

血清 COL10A1 在骨关节炎中检测的意义

马金赛¹ 任姜栋² 张晓岗^{2*}

1. 新疆医科大学第一附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830054

2. 新疆医科大学第一附属医院关节外科, 新疆 乌鲁木齐 840054

中图分类号: R684.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 11-1370-05

摘要: 目的 观察并探讨血清 COL10A1 水平在骨关节炎软骨损伤的诊断价值以及对骨性关节炎疾病活动性严重程度的预测价值。方法 所收集 89 例 KOA 患者均为 2014 年 9 月至 2016 年 4 月在我院关节外科门诊就诊和住院患者, 采集清晨空腹血 5ml, 依据影像学 Kellgren-Lawrence (K-L) 分级评分系统进行病情严重程度分级, I 级 20 例, II 级 25 例, III 级 23 例, IV 级 21 例, 正常对照组 23 例。各组年龄及性别构成比无显著性统计学差异, 所有血清标本应用双抗体夹心酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测 COL10A1 浓度。结果 1、KOA 组患者血清 COL10A1 (1.19 (0.61 - 1.93) ng/ml) 浓度水平较正常对照组 (0.45 (0.34 - 0.52) ng/ml) 高, 且差异具有显著性统计学意义 ($P < 0.01$)。2、在骨关节炎病情预测上, 血清 COL10A1 浓度水平在 OA 患者 K-L 分级 II 级组 (1.98 (1.59 - 2.12) ng/ml) 和 III 级组 (1.84 (1.43 - 2.02) ng/ml) 最高, 且与 I 级组和 IV 级组差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 其中 II 级组与 III 级组患者血清 COL10A1 浓度水平差异不具有统计学意义 ($P = 0.149$), 二者无显著差异。结论 1、骨性关节炎患者血清 COL10A1 浓度水平较正常对照组高。2、在骨关节炎组, 血清 COL10A1 水平随着 K-L 分级等级逐渐升高, 在 II 级组和 III 级组时达到最高, 随后逐渐下降, 因此具有结合影像学 K-L 分级预测评价患者病情严重程度的潜力。

关键词: X 型胶原; 骨性关节炎; COL10A1

Detection of serum COL10A1 level in patients with knee osteoarthritis

MA Jinsai¹, REN Jiangdong², ZHANG Xiaogang^{2*}

1. The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054;

2. Department of Joint Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: ZHANG Xiaogang, Email: zxgjohn1972@sina.com

Abstract: **Objective** To observe the relationship between the serum COL10A1 level and the severity of knee osteoarthritis (KOA). **Methods** Eighty-nine patients with KOA in our outpatient and inpatient department from September 2014 to April 2016 were selected. Five ml morning serum of each subject was collected and lateral position of X-ray detection of knee joint was performed. The X-ray images were classified according to the Kellgren-Lawrence radiographic grading criteria. All the subjects were divided into group I ($n = 20$), group II ($n = 25$), group III ($n = 23$), group IV ($n = 21$), and control group ($n = 23$). There were no significant differences of age and gender among the groups. The serum COL10A1 level was detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** 1) The serum COL10A1 level in KOA group (1.19 ng/ml, 0.61 - 1.93 ng/ml) was significantly higher than that in control group (0.45 ng/ml, 0.34 - 0.52 ng/ml, $P < 0.01$). 2) In group KOA, the serum COL10A1 levels in group II (1.98 ng/ml, 1.59 - 2.12 ng/ml) and group III (1.84 ng/ml, 1.43 - 2.02 ng/ml) were the highest, and no significant difference of the serum COL10A1 level between group II and group III was observed ($P > 0.05$). Among them, it was significantly different between group I and IV ($P < 0.01$). **Conclusions** 1) The serum COL10A1 level in patients with KOA is higher than that in normal subjects. 2) In KOA group, the serum COL10A1 level increases gradually, and reaches to the highest in group II and group III, and then decreases gradually. So it has potential to evaluate the severity of the patient's condition combining with the K-L classification.

