

I型胶原C末端肽的检测方法和临床运用

冯晓丽 张忠辉

I型胶原是人体最丰富的胶原蛋白形式,是骨中唯一的胶原成分,占骨基质的90%以上。在骨组织骨基质的不断重建中,I型胶原被降解,小片段释放入血,部分出现于尿液中。测定血、尿中这些小片段的含量和变化可评价骨吸收状态,既有助于代谢性骨病的诊断,也能监测和评价抗骨吸收药物的疗效。

I型胶原C末端肽(C-terminal telopeptides of type I collagen, CTX),又称为 Crosslaps,是这些小肽片段中的一种。Bonde 于1994年建立 CTX 的检测方法^[1],并率先应用它作为骨吸收的指标。同传统的骨吸收指标尿羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hpr)相比,CTX 的检测有几个突出优点:①只来源于成熟胶原纤维,而不来源于新合成胶原;②在体内不被降解,也不被重新利用,能直接反映胶原纤维的降解情况;③胶原饮食对测量结果无影响;④特异性强,灵敏;⑤检测方法简便。因而 CTX 的检测正取代尿羟脯氨酸被广泛地应用于临床和科研。本文就其检测方法和临床应用作一综述。

1 生化特点

完整的 I 型胶原 C 末端肽含有 26 个氨基酸,其第 15~22 个氨基酸依次为谷-赖-丙-组-天冬-甘-甘-精氨酸(EKAHDGGR),这一部分对于 I 型胶原 $\alpha_1(I)$ 链羧基末端具特异性,称为 8 氨基酸序列^[1](8AA)。在体内,8AA 中的天冬-甘氨酸残基肽链之间自然地有由 α 位向 β 位转化的趋势,从而形成 β 异构 8AA (EKAH- β -DGGR),而且这种 β 异构形式与蛋白老化有关,其含量随骨中 I 型胶原分子老化的增加而

增加^[2]。8AA 的第二个氨基酸赖氨酸参与胶原分子间交联—吡啶并啉(Pyr)和脱氧吡啶并啉(D-Pyr)交联的形成。由于 8AA 序列含分子间交联的这一重要区域,交联残基的接近和这些分子的紧密结构可保护含有这一序列的肽免受肾的进一步降解,因此由成熟 I 型胶原部分降解产生的 CTX 也可以在尿中检出^[1]。CTX 在尿中的排泄有昼夜节律改变,峰值在凌晨及下午最低^[3]。血和尿中 CTX 稳定,在 20℃ 无任何防腐剂保存 7 天,或重复冻融标本 5 次,所测浓度无明显变化^[1,6]。

2 检测方法

血清和尿中的 CTX 都能被测定。1994 年, Bondé^[1] 首创尿 CTX 的酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),称为 Crosslaps ELISA。该法用多克隆抗体测定,微孔板预先以合成 EKAHDGGR 包被。测定时,微孔中加入标准品或未加样品,然后加入兔抗 8 氨基酸序列多克隆抗体,室温孵育 1 小时。洗孔,加入过氧化物酶结合山羊抗兔 IgG,室温再孵育微孔板 1 小时。二次洗孔后,加底物溶液,即等量混合的过氧化氢和四甲基联苯胺,孵育 15 分钟,加磷酸终止反应,酶标仪测波长 450 nm 条件下的吸光度。在半对数曲线图上,根据已知标准品浓度与其各自吸光度为横纵坐标建立标准曲线,而未知样品的含量通过标准曲线内插法即可得出。为减少尿量与体型的影响,最后结果需以尿肌酐校正。此法批内和总的变异系数分别为 5.3% 和 6.6%,测定范围 0.5~10.5 mg/L,检测限为 0.2 mg/L。由于该 CTX 检测技术简便易行,结果精确,所需时间不超过 3 小时,故很快应用于科研和临床。

1997年, Fledelius^[1]建立测定尿CTX的另一种酶联免疫吸附法——竞争性一步酶联免疫吸附法。该法用抗合成8AA单克隆抗体测定,以辣根过氧化物酶直接标记单抗。检测时,单抗与样品一起加入到固定有8AA的微孔中,孵育1小时。洗孔后再依次加入底物溶液、终止液后测吸光度。样品中CTX含量与吸光度成反比。此种ELISA,检测范围为200~7000mg/L,检测限为25 mg/L,批内批间变异系数分别为5.5%、8.0%。虽然Fledelius后来的研究表明,以上两种ELISA测尿中CTX有区别,前者测的是含有 β 异构8AA的CTX,而后者是含非 β 异构8AA的CTX^[2],但这两者的值高度相关($r=0.93, n=158$),而后者所需时间更短^[1]。

