

Ⅱ型胶原酶联免疫方法的建立及对骨性关节炎研究的应用

赵丹慧 姚力 周乙雄 尹大庆 李成文

【摘要】 目的 建立Ⅱ型胶原酶联免疫测定方法学,为临床骨性关节炎(OA)的诊断及预后评价提供灵敏的检测手段。方法 建立Ⅱ型胶原酶联免疫夹心测定法,在动物实验的基础上对24例正常人及65例OA患者进行分组血清学检测,并与蛋白多糖的血清学检测进行比较。结果 Ⅱ型胶原与蛋白多糖高度相关,OA患者血清中两种指标明显高于正常人($P < 0.01$, $P < 0.05$);X光片显示OA患者B组、C组Ⅱ型胶原明显增高($P < 0.05$);截骨术后半年及1年Ⅱ型胶原明显降低($P < 0.05$)。结论 Ⅱ型胶原可较灵敏的反映患者的软骨代谢情况。

【关键词】 Ⅱ型胶原; 夹心ELISA; 骨性关节炎; 蛋白多糖

Application of enzyme linked immunosorbent assay for type Ⅱ collagens of osteoarthritis study ZHAO DanHui, YAO Li, ZHOU Yixiong, et al. Beijing Ji Shui Tan Hospital, Beijing 100035, China

【Abstract】 Objective To develop the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) of type Ⅱ collagens and study clinical significance of type Ⅱ collagens in patients with osteoarthritis(OA). **Methods** The sandwich ELISA method for type Ⅱ collagens was develop, serum levels of type Ⅱ collagens in OA patients and control group were acsayed, and compared with the levels of serum proteoglycans. **Results** There is a high correlation between type Ⅱ collagens and proteoglycans. Serum levels of type Ⅱ collagens and proteoglycans were higher in OA patients ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Type Ⅱ collagen levels were higher ($P < 0.01$) and proteoglycan levels were lower ($P < 0.01$) in OA animals. X rays showed that type Ⅱ collagen levels in groups B and C were higher ($P < 0.05$). Type Ⅱ collagen decreased ($P < 0.05$) after tibial osteotomy. **Conclusion** Type Ⅱ collagens and proteoglycans can reflect the metabolism of cartilage in OA patients. The type Ⅱ collagens are sensitive.

【Key words】 Type Ⅱ collagen; Sandwich enzyme linked immunosorbent assay; Osteoarthritis; Proteoglycans

Ⅱ型胶原及蛋白多糖两种大分子蛋白是构成关节软骨的主要成分。骨性关节炎(简称OA)是一种退行性关节疾病,特征是关节软骨的广泛降解,在分子水平上表现为Ⅱ型胶原的断裂,蛋白多糖的丢失。目前对OA早期诊断,软骨降解的变化规律及关节炎术后效果的判断等许多方面,国内外均缺乏灵敏的检测指标^[1]。本研究自行建立了Ⅱ型胶原酶联夹心检测方法,在动物实验的基础上应用于临床,对65例手术前后OA患者血中的Ⅱ型胶原及蛋白多糖两种软骨代谢指标进行了比较研究。结果证明Ⅱ型胶

原可以较灵敏的反映OA术后患者的软骨代谢情况。

材料和方法

1. 实验动物

选用Hartly雌性豚鼠30只,按出生月龄分为:1个月(对照)组;3个月(早期OA)组、7个月(晚期OA)组。每组10只,在分组月龄2~7d的动物股动脉中抽取全血,离心后,血清放-20℃冰箱保存。3组动物取膝关节标本,经电镜形态学检查证实,1个月组为正常关节,3个月及7个月组分别为早期,晚期OA组^[2]。

2. 临床研究

(1)OA患者:65例,其中男性12例,女性53例;根据患者X光片的改变由轻到重分组为A、B、C、D

基金项目:本课题受国家自然科学基金资助(39500167);本方法已申报国家发明专利,申请号:00130134.9

作者单位:100035 北京积水潭医院(Email: zhaodanhu@mail.people.com.cn)

4个组。患者平均年龄为(60±8)岁。

(2)正常对照组:24例,男性11例,女性13例;平均年龄为65岁;标准:双膝既往无关节病史,查体正常,无代谢病史。

3. 选用试剂及仪器

(1)ELISA试剂:纯化鼠抗人II型胶原II-4CII单克隆抗体(购自日本富士公司);酶标羊抗鼠IgG由本实验室自行制备,TMB(四甲基联苯胺)、Tween 20购自Sigma公司,酶标板为美国Coster产品。

