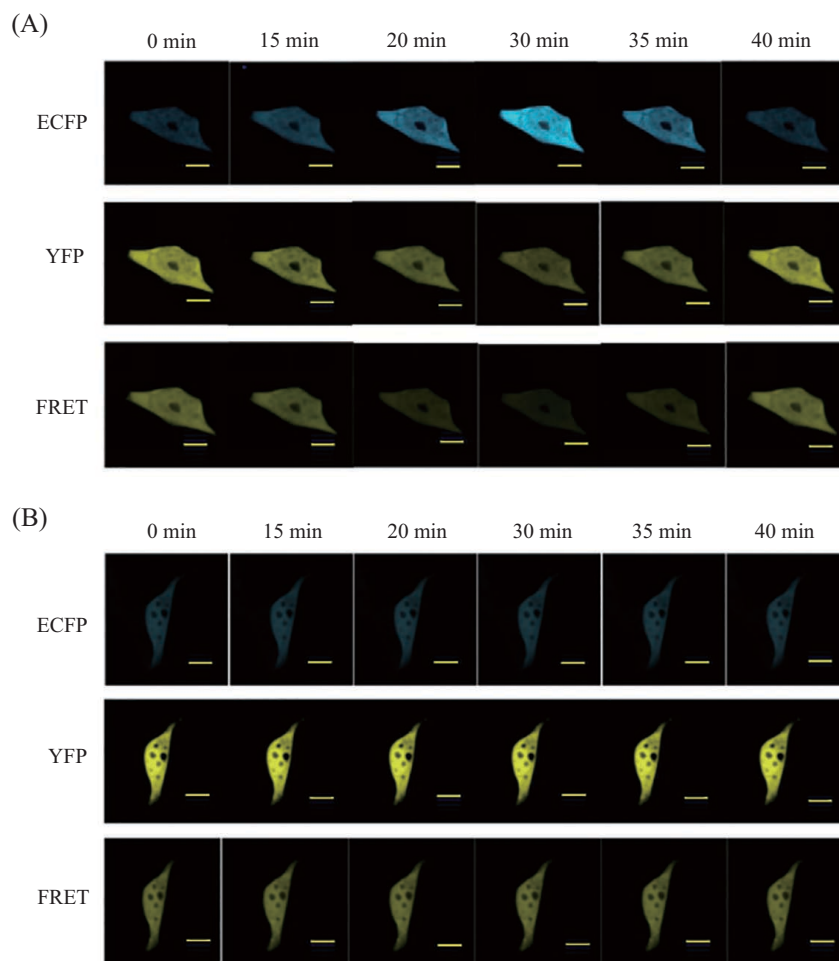


A: CFP通道荧光图像; B: YFP通道荧光图像; C: FRET通道荧光图像。

A: image of CFP channel; B: image of YFP channel; C: image of FRET channel.

图6 MMP-9生物传感器在293T细胞中的FRET现象

Fig.6 FRET image of MMP-9 biosensor expression in 293T cells



A: MMP-3刺激组; B: PBS组。标尺=10 μm 。

A: MMP-3 group; B: PBS group. Bars=10 μm .

图7 加入MMP-3与293-T细胞共孵育后三个通道的荧光图像

Fig.7 The three channel images of 293-T cells after incubation with MMP-3

2.3 MMP-3刺激MMP-9的FRET现象

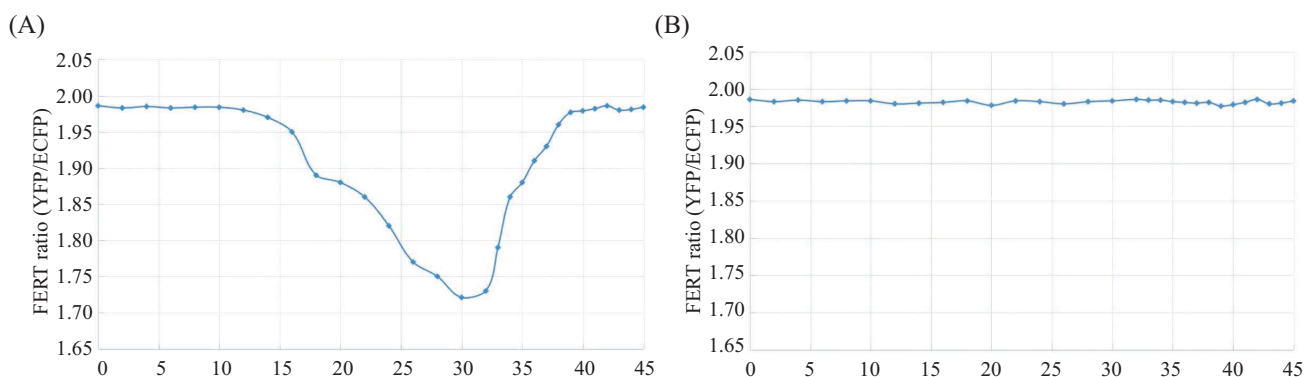
为了实时动态观察MMP-3处理前后MMP-9生物传感器融合蛋白产生的FRET现象的变化,本研究采用MMP-9生物传感器载体转染293T细胞,细胞分为实验组($n=6$)和对照组($n=6$)。实验组中加入MMP-3 (2 ng/mL),对照组加入PBS。记录时间内,对照组CFP和YFP荧光强度在处理前后均无明显变化;实验组加入MMP-3大约17 min后,观察到胞核中FRET先开始降低,胞质和胞核中FRET在30 min时降到最低,随后逐渐恢复,约在37 min时恢复至MMP-3刺激前水平(图7)。通过FRET原理,实时动态分析实验组和对照组YFP和CPF的荧光变化比率,证实MMP-9在MMP-3诱导下被激活并发生了空间构象的改变(图8)。

