

- membranes of red and white skeletal muscle[J]. Am J Physiol, 1991,261(5 Pt 1):E556—561.
- [33] King PA, Hirshman MF, Horton ED, et al. Glucose transport in skeletal muscle membrane vesicles from control and exercised rats [J]. Am J Physiol, 1989,257 (6 Pt 1):C1128—1134.
- [34] Konrad D, Bilan PJ, Nawaz Z, et al. Need for GLUT4 activation to reach maximum effect of Insulin -Mediated glucose uptake in brown adipocytes isolated from GLUT4 myc-Expressing Mice[J]. Diabetes, 2002,51(9):2719—2726.
- [35] Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, et al. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3 -L1 adipocytes and L6 myotubes [J]. J Biol Chem, 1999,274(15):10071—10078.
- [36] Somwar R, Koterski S, Sweeney G, et al. A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3 -L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation [J]. J Biol Chem, 2002,277(52):50386—50395.
- [37] Abbud W, Habinowski S, Zhang JZ, et al. Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of Glut1-mediated glucose transport [J]. Arch Biochem Biophys, 2000,380(2):347—352.
- [38] Xi X, Han J, Zhang JZ. Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase[J]. J Biol Chem, 2001,276(44):41029—41034.

· 综述 ·

骨性关节炎软骨生物学标志物的国外研究进展*

李蕊¹ 肖迪² 周军¹

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是最常见的关节疾患之一,主要表现为关节缓慢发展的疼痛、僵硬、肿大,伴关节功能障碍,甚至发生残疾。OA 对人类的健康和生存质量影响很大,随着老龄化社会的到来,本病的发病率日趋升高,对其的研究已成为医学领域中的重要课题。目前,OA 的早期诊断、病变监测和有效防治仍是骨科领域亟待解决的疑难问题,是当今学者研究的焦点。本文将就国外近年来 OA 研究过程中使用的主要软骨生物学标志物进行综述,为深入研究 OA 提供可资借鉴的资料。

1 OA 诊断及评估现状

OA 的病理特点主要为关节软骨的退行性改变,进而导致关节软骨损伤、破坏,关节边缘和软骨下骨反应性增生,骨赘形成。目前,对 OA 的诊断主要依靠临床参数(疼痛、肿大、活动受限等)、影像学资料和关节镜检查等,其中,后两者对于明确关节部位组织病理变化情况有很大价值。影像学中 X 线的改变是评价 OA 进展的常用方法,但它仍具有一定的局限性,其特异性和敏感性较差。通过病理标本研究发现,即使在 X 线表现正常时,关节软骨也可能已严重受累;一旦患者出现 X 线改变,疾病往往已经处于进展期^[1-2],关节的正常功能和患者的生活质量已经受到严重的、不可逆的影响。磁共振成像(MRI)对软组织分辨率高,可从任意面成像及多参数、多序列成像,能直接显示软骨的改变情况,有助于 OA 的早期诊断^[3],但由于价格昂贵,难以用于大范围的疾病评估和普查。此外,关节镜是评价关节软骨受损的最佳手段,被认为是诊断关节软骨受损的金标准,可以直接观察透明软骨的肿胀及破溃情况。但是由于检查的有创性,且不能显示软骨深层和软骨下骨质的改变,其临床应用也受到限制。因此,探究有效、廉价且微创的检查手段来检测亚临床的 OA 和监测病变的进展,对早期诊断和有效防治 OA 有着重要的意义。

随着分子生物学的发展和研究手段的提高,目前许多研究者都在试图寻找用于临床评价 OA 的生物学标志物。OA 的生物学标志物,为关节组织基质的分子物质或片断,它们在组织合成和分解的代谢过程中被释放进入血液或尿液,可

