

· 论 著 ·

血清和关节液中钙结合蛋白(S100A12)的水平与膝关节炎严重程度的相关性分析

陈荣国¹ 代凤雷^{2*} 欧先锋² 曾悻² 杨超² 钱建吉² 任家云² 虞泽琰² 金雯³

1. 南京中医药大学第三附属医院,南京市中医院骨科,南京 210001

2. 扬州大学医学院附属六合医院骨科,南京 211500

3. 扬州大学医学院附属六合医院病理科,南京 211500

中图分类号: R684.3

文献标识码: A

文章编号: 1006-7108(2016) 08-0985-04

摘要: 目的 探讨患者关节液和血清中钙结合蛋白(S100A12)浓度和膝关节炎严重程度相关性,以评估它在骨性关节炎(osteoarthritis, OA)发病中的作用。方法 40例骨性关节炎(OA组)与40例需关节镜手术的半月板、韧带损伤的患者及行髓内钉固定的股骨及胫骨骨折患者(对照组);对两组患者静脉采血及取关节液,采用ELISA法测S100A12含量;采用Kellgren-Lawrence(K-L)标准对膝关节X线片进行评估分级。结果 OA组的血清中S100A12水平(35.10 ± 26.43) ng/ml显著高于对照组含量(22.13 ± 15.67) ng/ml,有统计学差异($P=0.026$);OA组关节液S100A12含量(14.09 ± 8.08) ng/ml显著高于对照组关节液中的含量(9.30 ± 6.85) ng/ml($P=0.02$)。OA组血清中的S100A12水平显著高于关节滑液中的水平($P<0.01$)。关节液中的S100A12含量和血液中的S100A12水平显著正相关($r=0.42, P=0.02$),但相关关系并不密切。OA组关节滑液中S100A12与K-L分级成正相关($r=0.65, P<0.01$)。血清中的S100A12与K-L分级关联不显著($r=0.29, P=0.24$)。结论 S100A12在OA患者的血液及关节液中都有表达;关节液的S100A12表达与患者骨关节炎严重程度成正相关;检测关节液中的S100A12有助于骨性关节炎的早期诊断,提示病变严重程度,为临床治疗提供参考。

关键词: 钙结合蛋白;骨性关节炎;关节液;血清

The associations of S100A12 levels in serum and synovial fluid with severity of knee osteoarthritis

CHEN Rongguo¹, DAI Fenglei^{2*}, OU Xianfeng², ZENG Yi², YANG Chao², QIAN Jianji², REN Jiayun², YU Zelong², JIN Wen³

1. Department of Orthopedics, Nanjing Hospital of T. C. M., The Third Affiliated Hospital of Nanjing University of T. C. M., Nanjing 210001

2. Department of Orthopedics, Liuhe Affiliated Hospital of Yangzhou University Medical Academy, Nanjing 211500

3. Department of Pathology, Liuhe Affiliated Hospital of Yangzhou University Medical Academy, Nanjing 211500, China

Corresponding author: DAI Fenglei, Email: daifenglei555@163.com

Abstract: Objective To investigate the correlation between S100A12 concentrations in serum and synovial fluid and severity of knee osteoarthritis. **Methods** 40 osteoarthritis patients and 40 controls (femoral and tibia fractures with intramedullary nail fixation, ligament and meniscus injury of knee joint and received early operative treatment) were enrolled in this study. Serum and synovial fluid samples from the two groups were collected. Samples were analyzed for S100A12 protein levels by ELISA. The progression of osteoarthritis was classified by Kellgren-Lawrence grading scale by evaluating the X-ray changes of the knee joint. Knee function was evaluated using WOMAC Index (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index). **Results** S100A12 levels in serum and synovial fluid were elevated in both OA and control groups. S100A12 serum levels in OA patients (35.10 ± 26.43) ng/ml were significantly higher than that of the controls (22.13 ± 15.67) ng/ml ($P=0.026$). The S100A12 content in synovial fluid of OA group (14.09 ± 8.08) ng/ml was significantly higher than that of the control group (9.30 ± 6.85) ng/ml ($P=0.02$). S100A12 levels in serum were significantly higher than the levels in synovial fluid in OA patients ($P<0.01$). There was a significantly positive correlation between serum S100A12 and synovial fluid S100A12 levels, but the correlation was not

