

骨关节炎早期的 Ⅱ型胶原代谢产物

班吉鹤, 赵建宁

(南京大学医学院 南京军区总医院骨科, 江苏 南京 210002)

【摘要】 骨关节炎是以关节软骨渐进性破坏为特点的、普遍的致残性疾病。临床上需要一些早期即可以测量的、敏感的、特异性的标志物来诊断疾病。软骨的主要组成是 Ⅱ型胶原, 所以其合成和降解所产生的生物学标志物已成为研究重点。对关节滑液、血清、尿中的生物学标志物的检测可以早期诊断疾病、监测疾病的发展、了解机体对治疗药物的反应。 Ⅱ型胶原合成的产物包括: Ⅱ型胶原 C前肽、ⅠA型胶原 N前肽。 Ⅱ型胶原降解产物包括: Ⅱ型胶原 C端肽、Ⅱ型胶原新抗原表位、Ⅱ型螺旋、单克隆抗体 C2C结合肽段、可氰溴化的 9.7肽段、Ⅱ型胶原-1和硝化的 Ⅱ型胶原-1。本文仅对 Ⅱ型胶原合成、降解所产生的生物学标志物与早期骨关节炎之间的关系加以阐述。

【关键词】 生物学标记; 胶原 Ⅱ型; 骨关节炎

Metabolites of type Ⅱ collagen in early osteoarthritis BAN Ji-he, ZHAO Jian-ning Department of Orthopaedics, the General Hospital of Nanjing Military Command, the Medical College of Nanjing University, Nanjing 210002, Jiangsu, China

ABSTRACT Osteoarthritis(OA) which is characterized by progressive destruction of the articular cartilage, is a universal disabling disease. The measurable, sensitive and specific biomarkers, which can be detected in the early stage of disease, are very necessary for the diagnosis in clinics. The primary component of articular cartilage is type Ⅱ collagen (C), so produced in the synthesis and degradation of C are extensively investigated. Assaying these biomarkers in synovial fluid, serum and urine is useful in early diagnosis, detecting disease development, understanding organism response to anti-arthritis drugs. Synthetic biomarkers of C include the type Ⅱ procollagen C-propeptide (P-CP) and the type ⅠA procollagen N-propeptide (P-ANP). Degradation products of C include C C-terminal peptide (CTX-), C C-terminal neoepitope (TINE), helix-, monoclonal antibody C2C combined peptide, the cyanogen brominated 9.7, type Ⅱ collagen-1 (collon2-1, col12-1) and nitrated type Ⅱ collagen-1 (nitrated collon2-1, col12-1NO₂). The article summarizes the relationship between biomarkers of C and early OA.

Key words Biological markers; Collagen type Ⅱ; Osteoarthritis

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(7): 500-501 www.zggszz.com

胶原是软骨的主要组部成分, Ⅱ型胶原(C)占软骨干重的60%^[1]。软骨的生理学特性由完整的C网络结构来决定, 因此C代谢产物的检测可对软骨进行评估。

1 C的合成与降解

C是由3条同等的链构成的三螺旋蛋白。首先, 链前胶原在细胞内由脯氨酸和赖氨酸羟化酶作用, 使脯氨酸和赖氨酸残基羟基化, 然后羟赖氨酸残基的O-糖基化, 链与链之间以及链内部的二硫键作用便形成了三链螺旋结构^[2-3]。接下来, 三螺旋结构的前胶原特殊蛋白酶作用去掉C和N末端前肽便形成了有序的、成熟的胶原纤维及交联结构。三螺旋体之间多是赖氨酸羟化吡啶交联的, 这一过程是由赖氨酸氧化酶细胞转化酶来介导的^[4-5]。在C形成过程中 Ⅱ型胶原和 Ⅰ型胶原的作用也不容忽视。 Ⅱ型胶原是有

