

软骨胶原标志物与骨性关节炎的关系

葛广勇, 赵建宁

(第一军医大学南京临床学院 南京军区南京总医院骨科, 江苏 南京 210002)

摘要 骨性关节炎是以关节软骨的合成与降解失衡所致软骨丢失为特点的慢性疾病。软骨胶原是软骨的重要组成成分, 其代谢及结构的改变对骨性关节炎的发生、发展及预后产生重要的影响。本文对软骨胶原标志物与骨性关节炎的关系作一综述。

关键词 生物学标记; 软骨胶原; 骨关节炎

Relationship between the markers of cartilage collagens and osteoarthritis GE Guangyong, ZHAO Jianning. Clinical School of Nanjing, the First Military Medical University. Department of Orthopaedics, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Jiangsu Nanjing, 210002, China

Abstract The characteristic of osteoarthritis (OA) is the loss of articular cartilage. This loss arises from an imbalance between cartilage synthesis and degradation. The cartilage collagens were important components of cartilage. Its alteration in metabolism and structure will make an effective influence on occurrence, development and prognosis of osteoarthritis. This article will summarize the relationship between the markers of cartilage collagens and osteoarthritis.

Key words Biological markers; Cartilage collagen; Osteoarthritis(OA)

胶原是软骨重要的细胞外基质成分, 占软骨干重的 60%。关节软骨内的胶原蛋白分子高度有序地排列成胶原纤维网架结构, 使具有高度吸水性的蛋白多糖镶嵌于内, 从而使软骨具有独特的弹性、低摩擦性和高抗压性。

1 正常关节软骨胶原的类型及结构特点

目前能从正常关节软骨和软骨细胞培养基中提取的胶原有 7 种: II、VI、IX、X、XI、XII、XIV 型胶原^[1]。各型胶原都有相似的分子结构, 每分子胶原是由 3 条多肽链形成的一种特殊的三螺旋结构。每一条多肽链亚基称 a 链, 每一条 a 链由特征的 (Gly-X-Y) 氨基酸重复序列组成, 其中 X 位通常为脯氨酸, Y 位为羟脯氨酸。甘氨酸残基 R 集团小, 可以位于螺旋的中央, 使 a 链成为螺旋状, 故 a 链上每 3 个氨基酸中必需有 1 个甘氨酸。3 条 a 链相互缠绕成右手超螺旋结构, 这种超螺旋结构能有效地抵抗除金属蛋白酶以外的其他蛋白酶的降解。

关节软骨中含量最多的是 II 型胶原, 占总胶原的 80%~90%, 为 3 条 a1(II) 链构成的同质三聚体 [a1(II)]₃^[2]。II 型胶原的大部分非螺旋区在前胶原分泌到细胞外时被特殊的蛋白酶清除掉, 只在氨基端和羧基端剩下非螺旋序列, 称为肽端。

IX、XI 与 II 型胶原是软骨特异性胶原, 他们相互作用, 形成一个纤维网架结构^[3]。IX 型胶原属于不连续三螺旋结构的纤维相关胶原。是由 3 条不同的 a 链组成的异质三聚体 [a1

(IX)a2(IX)a3(IX)]。免疫电镜显示 IX 型胶原周期地排列在 II 型胶原的表面, 其 Col3 区和 NC4 区从 II 型胶原的表面突出, a2(IX) 链 Col2 区末端的氨基酸和 II 型胶原氨基肽端的氨基酸以羟吡啶啉相连接^[4]。XI 型胶原也是由 3 条不同的 a 链组成的异质三聚体 [a1(XI)a2(XI)a3(XI)], 在分子结构上与 II 型胶原相似。

X 型胶原由 3 条相同的 a1(X) 链构成的短链非微纤维形成性胶原, 它包含 3 个部分: 三螺旋区 (Col), C 端非螺旋区 (NC1), N 端非螺旋区 (NC2)。NC1 和 NC2 区含有较多的芳香族氨基酸。X 型胶原局限地分布于软骨肥大细胞区的 II-IX-XI 型胶原纤维网络中, 可能与软骨内骨化有关^[5]。

