·临床研究·

脂联素在膝骨关节炎患者软骨中的表达与软骨损伤程度的关系

陈 亮,刘玉杰*,魏 民*
(解放军总医院骨科 北京 100853)

【摘 要】 **目的** 探讨膝骨关节炎(OA)损伤的软骨脂联素(adiponectin)表达水平与软骨损伤程度的关系。**方法** 选取解放军总医院骨科2016年6月至12月因OA行人工全膝关节置换术18例患者的临床资料和内侧胫骨平台和外侧胫骨平台关节软骨样本,荧光定量PCR反应检测脂联素的表达水平。**结果** 内侧胫骨平台软骨脂联素的ΔCt平均值为(1.93±0.85)个循环,外侧胫骨平台软骨脂联素的ΔCt平均值为(1.42±0.55)个循环,内侧胫骨平台软骨脂联素表达水平低于外侧胫骨平台软骨,差异具有统计学意义($P<0.05$)。以内侧胫骨平台Outerbridge Ⅳ级损伤软骨的脂联素ΔCt值为因变量,体质量指数(BMI)、HSS评分、内翻角为自变量,两者之间的Beta值分别为-0.491、-0.459、-0.54。以外侧胫骨平台非Ⅳ级损伤软骨的脂联素ΔCt值为因变量,BMI、HSS评分、内翻角为自变量,两者之间的Beta值分别为-0.095、0.112、-0.067。内侧胫骨平台软骨脂联素ΔCt与BMI、HSS评分和内翻角负相关($P<0.05$)。**结论** 软骨脂联素表达水平与软骨损伤程度有关,内侧胫骨平台Ⅳ级损伤软骨的脂联素表达水平低于外侧胫骨平台非Ⅳ级损伤的软骨。

【关键词】 脂联素;骨关节炎;关节软骨
【中图分类号】 R684.3 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.04.057

Relationship of adiponectin expression in cartilage from knee osteoarthritis with cartilage injury severity

CHEN Liang, LIU Yu-Jie*, WEI Min*
(Department of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the relationship of cartilage expression profiles of adiponectin from knee osteoarthritis (OA) with the severity of cartilage injury. **Methods** Clinical data of 18 OA patients undergoing total knee arthroplasty in our department from June 2016 to December 2016 were collected in this study. Their cartilages tissues from the medial and lateral tibial plateaus were harvested to detect the mRNA expression level of adiponectin by real-time quantitative PCR. **Results** The expression level of adiponectin was significantly lower in the cartilage tissues from the medial tibial plateau than those from lateral tibial plateau [ΔCt value (1.93±0.85) *vs* (1.42±0.55) cycles, $P<0.05$]. With the expression level of adiponectin in Outerbridge grade Ⅳ cartilage from the medial tibial plateau as a dependent variable (ΔCt value), and body mass index(BMI), hospital for special surgery(HSS) score and varus angle as independent variables, their Beta values were -0.491, -0.459 and -0.54, respectively. And the Beta values were -0.095, 0.112 and -0.067, respectively when the ΔCt value in non-grade Ⅳ cartilage from the lateral tibial plateau was regarded as a dependent variable, and the above 3 indicators as independent variables. ΔCt of adiponectin from the medial tibial plateau was negatively correlated with 3 indicators. **Conclusion** The cartilage expression level of adiponectin is associated with the severity of cartilage injury in knee OA. The expression level is milder in the grade Ⅳ cartilage from the medial tibial plateau than in non-grade Ⅳ cartilage from the lateral tibial plateau.

【**Key words**】 adiponectin; osteoarthritis; articular cartilage
This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81473710) *and the General Program of Natural Science Foundation of Beijing*(7152134).
Corresponding author: LIU Yu-Jie, E-mail: 13701356371@163.com; WEI Min, E-mail: weim301gk@sina.com

人口老龄化以及代谢疾病和肥胖人数的增多使得骨关节炎(osteoarthritis, OA)的发病率逐年增高,但目前研究人员对OA的病因还没有充分的认识[1,2]。生化、遗传、机械因素对OA的发病和进展

收稿日期:2017-01-23;**修回日期**:2017-02-21
基金项目:国家自然科学基金面上项目(81473710);北京市自然科学基金面上项目(7152134)
通信作者:刘玉杰,E-mail:13701356371@163.com;魏 民,E-mail:weim301gk@sina.com

都可产生影响,脂肪组织分泌的一些细胞因子在OA的发生和发展中也起着重要作用[3,4],瘦素、脂联素是脂肪细胞因子当中研究最广泛的两种,相比瘦素的促炎性作用,脂联素兼有促炎性和抗炎性作用[5]。1995年,Scherer首次报道脂联素(adiponectin)是结构类似补体C1q的一种激素。膝关节是OA患者最常发病的关节,本文探讨了脂联素在膝关节OA软骨中的表达水平以及对于OA的作用。

