

联合检测软骨代谢生物标志物在膝骨关节炎早期诊断中的应用

胡楠¹, 张竞¹, 王静¹, 王沛¹, 王婧², 李自成³, 吴田明⁴, 王亚红⁵, 王强⁶, 何岚^{1*}

(西安交通大学第一附属医院 1. 风湿免疫科; 2. 医学影像科, 陕西 西安 710061;
神木市医院 3. 影像科; 4. 临床检验科; 5. 体检中心; 6. 骨科, 陕西 神木 719300)

摘要:目的 评估软骨合成降解中的生物标志物在膝骨关节炎(OA)早期诊断和疾病进展中的临床意义。方法 收集神木市医院门诊及住院部确诊的膝OA患者227例作为膝OA组,选取同期健康体检者178例作为对照组。酶联免疫吸附法检测血清IIA型前胶原N端前肽(PⅡANP)、软骨寡聚基质蛋白(COMP)、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)和尿II型胶原交联C端肽(CTX-II)水平,双膝X线正侧位片和SF-36简明健康调查问卷分别评估膝OA受累程度和生活质量。结果 1)与对照组相比,膝OA组血清PⅡANP水平降低,血清COMP、MMP-3和尿CTX-II水平均升高($P<0.05$);2)中晚期膝OA组血清PⅡANP低于早期膝OA组及对照组($P<0.05$),血清COMP、MMP-3($P<0.05$)和尿CTX-II均高于早期膝OA组及对照组;3)膝OA组血清PⅡANP水平与K-L分级呈反相关($P<0.05$),血清COMP和MMP-3水平与K-L分级呈正相关($P<0.05$),血清COMP水平还与年龄呈正相关($P<0.05$)。血清PⅡANP水平与精神健康呈反相关($P<0.05$);血清COMP水平与生理功能呈反相关($P<0.05$),与精神健康呈正相关($P<0.05$)。结论 血清PⅡANP、COMP、MMP-3和尿CTX-II在膝OA中表达异常,并随疾病严重程度增加而变化,可作为膝OA诊断和疾病进展的参考指标。

关键词: 膝骨关节炎; IIA型前胶原N端前肽; 软骨寡聚基质蛋白; 基质金属蛋白酶-3; II型胶原交联C端肽
中图分类号: R684.3 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2022.12.1906

Combined detection of biomarkers of cartilage metabolism for early diagnosis of knee osteoarthritis

HU Nan¹, ZHANG Jing¹, WANG Jing¹, WANG Pei¹, WANG Jing², LI Zi-cheng³,
WU Tian-ming⁴, WANG Ya-hong⁵, WANG Qiang⁶, HE Lan^{1*}

(1. Department of Rheumatology; 2. Department of Radiography, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061; 3. Department of Radiography; 4. Clinical Laboratory; 5. Physical Examination Center; 6. Department of Orthopaedics, Shenmu Hospital, Shenmu 719300, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical significance of biomarkers of cartilage synthesis and degradation for early diagnosis and prognosis of knee osteoarthritis (OA). **Methods** Two hundred and twenty-seven knee OA outpatients and inpatients in Shenmu Hospital were collected as the knee OA group, while 178 healthy physical examiners as the control group during the same period. Serum pro-collagen IIA N-terminal peptide (PⅡANP), cartilage

收稿日期: 2022-04-15 修回日期: 2022-10-21

基金项目: 国家自然科学基金(82102523); 西安交通大学第一附属医院临床研究基金(XJTU1AF-CRF-2020-009)

