Published online www. wanfangdate. com. cn doi:10.3969/j. issn. 1006-7108. 2015. 11.010

·论著·

人尿液中 CTX－Ⅱ与 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度对膝关节骨关节炎诊断价值的研究

区权利[1] 辛林伟[2*] 王锐英[2] 唐际存[2] 陈蕾[1]
1. 桂林医学院附属医院,桂林 541001
2. 桂林医学院附属医院骨科,桂林 541001

中图分类号: R684.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006-7108(2015) 11-1342-05

摘要: **目的** 探讨膝关节骨关节炎(KOA)患者尿液中 CTX－Ⅱ与 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度与其病变程度的关系。**方法** 收集 82 例 KOA 组和 20 例对照组的尿液标本及膝关节正侧位影像学资料,采用 Kellgren-Lawrence 放射学分级标准对 KOA 组的影像学表现分级,分为Ⅰ级组、Ⅱ级组、Ⅲ级组及Ⅳ级组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测尿液中 CTX-Ⅱ、ICP-AES 测定 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度。**结果** KOA 组尿液中 CTX-Ⅱ与 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度高于对照组($P<0.001$)。CTX－Ⅱ水平:Ⅳ组>Ⅲ组>Ⅱ组>Ⅰ组和对照组($P=0.000$)。Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度:Ⅳ组、Ⅲ组、Ⅱ组、Ⅰ组>对照组($P=0.000$)。**结论** CTX-Ⅱ升高水平与 KOA 的影像学分级平行,两者呈高度正相关性。Zn^{2+}、Ca^{2+} 升高水平与 KOA 的影像学分级并不平行。CTX-Ⅱ可作为区分 KOA 严重程度的标志物,但其作为早期诊断的价值有限,但与 Zn^{2+}、Ca^{2+} 联合有望成为 KOA 的早期诊断指标。

关键词: 膝关节骨关节炎;尿液;Ⅱ型胶原;CTX-Ⅱ;Zn^{2+};Ca^{2+}

The study of the effect of type II collagen and Zn^{2+}, Ca^{2+} in the human urine on the diagnosis of knee osteoarthritis

OU Quanli[1], XIN Linwei[2], WANG Ruiying[2], TANG Jicun[2], CHEN Lei[1]
1. The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China
2. Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China
Corresponding author: XIN Linwei, Email: xinlinwei@ hotmail. com

Abstract: **Objective** To discuss the relationship between the concentration of CTX-II, Zn^{2+}, and Ca^{2+} in urine and the severity of knee osteoarthritis (KOA). **Methods** Eighty-two patients with KOA were chosen as KOA group, and twenty healthy volunteers were selected as control group. Urine and anteroposterior and lateral position X-ray films of the knee joint were collected. The images were classified according to Kellgren-Lawrence radiographic grading criterion. The patients were divided into grade I group, grade II group, grade III group, and grade IV group. The concentration of CTX-II in the urine was detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The concentrations of Zn^{2+} and Ca^{2+} in urine were detected using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). **Results** The concentrations of CTX-II, Zn^{2+}, and Ca^{2+} in KOA group were significantly higher than those in control group ($P<0.001$), in a grade-dependent manner (group IV > group III > group II > group I > control group. **Conclusion** The increase of CTX-II is paralleled with the grade in X-ray image. They are highly correlated. The increase of Zn^{2+} and Ca^{2+} is not paralleled with the grade in X-ray image. CTX-II is a marker for the progress of KOA, but it has little help for early diagnosis for KOA. However, CTX-II combines with Zn^{2+} and Ca^{2+} may be helpful for the early diagnosis for KOA.