VI 型胶原主要分布于软骨细胞周围, 为异质三聚体 [a1(VI)a2(VI)a3(VI)], 与透明质酸 (HA) 特异性非共价键结合, 与 II 型胶原和小分子蛋白多糖的核心蛋白相互作用, 从而处于稳定状态^[6]。

XII、XIV 型胶原其功能、作用机制目前还不清楚。

2 关节软骨胶原的合成与降解

胶原的合成分为细胞内阶段和细胞外阶段。在软骨细胞内经过转录、翻译合成多肽链 (前胶原), 多肽链进一步被羟化, 形成具有三螺旋结构的前胶原, 前胶原分子含 N 肽端 (P II NP), C 肽端 (CPII)。经高尔基体分泌到细胞外的前胶原在氨基端前肽酶和羟基前肽酶的作用下分别去除氨基肽端和羧基肽端, 形成原胶原。原胶原分子通过共价键交联, 聚合成胶原微纤维, 再进一步聚合成胶原小纤维及胶原纤维^[7]。软骨细胞同时还能合成降解胶原的多种蛋白酶。蛋白酶首先作

用于胶原纤维中原胶原分子间的交联部位,使胶原纤维裂解成单个原胶原分子,然后在基质金属蛋白酶(MMPs)的作用下,三螺旋结构解离,产生 3/4 等各种片段。这些片段易被其他 MMPs 如明胶酶降解,从而使软骨吸收,最终导致关节软骨的进行性破坏^[8]。导致骨性关节炎中软骨破坏的主要原因是关节软骨胶原合成和分解代谢的失衡^[8,9]。因此,关节软骨细胞外基质分解代谢的增加将导致关节退变。

3 软骨胶原标志物与骨性关节炎(OA)的关系

3.1 合成有关的标志物与 OA

3.1.1 CP II(羧基端 II 型原胶原前肽) CP II (C propeptide of type II procollagen), 来源于 II 型前胶原分子,可以在血清和其他体液中检测到^[9]。曾报道运用夹心 ELISA 检测,OA 关节液中的浓度是正常水平的 3 倍,且与 OA 的严重性、BMI 独立相关^[10]。然而另有报道家族性 COL2A1 基因突变的携带者,可发生早期严重的 OA,尽管血清中 KS、COMP 显著升高,但 Epidope846,CP II 并无增高^[11]。其原因可能是 $\alpha 1$ 链上必需氨基酸甘氨酸半胱氨酸被精氨酸置换,影响 $\alpha 1$ 链的正常结构,突变产物不能合成胶原纤维^[12]。在正常关节软骨中 CP II 可以被免疫化学染色,在 OA 关节软骨中,特别是在胶原降解的细胞周围区域染色明显增加^[13]。Nelson 等^[14]运用免疫染色的方法研究发现在早期 OA 的关节软骨中,CP II 显著升高(平均 7.6 倍),尤其在软骨的中、下层,CP II 与 II 型胶原的总量直接相关。说明在早期 OA 中 II 型胶原的合成增加。在高位胫骨截骨纠正 OA 膝内翻畸形后,由于机械压力下降,随着软骨的再生,软骨免疫染色区的 CP II 浓度下降^[15]。关节液中的 CP II 浓度在早、中期升高,在晚期下降^[10]。由于在骨性关节炎的早期阶段,软骨破坏不明显,CP II 水平升高不多,在中期阶段出现明显的关节间隙狭窄时,软骨基质破坏明显,软骨细胞合成作用增加,膝关节软骨剩余的总量还较多,CP II 水平最高,在晚期阶段,软骨基质破坏殆尽,软骨细胞合成能力明显下降,CP II 水平也随之下降。检测关节液 CP II 水平可反映软骨细胞在骨性关节炎中合成胶原的能力,间接反映 OA 进展及治疗后的效果。