1 对象与方法

1.1 对象

选取解放军总医院骨科2016年6月至12月因OA行人工全膝关节置换术18例患者的关节软骨样本,其中女性15例,男性3例,年龄(67.67±7.84)岁。OA诊断标准:美国风湿病学会标准[6]。纳入标准:年龄>50岁;符合OA诊断标准;患者有不同程度的内翻畸形。排除标准:除OA以外的骨或关节疾病如类风湿性关节炎患者;膝关节有外伤或手术史。本研究已通过医院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 膝关节评分 根据美国纽约特种外科医院(hospital for special surgery, HSS)[7]膝关节评分标准对膝关节进行评价。HSS评分项目包括疼痛、活动度、肌力、稳定、屈曲畸形等。运用计算机(Picture Achieving and Communication Systems,PACS)系统软件测量患者下肢全长位X线片上膝关节的内翻角度,股骨头中心至膝关节中心的连线,膝关节中心至踝关节窝中心的连线,两条线的夹角即为内翻角度,每例患者测量3次取平均值。内翻畸形的诊断标准为股骨头中心与踝关节中心的连线偏离膝关节中心。体质量指数(body mass index,BMI)计算方法:体质量(千克)÷身高(米)的平方[8]。

1.2.2 胫骨平台软骨损伤分级和取样 把内、外侧胫骨平台各在矢状轴上分别分成三等份,靠近髁间嵴的一侧为近侧,远离髁间嵴的一侧为远侧,两者之间为中侧。根据Outerbridge[9]标准评定胫骨平台软骨损伤程度,Ⅰ级:软骨变软或出现空泡;Ⅱ级:软骨出现破损,破损不累及全层的50%;Ⅲ级:软骨出现破损,累及超过全层50%;Ⅳ级:裸露软骨下骨。外侧胫骨平台和内侧胫骨平台软骨均取自远侧,距软骨下骨边缘<0.5 cm,每例接受膝关节置换术患者取内侧胫骨平台Ⅳ级损伤软骨和外侧胫骨平台非Ⅳ级损伤软骨。

1.2.3 脂联素表达水平的检测 RNA提取试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。反转录试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司。Thermo ST 16R台式高速离心机购自赛默飞世尔科技有限公司,实时荧光定量PCR仪Mx3000P购自安捷伦科技有限公司。(1)RNA的提取:用研磨研碎软骨呈粉末状,往软骨粉末中加入TRIzon试剂,裂解5 min后,往管中添加0.2 ml三氯甲烷,静置5 min后,4℃,12 000转/min,离心15 min。离心后RNA主要在上层水相里。吸出上层水相注入新的离心管中,加入等体积的异丙醇,4℃,2000转/min,离心10 min,离心管底部絮状沉淀为RNA。弃去管中的液体,加入1 ml无水乙醇,4℃,7500转/min,离心5 min,离心后弃去管中液体,管中风干后,加入15 μl RNase Free DH_2O,用超微量分光光度计检测各离心管中的RNA浓度。(2)反转录cDNA:反转录体系:5×RT Buffer 4 μl、Oligo dT 1 μl、dNTP mixture 1 μl、RNase Free DH_2O 6.1 μl、RT 1 μl、Total RNA + RNase Free DH_2O 4 μl、25 mmol/L $MgCl_2$ 2.4 μl、Recombinant RNase Inhibitor 0.5 μl,共20 μl。反转录条件:70℃,15 min,42℃,1 h。反转录后得到的cDNA贮存于-70℃冰箱备用。(3)实时荧光定量PCR反应:脂联素上游引物:5'-ATGGGG AAGGAGAGCGTAAT-3',下游引物:5'-ATTGACTTTGGGGCTGTTTG-3';内参上游引物:5'-TGGACCTGACCTGCCGTCTA-3',下游引物:5'-GGTGTCGCTGTTGAAGTCAGA -3'。

荧光定量PCR反应体系为:UltraSYBR Mixture 10 μl,引物1 μl,cDNA 1 μl,dH_2O 8 μl,总体积20 μl。反应条件:变性95℃,15 s,退火60℃,1 min,延伸70℃,1 min。

1.3 统计学处理

应用SPSS17.0统计软件对数据进行处理,计量资料中呈正态分布者用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用t检验。多重线性回归分析脂联素ΔCt值和BMI、HSS评分和内翻角的相关性。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者基本资料

18例OA患者均首次接受全膝关节置换术,内翻角度为(9.56°±3.08°),HSS评分为(40.06±8.33)分,BMI为27.40±4.10,体质量为(69.16±10.29)kg。HSS评分结果:18例患者均有行走时严重疼痛,行走<500 m或不能行走;12例患者膝关节屈曲<120°,6例患者<90°;1例患者有轻度屈曲畸形;

14 例肌力能带动关节活动,4 例不能带动关节活动;15 例患者关节稳定性正常,3 例轻度不稳。

2.2 脂联素的扩增和熔解曲线

计算机采集到荧光信号强度为 0.1 时,记录样本目的基因和内参基因的 Ct 值即循环数,两者循环数的差值为 ΔCt 值。外侧胫骨平台软骨脂联素的 ΔCt 平均值为(1.42 ±0.55)个循环,内侧胫骨平台软骨脂联素的 ΔCt 平均值为(1.93 ±0.85)个循环。结果表明,软骨中脂联素基因和内参基因扩增效果良好,内侧胫骨平台软骨脂联素表达水平低于外侧胫骨平台软骨,差异具有统计学意义($P<0.05$)。图 1 为同一患者内侧胫骨平台Ⅳ级损伤软骨和外侧胫骨平台非Ⅳ级损伤软骨的脂联素扩增和熔解曲线。图 2 为 18 例患者内、外侧软骨脂联素的相对表达水平。