Key words: Knee osteoarthritis; Urine; Collagen type II; CTX-II; Zn^{2+}; Ca^{2+}

膝关节骨关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)是中老年人的常见病,根据流行病学调查,我国 50 岁以上的人群中,50% 患有骨关节病;65 岁以上的人群中 80% 女性和 70% 男性患有此病[1]。目前诊断 KOA 多依据临床症状和影像学,这些手段往往不能

基金项目: 广西桂林市科学研究与技术开发计划项目基金资助(30130120-5)

* 通讯作者: 辛林伟,Email:xinlinwei@ hotmail. com

万方数据

及早作出诊断而导致严重后果。这与中国的国情有着一定关系，因为看病花费大，很多老百姓都是到了很严重的情况下才来看病。本研究寻求一条有利于及时干预疾病并且简便、经济、有效的诊断方法，摆脱大型影像设备和常规抽血，更适合大规模的普查，对 KOA 的诊疗进行指导。本研究是通过采用酶联免疫吸附试验（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）检测不同分级的膝关节患者尿液中 CTX-Ⅱ与采用电感耦合等离子体原子发射光谱（Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, ICP-AES）测定 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度，探讨 CTX-Ⅱ与 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度和膝关节退变影像学分级的关系。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

收集 2014 年 11 月至 2015 年 6 月在桂林医学院附属医院门诊及住院膝关节疾病患者 82 例，志愿者 20 例，其一般资料如表 1。排除以下因素及疾病：①肝肾功能无异常，取样前避免过多进食海产品等含锌钙过高的食物[2]；②未服用影响激素及软骨代谢药物；③女性患者均绝经，避免尿液中 C2C 受雌激素影响[3]；④无髋关节、踝关节等其他关节的骨关节疾病症状，也无其他影响软骨代谢疾病，如强直性脊柱炎及类风湿关节炎。分级标准均符合 1986 年美国风湿病学会关于 KOA 的诊断标准，采用 Kellgren-Lawrence 放射学分级标准，0 级：正常；I 级：关节间隙可疑狭窄，可能有骨赘；II 级：明确的骨赘，关节间隙正常或可疑狭窄；III 级：中度骨赘，关节间隙明显狭窄，软骨下骨部分硬化，可能有畸形；IV 级：巨大骨赘，关节间隙明显狭窄，软骨下骨严重硬化，明确的畸形。

表 1 各组统计资料（计量资料用 $\bar{x} \pm s$）

Table 1 The statistical data in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	对照组	I 级组	II 级组	III 级组	IV 级组
例数	20	19	21	25	17
年龄（岁）	57.6 ± 6.1	56.7 ± 6.9	59.1 ± 5.9	59.9 ± 3.9	60.6 ± 4.8
性别（男/女）	8/12	9/10	10/11	11/14	8/9

1.2 方法

1.2.1 采用酶联免疫吸附法检测尿液中 CTX-Ⅱ水平：取清晨尿液 5 - 10 ml，2500 r/min 离心 20 min，取上清液，-80 ℃冰箱保存。CTX-Ⅱ水平检测：从 -80℃冰箱取出尿液标本，在室温下解冻，解冻后 2500 R/min 离心 20 min。在酶标包被板上设标准品孔 10 孔，空白孔 1 个，其余加待测样品，稀释 5 倍，37°温育 1 h，洗板 5 次，每孔加入酶标试剂 50 μl，空白孔除外，先后加入显色剂 A、B 各 50 μl，37℃避光显色 15 min，加入终止液，15 min 内在 450 nm 波长下测量各孔的吸光度值（*OD* 值），以 OD 为纵坐标绘制标准曲线，求出曲线方程，计算其中 CTX-Ⅱ含量，用 pg/ml 表示。

1.2.2 测量元素 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度：从 -80℃冰箱取出尿液标本，在室温下解冻，精确量取 2 ml，加 5% 的 HNO_3 稀释至 10 ml，充分混匀后由全谱直读等离子体光谱仪进样待测。全谱直读等离子体光谱仪工作条件：入射功率 1.1 kW，氩气流量 0.5 L·min，氩气冷却。测量元素 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度，结果用 mg/L 表示。Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度由两位专业技术人员用全谱直读等离子体光谱仪检测所得。

1.2.3 观察指标：所有影像学资料由 3 名医生采用 Kellgren-Lawrence 放射学分级，患者的尿液标本由两位专业技术人员用 ELISA 检测两次取平均值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验，多组数据比较应用单因素方差分析，采用 LSD 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 CTX-Ⅱ浓度比较