Key words: Type X collagen; Osteoarthritis; COL10A1

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (U1503221)

* 通讯作者: 张晓岗, Email: zxgjohn1972@sina.com

引言

骨关节炎(OA)是一种以关节软骨下骨的异常增生和软骨的退化以及关节功能的丧失为特点的非非常普遍的关节疾病,因其患病率非常高且伴随着关节功能的丧失导致个人、家庭及社会的负担日益严重^[1]。目前对于骨关节炎的治疗最有效的也就是关节置换,暂无其他更有效的能够在关节软骨下骨及软骨的结构层面上进行改善的治疗手段。绝大部分的治疗都是对症治疗,缓解疼痛,不能阻止和延缓病情的恶化,最后只得行人工关节置换手术替代治疗。因此,对于骨关节炎的早期诊断及准确的预测病情发展极为重要,但是,现阶段对于骨关节炎的诊断主要是痛过影像学及临床体征来诊断的,放射影像学检查是了解关节形态学改变的最好方法,特别是进展性关节软骨损害的疾病。但是放射影像学改变是个十分缓慢的过程,关节软骨出现放射影像学损害时常常已经处于中晚期。由于放射影像学对于 OA 的早期诊断意义不大,因此很多专家学者开始关注研究 OA 组织结构学层面的分子生物标志物。近年来,X 型胶原蛋白在骨关节炎中的特异性表达引起了越来越多该领域专家及科研工作者的重视^[2],X 型胶原的发现:1977 年由 Sylvest^[3]等研究发现,在损伤或者是退变的椎间盘组织发现有细胞簇集合和增生现象,提示组织自我修复。1983 年由 Schmid^[4]等经过实验研究将 X 型胶原从人生长板上的肥大软骨细胞中分离出来。1992 年 Garder^[5]认为这些软骨上的肥大细胞簇是疾病早期细胞分裂增加引起,伴有 X 型胶原蛋白(COL-X)的合成分泌,提示这可能是基质损伤后修补的表现。1995 年 Walker^[6]等报道钙化软骨及其邻近的软骨细胞簇中发现 X 型胶原蛋白。免疫染色法能够确定 X 型胶原的分布。相关文献报道 X 型胶原在软骨的分布是局灶性的,这就提示了它是在某些局限的区域,对局部的信号或刺激反应而产生的,也许是试图修补或重塑受损的软骨细胞外基质^[7-9]。

因此,结合相关研究已证实 X 型胶原在骨关节炎患者 mRNA 层面^[10]以及组织蛋白表达水平^[11]上是明显升高的,且 X 型胶原是骨关节炎软骨细胞肥大变性的特异性标志物^[12-15],提示 X 型胶原可能具有作为骨关节炎诊断的特异生化标志物潜力。X 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(COL10A1)为 X 型胶原蛋白的特异性裂解片段^[16],本研究拟通过检测骨关节炎患者血清中 COL10A1 的浓度水平,探讨其在骨关节炎早期

软骨损伤的诊断价值以及骨性关节炎疾病严重程度的预测价值。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 纳入标准:①在本院骨科门诊就诊确诊膝骨关节炎患者。②女性已绝经患者,排除雌激素对血清 COL10A1 的影响。③所有研究对象肝、肾功能正常。④所有对照组纳入对象与实验组年龄匹配,且无膝骨关节炎临床体征及影像学改变证据。⑤本研究经过医院伦理委员会批准,受试者均签署知情同意书。

1.1.2 排除标准:本身同时患有其他炎症性关节炎或自身免疫性疾病,包括类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、痛风等者;在 3 个月内有类固醇药物注射史或非类固醇类药物应用史者;既往一侧或双侧膝关节行膝关节置换术者,既往有膝关节严重创伤史者;合并严重肝肾功能疾病及心血管疾病者。

1.1.3 分级标准:所有 KOA 患者均符合 1995 年美国风湿病学会关于膝骨性关节炎(KOA)的诊断标准,即 KOA 严重程度分级采用 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。