基金项目: 江苏省南京市卫生局医学科技发展项目(YKK13218)

* 通讯作者: 代凤雷, Email: daifenglei555@163.com

strong ($r = 0.42$, $P = 0.02$). There was no significant correlation between the serum levels of S100A12 and the severity of Osteoarthritis ($r = 0.29$, $P = 0.24$). However, there was a positive correlation between S100A12 levels in synovial fluid and the severity of Osteoarthritis ($r = 0.65$, $P < 0.01$). **Conclusion** S100A12 were detected in both serum and synovial fluid. S100A12 levels in synovial fluid were closely correlated with the severity of Osteoarthritis. As synovial fluid levels of S100A12 reflect the severity of Osteoarthritis, it can be used as an effective biochemical marker for early detection of osteoarthritis, and for the evaluation of clinical therapy of OA.

Key words: Calcium binding protein; Osteoarthritis; Synovial fluid; Serum

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨的变性、破坏及骨质增生为特征的慢性关节病,主要表现为关节疼痛和活动不灵活。近年来有关其发生机制研究有了很大的进展。研究发现 S100A12 在各种炎性反应中如类风湿关节炎、溃疡性结肠炎和多种肿瘤等都有高的血清反应^[1-3]。血清钙结合蛋白 S100A12 水平与患者发生 OA 的独立相关性仍然没有明确。本研究的目的是探讨患者关节液和血清中 S100A12 浓度和膝关节骨性关节炎严重程度相关性,以评估它在 OA 发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 临床资料

2013 年 6 月-2015 年 9 月,我院收治的 OA 组病人 40 例,男 21 例,女 19 例,平均 63 岁;对照组患者 40 例,男 22 例,女 18 例,平均年龄 55 岁,其中半月板及韧带损伤 14 例,胫骨骨折及股骨髁上骨折行髓内钉固定患者 26 例,对照组患者均未累及膝关节软骨,均在伤后一周内行髓内钉内固定或关节镜手术;所有入选患者均做膝关节 X 线、MRI 检查。纳入患者得到本人同意及医院伦理委员会的批准。

1.2 诊断标准

采用 1995 年美国风湿病协会修订的膝关节 OA 诊断标准:①近 1 个月内反复膝痛;②X 线片示关节间隙变窄、膝关节边缘骨赘形成;③关节液检查符合标准清晰、黏稠,白细胞计数 $< 2 \times 10^9/L$;④中老年患者 (≥ 40 岁);⑤晨僵 ≤ 30 min;⑥活动时有关节摩擦音。符合①②条或①③⑤⑥条或①④⑤⑥条,即可确诊膝关节骨性关节炎。

1.3 排除标准

其它原因导致的膝关节病变如类风湿性关节炎、感染等;关节置换术后;治疗前 2 周内使用过糖皮质激素;半年内行关节腔内注射;合并有脑血管、肝、肾和造血系统疾病以及神经、精神障碍者。

1.4 临床评价

对 OA 组患者的膝关节 X 片,根据 Kellgren-Lawrence (K-L) 分期标准,将骨性关节炎分为五级:0 级:正常;1 级:关节间隙可疑变窄,可能有骨赘;2 级:有明显骨赘,关节间隙可疑变窄;3 级:中等量骨赘,关节间隙变窄较明显,有硬化性改变;4 级:大量骨赘,关节间隙明显变窄,严重硬化性病变及明显畸形。当分级 ≥ 2 级定义为骨关节炎。

1.5 样本收集

患者禁食 12 h,取静脉血,除送检血常规、ASO、RF、CRP 外,4℃ 下 2 000 g 离心 10 min 后取上清贮存于 -80℃ 冰箱内备用。OA 组无菌条件下穿刺取关节液;对照组在行手术治疗前抽取关节液,4℃ 下 5 000 g 离心 15 min,取上清储存在冻存管,置于 -80℃ 冰箱内备用。