* 通信作者 (corresponding author): xajdhl87@mail.xjtu.edu.cn

oligomeric matrix protein (COMP), matrix metalloproteinase (MMP-3), and urinary cross-linked C-telopeptide (CTX-II) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The degree of knee OA involvement and quality of life were assessed by antero-posterior and lateral radiographs of both knees and the SF-36 brief health questionnaire, respectively. **Results** 1) Compared with the control group, the serum P II ANP level decreased and serum COMP, MMP-3 as well as urinary CTX-II increased in the knee OA group ($P < 0.05$). 2) Serum P II ANP was lower ($P < 0.05$), serum COMP, MMP-3 ($P < 0.05$) and urinary CTX-II levels were higher in mid-late stage knee OA group than early knee OA group and control group. 3) Serum P II ANP levels were inversely correlated with K-L grade ($P < 0.05$), serum COMP and MMP-3 levels were positively correlated with K-L grade ($P < 0.05$), and serum COMP level was positively correlated with age ($P < 0.05$). Serum P II ANP level was negatively correlated with mental health dimension in the SF-36 scale ($P < 0.05$); serum COMP level was negatively correlated with physical function dimension ($P < 0.05$) but positively correlated with mental health dimension ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of P II ANP, COMP, MMP-3 and CTX-II is abnormal in knee OA and related to the progress of the severity of the disease, so is a potential reference index for the diagnosis and prognosis of knee OA.

Key words: knee osteoarthritis; procollagen II A N-terminal peptide; cartilage oligomeric matrix protein; matrix metalloproteinase; crosslinked C-telopeptide

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种累及全关节的复杂的异质性疾病, 关节软骨破坏是其最根本的病理学特征。检测敏感有效的生物学标志物在 OA 早期诊断、判断疾病进展以及新药研发中有重要意义。II A 型前胶原 N 端前肽 (procollagen II A N-terminal peptide, P II ANP)、软骨寡聚基质蛋白 (cartilage oligomeric matrix protein, COMP)、基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase, MMP-3) 和 II 型胶原交联 C 端肽 (crosslinked C-telopeptide, CTX-II) 是近年来研究发现的软骨合成和降解过程中最具代表性的新型生物标志物^[1-2]。P II ANP 的表达反映了关节软骨的主要成分 II 型胶原的合成, CTX-II 和 COMP 的水平分别反映了 II 型胶原、非胶原蛋白的降解, 而 MMP-3 是基质金属蛋白酶家族成员之一, 可直接降解蛋白多糖和 IV 型胶原。联合检测上述 4 项指标可对膝 OA 的软骨代谢进行全面评估。本研究选取在陕西省神木市医院门诊及住院部就诊的膝 OA 患者, 探讨联合检测血清 P II ANP、COMP、MMP-3 及尿 CTX-II 在膝 OA 早期诊断和疾病严重程度评估中的临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象: 收集 2017 年 9 月至 2018 年 8 月陕西省神木市医院门诊及住院部确诊的膝 OA 患者

227 例作为膝 OA 组 (符合 1995 年美国风湿病学会修订的 OA 分类诊断标准), 年龄 40~80 岁, 性别不限。选取同期健康体检者 178 例作为对照组, 按照年龄、性别进行匹配。排除其他类型膝关节炎、严重的脏器损害或精神疾病、影响骨代谢的疾病、以及近 4 周内含糖皮质激素或其他药物服用史者。本研究获得西安交通大学第一附属医院及神木市医院伦理委员会批准, 所有受试者均知情同意。

1.1.2 主要试剂: 人 P II ANP 检测试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司), 人 MMP-3、COMP 和 CTX-II 检测试剂盒 (R&D 公司)。

1.2 方法

1.2.1 样本采集: 常规收集受试者血清及尿液标本, 保存于 -80°C 待测。

1.2.2 ELISA 法检测血清中 P II ANP、COMP、MMP-3 以及尿液中 CTX-II 水平: 遵照试剂盒使用说明书操作, 绘制标准曲线, 在酶标仪上 450 nm 处测出各样本吸光度值 (A 值), 根据 A 值在标准曲线上的位置查出各生物标志物浓度 (ng/mL)。

1.2.3 临床资料整理: 收集膝 OA 组患者的临床表现和一般资料, 包括关节肿胀数、关节压痛数、女性绝经情况、有无家族史、既往骨折史、激素服用史等; 同时检测患者的西安大略和麦克马斯特大学关节炎指数 (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index, WOMAC)、双膝 X 线正侧位片、