1.1.4 分组方法:分为五组,对照组,I 级组,II 级组,III 级组及 IV 级组。收集 2014 年 9 月至 2016 年 4 月在新疆医科大学第一附属医院门诊及住院膝关节炎患者血清 89 例以及新疆医科大学第一附属医院健康体检管理中心健康体检者血清 23 例。

表 1 各组一般资料(计量资料用 $\bar{x} \pm s$)

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

组别	例数	年龄(岁)	性别	
			男	女
对照组	23	63.83 $\pm$ 6.75	10	13
I 级组	20	65.4 $\pm$ 6.83	9	11
II 级组	25	66.52 $\pm$ 6.5	12	13
III 级组	23	66.09 $\pm$ 6.82	8	15
IV 级组	21	67.0 $\pm$ 7.48	8	13

注:各组年龄及性别构成无统计学意义($P > 0.1$)

Note: No statistical significance of age and gender among groups ($P > 0.1$)

1.2 标本的采集、处理以及检测方法

血清的收集与保存:受试者禁食 12 h,术前清晨空腹抽取肘静脉血 5 ml,放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,然后置

室温 2285 r/min 离心 10 min, 分离上层血清, 分装于 Eppendorf 管, 做好标记置于 - 80 ℃ 冰箱保存。COL10A1 水平测定: 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 对血清中 COL10A1 含量进行测定 (武汉华美 CUSABIO 公司试剂盒): 根据说明书, 分别设标准品孔、待测样品孔。将解冻恢复至室温的待测样本各 100 μl 依次加入已包被有单抗的 96 孔板中, 做好标记。37 ℃ 孵育 2 h, 弃去液体, 甩干。然后每孔加入 100 μl 生物素标记抗体工作液, 覆上板贴, 37 ℃ 孵育 1 h, 然后弃去孔内液体, 甩干, 反复冲洗 3 次, 每孔加入辣根过氧化物酶标记亲和素工作液 100 μl, 覆上板贴, 37 ℃ 孵育 1 h, 弃去孔内液体, 反复冲洗 3 次, 每孔加入底物溶液 (TMB) 90 μl, 37 ℃ 避光孵育 15 min。最后每孔加入 50 μl 终止液, 使基质液和终止液摇匀, 于 450 nm 波长处测定吸光度 (A 值)。通过标准曲线计算样品浓度。

1.3 主要观察指标

OA 组与健康对照组血清 COL10A1 水平差异以及 OA 组间血清 COL10A1 水平差异。

1.4 统计学分析处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计学处理。若数据符合正态性, 方差齐, 则结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 若数据方差不齐则采用 $M(Q1-Q3)$ 表示。各组性别构成比较采用 χ^2 检验, 骨关节炎各分级组和对照组血清 COL10A1 浓度的成组比较采用非参数统计分析 Kruskal-Wallis 检验, 认为 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 膝 OA 组与对照组患者血清中 C2C 水平比较

膝 OA 组患者血清 COL10A1 浓度水平 1.19 (0.61 - 1.93) ng/ml 高于对照组 0.45 (0.34 - 0.52) ng/ml, 且差异具有显著性统计学意义 ($P = 0.000$), 见表 2 及图 1。

表 2 对照组与膝骨关节炎组血清 COL10A1 水平比较

分组	例数	COL10A1	
		ng/ml	P
对照组	23	0.45 (0.34 - 0.52)	N
膝 OA 组	89	1.19 (0.61 - 1.93)	0.000

2.2 膝 OA 各亚组患者与对照组血清 COL10A1 浓度水平比较

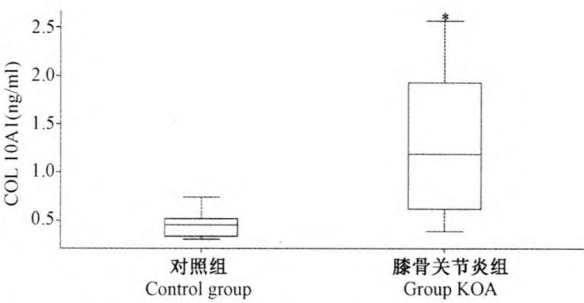


图 1 对照组与 KOA 组患者血清中 COL10A1 水平对比
Fig.1 Comparison of the serum COL10A1 level between control group and KOA group ($P < 0.01$).