1.6 实验室方法

S100A12 浓度的定量测定采用酶联免疫吸附法 (ELISA),使用 ELISA 试剂盒并按试剂盒说明书执行 (S100A12/EN-RAGE ELISA Kit, Cat no: KOA091 V.04, 美国 Abnova 公司)。S100A12 蛋白标准液用前 24h 内配制;取 0.1ml 的蛋白标准工作液于孔板中;0.1ml 样品稀释液于“0”孔中,做空白对照;取样品上清 50ul 加入 50ul 的样品稀释液于空的孔中;加盖,37℃,90min,孵育;孵育结束,去掉孔板上的液体;取 0.1ml 抗体工作液于每孔中,37℃,60min,孵育;PBS 洗板 3 次,去掉液体;取 0.1ml 稀释后的 ABC 工作液于每孔,37℃,30min,孵育。PBS 洗板 5 次,去掉孔板上的液体;加入 90ul TMB 显色液,37℃,30min,孵育;加 100ul TMB 终止液于每孔中,30min 内酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司) 测定 A450 的 OD 值。根据标准曲线计算出样品的蛋白含量。实际 S100A12 浓度应为测试结果乘以稀释倍数。

1.7 统计学处理

统计分析采用 SPSS 16.0,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用独立样本 t 检验比较两组的性别、年龄,以及血清与关节液的 S100A12 含量;单样本 t

检验分析各组关节液与血液的 S100A12 含量;使用 Pearson 相关分析血液与关节液 S100A12 的相关性;使用非参数检验 Spearman 相关系数分析 S100A12 水平与和 K-L 分级之间的联系。 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

OA 组患者年龄 $[(63.33 \pm 8.14)$ 岁] 和对照组 $[(55.79 \pm 15.28)$ 岁] 之间存在显著的年龄差异 ($P = 0.02$), 两组之间性别差异不显著 ($P = 0.59$), 见表 1。

表 1 OA 组与对照组一般情况比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of general characteristics between OA and control groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄 (岁)	性别 (男/女)	血清 S100A12 (ng/ml)	关节液 S100A12 (ng/ml)
OA 组	40	63.33 $\pm$ 8.14	21/19	35.10 $\pm$ 26.43	14.09 $\pm$ 8.08
对照组	40	55.46 $\pm$ 15.28	22/18	22.13 $\pm$ 15.67	9.3 $\pm$ 6.85
P		0.02	0.59	0.026	0.02

OA 组与对照组的血清和关节滑液中均检测到 S100A12。OA 组的血清中 S100A12 水平 (35.10 $\pm$ 26.43) ng/ml 显著高于对照组含量 (22.13 $\pm$ 15.67) ng/ml, 有统计学差异 ($P = 0.026$); OA 组关节液 S100A12 含量 (14.09 $\pm$ 8.08) ng/ml 显著高于对照组关节液中的含量 (9.30 $\pm$ 6.85) ng/ml ($P = 0.02$)。

OA 组血清中的 S100A12 水平显著高于关节滑液中的水平 ($P < 0.01$)。关节液中的 S100A12 含量和血液中的 S100A12 水平显著正相关 ($r = 0.42, P = 0.02$), 但相关关系并不密切。

将 40 例 OA 组患者按照 K-L 分级标准划分: 2 级 12 例, 3 级 18 例, 4 级 10 例。K-L 分级越高, 关节滑液中 S100A12 也越高 ($r = 0.65, P < 0.01$)。血清中的 S100A12 与 K-L 分级关联不显著 ($r = 0.29, P = 0.24$)。见表 2。

表 2 不同 K-L 分级 OA 患者关节液与血液中 S100A12 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of S100A12 levels in serum and synovial fluid in OA patients with different KL gradation ($\bar{x} \pm s$)