3个不同链构成的, 它的作用是调节纤维的大小。 Ⅱ型胶原是断续三股螺旋原纤维缔合胶原蛋白, 它以共价键结合蛋白聚糖。

软骨中胶原的持续降解导致软骨破坏及关节退变。最初C的降解是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的作用, 如胶原酶1、2、3、MMP-1、8、13、14^[6-7]。这些蛋白酶可分解C Gly⁷⁹⁴-Leu⁷⁹⁵之间的肽键, 形成了一个具有794个氨基酸大小的 Ⅱ型胶原 3/4片段和具有266个氨基酸大小的 Ⅱ型胶原 1/4片段^[8](见图1)。接下来这两个胶原前体片断的三螺旋结构解螺旋, 并进一步由其他蛋白水解酶降解。

2 C代谢产物与软骨损伤及骨性关节炎的关系

胶原网络结构的稳定靠的是合成与降解之间的平衡, 一旦这个平衡被打破必将造成软骨的退变, 进而造成关节的退变。因此C作为最重要的软骨成分, 其代谢产物为我们提供一种思路: 检测C代谢产物水平以监测软骨病理生理的改变。

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2005085)

通讯作者: 赵建宁 Tel: 025-80860016 E-mail: zhoujuan1009@163.com

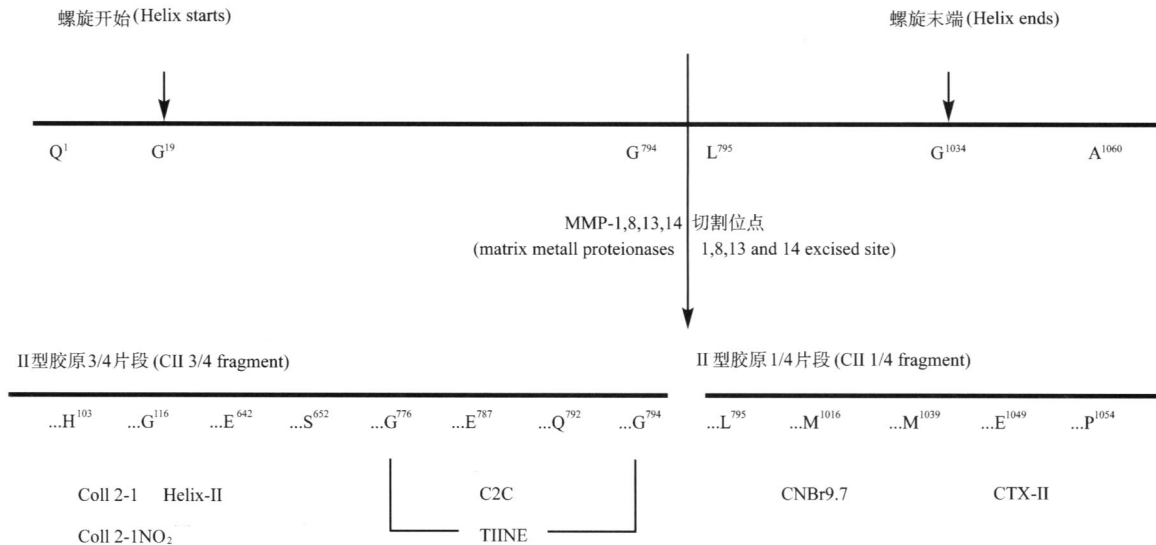


图1 II型胶原降解产物模式图

长箭头所示即被间质金属蛋白酶(MMP)-1、8、13、14所切断的甘氨酸与亮氨酸之间的肽键以此形成3/4、1/4大小的胶原前体片断

Fig. 1 The ideograph of degradation product of the CII

The matrix metalloproteinases 1, 8, 13 and 14 cleave peptide bond between Gly⁷⁹⁴ and Leu⁷⁹⁵ generating two fragments that are 3/4 and 1/4 the size of the collagen precursor (long arrow point).