* $P < 0.01$ compared with control group

对照组血清 COL10A1 浓度低于膝 OA 各亚组浓度, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3 及图 2。

表 3 对照组与膝骨关节炎各亚组血清 COL10A1 水平比较

Table 3 Comparison of the serum COL10A1 level between control group and each KOA group

分组	例数	COL10A1	
		ng/ml	P 值
对照组	23	0.45 (0.34 - 0.52)	N
I 级	20	0.52 (0.46 - 0.75)	0.048
II 级	25	1.98 (1.59 - 2.12)	0.000
III 级	23	1.84 (1.43 - 2.02)	0.000
IV 级	21	0.79 (0.59 - 1.16)	0.000

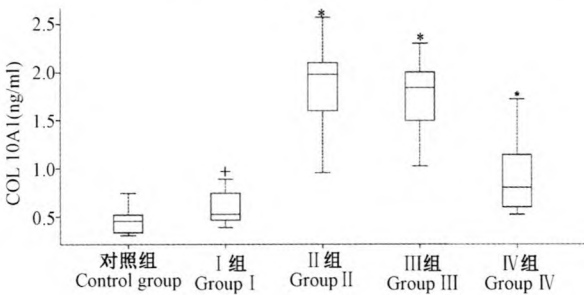


图 2 对照组与各 KOA 亚组患者血清 COL10A1 水平对比

Fig.2 Comparison of the serum COL10A1 level between control group and each KOA group.

* $P < 0.01$ compared with control group, * $P < 0.05$ compared with control group.

2.3 膝 OA 患者各组间比较, I 级组血清 COL10A1 中位数浓度水平低于 II 级组, 差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$), I 级血清 COL10A1 中位数浓度水平低于 III 级组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), I 级血清 COL10A1 中位数浓度水平低于 IV 级组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), II 级血清 COL10A1 中

位数浓度水平高于Ⅲ级,但差异不具有统计学意义($P>0.05$),Ⅱ级血清 COL10A1 中位数浓度水平高于Ⅳ级,差异具有统计学意义($P<0.01$),Ⅲ级血清 COL10A1 中位数浓度高于Ⅳ级,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 4。

表 4 各 KOA 亚组患者血清 COL10A1 水平比较

Table 4 Comparison of the serum COL10A1 level between each KOA subgroup

组别	例数	血清 COL10A1 浓度
I 级	20	0.52(0.46-0.75) ^{αβ}
Ⅱ级	25	1.98(1.59-2.12) ^{λδ}
Ⅲ级	23	1.84(1.43-2.02) [*]
Ⅳ级	21	0.79(0.59-1.16)

α: I 级与Ⅱ级和Ⅲ级比较 $P<0.01$, β: I 级与Ⅳ级比较 $P<0.05$, λ: Ⅱ级与Ⅲ级比较 $P>0.05$, δ: Ⅱ级与Ⅳ级比较 $P<0.01$, *: Ⅲ级与Ⅳ级比较 $P<0.01$

3 讨论

骨性关节炎的早期病理变化是关节软骨下骨的异常增生以及其上覆的软骨受到异常机械压力及生物、化学等复杂因素的综合作用导致软骨细胞发生肥大变性^[17],软骨细胞发生肥大变性时大量分泌 X 型胶原试图修复损伤的软骨细胞^[18],同时Ⅱ型胶原的分泌量减少^[19],因关节软骨持续受软骨下骨的异常增生压力及一系列复杂的异常生物、化学因素综合作用,最终导致软骨细胞变性死亡,造成关节软骨的进一步退化^[17],因此 X 型胶原作为骨关节炎的生化标志物具有坚实的理论依据。