以通过酶联免疫吸附法(ELISA)或放射免疫法进行测定^[4]。近年来,对软骨(Ⅱ型胶原 N 和 C 前肽、Ⅱ型胶原 C-端肽、软骨寡聚基质蛋白、软骨糖蛋白 YKL-40、Ⅱ型胶原 α 链片断等)、滑膜(Ⅲ型胶原 N 前肽、透明质酸等)及骨(Ⅰ型胶原 N 和 C 前肽、吡啶啉、脱氧吡啶啉等)的生物学标志物进行了大量的实验研究和临床分析^[5-8],并取得了一定进展,证明了 OA 的生物学标志物能够定量地、动态地监测骨关节组织的改变。由于 OA 的主要特征为关节软骨降解增加而引起软骨丢失^[9],因而反映软骨代谢的生物学标志物对于监测 OA 的病变进展具有很大的价值。

2 OA 软骨生物学标志物的研究进展

在关节病变过程中,软骨细胞外基质的合成与分解失去平衡,基本结构遭到破坏。其中Ⅱ型胶原和蛋白多糖的破坏最为显著,从而影响了关节软骨的正常生理功能。因此,这些能够反映软骨基质合成(PⅡNP、PⅡCP、CS846、YKL-40 等)和降解(CTX-Ⅱ、Ⅱ型胶原 α 链片断、COMP 等)的物质,被不少学者作为生物学标志物而用于 OA 病变的诊断和评估。

2.1 Ⅱ型胶原 C-端肽(CTX-Ⅱ)

Ⅱ型胶原是关节软骨的主要结构成分,占胶原总量的 80%—90%。OA 发生时,Ⅱ型胶原降解代谢加快,在蛋白酶的作用下,Ⅱ型胶原首先裂解产生 C-端肽,即为 CTX-Ⅱ。由于 CTX-Ⅱ 是Ⅱ型胶原的裂解产物,完全来自成熟的结构性胶原,以小肽形式全部进入尿液,可通过 ELISA 方法进行检测,因此具有作为 OA 候选生物学标志物基因的优势^[10]。有研究显示,OA 患者体内的 CTX-Ⅱ 水平较健康人显著升高,甚至可高达 3 倍^[11]。在反映骨、软骨和滑膜代谢水平的不同生物学标志物中,尿 CTX-Ⅱ 是预测关节软骨破坏进展的最好指标^[12-14]。不仅如此,还有研究发现 CTX-Ⅱ 水平高低还与关

* 基金项目:清华-裕元医学研究基金资料项目(2002400005-11)

1 首都体育学院,北京,100088

2 清华大学生命科学与医学研究院

作者简介:李蕊,女,硕士研究生

收稿日期:2006-09-26

节疼痛程度及关节间隙大小密切相关。同时, OA 患者的尿 CTX-II 水平升高还与软骨的快速破坏相关联, 这提示尿 CTX-II 水平越高, OA 的发病危险越大, 疾病进展的可能性也越大^[15]。CTX-II 作为唯一可同时在血、尿和滑液中检测的标志物, 其样品具有较长时间的稳定性, 对临床常规检测更有意义^[16], 因此逐渐成为研究 OA 生物学标志物的首选指标。

2.2 软骨寡聚基质蛋白(cartilage oligomeric matrix protein, COMP)

关节软骨细胞通过调节各种基质成分的合成与降解, 对维持整个关节软骨的功能起着非常重要的作用。COMP 是细胞外基质蛋白的一种, 属于凝血蛋白家族, 其作为软骨非胶原蛋白的主要成分, 是目前研究较为广泛、应用较多的软骨生物学标志物。COMP 除了由软骨细胞分泌外^[17], 滑膜细胞^[18]、肌腱成纤维细胞^[19]、成骨细胞以及血管平滑肌细胞^[20]也均可分泌少量 COMP。新近研究证实, OA 早期血清中 COMP 水平就可明显升高, 且类风湿性关节炎患者的血清中 COMP 水平低于 OA^[21]。在对转基因小鼠进行的动物实验中也发现, COMP mRNA 表达上调与 COMP 蛋白重新分布, 是 OA 病程中关节软骨退行性变早期阶段的特征性改变^[22]。OA 发展过程中, 关节滑液及血清中的 COMP 水平显著升高^[23], 且与 OA 的影像学进展呈正相关^[24]。Sharif 等^[25]对 115 例膝 OA 患者血清 COMP 水平进行测定后证实了这一点, 结果表明血清 COMP 水平与膝 OA 进行性关节损害是密切相关的, 并且此种损害的发展呈阶段性。由于 COMP 只在关节内高表达, 具有明显的组织特异性, 因此其作为关节软骨病损的标志物已越来越受到重视。