尿中CTX还可用于RIA测定。这个测定用的是与来自I型胶原C末端肽的非 β 异构8AA序列起反应的单克隆抗体。测定前需以抗生物素链菌素包被试管,用¹²⁵I标记抗8AA序列单抗作示踪剂。测定时,试管内加入生物素结合的EKAHDGGR,在室温下孵育15分钟,以使生物素结合的EKAHDGGR结合到不动的抗生物素链菌素。试管用缓冲液清洗后,依次加入样品、示踪剂,同样条件下再孵育3小时。反应结束后,清洗试管,每个管的放射性用 γ -计数器计数60秒。样本计数与CTX存在量成反比。该法测量范围为200~13500 μ g/L,检测限是40 μ g/L,批内批间变异系数平均为4.4%、5.3%。RIA法与ELISA法测定的CTX值高度相关($r=0.94, n=678$)^[3]。

血清中的CTX应用ELISA方法测定,所用的抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体。如果用多抗,检测过程与用多抗测尿CTX的ELISA过程类似,只是所加样品为血清而非尿液。此ELISA同样检测的是 β 异构形式的8AA序列,与非异构合成的8AA的交叉反应不到0.2%。批内批间变异系数分别为6.7%和9.2%,检测范围从25 ng/ml到500 ng/ml,检测限为10 ng/ml^[4]。如果用单克隆抗体测定血清CTX,则采用ELISA中的双抗体

夹心法,即将筛选出的具有相似特异性和高亲和力的两种单抗分别与生物素和过氧化物酶结合,然后将它们的混合液与未知样品一起加入预先包被有抗生物素链菌素的试管内,在20℃下孵育2小时,以形成抗生物素链菌素-生物素-单抗₁-CTX-单抗₂-过氧化物酶复合物。用缓冲液洗管5次,加四甲基联苯胺,暗处孵育15分钟,加硫酸终止反应,用酶标仪在450 nm处测其吸光度,吸光度越高,血清中CTX的含量越高^[5]。此一步ELISA法,测定的是含有通过赖氨酸残基形成共价交联的双链 β 异构8AA序列的分子,批内和批间的差异都小于8%,测定范围500~16000 pmol/L,检测限80 pmol/L。

以上各种方法,仍以Crosslaps ELISA最常用,血清CTX的ELISA试剂盒在商业上也可买到。在测定CTX和评定结果时,需注意以下共同问题:①尿CTX的排出有明显昼夜节律,一般夜间比白天高,故在临床应用中,标本收集的时间对测定结果有影响。有报道认为,夜间(11 pm~7 am)和第一次空腹晨尿标本比24小时尿更能反应骨吸收情况,且收集方便,容易实行,建议作为收集标本的标准^[3]。②测尿中CTX,不管用什么方法,最后结果都需以尿肌酐校正,以减少尿量和体型的影响,这就会受诸如身体肌肉群的大小和肌肉代谢紊乱等因素的影响,而且由于需同时测尿肌酐,使最后结果误差增大。③血清CTX与尿CTX相比,有昼夜节律较小及不需测尿肌酐两大优势^[6],但是受肾功能影响。肾功能不全时,血清CTX的值可能升高。

3 临床应用

由8氨酸序列组成的多肽,只存在于I型胶原C末端肽,所以与其他胶原无交叉反应。Bond研究表明,用ELISA测尿中CTX与高效液相色谱法(HPLC)测尿D-Pyr的结果有良好相关性($r=0.83, n=214$),与另一骨吸收指标Hpr也相关($r=0.78, n=121$)^[1]。Garnero发现,尿CTX的排出在男性与年龄无显著相关。

而女性,CTX值随年龄的增加而增高($r=0.25, P<0.002$),在50岁后显著增高,且这种高水平CTX值从60岁维持到90岁,这与正常妇女骨转换和骨吸收率与年龄相关的增高是一致的^[9]。说明CTX的检测能反映体内骨吸收情况,可作为骨吸收敏感而特异的指标。

CTX应用于临床,主要是判断代谢性骨病的骨吸收状态,监测和评价抗骨吸收药物的疗效。如绝经使健康妇女尿CTX增高至少70%,经12个月激素替代治疗后则下降达60.7%,尿CTX的这种变化幅度较骨钙素(BGP)、Hpr、Pyr和D-Pyr明显,说明尿CTX是研究雌激素缺乏所致骨吸收更为敏感的指标^[10]。骨量丢失率是骨质疏松的危险预告因子之一,可通过骨量测定获得。Bond发现,尿CTX含量与单光子密度仪所测前臂的骨量丢失率相关系数为-0.61,高于其他骨转换指标。因此,尿CTX浓度可用来判断骨丢失率。如果骨量丢失 $>3\%$ /年被定为危险因素,则尿CTX 600 mg/mol Cr作为分界点具有诊断73%的敏感性和79%的特异性,是判断绝经后骨质疏松的最有用筛选参数^[10]。在一些雌激素急性缺乏研究中,如使用促性腺激素释放激素类似物(GnRHa),尿CTX也明显升高($n=68, P<0.01$),与腰椎骨密度变化负相关($r=-0.651$)的程度也高于其他指标^[11]。Paget病,是一种高骨转换率疾病,患者的尿CTX的排出比年龄匹配的对照者增高明显($n=32, P<0.001$),与尿Hpr排出高度相关($r=0.91, P<0.001$)。经三天静脉使用特异而有效的骨吸收抑制剂二磷酸盐 Pamidronate后,CTX下降了71%,比尿Hpr下降幅度明显(17%, $P<0.001$),说明CTX的测定更能直接判断骨吸收率^[9]。在大多数甲亢患者中,尿CTX排出增加($n=27, P<0.001$),并与血清甲状腺激素 T_3 、 T_4 水平相关($r=0.5$ 与 $0.52, P<0.02$ 和 0.01)。经一个月甲亢平和放射性碘治疗后,尿CTX恢复正常范围。揭示这一指标的测定有助于评价甲亢相关骨疾病的骨吸收状态,并监测这些病人的疗效^[9]。肿瘤骨转移引起