(2)仪器:酶联仪及洗板机为美国伯乐公司产品。

4. 方法

(1)建立II型胶原ELISA夹心测定法,测定患者及实验动物血清中II型胶原含量。方法:间接夹心法:抗人II胶原单抗II-4CII 2 μg/mg包板→加入兔血清(免疫沉淀去除交叉反应的II型胶原)封板→将人及动物样品及质控血清稀释50倍取100 μl加入板中孵育2h→再加入同一抗体3 μg/ml孵育0.5h→加入酶标二抗1:1000稀释孵育0.5h→加入底物TMB→加入终止液→450 nm测定。

(2)采用建立的方法对各组样品及实验动物模型进行II型胶原血清学测定。

(3)测定各组样品及实验动物模型血清中蛋白多糖含量。选用比利时Biosource公司生产的蛋白多糖试剂盒,蛋白多糖为抗人G1区单抗,免疫化学原理为间接夹心法。

5. 统计学处理:采用DUNNETT t检验。

结果

1. II型胶原ELISA方法学的评价

重复性:批内批间差分别为6.3%、9.8%;敏感性:血清样品均经50倍稀释,3组OA豚鼠实验动物模型的结果在OD 450:0.468~2.160之间;正常人范围OD 450:1.61~2.48;空白对照OD 450在0.1~0.2之间。

特异性:与I型胶原无交叉反应(ELISA法)。

2. 对实验动物豚鼠OA模型的研究结果

豚鼠血清II型胶原3个月起明显增高:1个月组与3个月及7个月组比较差异有非常显著性(P<0.01);3个月组与7个月组比较差异无显著性(P>0.05)。血清蛋白聚糖随年龄增长下降:1个月组与3个月组和7个月组比较均差异有非常显著性(P<0.01);7个月组与3个月组比较差异也有非常显著性(P<0.01),见表1。

3. OA患者的研究结果

(1)将正常人与OA患者的II型胶原与蛋白多糖结果做相关分析,相关系数为0.3, P<0.01。证明二者高度相关。

(2)对照组与临床实验组两种指标的比较:临床实验组OA患者的II型胶原及蛋白多糖均明显高于对照组(P<0.01, P<0.05),见表2。

表1 OA模型豚鼠血清II型胶原及蛋白多糖浓度的变化

组别(月)	II型胶原(A)	蛋白多糖(μg·ml ⁻¹)
1	0.742±0.16	5.008±0.81
3	1.306±0.55*	1.191±0.39*
7	1.193±0.37*	0.656±0.18*

注:与1个月对照组比较:*P<0.01

表2 OA患者与对照组的II型胶原及蛋白多糖含量

组别	例数(n)	II型胶原(A)	蛋白多糖(ng·ml ⁻¹)
对照组	24	2.48±0.87	172.6±30.4
OA患者	65	3.37±1.00**	201.6±60.8*

注:与正常对照组比较:*P<0.05,**P<0.01

(3)依据X光片将临床实验组分A(n=9)、B(n=12)、C(n=33)、D(n=11)组并与正常对照组比较;两种指标均在B组、C组明显高于正常(P<0.05);A、D组与正常对照组差异无显著性(图1、2)。

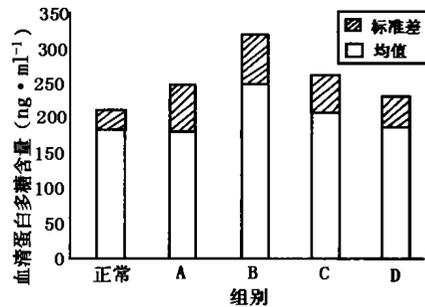


图1 正常人及OA患者血清蛋白多糖含量

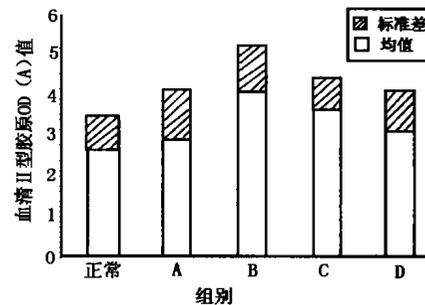


图2 正常人及OA患者血清II型胶原OD值

(4)晚期临床实验组手术前后两种指标的比较:

表3 不同术式 OA 患者手术前后血清中两种指标的变化

术手时间 (年)	n	截骨术		全膝置换			关节探查		
		II型胶原	蛋白多糖	n	II型胶原	蛋白多糖	n	II型胶原	蛋白多糖
手术前	21	3.75 ± 0.95	218.60 ± 69.10	17	3.47 ± 0.84	217.90 ± 54.7	7	2.86 ± 1.45	216.90 ± 81.40
0.5	21	3.31 ± 0.81*	211.33 ± 45.95	17	3.11 ± 0.98	188.17 ± 61.14*	7	3.31 ± 1.10	188.02 ± 34.64
1	11	3.39 ± 0.86*	198.70 ± 60.50	—	—	—	—	—	—

注:与手术前比:* $P < 0.05$; II型胶原单位为 A, 蛋白多糖单位为 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$

截骨术组术前与术后(半年及1年) II型胶原均明显下降($P < 0.05$), 蛋白多糖无明显差异; 全膝置换组术前与术后半年蛋白多糖明显降低($P < 0.05$), II型胶原则无明显差异; 关节探查组术前与术后两种指标均无明显差异(表3)。

讨 论

关节软骨的95%为 II型胶原及蛋白多糖, 90%的 II型胶原构成了软骨的网状支架, 5%的蛋白多糖附着在支架上。当骨性关节炎发生时, II型胶原及蛋白多糖均发生降解, 降解产物释放入血, 血中浓度发生变化。以前的研究较多的报道了 OA 患者关节液及血清中蛋白多糖含量的变化^[3,4], 对血清中 II型胶原浓度的变化尚无报道。

本研究自行建立了 II型胶原酶联测定方法。在酶联免疫分析中, 夹心测定法通常是选用同一抗原不同株的单克隆抗体对样品进行测定, 本研究使用一株抗人 II型胶原单抗建立了检测方法, 并使其具有较高的稳定性、灵敏度、特异性及符合标准的本底($\text{OD} 450 < 0.2$)。这一方法证明: 对 II型胶原这种抗原决定簇具有高度重复性、并在血清中具有较高含量的大分子蛋白, 在仅有一株单抗的情况下, 可以使用一株抗体进行间接法测定, 并可达到较高的灵敏度。

应用本方法在动物实验的基础上研究了正常人、OA 患者血清中 II型胶原的变化规律。与进口的蛋白多糖试剂盒相比, II型胶原能更灵敏的反映 OA 病变情况, 特别是对术后效果的判断有应用价值, 可作为改进治疗方法的依据, 是今后 OA 研究中的有效指标。

本研究结果显示 OA 患者的 II型胶原及蛋白多糖含量均明显高于对照组, 其中以 II型胶原的变化更为明显($P < 0.01$)。从术前 OA 患者的分组情况来看, X光片改变处于中期的 B组、C组两种指标均明显高于正常, 而早期的 A组及晚期的 D组则与正常组均无显著差异。以往的研究较多报道的是关于蛋

白多糖的研究: Lohmander^[5]的研究证明在 OA 早期阶段关节液中蛋白多糖浓度明显增加, 而后逐渐下降, 这与我们对血清学的研究结果是一致的。Dahlberg等^[6]研究了 X光片尚无改变, 而关节镜下表现出软骨退变患者的关节液中发现其蛋白多糖的含量明显高于正常对照。我们的结果证实了在 OA 研究过程中的一个重要现象: 即 II型胶原血清学的变化可以反映骨关节炎的变化规律, 还证实 II型胶原指标变化的趋势与蛋白多糖是一致的。

Odenbing等^[7]于1991年研究了截骨术前后关节液中蛋白多糖的变化, 发现在术后3个月高于术前, 而后逐渐下降, 两年后达正常水平。我们对3种不同手术方式, 术前与术后半年、1年检测的结果证明, II型胶原及蛋白多糖分别可以证明截骨术及全膝置换术后的好转情况, 特别是 II型胶原反映截骨术的效果更为灵敏: 术后半年及1年的结果与术前比均差异有显著性(表3)。

许多学者使用豚鼠做为原发性 OA 模型的研究仅报道了形态学的变化^[8,9], 本研究同时报道了 OA 动物模型体内 II型胶原及蛋白多糖两种指标的变化情况, 发现豚鼠 II型胶原的变化规律与人类相似, 即先明显高于正常, 之后有轻微下降; 而蛋白多糖的变化则与人类的 OA 不同, 呈持续下降的趋势, 这与正常人蛋白多糖的变化规律是一致的。这一结果提示研究豚鼠 OA 模型时, 软骨代谢指标以 II型胶原更为合适。本实验中用抗人 II型胶原单抗测定豚鼠抗原, 得出了较好的结果, 证明人与豚鼠的上述抗原具有共同性抗原的交叉反应, 为今后进行豚鼠 OA 模型的软骨代谢指标研究提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 Poole AR. Immunochemical markers of joint inflammation, skeletal damage and repair; where are we now? *Ann Rheum Dis*, 1994, 53:3-5.
- 2 赵丹慧, 张艳, 薛延, 等. 豚鼠原发性骨性关节炎超微结构及生化改变的动态观察. *中华手外科杂志*, 1999, 15:180-182.