SF-36 简明健康调查问卷 (short form-36 health survey, SF-36), 对膝 OA 受累程度和生活质量评分做总体评估。

WOMAC 评分: 记录膝 OA 组患者关节疼痛, 包括自我评价静息痛、下蹲痛、活动痛和被动活动痛, 按 10 cm 标尺积分, 无痛为 0 分, 最痛为 10 分, 总指数积分用 24 个组成项目的积分总数来表示^[3], WOMAC 指数越高表示膝 OA 越严重。根据总积分, 按下列标准评估膝 OA 患者的轻重程度: <80 分, 轻度; 80~120 分, 中度; >120 分, 重度。

X 线分级标准: 参考 Kellgren-Lawrence (K-L) 标准, 0 级为正常; 1 级为可疑骨赘; 2 级为明确骨赘和 (或) 关节间隙可疑狭窄; 3 级为中度骨赘和关节间隙明确狭窄; 4 级为重度骨赘、关节间隙明确狭窄和 (或) 关节面硬化。K-L=1 级为早期膝 OA, K-L=2~3 级为中晚期膝 OA^[4]。

SF-36 量表: 包括生理功能 (physical functioning, PF)、生理职能 (role-physical, RP)、躯体疼痛 (bodily pain, BP)、一般健康状况 (general health, GH)、活力 (vitality, VT)、社会功能 (social function-ing, SF)、情感职能 (role-emotional, RE) 以及精神健康 (mental health, MH) 共 8 个指标。其中 PF、RP、BP 和 GH 反映躯体健康, VT、SF、RE 和 MH 反映精神健康。

1.3 统计学分析

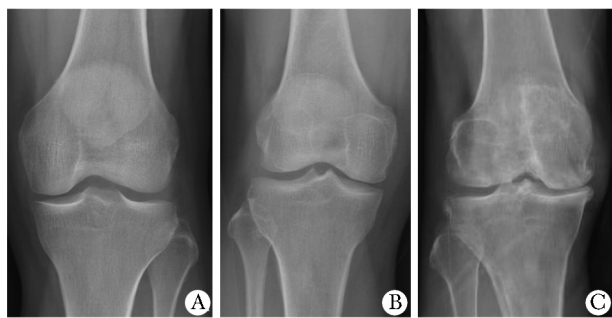
采用 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用成组 *t* 检验、秩和检验; 计数资料以率或构成比表示, 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 两组受试者临床特征

膝 OA 组共纳入 227 例, 其中女性 160 例 (含绝

经者 99 例, 占 61.9%), 男性 67 例; 平均年龄 (56.3 ± 7.9) 岁; BMI (25.53 ± 2.97) kg/m^2 ; WOMAC 评分 (34.79 ± 38.33) 分; 膝关节 X 线 K-L 分级为 1 级 166 例 (73.13%), 2 级 57 例 (25.11%), 3 级 4 例 (1.76%), 无 4 级 (图 1)。对照组 178 例, 其中女性 138 例 (含绝经者 82 例, 占 59.4%), 男性 40 例; 平均年龄 (55.1 ± 8.9) 岁; BMI (25.40 ± 3.14) kg/m^2 。



A. control group, K-L=0; B. early knee OA group, K-L=1; C. mid-late stage knee OA group, K-L=3

图 1 对照组与不同阶段膝 OA 组的膝关节 X 线检测结果

Fig 1 X-ray of knee joints in control group and knee OA group with different stages

2.2 两组血清 PIIANP、COMP、MMP-3 和尿 CTX-II 水平比较

与对照组相比, 膝 OA 组血清中 PIIANP 水平降低, 而血清中 COMP、MMP-3 和尿 CTX-II 水平均升高 ($P<0.05$) (表 1)。

2.3 不同 K-L 分级膝 OA 患者血清 PIIANP、COMP、MMP-3 和尿 CTX-II 水平比较

早期膝 OA 组血清 PIIANP、COMP、MMP-3 和尿 CTX-II 水平与对照组无差异。中晚期膝 OA 组血清 PIIANP 低于早期组及对照组 ($P<0.05$), 血清 COMP、MMP-3 ($P<0.05$) 和尿 CTX-II 均高于早期组及对照组 (表 2)。

表 1 两组血清 PIIANP、COMP、MMP-3 和尿 CTX-II 水平比较

Table 1 Comparison of serum PIIANP, COMP, MMP-3 and urine CTX-II levels between two groups ($\bar{x}\pm s$, ng/mL, $n=2$)

group	PIIANP	COMP	MMP-3	CTX-II
control ($n=178$)	15.47±8.71	137.81±44.06	10.09±7.29	12.40±5.53
knee OA ($n=227$)	11.66±4.21*	249.91±123.44*	14.97±9.78*	15.49±4.92*

* $P<0.05$ compared with control group.