X 型胶原为肥大软骨细胞的特异性表达标志物,主要分布于胚胎时期及生长发育期的生长板软骨内,能够促进软骨细胞钙化胞周基质以及诱导软骨内成骨的功能^[20]。正常成人软骨细胞是不分泌 X 型胶原的,只有在关节软骨细胞发生肥大变性时才会合成分泌 X 型胶原^[21]。X 型胶原蛋白是由三条相同的 α 肽链组成的非纤维性胶原蛋白,每条肽链含有 3 个结构域^[16]:一个短的三螺旋结构域以及在羧基末端的一个较大的球状结构域和在氨基末端的较小的非胶原结构域,其中 X 型胶原的裂解产物 α 肽链能够释放进入血液循环,2014 年 Anne^[16]等学者利用从人 X 型胶原 α 肽链(COL10A1)的羧基端球状结构域获得特异性肽 SFSGFLVAPM,通过去除该特异性肽的末尾两个氨基酸(PM)和无意义肽(DMDYLPRVPNQ),利用竞争性 ELISA(酶联免疫吸附法)成功制备出抗 COL10A1 单克隆抗体,并且通过对 261 例 KOA 患者以及 10 例正常体检者的血

清 COL10A1 水平进行检测,发现 KOA 组血清 COL10A1 是明显升高的,目前因国内暂无血清 COL10A1 水平在骨关节炎早期诊断研究方面的文章,因此本课题组重点研究比较了 KOA 患者和正常对照组以及在影像学不同严重程度分级间的血清 COL10A1 水平比较。

本次课题组研究结果经统计分析得出:人血清 COL10A1 在 KOA 组浓度水平明显高于正常对照组,且差异具有显著性统计学意义($P<0.01$),这说明血清 COL10A1 浓度水平具有对骨关节炎的诊断价值。另外血清 COL10A1 在 KOA 组不同 X 线片改变(K-L 分级)的浓度差异测定发现,血清 COL10A1 在 K-L 分级 KOA-Ⅱ级组和Ⅲ级组浓度水平最高(见图 2),经过统计分析得出血清 COL10A1 在 KOA-Ⅱ级组和 KOA-Ⅲ级组浓度水平差异不具有统计学意义($P>0.05$),KOA-I 级组和Ⅳ级组血清 COL10A1 浓度水平均明显低于Ⅱ级和Ⅲ级组,经统计分析得出差异均具有显著统计学意义($P<0.01$),对上述统计结果分析如下:骨性关节炎患者在 KOA-I 级早期 OA 发生时,软骨细胞肥大变性处于早期,肥大软骨细胞分泌 X 型胶原蛋白试图修补损伤的软骨细胞,故 X 型胶原蛋白的分泌量逐渐增多。在 KOA-Ⅱ级和Ⅲ级时,大量的软骨细胞肥大变性,X 型胶原蛋白分泌量大增,此时外周循环系统测定 X 型胶原代谢标志物 COL10A1 含量是明显增高而且达到峰值。在 KOA-Ⅳ级时,随着关节软骨下骨的持续异常增生,软骨细胞肥大变性失代偿导致软骨细胞死亡数量逐渐增多,关节表面软骨的体积越来越少,软骨下骨质的暴露,关节间隙进一步狭窄,软骨丢失退化严重,故其分泌的 X 型胶原含量开始下降,外周循环系统测定 COL10A1 水平也随之出现下降。因此骨关节炎患者血清 COL10A1 浓度水平的测定结合影像学 K-L 分级,在某种程度上能够对 KOA 病情进行预测评价。

综上所述,血清 COL10A1 作为肥大软骨细胞的特异性标志物,在骨关节炎疾病的早期诊断上具有高度的敏感性,其作为骨关节炎新的生化标志物具有重要的意义,而且血清 COL10A1 浓度测定结合骨关节炎 K-L 分级能够对骨关节炎的病情严重程度作出一定程度的预测。这表明血清 COL10A1 水平不仅可以作为骨关节炎诊断的生物标志物,而且为后续的骨关节炎软骨细胞肥大变性的生化发病机制研究提供了另外一种方向。本研究的不足之处在于检测指标较单一,后续有待于联合软骨合成与分解