3 讨论

本研究利用原有质粒Src生物传感器和通用载

体pMD-18T,通过基因工程的方法构建真核表达质粒MMP-9生物传感器并通过PCR和双酶切鉴定质粒构建成功。我们又将MMP-9生物传感器载体转染293T细胞,在荧光显微镜下观察,转染效率高达40%,并观察到了融合蛋白的表达。用MMP-3刺激转染细胞,在17 min时开始出现胞核中FRET先开始降低,在30 min时胞质和胞核中FRET降到最低,随后逐渐恢复,约在37 min时恢复至MMP-3刺激前水平。

已有研究表明,MMPs在骨关节炎软骨组织降解过程中起着关键作用,在OA患者的关节液中MMP-9水平明显升高^[11]。MMP-9是鉴别OA的重要的实验室指标^[12],传统实验方法采用RT-PCR或Western blot等来观测细胞蛋白质表达,弊端在于破坏了细胞,而且不能动态观测蛋白质的时空变化信息。为了研究细胞信号转导通路,在生理状态的活细胞中动态观察MMP-9的时空变化信息,我们构建



A: MMP-3刺激组; B: PBS组。

A: MMP-3 group; B: PBS group.

图8 用计算机分析转染MMP-9的单个293T细胞在MMP-3刺激下的FRET现象

Fig.8 Computerized analysis of FRET in a single 293T cell transfected with MMP-9 biosensor after the incubation with the ligand of MMP-3

了MMP-9生物传感器。生物传感器作为荧光蛋白表达的载体,是一种可用于活细胞的探针^[13]。近年来, FRET现象被广泛应用到生物传感器的构建中来,用于研究细胞信号分子的转导和细胞中环境的变化。Lim等^[14]分别构建了MMP-12和MMP-13两种FRET探针用来观察活体动物中MMP-12和MMP-13的活性。陈召等^[15]所构建的生物传感器是人的转化生长因子 β 的I型受体(type I transforming growth factor β receptor, T β RI)基因片段与ECFP、YFP荧光蛋白的融合表达载体,来实时定位监测转化生长因子 β TGF β 在活细胞内的信号转导过程。Liao等^[16]基于FRET构建了FAK和Src两种生物传感器,定位于人间充质干细胞胞膜,发现在人间充质干细胞分化过程中FAK和Src分别由不同的分化诱导因子调控。这类生物传感器的特点是具有活性的特异性蛋白酶不可逆地切割了含有蛋白酶底物序列的小肽,生物传感器的FRET效率在此过程中会明显减小,所以这类生物传感器显示出高灵敏性和高特异性;而且生物传感器内FRET的效率与蛋白酶活性呈现负相关,可以直接从FRET效率的变化来监测蛋白酶在细胞凋亡中活性的变化。文献报道, MMP-3是MMP-9的内源性激活剂^[17-18]。我们前期的研究表明, MMP-9在受到MMP-3的激活后会产生级联放大作用,从而强烈地促进软骨降解。通过检测FRET现象就可以得到MMP-9被激活的时空变化信息^[19-20]。

MMP-9生物传感器载体的成功构建为我们深入研究骨性关节炎的发病机制、实现骨性关节炎的靶点治疗提供了可能。今后,我们将应用MMP-9生

物传感器做进一步实验,通过观察胞内MMP-9生物传感器的FRET现象,研究MMP-9被磷酸化的时空变化信息,认识这一信号转导通路所涉及的多种病理生理过程,进一步揭示OA的病因学。

致谢——

感谢美国霍普金斯大学曹旭教授实验室给予的技术支持!