3.1.2 P II ANP(氨基端 II 型原胶原前肽) 同 CP II 一样, P II ANP 也用于反映机体软骨胶原的合成状况。OA 的特点就是在一定时期内关节软骨合成与降解失衡导致的关节软骨的丢失^[9]。Garnero 等^[8]研究表明,与正常成人相比,OA 患者血清 P II ANP 浓度降低(20~ 29 ng/ml, $P < 0.001$)。同关节液中 CP II 升高相反, Nelson 等^[14]报道,与正常人对比,膝 OA 血清 P II ANP 浓度反而降低,说明 P II ANP 降低与软骨的快速丢失有关。其在椎间盘退变研究中还发现, P II ANP 出现在椎间盘的胚胎发生时,而在成人时明显消失,在软骨退变时又重新出现。在 OA,血清 P II ANP 浓度降低提示 II 型胶原合成缺乏,而因此导致软骨修复的缺乏,进一步导致 OA 的迅速发展。有关文献报道在膝 OA 中,血清 P II ANP 与尿 CTX 没有关联性^[8],这就说明 II 型胶原的合成与局部软骨基质的降解互不相干。联合应用此两种标志物更能反映软骨胶原代谢的动态改变,更准确地预测 OA 的进展。比单一标志物更能有效地预测膝 OA 在一年内的 X 线表现进展^[16]。其检测方法:免疫染色,夹心抗体法,ELISA。

3.2 分解标志物与 OA OA 是最常见的关节疾患,其病理特征为关节软骨进行性变性和破坏及骨赘形成,其中关节软骨的变性为最早变化,骨赘形成为后期的代偿性改变。在 OA 的早期关节面粗糙和退化,裂隙改变从表层向中层延伸,这是浅层和中层区域的胶原纤维网受损伤的结果。Hollander 等^[17]用免疫方法检测出此期软骨中正常 II 型胶原含量明显较正常软骨中的含量低,且变性的胶原比正常软骨高。在上述关节炎早期(Mankin 分级 2~ 6 级)软骨基质中出现多种降解产物,有的保留于细胞外基质中,有的被释放到滑液,或被滑膜细胞吞噬进入淋巴或血液。在 OA 的早期阶段软骨代谢加快,软骨破坏明显。Price 等^[18]在切除膝前交叉韧带建立的 OA 试验中,运用活检免疫组织技术及 ELISA 方法证实: II 型胶原降解最早发生,主要位于软骨表层、中上层。

3.2.1 CTX-II (II 型胶原羧基末端交链) CTX-II 是 II 型胶原被胶原酶降解得到的,且只有 II 型胶原降解得到,因而是特异的。CTX-II 是部分紧密交联的肽端结构区域,在肾中不被降解^[19]。骨性关节炎是以骨更新下降、软骨、滑膜更新加快等系统改变为特征的疾病^[20]。Garnero 等^[21]研究证明:尿 CTX-II、尿 Glc Gal PyD 和血清 P III INP 是与关节面降解高度相关的,能预测 WOMAC 指数(关节疼痛和功能评分)及关节损害的程度。Matyas 等^[22]在切断马膝前交叉韧带建立 OA 的模型研究中发现:在术后 3~ 12 周关节液及血清中 CTX-II 均升高。Garnero 等^[20]还发现:在迅速发展的 OA 中,尿 CTX-II 显著升高,而反映骨吸收的脱氧吡啶啉(DPD)无明显改变。提示尿 CTX-II 水平能反映 OA 关节软骨破坏的程度及速度,对 OA 关节软骨快速破坏危险性的评估具有特异性。