KOA 组 CTX-Ⅱ水平［(261.235 ± 39.944) pg/ml］高于对照组［(218.341 ± 22.270) pg/ml］，($F = 43.722$, $P = 0.000$)。IV 组 > III 组 > II 组 > I 组和正常对照组，($F = 334.402$, $P = 0.000$)（图 1）。正常对照组与 I 级组差异无统计学意义（$P > 0.05$）。

2.2 各组 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度比较

KOA 组 Zn^{2+} 浓度［(0.7000 ± 0.1736) mg/L］高于对照组［(0.3764 ± 0.2163) mg/L］，($F = 53.401$, $P < 0.000$)。但各 KOA 组之间 $P > 0.05$. KOA 组 Ca^{2+} 浓度［(204.3536 ± 71.6828) mg/L］高于对照组

万方数据

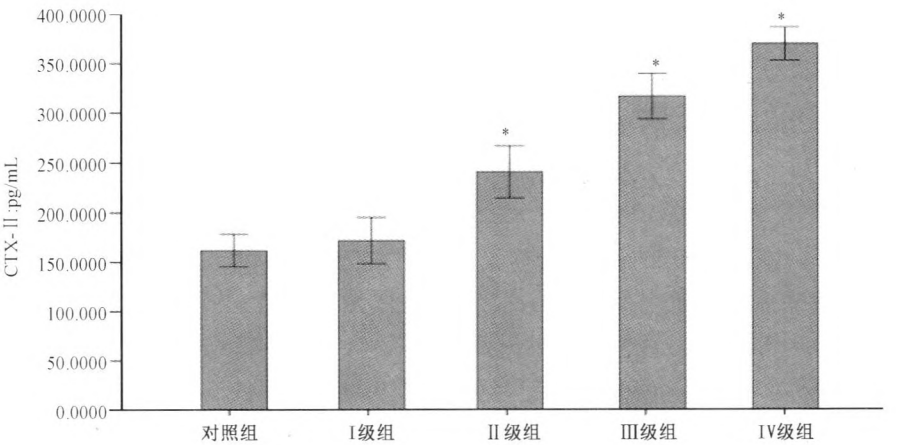

图 1 对照组与各 KOA 组 CTX－Ⅱ浓度对比

*：与对照组、I 级组相比 $P<0.05$

Fig. 1 Comparison of the concentration of CTX-II in urine between control group and each KOA group.

*: compared with control group and group I, $P<0.05$

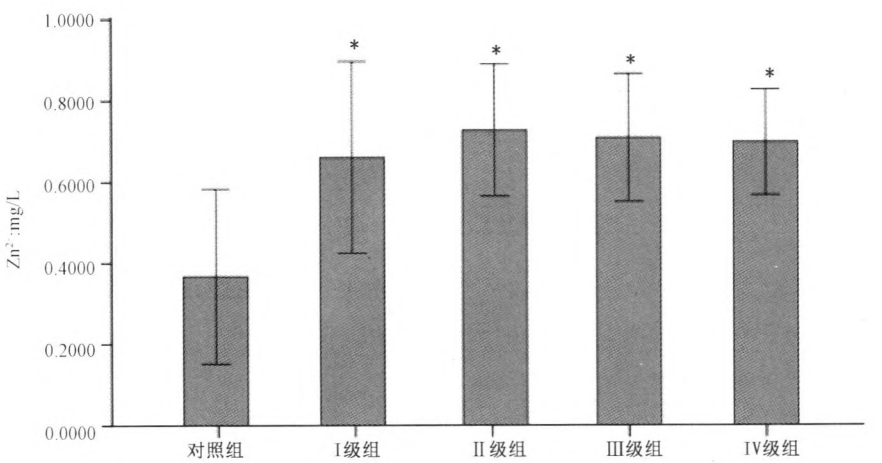

图 2 对照组与各 KOA 组 Zn^{2+} 浓度对比

*：与对照组相比 $P<0.05$

Fig. 2 Comparison of the concentration of Zn^{2+} in urine between control group and each KOA group.