(下转第34页)

调节因子之一。是骨生成的强刺激因子,也对破骨细胞的前体细胞分化为破骨细胞有促进作用,其对骨形成和骨吸收均有增加, Mochizuki 将破骨细胞与一定剂量的 IGF-1 共同培养发现,破骨细胞的活性增强,抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色阳性的多核细胞数目增加,提示破骨细胞形成增加。用脾制备的无骨基质的血胚细胞经培养后,在 1, 25-(OH)₂D₃ 及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 存在的情况下, IGF-1 可使 TRAP 阳性的细胞数目增多,表明 IGF-1 对破骨细胞的前体细胞分化为破骨细胞有促进作用。多种激素及细胞因子可影响破骨细胞形成及功能,研究表明其中大多数可调节 OPG、RANKL 表达,对骨吸收的影响可通过调节 OPG、RANKL 表达来实现。

本实验首次研究 rhIGF-1 对 OPG、RANKL 的调节作用,表明 rhIGF-1 上调成骨细胞 OPG、RANKL 基因 mRNA 的表达,说明 rhIGF-1 促进成骨的作用可能也通过调节 OPG、RANKL 来实现的,一定剂量的 rhIGF-1 促进成骨的作用可能也通过调节 OPG、RANKL 来实现的,一定剂量的 rhIGF-1 使成骨与破骨形成新的平衡,骨形成大于骨吸收,使骨重建。低剂量的 rhIGF-1 增强细胞的增殖活性和 OPG、RANKL 基因 mRNA 的表达。高剂量的 rhIGF-1 起抑制作用。这符合细胞因子在低浓度下起刺激作用,而在高浓度下起抑制作用的普遍规律^[10]。

GM-CSF 和 OPGL 是破骨细胞生成必须的而且仅是仅有两种因子,但 OPGL-RANK-OPG^[11,12] 环路则是最主要的调节破骨细胞分化 and 功能的系统,在骨微环境中其他细胞因子都是通过影响这一环路而起作用的。因此,研究细胞因子等对 OPGL-RANK-OPG 环路的影响和关系将为进一步明确骨质疏松的发生机理及治疗开拓新的领域。OPG、RANKL 对骨形成和骨吸收的重要调节作用,已成为骨科学、口腔科

学、药理学和免疫学等领域的研究热点。

参 考 文 献

- 1 Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, et al. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol*, 2002, 169:3353-3362.
- 2 Tauda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234:137-142.
- 3 Morony S, Capparelli C, Lee R, et al. A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1 β , TNF- α , PTH, PTHrP and 1, 25 (OH)₂D₃. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 1478-1485.
- 4 薛庆善, 主编. 体外培养的原理与技术. 北京: 科学出版社, 2001. 485-486.
- 5 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990. 42.
- 6 Zofkora I, Kancheva RL, Bendlova B. Effect of 1, 25(OH)₂ Vitamin D₃ on circulation insulinlike growth factor- I and beta2 micro globulin in patients with osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 1997, 60:236-239.
- 7 Wakisaka A, Tanaka H, Barnes J, et al. Effect of locally infused IGF-1 on femoral gene expression and bone turnover activity in old rats. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:13-19.
- 8 Mohan S, Baylin DJ. Serum insulin-like growth factor binding protein IGF-BP-4 and IGFBP-5 levels in aging and age-associated diseases. *Endocrine*, 1997, 7:87-91.
- 9 Rogers A, Saleh G, Hannon RA, et al. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87:4470-4475.
- 10 杨贵贞, 主编. 免疫生物工程纲要与技术. 长春: 吉林科技出版社出版, 1991. 28-73.
- 11 刘继中, 纪宗民, 陈苏民. OCIF/OPG 的结构与功能. *细胞与免疫学杂志*, 2001, 17(3):61-63.
- 12 Stejskal D, Zurek M, Bartek J, et al. Osteoprotegerin and bone density. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2001, 145 (2):75-76.

(收稿日期:2002-10-21)