恶性高钙血症,患者的尿CTX在治疗前比正常对照升高5倍,二磷酸盐治疗后恢复正常,表现出比尿吡啶并啉交联、尿钙、尿Hpr更大的变化幅度^[12]。此外,尿CTX在原发性甲旁亢^[4]、类风湿关节炎^[13]等代谢性骨病患者中也明显升高。

血清CTX与尿CTX值高度相关($r=0.856, n=638$)^[7],而且与尿CTX相比,有昼夜节律较小及不需测尿肌酐两大优势,因此同样为骨吸收特异而敏感的指标。Christgau研究表明,在对绝经后妇女各种抗骨吸收治疗效果观察及BMD变化评价中,血清CTX与尿CTX变化相似,他们因此认为血清CTX的一步ELISA法在骨质疏松抗吸收治疗随访中的作用至少与尿CTX相当^[11]。在Paget病、原发性甲旁亢等代谢性疾病中,血清CTX同样也明显增加^[6]。

参 考 文 献

- 1 Bone M, Qvist P, Fledelius C, et al. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem*, 1994, 40(11): 2022-2025.
- 2 Fledelius C, Johnsen A, Cloos P, et al. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. *J Biol Chem*, 1997, 272(15): 9755-9763.
- 3 Ju HSJ, Leung S, Brown B, et al. Comparison of analytical performance and biological variability of three bone resorption assays. *Clin Chem*, 1997, 43(9): 1570-1576.
- 4 Fledelius C, Kolding I, Qvist P, et al. Development of a monoclonal antibody to urinary degradation products from the C-Terminal telopeptide alpha 1 chain of type I collagen. Application in an enzyme immunoassay and comparison to crosslaps ELISA. *Scand J Clin Lab Invest*, 1997, 57(1): 73-83.
- 5 Bonde M, Fledelius C, Qvist P, et al. Coated-tube radioimmunoassay for C-telopeptides of type I collagen to assess bone resorption. *Clin Chem*, 1996, 42(10): 1639-1644.
- 6 Bonde M, Garnero P, Fledelius C, et al. Measurement of bone degradation products in serum using antibodies reactive with an isomeric form of an 8 amino acid sequence of the C-telopeptide of type I collagen. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(7): 1028-1034.

(下转第19页)

作者在电镜观察中发现,加 OGP 培养的三组细胞粗面内质网比对照组丰富,是代谢旺盛的表现,同时光镜观察用药组的细胞数目明显多于对照组,且有细胞结节产生^[9],也证实了 OGP 具有促进成骨细胞样细胞分泌促成骨成份的作用。因此,OGP 能调节成骨细胞样细胞的成骨作用,促进骨形成。它在治疗骨折,骨质疏松,骨植入和骨髓移植方面的作用,尚在研究起步阶段,有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Greenberg Z, Chorev M, Muhlrad A, et al. Structural and functional characterization of osteogenic growth peptide from human serum: identity with rat and mouse homologs. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80: 2330.
- 2 蔡武城, 李碧羽, 李玉民, 等. 生物化学实验技术教程. 上海: 复旦大学出版社, 1983, 184-186.
- 3 Amsel S, Maniatis A, Tavassoli M, et al. The significance of intramedullary cancellous bone formation in the repair of bone marrow tissue. *Anat Rec*, 1969, 164(1): 101.
- 4 Bab I, Gazit D, Muhlrad A, et al. Regenerating bone marrow produces a potent growth-promoting activity to osteogenic cell. *Endocrinology*, 1988, 123: 345.
- 5 Bab I, Gazit D, Chorev M, et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. *EMBO J*, 1992, 11: 1867.
- 6 Greenberg Z, Gavish H, Muhlrad A, et al. Isolation of osteogenic growth peptide from osteoblastic MC3T3 E1 cell culture and demonstration of osteogenic growth peptide binding proteins. *J Cell Biochem*, 1997, 65(3): 359-367.
- 7 Robinson D, Bab I, Nevo Z. Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 690.
- 8 Kahn A, Gibbon R, Perkins S, et al. Age-related bone loss. *Clin Orthop*, 1955, 313: 69-75.
- 9 饶寒敏, 王智兴, 李群, 等. 成骨生长肽对体外培养成骨细胞样细胞的促成骨作用. 待发表.