2.1 C合成标志物

2.1.1 型胶原 C前肽 (type procollagen C-propeptide, P-CP) 游离的 P-CP是由 3个 35KD 的蛋白链以二硫键结合而成的,其半衰期仅有 16 h^[9]。有研究表明 OA早期阶段的 C合成增加,这使得 P-CP在软骨中的含量增加^[10]。在膝交叉韧带、半月板急性损伤患者的关节滑液中 P-CP含量立即增加并持续许多年^[11]。Lohmander等^[12]通过一项长达 4年的对关节液分析也证实了 P-CP含量在早期 OA患者的关节滑液中增加的观点。因此关节滑液中 P-CP含量变化可用于诊断早期阶段 OA以及判断疾病的发展,不过这仅限于关节滑液,而不是在血清或尿中^[13]。

2.1.2 A型胶原 N前肽 (type A procollagen N-propeptide, P-ANP) P-ANP是 C基因的可选择性剪接变体,它富含半胱氨酸,经特殊蛋白酶作用形成成熟的三螺旋型基因^[14]。据推测 A型胶原来自于发育中的软骨母细胞,而成熟的软骨细胞则分泌缺乏半胱氨酸的 B型胶原。在 OA的成熟软骨细胞中发现 A型前胶原的表达,这表明这些软骨细胞可能向原始细胞表型转化,同时也可能是一种自身修复机制^[15-18]。Rousseau等^[19]应用多克隆抗体的竞争性 ELISA检测出 P-ANP的浓度范围:1.1~40 ng/ml。抗 P-ANP并没有与血小板反应素、血管假性血友病因子及人型胶原 N前肽的交叉反应性。尽管与健康者对照,OA患者血清中 P-ANP的浓度显著下降,但这种改变的临床意义仍值得商榷。

2.2 型胶原降解产物

2.2.1 型胶原的可氰溴化的 9.7肽 (the C-cyanogen bromide 9.7, C-CNBr9.7) Srinivas等^[20]通过定量检测正常的和退变的软骨发现两种特异性的抗体:抗体 C4F6可以识别天然三螺旋构象,而抗体 E1E5则仅识别变性的 C-抗原表

位,这样在关节软骨细胞移植培养中定量检测 C的降解情况。抗体 E1E5连同单克隆抗体 14.7 D8和单克隆抗体 18.6 D6与氰溴化物 (cyanogen bromide, CNBr)反应去切割 C的 9.7肽,其中抗体 14.7 D8的作用是拮抗 C中的一段 15个氨基酸长度的肽 (GPQGRGDKGEA)与钼孔碱血蓝素结合,抗体 18.6 D6则是用来拮抗 CNBr 9.7肽段与卵清蛋白结合^[21-22]。应用抗体 14.7 D8和抗体 18.6 D6的夹心 ELISA检测 CNBr 9.7在关节滑液中的浓度范围:2.5~5 ng/ml^[23]。另外与研究关节液中型胶原肽含量变化的实验对比发现,CNBr 9.7含量的增加能反映出关节近期受过伤,这样可以将其作为一个评估治疗效果的依据,同时可以评估基质金属蛋白酶抑制剂在关节软骨损伤的患者或动物模型中的改变情况^[24]。

2.2.2 型胶原新抗原表位 (C-C-terminal neoepitope, TINE) 当 C被胶原酶作用时,所产生的 3/4片段的羧基端便形成一个新的抗原表位,这个新抗原表位可在尿中检测出,因此能够成为检测关节软骨疾病中 C降解程度的指标。Ottewill等^[25]应用抗体 9A4结合⁷⁸⁸GPPGPQ⁷⁹⁴抗原表位,但抗体 9A4也可以结合型胶原和型胶原被胶原酶降解后产生的羧基端新抗原表位。应用抗体 5109和 9A4的夹心 ELISA法,即用抗体 5109做为捕获抗体,抗体 9A4则检测该抗体,而此方法也没有与型胶原和型胶原的交叉反应性。因此应用该法检测 OA患者尿液中 TINE的浓度范围为:0.01~1 nM,它明显地高于对照组,但却没有报道分析该结论的精确性^[26]。

2.2.3 型胶原 C端肽 (C-C-telopeptide, CTX-) CTX-的氨基酸序列为¹⁰⁴⁹EKGDP¹⁰⁵⁴,其中 K为交联位点,因较小可被肾脏滤过并在尿中聚集。Fosang^[27]应用单克隆抗体 F2603的竞争性 ELISA法在尿液中检测出的 CTX-范围为:

6~660 nM, OA患者尿液中 CTX⁻ 的含量显著高于对照组。尿 CTX⁻ 与 C 合成标志物联合作为检测指标能比单一的标志物更好地预测已超过 1 年的关节损害的进程^[28]。也有学者^[29]应用单克隆抗体 2B4 结合¹⁰⁴⁹ EKGDP¹⁰⁵⁴ 来检测标本中 CTX⁻ 的含量, 2B4 可识别关节液中 C 大片段以及尿中小片段的交联位点。应用 2B4 抗体的竞争性 ELISA 法检测对照组、膝 OA 及全身性 OA 患者的尿 CTX⁻, 可清楚的显示尿 CTX⁻ 与疾病之间的关联性。应用此法检测关节液中 CTX⁻ 含量发现膝关节受伤后 1 周显著地升高^[30]。与抗体 F2603 相比, 抗体 2B4 在检测 CTX⁻ 上具有更高的敏感性。

2.2.4 单体克隆抗体 C2C 分析 Poole 等^[31]利用合成肽 CGGE⁷⁸⁷ GPOGPQG⁷⁹⁴ (其中 O 为羟脯氨酸) 制备了单克隆抗体 C2C (即 C 3/4 长单体), 因此该⁷⁸⁷ GPOGPQG⁷⁹⁴ 片段被称为 C2C, 并将单克隆抗体 C2C 应用于竞争性 ELISA 法检测出样本中 C2C 含量范围: 10~500 ng/ml, 在与正常对照的对比中发现, 在类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 患者的关节液中 C2C 的含量明显增高。在一项狗膝关节骨性关节炎模型的研究中发现: 膝关节损伤后的 3 周关节液中 C2C 与 CTX⁻ 的含量显著增加; 12 周后在血清及尿中 C2C 的含量明显增加, 而 CTX⁻ 则在血清中含量增加较明显, 这项结果表明早期软骨损伤中 C2C 与 CTX⁻ 具有相似的降解释放趋势, 而后期 C2C 的变化更有意义^[32]。

2.2.5 型胶原-1 (Collagen2-1, Col12-1) 和硝化的型胶原-1 (nitrated collagen2-1, Col12-INO₂) 蛋白质中的芳香族氨基酸经过氧化亚硝酸盐作用可产生 NO 和过氧化物。增加亚硝酸盐的浓度可发现 OA 患者关节液和血清中 NO 含量增加, 研究发现 C 的苯丙氨酸和色氨酸残基对硝化作用敏感^[33]。Deberg 等^[34]制备了多克隆抗体抗 C¹⁰⁸ HRGYPLDG¹¹⁶ 的螺旋抗原表位 (即 Col12-1) 以及硝化形式的¹⁰⁸ HRGY (NO₂) PLDG¹¹⁶ (即 Col12-INO₂), 应用竞争性 ELISA 法测定 OA 和 RA 样本中 Col12-1 及 Col12-INO₂ 含量范围分别为: 25~500 nM, 0.1~10 nM。研究发现 OA、RA 患者血清中 Col12-1 的含量明显高于正常对照组, 而 Col12-INO₂ 在 RA 患者血清中的含量明显高于 OA 及正常对照组, 这表明 Col12-INO₂ 更适合做 RA 的诊断标志物。

2.2.6 C 螺旋体 (Helix-) Chari 等^[35]针对 Helix- 表位⁶⁴² ERGETGPOGTS⁶⁵² (其中 O 是羟脯氨酸, 这段序列是 C 链中的一部分, 当蛋白水解酶作用时即被释放出来) 制备了多克隆抗体, 该抗体却不会与变性的、但却完整的 C 反应, 也不会与来源于 C、C 的同源序列反应。因此应用竞争性 ELISA 法测定样本中 Helix- 含量范围: 0.1~50 nM, 研究发现 OA 及早期 RA 患者尿中 Helix- 含量明显高于正常的年龄及性别配对的对照组, 在早期 RA 患者尿中 Helix- 水平的升高程度则提示疾病的发展程度, 当联合 CTX⁻ 进行分析时会显著提高对疾病进展的预测能力。

3 展望

运用 C 代谢产物作为疾病起始、发展过程的生物学标志物已经成为现在广泛研究的课题。检测 C 合成标志物如 P CRP、P ANP 以及降解标志物如 CTX⁻、Col12-INO₂、TINE、C CNBr 9.7, C2C 已经是日趋成熟的技术, 大多数的