*: compared with control group, $P<0.05$

[(80.4635 ± 39.3493) mg/L], ($F = 55.379$, $P < 0.000$)，但各 KOA 组之间 $P<0.05$。

3 讨论

OA 是以关节组织不断损坏为特征的疾病，包括了软骨的磨损与滑膜组织的改变[4]。在软骨不断磨损的过程中，软骨含量最丰富的 II 型胶原被酶不断地降解。降解 II 型胶原的酶有几种蛋白酶，包括由软骨细胞、破骨细胞、滑膜细胞合成的基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)[5]。MMPs 是依赖 Zn^{2+}、Ca^{2+} 的蛋白酶家族[6]。MMP 由前域、催化域、血液结合素域组成。在催化域中包含有锌指结构模体，Zn^{2+} 与三个组氨酸结合。在非激活状态，存在半胱氨酸开关模体，Zn^{2+} 通过与前域中的半胱氨酸残基结合防止前域被水解，当半胱氨酸与 Zn^{2+} 的结合被移除后，MMP 就被激活[7]。有文献报道 Zn^{2+} 可以调节 MMP-3、MMP-9、MMP-12、MMP-13 的活性[8]。Ca^{2+} 与催化域结合，起到维持域的稳定与调节催化活动的作用[9-11]。有文献报道 Ca^{2+} 可以调节 MMP-1 的活性[12]。II 型胶原被 MMP-1 水解，由于结合位点不一样，导致产生 3/4、1/4 片段[13]。这些片段在其他的 MMP 与蛋白酶作用下再

万方数据

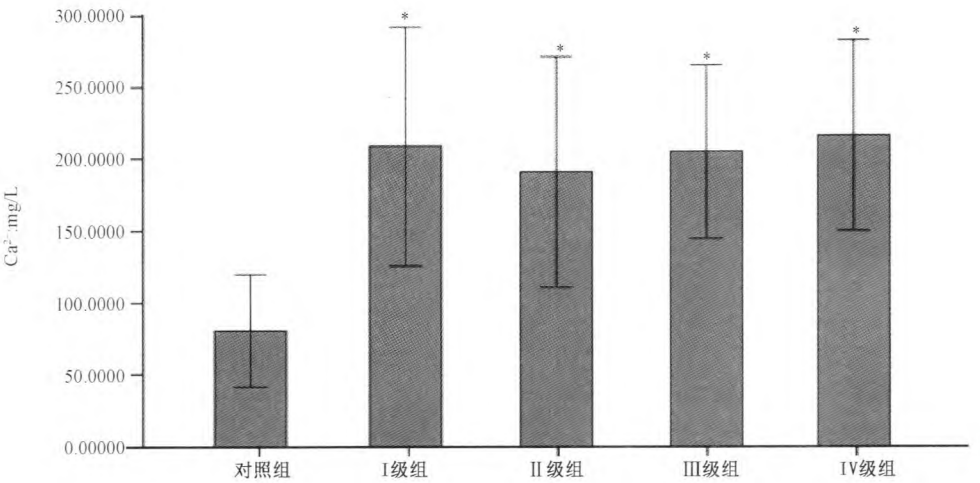

图 3 对照组与各 KOA 组 Ca^{2+} 浓度对比

*：与对照组相比 $P<0.05$

Fig. 3 Comparison of the concentration of Ca^{2+} in urine between control group and each KOA group.

*: compared with control group, $P<0.05$

次被降解，而 CTX-Ⅱ就是降解产物中的一种[14]。尿 CTX-Ⅱ首次由 Christgau 等描述，是目前最为有效的诊断与评估 OA 的生物标记物[15-17]。

本研究结果提示，虽然对照组和 I 级组尿液中 CTX-Ⅱ水平相对低，且无明显差异，但是有研究报道Ⅱ级才是定义 KOA 影像特征的界限，并且 I 级有向Ⅱ级发展的趋势，况且对早期 OA 的定义存在着分歧，因此 CTX-Ⅱ能不能作为 KOA 早期诊断的指标是存在争议的[18]。OA 是全身性疾病，老年患者常合并有膝关节、髋关节，踝关节等关节的退变，CTX－Ⅱ会受全身软骨状态的影响。软骨的退变受年龄、雌激素、运动等多因素的影响。即使研究分组排除上述干扰因素，但还有可能存在无症状无 X 线改变的关节退变患者影响正常对照组 CTX-Ⅱ浓度，这也是影响 CTX-Ⅱ不能作为 KOA 早期诊断的因素之一。随着软骨的逐渐丢失，骨质暴露，胶原也应是逐渐的丢失，本研究结果显示 II 组、III 组、IV 组尿液中 II 型胶原代谢产物 CTX-Ⅱ浓度相比对照组与 I 级组逐渐升高，与疾病的发展符合。但是 CTX-Ⅱ与 C2C[19]一样，作为 OA 的诊断检测指标过于单一，说服力不强。