3.2.2 Col2-3/4c(II 型胶原羧基末端 3/4 片段) Col2-3/4c 为 MMPs 裂解的 II 型胶原 3/4 长度片段的 COOH 端。目前研究表明胶原纤维的破坏是 OA 的一个重要表现,在骨性关节炎的早期就有胶原的破坏,胶原网架结构的破坏是骨性关节炎病变发展中不可逆转的阶段。随着免疫组织化学技术及抗体制备技术的提高,人们制备了 Col2-3/4cshort 和 Col2-3/4m 抗体,Col2-3/4cshort 抗体特异识别 MMP 1、MMP 8、MMP 13 降解 II 型胶原产生的 Col2-3/4c 片段,Col2-3/4m 抗体特异性识别变性的 II 型胶原(因胶原变性后其螺旋结构解体,抗原决定簇暴露)。OA 早期软骨内主要发生依赖 MMPs 的胶原的纤维破坏,后期才表现不依赖 MMPs 的退行性变^[23]。Matyas 等^[22]证明在术后 3、12 周关节液中的 Col2-3/4c 显著增高,术后 12 周血清及尿中 Col2-3/4c 升高。Col2-3/4c 可早期反映早期 OA 关节软骨的代谢改变,同时也揭示 MMPs 在关节软骨降解中起重要作用。

3.2.3 羟脯氨酸(OHP) 羟脯氨酸在胶原蛋白翻译后修饰过程中出现,在胶原中含量最高约占 10%。在胶原分解后,含有羟脯氨酸的肽端不能重新用于胶原的合成,而从尿排出。尿羟脯氨酸已经作为胶原降解的标志^[24]。通过测定尿羟脯氨酸评价软骨胶原的代谢率。但在临床应用中,这种排泄物有多种来源,即可做 I 型胶原的标志物,其浓度在 RA 中也升高,故 OHP 不是特异的。尿 OHP 可通过比色法或高压液相分光光度法检测。

3.2.4 吡啶(PD)及脱氧吡啶(DPD) 胶原降解期间,

存在于胶原纤维分子间的 PD 及 DPD 交联以游离或不同大小的肽段形式进入血液循环。他们在尿中可通过 HPLC 和免疫方法检测到。但此方法不能鉴别是 I 或 II 型胶原降解的端肽,其更多的是反映 I 型胶原的降解^[9],反映骨吸收的能力。尿 DPD 仅在 OA IV(Outerbridge 分期)升高^[25]。尿 Glc-Gat-PYD 在 OA 中显著增加与血骨钙的降低、高 WOMAC 指数相关,较重的 OA,其尿 Glc-Gat-PYD 显著增加。PD 及 DPD 可以做为判断 OA 严重性的指标。

3.3 其他软骨胶原标志物与 OA III、VI、IX、X、XI 型胶原可能是反映 OA 的次要标志物,软骨细胞不会同时表达 II、III 型胶原。生化、免疫组织化学和原位杂交技术都显示:OA 关节软骨内细胞周围基质中出现 III 型胶原,OA 早期仅有少量的 $\alpha 1$ (III) mRNA 表达,在细胞外基质中只能检测到少量 III 型胶原,晚期可检测到大量的 III 型胶原^[26]。VI 型胶原是软骨细胞周围正常的组成成分,在 OA 软骨中、低层广泛分布,而在表层分布较少^[27]。IX 型胶原在 II 型胶原纤维的表面,它的突变可导致软骨发育不良。IX α 1 链突变的小鼠将发展成早期严重 OA。研究发现 OA 时,关节软骨细胞受病理刺激后会增生,进而分化为肥大软骨细胞,并失去正常 II 型胶原的表达,合成大量的 X 型胶原。X 型胶原可能是大量关节软骨细胞发生凋亡,最终导致关节软骨变薄、软骨下骨变硬、增厚的原因之一^[28]。XI 型胶原分布于关节软骨细胞的表面和 II 型胶原纤维中,与蛋白多糖相互作用,在软骨的胶原网络中具有重要作用,在 OA 软骨中, MMP-2 含量增加, XI 型胶原降解增加,胶原网破坏,进而导致关节软骨的退变。至于它们在关节液、尿液及血清中的水平目前还无资料证明,需进一步研究。