2.3 II 型胶原前肽(PⅡNP、PⅡCP)

OA 关节软骨破坏的同时伴随着软骨修复的过程。在所有的软骨胶原中, 只有 II 型胶原在合成时先形成高分子量前体, 前体中含有非螺旋结构的氨基端(N)和羧基端(C)前肽, 这两种前肽(PⅡNP、PⅡCP)裂解后进入体液, 因此测定其含量可反映关节软骨的合成代谢。有研究报道, 运用夹心 ELISA 方法检测出 OA 关节液中的 PⅡCP 浓度是正常水平的 3 倍, 且与 OA 的严重性及 BMI 独立相关^[26]。关节液中的 PⅡCP 浓度在早、中期升高, 在晚期下降^[26-28]。这可能是由于在 OA 的早期, 软骨破坏不明显, PⅡCP 水平升高不多; 而在中期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, 且关节软骨剩余的总量还较多, 此阶段 PⅡCP 水平最高; 到了晚期, 软骨基质破坏殆尽, 软骨细胞合成能力明显下降, PⅡCP 水平也随之下降。因此, 检测关节液中 PⅡCP 水平可反映软骨细胞在 OA 中合成胶原的能力, 并可间接反映 OA 进展及治疗后的效果。

此外, PⅡNP 以 PⅡANP 和 PⅡBNP 这两种变异体存在, 它们分别代表 II A 和 II B 胶原的产物。研究表明, PⅡANP 在 OA 患者血清中的水平低于对照组, 提示 OA 患者可能存在软骨修复机制的缺失^[29-30], 从而会加速 OA 的发展。另有研究显示, 尿中 CTX-II 水平升高也与关节的快速破坏相关^[15]。可见, 若将反映 II 型胶原合成与分解的两种生物学标志物联合应用研究, 就能够更有效地反映软骨胶原代谢的动态变化, 更准确地预测 OA 的进展。

2.4 软骨基质蛋白 YKL-40

YKL-40, 又称人软骨糖蛋白 39(HCpg-39), 属于壳质酶蛋白家族, 但不具有壳质酶活性^[31], 主要由关节软骨细胞、滑膜细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等产生, 其 mRNA 在软骨细胞及肝脏中表达强烈。免疫组织化学研究表明, YKL-40 染色主要集中在 OA 软骨的表层和中层的软骨细胞中, 而不是深层软骨细胞中, 且在正常人的软骨中几乎检测不到^[32]。尽管有关 YKL-40 的研究刚起步, 但已有不少的相关研究报道, 如 Conrozier 等^[33]的研究显示, 髌 OA 患者的血清 YKL-40 水平较正常人显著升高, 这提示血清 YKL-40 可能与 OA 密切相关^[34]。Takahashi 等^[35]在对 71 例膝 OA 女性患者的研究中发现, 有症状的 OA 患者血清 YKL-40 比无症状者的 YKL-40 水平增高更明显, 并进一步观察到 YKL-40 水平与影像学分级有关, 但与关节间隙无相关性。这提示血清的 YKL-40 水平可反映关节软骨的降解破坏程度, 还可反映局部疾病的活动性, 是关节破坏的一个局部诊断性标志物。