参考文献 (References)

- Schroepel JP, Crist JD, Anderson HC, Wang J. Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis. *Histol Histopathol* 2011; 26(3): 377-94.
- Hashimoto M, Nakasa T, Hikata T, Asahara H. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Med Res Rev* 2008; 28(3): 464-81.
- Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: An overview. *Front Biosci* 2006; 11: 1696-701.
- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: Role in arthritis. *Front Biosci* 2006; 11: 529-43.
- van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; 37(6): 375-536.
- Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metal-loproteases. *Amino Acids* 2011; 41(2): 271-90.
- 蒋太军. 骨性关节炎膝关节液及血清中 MMP-9、TNF- α 水平检测及意义. *西南国防医药(Jiang Taijun. Osteoarthritis of knee joint fluid and serum MMP-9, TNF-levels of detection and significance. Southwest National Defense Medicine)* 2009; 19(4): 380-2.
- 张益珍, 幸浩洋, 李宜贵. 荧光共振能量转移技术及其在医药学中的应用. *华西药学杂志(Zhang Yizhen, Xin Haoyang, Li Yigui. Fluorescence resonance energy transfer technology and its application in medicine. West China Journal of Pharmaceutical*

- Science) 2004; 19(6): 491-2.
- 9 曹薇薇, 刘伟, 王维山, 陈召, 何仁豪, 何建伟. 利用荧光共振能量转移技术研究TGF- β /Smad3信号转导通路. 生物医学工程杂志(Cao Weiwei, Liu Wei, Wang Weishan, Chen Zhao, He Renhao, He Jianwei. Using fluorescence resonance energy transfer technology of TGF- β /Smad3 signal transduction pathway. Journal of Biomedical Engineering) 2014; 5: 1080-4.
 - 10 何建伟, 刘伟, 曹薇薇, 何建勋, 程江, 史晨辉. 转化生长因子 β 信号转导通路的生物传感器的构建. 生命科学研究(He Jianwei, Liu Wei, Cao Weiwei, He Jianxun, Cheng Jiang, Shi Chenhui. Construction of transforming growth factor beta biosensor signal transduction pathway. Life Sci Res) 2013; 5: 421-6.
 - 11 Kim KS, Lee YA, Choi HM, Yoo MC, Yang HI. Implication of MMP-9 and urokinase plasminogen activator (uPA) in the activation of pro-matrix metalloproteinase (MMP)-13. Rheumatol Int 2012; 32: 3069-75.
 - 12 Prince HE. Biomarkers for diagnosing and monitoring autoimmune diseases. Biomarkers 2005; 10(Suppl 1): S44-9.
 - 13 Zhang J, Michael DA. FRET-based biosensors for protein kinases: Illuminating the kinome. Molecular Biosyst 2007; 3(11): 759-65.
 - 14 Lim NH, Meinjohanns E, Bou-Gharios G, Gompels LL, Nuti E, Rossello A, *et al.* *In vivo* imaging of matrix metalloprotease12 and matrix metalloprotease 13 activities in the mouse model of collagen-induced arthritis. Arthritis Rheumatol 2014; 66(3): 589-98.
 - 15 陈召, 刘伟, 王维山, 曹薇薇, 何建伟, 史晨辉. 基于FRET技术的T β RI生物传感器载体的构建. 石河子大学学报(自然科学版)(Chen Zhao, Liu Wei, Wang Weishan, Cao Weiwei, He Jianwei, Shi Chenhui. Construction of FRET technology morphope T beta RI biosensor based on carrier. Journal of Shihezi University, Natural Science Edition) 2012; 4: 488-92.
 - 16 Liao X, Lu S, Wu Y, Xu W, Zhuo Y, Peng Q, *et al.* The effect of differentiation induction on FAK and Src activity in live HMSCs visualized by FRET. PLoS One 2013; 8(8): e72233.
 - 17 Dreier R, Grässel S, Fuchs S, Schaumburger J, Bruckner P. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. Exp Cell Res 2004; 297(2): 303-12.
 - 18 Flores-Pliego A, Espejel-Nuñez A, Castillo-Castrejon M, Meraz-Cruz N, Beltran-Montoya J, Zaga-Clavellina V, *et al.* Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) is an endogenous activator of the MMP-9 secreted by placental leukocytes: Implication in human Labor. PLoS One 2015; 10(12): e0145366.
 - 19 王维山, 史晨辉, 李长俊, 张振东, 陈安民, 郭风劲. 骨关节炎患者关节镜清理术前后关节液中uPA、MMP-3、MMP-9、MMP-13和MMP-14表达水平的检测及其意义. 吉林大学学报(医学版)(Wang Weishan, Shi Chenhui, Li Changjun, Zhang Zhendong, Chen Anmin, Guo Fengjin. Patients with osteoarthritis after arthroscopic debridement in synovial fluid of uPA, MMP-3, MMP-9, MMP-13 and MMP-14 expression. Journal of Jilin University, Medical Science Edition) 2014; 3: 650-4.
 - 20 王维山, 史晨辉, 李长俊, 张振东, 陈安民, 郭风劲. OA患者关节液uPA和MMP-3,9,13,14的表达水平与关节功能的相关性研究. 中国骨质疏松杂志(Wang Weishan, Shi Chenhui, Li Changjun, Zhang Zhendong, Chen Anmin, Guo Fengjin. Correlation between expression level and joint function in patients with OA and uPA in synovial fluid and MMP-3,9,13,14. Chinese Journal of Osteoporosis) 2014; 6: 602-5, 610.