KL 分级	n	血清 S100A12 (ng/ml)	关节液 S100A12 (ng/ml)
2	12	9.52 $\pm$ 2.19	5.28 $\pm$ 3.22
3	18	22.88 $\pm$ 5.33	9.65 $\pm$ 6.55
4	10	45.38 $\pm$ 15.15	17.33 $\pm$ 4.84
P		0.24	<0.01

3 讨论

钙结合蛋白 S100 蛋白家族有超过 23 个小分子钙结合蛋白组成, 这些钙结合蛋白控制一些关键细胞通路, 如细胞骨架、细胞的迁移与粘附、主动氧化防御、参与伤口的愈合、多数炎症疾病的发作等。S100A12 主要由中性粒细胞分泌和表达, 广泛参与了机体的一系列炎症性、代谢性及肿瘤性疾病的病

理生理过程^[4-5]。

S100A12 基因定位于人类染色体 1q21, 介于 S100A8 和 S100A9 之间^[6], 其由 92 个氨基酸组成, 以共价二聚体形式存在。S100A12 蛋白与钙离子的亲和力较高。S100A12 可在结合钙离子或其他炎症介质刺激后, 发生蛋白构象的改变, 由此暴露靶蛋白结合位点, 通过结合相应配体, 从而发挥其生物学功能^[7]。

OA 的主要病理改变是由各种原因引起的细胞外基质发生的进行性改变, 导致正常的软骨失去其生物力学特征, 其病因复杂并存在争议。目前认为滑膜炎在 OA 发病中起着重要的作用。滑膜组织分泌的各种活性因子参与并刺激骨的吸收及成骨样细胞增殖, 导致关节骨、软骨下骨的增生改变^[8-9], S100A12 的表达可增强细胞外基质蛋白水解及自身免疫, 可能参与骨性关节炎疾病的活动、关节软骨的破坏。

S100A12 促炎作用可能基于它们在炎性关节细胞外高表达以及在细胞募集和细胞毒方面的作用, 尤其是它能够激活肥大细胞, 参与中性粒细胞向炎症部位的转移过程, 并且发挥较强的中性粒细胞趋化作用^[10]。

因此, S100A12 水平的测量可能是炎症性疾病活动高度敏感的生物标志物, 因此关节液及血液中 S100A12 高表达应当对 OA 患者的软骨破坏起到作用。

本研究结果显示, OA 患者血清及关节液中的 S100A12 含量显著高于对照组, 说明关节外组织及血液中分泌的 S100A12 进入血液循环系统, 到达 OA 患者的关节周围组织如滑膜, 促进滑膜炎的产生; 与以往的研究类似, S100A12 具有炎症趋化作用, 参与滑膜炎性损伤, 进而影响软骨及关节骨的破

坏及骨增生的改变。血液的中性粒细胞分泌的 S100A12 并未完全通过滑膜进入关节液,可能在转运过程中受到滑膜屏障的限制,所以血液中的 S100A12 含量高于关节液中的含量,OA 患者血清与关节液的 S100A12 含量成显著正相关,血清中的 S100A12 含量越大,关节液中的 S100A12 含量越高,但这种相关关系并不密切。本试验缺少组织病理学检测,不能完全说明血液中的 S100A12 通过怎样的方式进入关节液,也不能说明关节内组织如滑膜、软骨、脂肪垫细胞能否产生 S100A12。

试验中发现 OA 患者关节液的 S100A12 含量与 K-L 分级成正相关,即关节液 S100A12 含量越高,关节炎 K-L 分级越高,关节退变越重。这种相关性提示 S100A12 作为一种炎性介质在 OA 发病中起炎性介导作用,S100A12 可能成为有利于 OA 的诊断及病程预后的检测指标。

S100A12 由于在多种疾病进程中被发现,如类风湿性关节炎、克罗恩肠炎、银屑病、胰腺炎、肿瘤、肺炎以及某些自身免疫性疾病,所以通过血液检测 S100A12 含量并不能准确反映 OA 的病变程度,缺少特异性;而通过关节穿刺获取关节液来检测 S100A12,可将关节外病变对 S100A12 含量变化的影响降低,进而提高灵敏度。因此检测关节液中的 S100A12 含量对早期诊断 OA,测定评估 OA 的进展有益^[11-13]。