林昂如[20]等提出元素对关节软骨结构及生理功能有重要作用，关节液中含有钙及其他多种元素并保持恒定，以维持关节液渗透压和提供营养病态下这些元素可发生失衡，不同疾病变化不一，因此，测定关节液中多种元素的含量变化有助于诊断。通过定期检测多种元素，动态观察可以分析疗效。Reagan[21]等报告用不同种类和含量的元素配制的溶液培养软骨细胞，发现不同效果。说明微量元素对软骨细胞再生修复有一定作用。Krachler M[22,23]等和 Yazar M[24]等相继提出微量元素测定对 OA 的诊断意义。王声雨[25]等检测 KOA 患者滑膜组织中 Zn、Ca 等元素的水平和疾病发生、发展的关系，为骨性关节炎的发病机制研究和诊治提供相关的理论依据。但尿液中元素与 II 型胶原生物标记物 CTX-Ⅱ、K-L 分级的关系尚缺乏研究。本实验尿液中 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度虽然与 KOA 患者影像学 K-L 分级无相关性，但是在 I 级的患者与正常对照组比较，尿液中 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度是升高的，且有统计学意义。这可能与 MMP 的早期激活有关，但 II 型胶原又没有被大量降解，所以 I 级的患者 CTX－Ⅱ水平虽然升高，但是并不是很明显。

本实验基于 KOA 患者影像学改变，避免了 KOA 患者症状及体征等主观因素的影响，这一相对客观数据进行分组研究 CTX-Ⅱ水平，揭露了尿液中 CTX-Ⅱ水平与 KOA 影像学分级的正相关性，可作为区分 KOA 严重程度的标志物，也可作为评价药物及手术治疗 KOA 疗效的参考指标。尿液中 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度虽然与 KOA 患者影像学改变无相关性，但是在 I 级的患者与正常对照组比较，尿液中 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度是升高的，且有统计学意义。通过联合监测尿液 CTX－Ⅱ与 Zn^{2+}、Ca^{2+} 浓度，可能为 KOA 的早期诊断提供最简单易行的替代手段，而且还可能将使社区医疗工作摆脱大型影像设备和常规抽血，

万方数据

更适合大规模的普查,及早对 KOA 作出诊断,尽量避免或减缓严重后果,提高患者生活质量。但这还需要更大范围、更大样本的实验研究来证实。

【参考文献】

[1] 翟云,高根德,徐守宇,等. 膝关节骨关节炎的基础研究进展[J],中国骨伤,2012,25(1):83-87.
Zhai Y, Gao GD, Xu SY, et al. The basic research process of knee osteoarthritis [J]. China Journal of Orthopaedics and Traumatology, 2012, 25(1):83-87.

[2] Dlugaszek M, Kaszczuk M, Mularczyk-Oliwa M. Magnesium, calcium, and trace elements excretion in 24-h urine[J]. Biol Trace Elem Res, 2011, 142(1):1-10.

[3] Nevitt, M, Cummings, S, Lane, N, et al. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group[J]. Arch Intern Med, 1996, 156(18): 2073-2080.

[4] Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB. Osteoarthritis in 2007[J]. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2007, 65(3):222-228.

[5] Sondergaard BC, Henriksen K, Wulf H, et al. Relative contribution of matrix metalloprotease and cysteine protease activities to cytokine-stimulated articular cartilage degradation [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(8):738-748.

[6] Ispanovic E, Serio D, Haas TL. Cdc42 and Rho A have opposing roles in regulating membrane type 1-matrix metalloproteinase localization and matrix metalloproteinase-2 activation[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295(3):C600-610.