2.5 其他软骨生物学标志物

OA 发生时软骨组织的变性、破坏, 可导致 II 型胶原解螺旋, 暴露抗原决定簇^[36]。因此, 针对这些抗原决定簇制备抗体就可以直接研究胶原纤维的破坏情况。如 Col2-3/4cshort 抗体, 可特异性识别基质金属蛋白酶裂解的 II 型胶原 3/4 长度片段的 COOH 端; 而 Col2-3/4m 抗体则可以特异性识别变性的 II 型胶原。Col2-3/4c 能够反映早期 OA 关节软骨的代谢改变, 同时也说明了 MMPs 在关节软骨降解中的重要作用。除 II 型胶原外, 软骨基质蛋白多糖代谢产物硫酸角质素(keratan sulfate, KS)的含量, 也能反映软骨的破坏情况。目前已研制出针对硫酸角质素抗原决定簇的两类抗体: 5-D-4, AN9P1^[37]。Kong 等^[37]进行的有关血清和尿液中 OA 标志物一日变化情况的研究显示, KS-5D4 及尿 C2C 变化显著, 与 OA 的放射学改变关系密切。另外, 软骨可聚蛋白多糖上的 846 抗原(CS846)与关节间隙狭窄有关^[38], 提示此生物学标志物也可作为临床试验的指标。

3 小结

随着对分子生物学研究的不断深入, 有关 OA 的软骨生物学标志物越来越多地被发现和应用。软骨合成和分解的生物学标志物, 由于其拥有较强的特异性和敏感性, 因此对 OA 的早期诊断具有指导意义。同时, 软骨生物学标志物所具有的快速应答特性, 也为其在软骨保护药物的临床开发及监测疗效方面提供了可能。

尽管软骨生物学标志物能够反映 OA 时软骨的代谢情况, 但其表达水平仍然会受到年龄、性别、体重指数、其他骨病等诸多因素的影响。因此, 在将软骨生物学标志物用于临床实践时, 应考虑到这些影响因素。另外, 单一生物学标志物的敏感性和特异性相对较差, 若能将几项标志物指标联合使用, 则会在 OA 的早期诊断和防治过程中发挥更加准确、真实的作用。

参考文献

- [1] Ravaud P, Giraudeau B, Auleley GR, et al. Variability in knee radiographing: implication for definition of radiological