表 2 健康对照组与不同 K-L 分级膝 OA 组血清 P II ANP、COMP、MMP-3 和尿 CTX-II 水平比较
Table 2 Comparison of serum P II ANP, COMP, MMP-3 and urine CTX-II levels between control group and knee OA group with different K-L grades ($\bar{x}\pm s$, ng/mL, $n=2$)

group	P II ANP	COMP	MMP-3	CTX-II
control (K-L=0, $n=178$)	15.47±8.71	137.81±44.06	10.09±7.29	12.40±5.53
early knee OA (K-L=1, $n=166$)	13.67±3.72	146.75±21.87	7.34±2.32	14.97±4.59
mid-late stage knee OA (K-L=2-3, $n=61$)	9.92±3.91*	339.32±102.62*	21.59±8.88*	16.39±5.51

* $P<0.05$ compared with early knee OA group.

2.4 血清 P II ANP、COMP、MMP-3 和尿 CTX-II 水平与膝 OA 患者临床特征及生活质量评分的相关性分析

膝 OA 组血清 P II ANP 水平与 K-L 分级呈反相关,血清 COMP 和 MMP-3 水平与 K-L 分级呈正相关,血清 COMP 水平还与患者年龄呈正相关 ($P<0.05$)。血清 P II ANP 水平与精神健康呈反相关 ($P<0.05$);COMP 水平与生理功能呈反相关,与精神健康呈正相关 ($P<0.05$)。

3 讨论

在 OA 疾病发展的早期阶段,关节局部生化因子的异常表达先于结构改变^[4]。已相继在多种体液(血清、尿液、关节液)和关节组织中(软骨、滑膜、软骨下骨等)检测到大量的生物标志物,但仅有少数与 OA 的发生发展有关^[1-2]。如何在众多生物标志物中进行筛选并应用于临床是目前研究的热点^[5-6]。本研究选择了在 OA 发病的关键环节即软骨退变中研究最多的 4 种生物标志物: P II ANP、COMP、MMP-3 和 CTX-II。联合检测它们在陕西地区膝 OA 患者中的表达情况及与患者临床特征、生活质量的相关性。结果表明,膝 OA 患者中 COMP、MMP-3 和 CTX-II 水平升高, P II ANP 水平降低,提示软骨降解增加,合成减少,并随疾病进展而进一步加剧。这一结论与既往研究^[7-8]一致。

为进一步探讨上述生物标志物在 OA 早期诊断和疾病进展中的意义,本研究将所纳入的膝 OA 患者分为早期和中晚期两组,结果发现,这 4 种生物标志物在中晚期膝 OA 组的表达与早期膝 OA 组和对照组之间均有显著差异,而后两组之间并未发现表达差异。这是由于 OA 是一种异质性很高的疾病,对早期膝 OA 的定义仍存在争议,例如国外有研究以 K-L=0 或 1 级作为判断标准^[9],中国以 K-L=1 或 2 级作为判断标准^[10]。本研究依据最新的 OA 分期标准^[4],将 K-L=1 级作为早期膝 OA 的纳入标准。将早期 OA 的判断标准统一将有助于筛选利于早期诊断的生物标志物^[6]。本研究还通过 SF-36 量表评估膝 OA 患者的生活质量,发现其精神健康和躯体健康与血清 P II ANP 和 COMP 水平相关,进一步说明上述 4 种生物标志物是反映膝 OA 疾病进展的敏感指标。

此外,血清 COMP、尿 CTX-II 水平会受运动、药物、创伤、年龄、BMI 等多种因素影响。本研究也发现在所有受试者中血清 COMP、MMP-3 水平与年龄呈正相关。因此,其稳定性和最佳检测时间有待确定。而血清 P II ANP 的表达水平与膝 OA 进展的相关性也有不同结论^[11-12],说明 P II ANP 的水平可能反映了不同阶段膝 OA 软骨修复合活性的不同,需要慎重评估其应用价值。

参考文献:

[1] Nguyen L, Sharma A, Chakraborty C, *et al.* Review of prospects of biological fluid biomarkers in osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 601. doi: 10.3390/

ijms18030601.