标志物在疾病早期阶段即表现出与正常对照组的不同, 而在关节液中检测出的结果与 C 结构改变的关联性更大。缺乏如何处理 C 代谢产物的信息使得我们无法合理检测这些生物学标志物, 因此能够选出一种或一组标志物则成为研究重点。目前最大的挑战是提高 C 代谢产物作为生物学标志物在疾病早期的检测效率, 以便我们达到早期诊断及早期治疗 OA 的目的。

参考文献

- 1 Eyre DR. The collagens of articular cartilage. *Semin Arthritis Rheum*, 1991, 21 (3 Suppl 2): 2-11.
- 2 Kivirikko KI, Myllylä R. Post-translational processing of procollagens. *Ann N Y Acad Sci*, 1985, 460: 187-201.
- 3 Eyre DR, Oguchi H. The hydroxypyridinium crosslinks of skeletal collagens: their measurement, properties and a proposed pathway of formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, 92 (2): 403-410.
- 4 Wu JJ, Eyre DR. Cartilage type IX collagen is cross-linked by hydroxypyridinium residues. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 123 (3): 1033-1039.
- 5 van der Rest M, Mayne R, Ninomiya Y, et al. The structure of type IX collagen. *J Biol Chem*, 1985, 260 (1): 220-225.
- 6 Gadher SJ, Eyre DR, Duance VC, et al. Susceptibility of cartilage collagens type I, II, and IX to human synovial collagenase and neutrophil elastase. *Eur J Biochem*, 1988, 175 (1): 1-7.
- 7 Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, et al. Enhanced cleavage of type IX collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest*, 1997, 99 (7): 1534-1545.
- 8 Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, et al. Cloning, expression, and type IX collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 1996, 97 (3): 761-768.
- 9 Niyibizi C, Wu JJ, Eyre DR. The carboxypeptide trimer of type IX collagen is a prominent component of immature cartilages and intervertebral-disc tissue. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 916 (3): 493-499.
- 10 Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, et al. Evidence for altered synthesis of type IX collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest*, 1998, 102 (12): 2115-2125.
- 11 Sugiyama S, Itokazu M, Suzuki Y, et al. Procollagen IX C-propeptide level in the synovial fluid as a predictor of radiographic progression in early knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62 (1): 27-32.
- 12 Lohmander LS, Yoshihara Y, Roos H, et al. Procollagen IX C-propeptide in joint fluid: changes in concentration with age, time after knee injury, and osteoarthritis. *J Rheumatol*, 1996, 23 (10): 1765-1769.
- 13 Kobayashi T, Yoshihara Y, Samura A, et al. Synovial fluid concentrations of the C-propeptide of type IX collagen correlate with body mass index in primary knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 1997, 56 (8): 500-503.
- 14 Ryan MC, Sandell LJ. Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type IX (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *J Biol Chem*, 1990, 265 (18): 10334-10339.
- 15 Sandell LJ, Morris N, Robbins JR, et al. Alternatively spliced type IX procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *J Cell Biol*, 1991, 114 (6): 1307-1319.
- 16 Zhu Y, McAlinden A, Sandell LJ. Type IX procollagen in development of the human intervertebral disc: regulated expression of the NH (2)-