[7] Van Wart, H. E. Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family [J]. Proc. Natl. Acad. Sci, 1990, 87: 5578-5582.

[8] Kim JH, Jeon J, Shin M, et al. Regulation of the catabolic cascade in osteoarthritis by the zinc-ZIP8-MTF1 axis[J]. Cell, 2014, 156(4):730-743.

[9] Seltzer JL, Welgus HG, Jeffrey JJ, et al. The function of Ca in the action of mammalian collagenases [J]. Arch Biochem Biophys, 1976, 173: 355-361.

[10] Housley TJ, Baumann AP, Braun ID, et al. Recombinant Chinese hamster ovary cell matrix metalloprotease-3 (MMP-3, stromelysin-1): role of calcium in promatrix metalloprotease-3 (pro-MMP-3, prostromelysin-1) activation and thermostability of the low mass catalytic domain of MMP-3 [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 4481-4487.

[11] Zhang Yn, Dean WL, Gray RD. Cooperative binding of Ca^{2+} to human interstitial collagenase assessed by circular dichroism, fluorescence, and catalytic activity[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 1444-1447.

[12] Paladini RD, Wei G, Kundu A, et al. Mutations in the catalytic domain of human matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) that allow for regulated activity through the use of Ca^{2+} [J]. J Biol Chem, 2013, 288(9):6629-6639.

[13] Welgus HG, Kobayashi DK, Jeffrey JJ. The collagen substrate specificity of rat uterus collagenase[J]. J Biol Chem, 1983, 258:14162-14165.

[14] Garnero P, Conrozier 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] 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.

[16] Valdes AM, Meulenbelt I, Chassaing E, et al. Large scale meta-analysis of urinary C-terminal telopeptide, serum cartilage oligomeric protein and matrix metalloprotease degraded type II collagen and their role in prevalence, incidence and progression of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage. 2014, 22(5):683-689.

[17] Ramos YF, Metrustry S, Arden N, et al. Meta-analysis identifies loci affecting levels of the potential osteoarthritis biomarkers sCOMP and uCTX-II with genome wide significance[J]. J Med Genet. 2014, 51(9):596-604.

[18] Hart DJ, Spector TD: Kellgren & Lawrence grade 1 osteophytes in the knee-doubtful or definite[J]? Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11:149-150.

[19] 江梦谣,唐际存,辛林伟. 膝关节骨性关节炎患者尿液中 C2C 水平检测[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,05:517-520.
Jiang MY, Tang JC, Xin LW. Detection of urine C2C level in patients with knee osteoarthritis [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2014, 05:517-520.

[20] 林昂如,金明新,孟庆礼,等. 骨关节炎关节液钙及多种微量元素的测定分析[J]. 中华骨科杂志,1995,05:290.
Lin AR, Jin MX, Meng QL, et al. The determination and analysis of calcium and various trace elements in osteoarthritis joint fluid [J]. Chinese Journal of Orthopaedics, 1995, 05:290.

[21] Reagan BT. Irrigating solution for arthroseopy[J]. JB One Joint Surg(Am), 1993, 65:629.

[22] Krachler M, Domej W, Irgolic K J. Concentrations of trace elements in osteoarthritic knee-joint effusions[J]. Biol Trace Elem Res, 2000, 75(1-3): 253-263.

[23] Krachler M, Domej W. Clinical laboratory parameters in osteoarthritic knee-joint effusions correlated to trace element concentrations. Biol Trace Elem Res, 2001, 79(2): 139-148.

[24] Yazar M, Sarban S, Kocyigit A, et al. Synovial fluid and plasma selenium, copper, zinc, and iron concentrations inpatients with rheumatoid arthritics and osteoarthritis[J]. Biol Trace Elem Res, 2005, 106(2): 123-132.

[25] 王声雨,陶树清,荣杰生,等. 骨性关节炎滑膜组织中 16 种元素的分析[J]. 中国骨与关节杂志,2013,07:375-378.
Wang SY, Tao SQ, Rong JS, et al. Distribution of 16 elements in synovial menbrane of patients with osteoarthritis[J]. Chinese Journal of bone and joint, 2013, 07:375-378.

(收稿日期: 2015-06-13)

万方数据