[2] Rousseau JC, Chapurlat R, Garnero P. Soluble biological markers in osteoarthritis [J]. *Ther Adv Musculoskelet*

- Dis, 2021, 13: 1759720X211040300. doi: 10.1177/1759720X211040300.
- [3] Pollard B, Johnston M, Dixon D. Exploring differential item functioning in the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2012, 13: 265. doi: 10.1186/1471-2474-13-265.
- [4] Ding C, Zhang Y, Hunter D. Use of imaging techniques to predict progression in osteoarthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2013, 25: 127-135. doi: 10.1097/BOR.0b013e32835a0fe1.
- [5] Kraus VB, Karsdal MA. Clinical monitoring in osteoarthritis: Biomarkers [J]. Osteoarthr Cartilage, 2022, 30: 1159-1173. doi: 10.1016/j.joca.2021.04.019.
- [6] van Spil W, Szilagy I. Osteoarthritis year in review 2019: biomarkers (biochemical markers) [J]. Osteoarthr Cartilage, 2020, 28: 296-315. doi: 10.1016/j.joca.2019.11.007.
- [7] 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, 62:939-943. doi: 10.1136/ard.62.10.939.
- [8] Verma P, Dalal K. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: a novel diagnostic and prognostic biomarker [J]. J Orthop Res, 2013, 31: 999-1006. doi: 10.1002/jor.22324.
- [9] Fernandes FA, Pucinelli ML, da Silva NP, *et al.* Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in knee osteoarthritis in a Brazilian population: clinical and radiological correlation [J]. Scand J Rheumatol, 2007, 36: 211-215. doi: 10.1080/03009740601154186.
- [10] 刘琳琳,傅捷,张树明,等. IL-6 联合 MMP-3 在早期诊断骨性关节炎中表达及临床意义 [J]. 中国实验诊断学, 2017, 21: 273-276.
- [11] Sharif M, Kirwan J, Charni N, *et al.* A 5-yr longitudinal study of type II A collagen synthesis and total type II collagen degradation in patients with knee osteoarthritis--association with disease progression [J]. Rheumatology, 2007, 46:938-943. doi: 10.1093/rheumatology/kel409.
- [12] Kraus V, Collins J, Hargrove D, *et al.* Predictive validity of biochemical biomarkers in knee osteoarthritis: data from the FNIH OA Biomarkers Consortium [J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76: 186-195. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209252.

本刊稿件格式要求(2)

2.1 摘要:一般以第三人称撰写,采用“结构式摘要”,包括目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)4部分。摘要应具有独立性和自明性,宜300~400字。英文缩写在摘要中首次出现时用“中文全称(英文缩写)”格式。关键词5个以内。在关键词下行标注中图分类号(按中国图书馆分类法第四版查阅)。中、英文摘要及关键词应一致。

2.2 引言:应引用近期参考文献,概述该领域的国内外研究现状及存在的主要问题,明确提出本研究的立题依据、目的及意义,一般400字以内。英文缩写在正文中首次出现时用“中文全称(英文全称,英文缩写)”格式。

2.3 方法:新方法或有特殊程序者应写明白。常用方法或可引用参考文献者不必详述,写明“见参考文献[文献序号]”即可。

2.4 结果:只列实验结果,不重复方法,不对结果进行分析、评述。图、表均须有中、英文题目,题目应具有自明性,图表的标目需写完整,图表内的内容及注释只用英文(注:短篇综述和医学教育栏目的图表内容及注释只用中文)。表格使用“三线表”;计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,注明例数(n);图的标值线分别在横坐标的上侧及纵坐标的右侧;镜下图片应清晰易辨,标明放大倍数。

2.5 讨论:应紧扣实验结果进行讨论,不重复具体方法和结果,一般在800字以内。