代谢相关的特异性标志物进一步深入研究证实。

【参 考 文 献】

- [1] Kular J, Tickner J, Chim SM, et al. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*, 2012, 45(12):863-873.
- [2] Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, et al. Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type X collagen gene. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(1):166-178.
- [3] Sylvest J, Hentzer B, Kobayasi T. Ultrastructure of prolapsed disc. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1977, 48(1):32-40.
- [4] Schmid TM, Linsenmayer TF. A Short chain (pro) collagen from aged epiphyseal chondrocytes. Biochemical characterisation. *J Biol Chem*, 1983, 258(15):9504-9509.
- [5] Gardner DL. Osteoarthritis and allied disease. *Pathological Basis of Connective Tissue Disease*, 1992, 11(2):842-923.
- [6] Walker GD, Fischer M, Gannon J. Expression of type X collagen in osteoarthritis. *J Orthop Res*, 1995, 13(1):4-12.
- [7] Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(5):216.
- [8] Van der Kraan PM, Van den Berg WB. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis and cartilage*, 2012, 20(3):223-232.
- [9] Pitsillides AA, Beier F. Cartilage biology in osteoarthritis lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(11):654-663.
- [10] J Gu, Y Lu, Q Zheng, et al. Identification and characterization of the novel Col10a1 regulatory mechanism during chondrocyte hypertrophic differentiation. *Cell Death and Disease*, 2014, 5(10):1469-1480.
- [11] Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res*, 2005, 8(1):7-11.
- [12] Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, et al. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(1):46-62.
- [13] Gelse K, Ekici AB, Cipa F, et al. Molecular differentiation between osteophytic and articular cartilage-clues for a transient and permanent chondrocyte phenotype. *Osteoarthritis and cartilage*, 2012, 20(2):162-171.
- [14] Saito M, Sasho T, Yamaguchi S, et al. Angiogenic activity of subchondral bone during the progression of osteoarthritis in a rabbit anterior cruciate ligament transaction model. *Osteoarthritis and cartilage*, 2012, 20(12):1574-1582.
- [15] Welting TJ, Caron MM, Emans PJ, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 impacts chondrocyte hypertrophic differentiation during endochondral ossification. *Eur Cell Mater*, 2011, 22(19):420-436.
- [16] Y He, AS Siebuhr, NU Brandt-Hansen, et al. Type X collagen levels are elevated in serum from human osteoarthritis patients and associated with biomarkers of cartilage degradation and inflammation. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2014, 15(1):1-10.
- [17] Janet L. Crane and Xu Cao. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(2):466-472.
- [18] Matsumoto T, Cooper GM, Gharraibeh B, et al. Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intraarticular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble Flt-1. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(5):1390-1405.
- [19] 尤笑迎, 杨红梅. 降钙素对兔膝关节炎发病过程中细胞因子及关节软骨细胞凋亡的试验研究. *中国骨质疏松杂志*, 2012, 18(3):223-228.
You xiao yin, Yang hongmei. The experimental research of the effects of calcitonin on cytokines and apoptosis of articular chondrocytes during the development of knee osteoarthritis in rabbits. *Chin J Osteoporos*, 2012, 18(3):223-228.
- [20] Mim Ding, Sam A, Hee Jeong IM, et al. Targeting Runx2 Expression in Hypertrophic Chondrocytes Impairs Endochondral Ossification During Early Skeletal Development. *J. Cell. Physiol*, 2012, 227(10):3446-3456.
- [21] Katsuhiko Amano, Michael Densmore, Beate Lanske, et al. Indian Hedgehog Signaling Regulates Transcription and Expression of Collagen Type X via Runx2/Smads. *The Journal of biological chemistry*, 2014, 289(36):24898-24910

(收稿日期: 2016-05-09; 修回日期: 2016-06-30)