参考文献

- 1 Eyre D. Collage of articular cartilage. *Arthritis Res*, 2002, 4(1): 30-35.
- 2 Bruckner P, Vander R. Structure and function of cartilage collagens. *Micros Res Tech*, 1994, 28: 378-384.
- 3 Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(9): 1916-1926.
- 4 Olsen BR. Collagen IX. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(4): 555-558.
- 5 Stoop R, Meijers TH, Pool AR, et al. Expression of type X collagen in young and old C57Bl/6 and Balb/c mice relation with articular cartilage degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001, 9: 92-100.
- 6 Hambachl L, Neureiter D, Zeiler G, et al. Sever of disturbance of the distribution and expression of type VI collagen chains in osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 1998, 41: 986-996.
- 7 Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, et al. Collagen fibri formation. *Biochem J*, 1996, 316: F11.
- 8 Garnero P, Ayrat X, Rousseau JC, et al. Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(10): 2613-2624.
- 9 Frank A, Wollheim MD. Serum of markers of articular cartilage damage and repair. *Rheumatic Diseases Clinics North America*, 1999, 25(2): 417-432.
- 10 Kobayashi T, Yoshihara Y, Samura A, et al. Synovial fluid concentration of the C-propeptide of type II collagen correlate with body mass index in primary knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 1997, 56(8):

500-503.

- 11 Bleasel JF, Poole AR, Henegard D, et al. Changes in seum cartilage marker levels indicate altered cartilage metabolism in familiars with osteoarthritis related type II collagen gene (Col2A1) mutation. *Arthritis Rheum*, 1999, 42: 39-45.
- 12 Mier KJ, Holderbaum D, Ferguson R, et al. Osteoarthritis in children association with a mutation in the type II procollagen gene (cola1). *Mol Genet Metab*, 2001, 74(3): 338-341.
- 13 Poole AR, Nelson F, Hollander A, et al. Collagen II turnover in joint disease. *Acta Orthop Scand*, 1995, 66: 88.
- 14 Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest*, 1998, 102(12): 2115-2125.
- 15 Kobayashi H, Saito T, Koshino T. Immunolocalization of carboxy-terminal type II procollagen peptide in regenerated articular cartilage of osteoarthritic knees after reduction of mechanical stress. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10(11): 870-878.
- 16 Garnero P, Delmas PD. Biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 2003, 15(5): 647-646.
- 17 Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, et al. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest*, 1994, 9(4): 1722-1732.
- 18 Price JS, Till SH, Bicherstaff DR, et al. Degradation of cartilage type II collagen precedes the onset of osteoarthritis following anterior cruciate ligament rupture. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(11): 2390-2398.
- 19 Baroncelli GI, Bertelloni S, Cellarelli C, et al. Bone turnover in children with Vitamin D deficiency rickets before and during treatment. *Acta Paediatr*, 2000, 89: 513-518.
- 20 Garnero P, Convozier T, Christgau S, et al. Urinary type II collagen C-telopeptide levels are increased in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62(10): 939-943.
- 21 Garnero P, Piperno M, Gineys E, et al. Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relation with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(6): 545-548.
- 22 Matyas TR, Atley L, Ionescu M, et al. Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(2): 543-552.
- 23 Stoop R, Buma P, Peter M, et al. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum*, 2000, 43: 2121-2131.
- 24 Bauth JC, Malone DG, Vailas AC. Effects of exercise on knee joints with osteoarthritis: a pilot study of biologic markers. *Arthritis Care Res*, 1997, 10(1): 48-55.
- 25 Schmitt Rohlffing B, Thomsen M, Niedhart C, et al. Correlation of bone and cartilage markers in the synovial fluid with the degree of osteoarthritis. *Rheumatol Int*, 2002, 21(5): 193-199.
- 26 Aigner T, Dudhia J. Phenotypic modulation of chondrocytes as potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis. *Ann Rheum Dis*, 1997, 56: 287-291.
- 27 Harvey S, Weisman M, O'Dell, et al. Chondrex: New marker of joint disease. *Clin Chem*, 1998, 44: 509-516.
- 28 Gibson G, Lin DL, Roque M. Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture. *Exp Cell Res*, 1997, 233: 372-382.