本试验存在一定缺陷,因为是对患者的血液及关节液进行检测,缺少健康对照组;OA 患者多为老年人,基础病较多,对纳入试验的患者不能将关节外病变完全排除,系统性疾病对检测结果应有一定的影响;缺少对患者关节周围组织如滑膜、软骨及脂肪垫的病理检测,明确关节内组织 S100A12 的来源;再者是缺乏自身对照,缺少治疗前后的检测对比。

综上所述,S100A12 在 OA 患者的血液及关节液中都有表达,并且关节液的 S100A12 的表达与患者骨关节炎严重程度成正相关;检测关节液中的 S100A12 有助于骨性关节炎的早期诊断,提示病变严重程度,为临床治疗提供参考。

【参 考 文 献】

- [1] Dabritz J, Langhorst J, Luger A, et al. Improving relapse prediction in inflammatory bowel disease by neutrophil-derived S100A12. *Inflamm. Bowel Dis*, 2013, 19(6): 1130-1138.
- [2] Kim HJ, Kang HJ, Lee H, et al. Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer. *Proteome Res*, 2009, 8(3): 1368-1379.
- [3] Meral G, Yildiz O, Asuman G, et al. Diagnostic importance of S100A9 and S100A12 in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2015, 76: 52-56.
- [4] Pietzsch J, Hoppmann S. Human S100A12: a novel key player in inflammation. *Amino Acids*, 2009, 36(3): 381-389.
- [5] Goyette J, Geczy CL. Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function. *Amino Acids*, 2011, 41(4): 821-42.
- [6] Garcia AF, Garcia W, Nonato MC, et al. Structural stability and reversible unfolding of recombinant porcine S100A12. *Biophys Chem*, 2008, 134(3): 246-253.
- [7] Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*, 2006, 396(2): 201-214.
- [8] 郭东武, 孙正明, 张向阳. 关节镜清理术加透明质酸钠注射治疗膝关节骨性关节炎 66 例临床分析. *山东医药*, 2007, 47(31): 80.
- Guo DW, Sun ZM, Zhang XY. To evaluate the clinical effect and safety of knee joint clear operation combined with injection treatment by Hyaluronan injecting into articular cavity for 66 cases osteoarthritis of knee. *Shandong Medical Journal*, 2007, 47(31): 80. (in Chinese)
- [9] 黄媛霞, 段永壮, 李康, 等. 膝关节 OA 患者血清和关节液中 IL-1、MMP-3、TIMP-1 的水平变化及意义. *山东医药*, 2010, 50(30): 59-60.
- Huang YX, Duan YZ, Li K, et al. The concentrations of IL-1, MMP-3, TIMP-1 in synovial fluid and serum of knee osteoarthritis patients. *Shandong Medical Journal*, 2010, 50(30): 59-60. (in Chinese)
- [10] Huang XH, Zeng YX, Xing XH, et al. Quantitative proteomics analysis of early recurrence/metastasis of huge hepatocellular carcinoma following radical resection. *Proteome Sci*, 2014, 12(3): 22.
- [11] Nordal HH, Brun JG, Hordvik M, et al. Calprotectin (S100A8/A9) and S100A12 are associated with measures of disease activity in a longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab. *Scand J Rheumatol*, 2016, 45(4): 274-281.
- [12] Ingels C, Derese I, Wouters PJ, et al. Soluble RAGE and the RAGE ligands HMGB1 and S100A12 in critical illness: impact of glycemic control with insulin and relation with clinical outcome. *Shock*, 2015, 43(2): 109-116.
- [13] Khorramdelazad H, Bagheri V, Hassanshahi G, et al. S100A12 and RAGE expression in human bladder transitional cell carcinoma: a role for the ligand/RAGE axis in tumor progression. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(7): 2725-2729.

(收稿日期: 2016-02-15)