- progression in medial knee osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 1998, 57(10):624—629.
- [2] Bruyere O, Collette JH, Ethgen O, et al. Biochemical markers of bone and cartilage remodeling in prediction of longterm progression of knee osteoarthritis [J]. *J Rheumatol*, 2003, 30(5):1043—1050.
- [3] Bashir A, Gray ML, Burstein D. Gd-DTPA2- as a measure of cartilage degradation [J]. *Magn Reson Med*, 1996, 36(5):665—673.
- [4] Anastassiades T, Rees -Milton K. Biochemical markers for osteoarthritis: from the present to the future and back to the past [J]. *J Rheumatol*, 2005, 32(4):578—579.
- [5] Otterness IG, Swindell AC, Zimmerer RO, et al. An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis: segregation of the markers into clusters and distinguishing osteoarthritis at baseline [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8(3):180—185.
- [6] Matyas JR, Atley L, Ionescu M, et al. Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(2):543—552.
- [7] Squires GR, Okouneff A, Ionescu M, et al. The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(5):1261—1270.
- [8] Kraus, Virginia Byers. Biomarkers in osteoarthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2005, 17(5):641—646.
- [9] Billingham RC, Dahlberg L, Lonescu M, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenase in osteoarthritic articular cartilage [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(7):1534—1545.
- [10] Lonhman LS, Atley LM, Pietks TA, et al. The release of crosslinked peptides from type II collagen into human synovial fluid is increased soon after joint injury and in osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(11):3130—3139.
- [11] Jung M, Christgau S, Lukoschek M, et al. Increased urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis [J]. *Pathobiology*, 2004, 71(2):70—76.
- [12] 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: relations with disease activity and joint damage [J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(6):619—626.
- [13] Garnero P, Ayral X, Rousseau JC, et al. Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 44(10):2613—2624.
- [14] Garnero P, Convozier T, Christgau S, et al. Urinary type II collagen C-telopeptide levels are increased in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62(10):939—943.
- [15] Reijman M, Hazes JM, Bierma-Zeinstras SM, et al. A new marker for osteoarthritis: Cross-sectional and longitudinal approach [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(8):2471—2478.
- [16] Christgau S, Garnero P, Fledelius C, et al. Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation [J]. *Bone*, 2001, 29(3):209—215.
- [17] Dodge GR, Hawkins D, Boesler E, et al. Production of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by cultured human dermal and synovial fibroblasts [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998, 6(6):435—440.
- [18] Recklies AD, Baillargeon L, White C. Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(6):997—1006.
- [19] Smith RK, Zunino RK, Webbon PM, et al. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load [J]. *Matrix Biol*, 1997, 16(5):255—271.
- [20] Riessen R, Fenchel M, Chen H, et al. Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(1):47—54.
- [21] Wagner S, Hofstetter W, Chiquet M, et al. Early osteoarthritis changes of human femoral head cartilage subsequent to femoro-acetabular impingement [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2003, 11(7):508—518.
- [22] Salminen H, Perala M, Lorenzo P, et al. Up-regulation of cartilage oligomeric matrix protein at the onset of articular cartilage degeneration in a transgenic mouse model of osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(8):1742—1748.
- [23] Marti C, Neidhart M, Gerber T, et al. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP): the role of a non-collagen cartilage matrix protein as a marker of disease activity and joint destruction in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Z Rheumatol*, 1999, 58(2):79—87.
- [24] Vilim V, Olejarova M, Machacek S, et al. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10(9):707—713.
- [25] Sharif M, Kirwan JR, Elson CJ, et al. Suggestion of nonlinear or phasic progression of knee osteoarthritis based on measurements of serum cartilage oligomeric matrix protein levels over five years [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(8):2479—2488.
- [26] 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 [J]. *Ann Rheum Dis*, 1997, 56(8):500—503.
- [27] Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(12):2115—2125.
- [28] 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 [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10(11):870—878.
- [29] Rousseau JC, Zhu Y, Miossec P, et al. Serum levels of type IIA procollagen amino terminal propeptide (PIIANP) are decreased in patients with knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(6):440—447.
- [30] Rousseau JC, Sandell LJ, Delmas PD, et al. Development and clinical application in arthritis of a new immunoassay for serum type IIA procollagen NH2 propeptide [J]. *Methods Mol Med*, 2004, 101:25—37.
- [31] Johansen JS, Jensen HS, Price PA. A new biochemical marker for joint injury: analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid [J]. *Br J Rheumatol*, 1993, 32(11):949—955.
- [32] Volck B, Ostergaard K, Johansen JS, et al. The distribution of YKL-40 in osteoarthritic and normal human articular cartilage [J]. *Scand J Rheumatol*, 1999, 28(3):171—179.
- [33] Conrozier T, Carlier MC, Mathieu P, et al. Serum levels of YKL-40 and C-reactive protein in patients with hip osteoarthritis and healthy subjects: cross sectional study [J]. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59(10):828—831.
- [34] Garnero P, Mazieres BM, Gueguen A, et al. Cross-sectional association of 10 molecular markers of bone, cartilage, and synovium with disease activity and radiological joint damage in patients with hip osteoarthritis: the ECHODIAH cohort [J]. *J Rheumatol*, 2005, 32(4):697—703.
- [35] Takahashi M, Naito K, Abe M, et al. Relationship between radiographic grading of osteoarthritis and the biochemical markers for arthritis in knee osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(3):208—212.
- [36] Downs JT, Lane CL, Nestor NB, et al. Analysis of collagenase-cleavage of type II collagen using a neopeptide ELISA [J]. *J Immunol Methods*, 2001, 247(1-2):25—34.
- [37] Kong SY, Stabler TV, Criscione LG, et al. Diurnal variation of serum and urine biomarkers in patients with radiographic knee osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(8):2496—2504.
- [38] Mazzuca SA, Poole AR, Brandt KD, et al. Associations between joint space narrowing and molecular markers of collagen and proteoglycan turnover in patients with knee osteoarthritis [J]. *J Rheumatol*, 2006, 33(6):1147—1151.