- propeptide by enzymic processing reveals a unique developmental pathway Dev Dyn, 2001, 220 (4): 350-362.
- 17 Aigner T, Zhu Y, Chansky HH, et al Reexpression of type A procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage Arthritis Rheum, 1999, 42 (7): 1443-1450.
 - 18 Salmiinen H, Vuorio E, Saamanen AM. Expression of Sox9 and type A procollagen during attempted repair of articular cartilage damage in a transgenic mouse model of osteoarthritis Arthritis Rheum, 2001, 44 (4): 947-955.
 - 19 Rousseau JC, Zhu Y, Miossec P, et al Serum levels of type A procollagen amino terminal propeptide (P ANP) are decreased in patients with knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12 (6): 440-447.
 - 20 Srinivas GR, Barrach HJ, Chichester CO. Quantitative immunoassay for type collagen and its cyanogen bromide peptides J Immunol Methods, 1993, 159 (1-2): 53-62.
 - 21 Chichester CO, Barrach HJ, Srinivas GR, et al Immunological detection of type collagen degradation: use in the evaluation of antiarthritic therapies J Pharm Pharmacol, 1996, 48 (7): 694-698.
 - 22 Nakamura M, Watanabe J, Ogawa R, et al Immunohistochemical localization of type and type collagens in articular cartilage of the femoral head of dexamethasone-treated rats Histochem J, 1997, 29 (9): 645-654.
 - 23 Felice BR, Chichester CO, Barrach HJ. Type collagen peptide release from rabbit articular cartilage Ann N Y Acad Sci, 1999, 878: 590-593.
 - 24 Elsaid KA, Jay GD, Chichester CO. Detection of collagen type and proteoglycans in the synovial fluids of patients diagnosed with non-infectious knee joint synovitis indicates early damage to the articular cartilage matrix Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11 (9): 673-680.
 - 25 Ottemess IG, Downs JT, Lane C, et al Detection of collagenase-induced damage of collagen by 9A4, a monoclonal C-terminal neopeptide antibody Matrix Biol, 1999, 18 (4) 331-341.
 - 26 Downs JT, Lane CL, Nestor NB, et al Analysis of collagenase-cleavage of type collagen using a neopeptide ELISA. J Immunol Methods, 2001, 247 (1-2): 25-34.
 - 27 Fosang AJ, Stanton H, Little CB, et al Neopeptides as biomarkers of cartilage catabolism Inflamm Res, 2003, 52 (7): 277-282.
 - 28 Gamero P, Ayrat X, Rousseau JC, et al Uncoupling of type collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis Arthritis Rheum, 2002, 46 (10): 2613-2624.
 - 29 Gorai I Bone and bone related biochemical examinations Bone and collagen related metabolites Bone resorption marker, urinary and serum CTX Clin Calcium, 2006, 16 (6): 1001-1008.
 - 30 Lohmander LS, Atley LM, Pietka TA, et al The release of crosslinked peptides from type collagen into human synovial fluid is increased soon after joint injury and in osteoarthritis Arthritis Rheum, 2003, 48 (11): 3130-3139.
 - 31 Poole AR, Inescu M, Fitzcharles MA, et al The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type collagen cleaved by collagenases J Immunol Methods, 2004, 294 (1-2): 145-153.
 - 32 Matyas JR, Atley L, Inescu M, et al Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis Arthritis Rheum, 2004, 50 (2): 543-552.
 - 33 Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, et al Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases Ann Rheum Dis, 1992, 51 (11): 1219-1222.
 - 34 Deberg M, Labasse A, Christgau S, et al New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO2), for studying oxidative-related type collagen network degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13 (3): 258-265.
 - 35 Chami N, Juillet F, Gamero P. Urinary type collagen helical peptide (HELIX-) as a new biochemical marker of cartilage degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis Arthritis Rheum, 2005, 52 (4): 1081-1090.

(收稿日期: 2007 - 01 - 23 本文编辑: 王宏)

肘关节功能评价 (美国特种外科医院, HSS)

疼痛 (最高 50分): 无或可被忽略 50分; 轻微疼痛, 偶尔需服止痛药 45分; 中度疼痛, 每日需服止痛药 35分; 中度疼痛, 休息或夜间痛 15分; 严重疼痛, 影响日常生活 0分。

功能 (最高 50分): 活动 (最高 30分): 不受限 30分; 轻微受限, 但不影响日常生活 25分; 不能举起 >4.5 kg (10磅) 物体 20分; 日常生活中度受限 10分; 不能梳头、触摸头部 5分; 不能自己进食 0分。 持久性 (最高 8分): 使用超过 30 min 8分; 使用超过 15 min 6分; 使用超过 5 min 4分; 不能使用 0分。 整体使用情况 (最高 12分): 使用不受限 12分; 娱乐时受限 10分; 家务及工作受限 8分; 生活自理受限 6分; 不能使用 0分。

优秀: 90 ~ 100分; 良好: 80 ~ 89分; 一般: 70 ~ 79分; 较差: 60 ~ 69分; 最差: < 60分。

摘自: 蒋协远, 王大伟. 骨科临床疗效评价标准. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 205.