2.3 内外侧胫骨平台脂联素 ΔCt 相关因素分析

以脂联素 ΔCt 值为因变量,多元线性回归分析其与 BMI、HSS 评分和内翻角的相关性。结果表明内侧胫骨平台的 ΔCt 值与 BMI、HSS 评分和内翻角呈负相关($P<0.05$;表 1)。

3 讨 论

脂联素既具有促炎作用,也有抗炎作用,其既能促进 OA 发生,也能抵抗 OA 发生[10]。本研究结果表明外侧胫骨平台非Ⅳ级损伤软骨的脂联素表达水平高于内侧胫骨平台Ⅳ级损伤软骨的脂联素表达水平,可能与脂联素在关节不同病变阶段发挥不同作用有关。

本研究结果表明,内侧胫骨平台的 ΔCt 值与 BMI、HSS 评分和内翻角呈负相关,由于 ΔCt 值越大,脂联素表达水平越低,脂联素表达水平与 BMI、HSS 评分和内翻角呈正相关。根据 Kidwai 等[11]的研究结果,相比 BMI 正常人群,BMI≥30 kg/m^2 的人群患 OA 的概率显著增加。我们认为,BMI≥30 kg/m^2

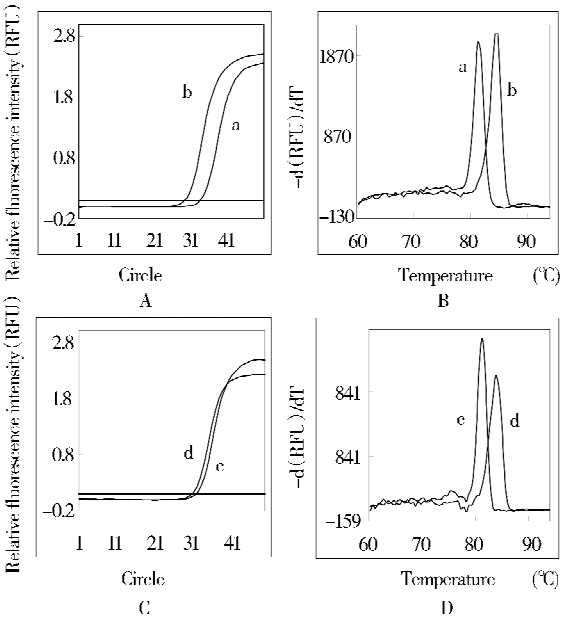


图 1 Adiponectin 基因荧光定量 PCR 扩增和熔解曲线

Figure 1 Amplification plots and dissociation curves of adiponectin gene by real-time quantitative PCR

A: amplification plots; B: dissociation curve (grade Ⅳ cartilage. a: adiponectin gene; b: reference gene); C: amplification plots; D: dissociation curve (non-grade Ⅳ cartilage. c: adiponectin gene; d: reference gene)

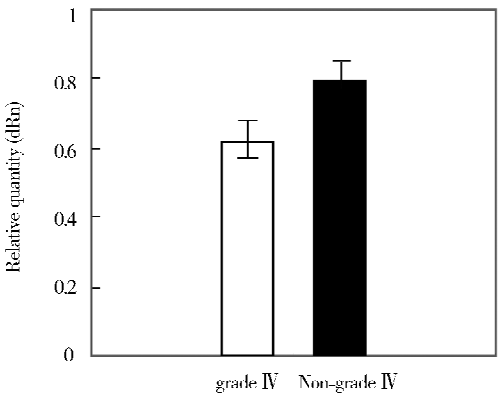


图 2 胫骨平台软骨脂联素相对表达水平

Figure 2 Relative expression levels of adiponectin in cartilage

表 1 脂联素 ΔCt 相关因素的多元线性回归分析

Table 1 The multiple linear regression analysis of adiponectin ΔCt related factors

Dependent variable	Independent variable	Beta	t	P value
ΔCt value of lateral tibial plateau[a]	HSS value	0.112	0.453	0.792
	Varus angle	-0.067	-0.268	0.657
	BMI	-0.095	-0.382	0.708
ΔCt value of medial tibial plateau[b]	HSS value	-0.54	-3.025	0.009
	Varus angle	-0.459	-2.646	0.021
	BMI	-0.496	-2.288	0.036

HSS: hospital for special surgery; BMI: body mass index. $t^{[ab]}=2.576$, $P^{[ab]}=0.02$

的人群软骨中的脂联素较正常人更高。再次提示了脂联素与软骨损伤有关[12]。Nihan 等[13]的研究表明,相比正常对照组,OA 组患者的血浆脂联素浓度更高,差异有统计学意义。校正患者的年龄、性别、BMI 后,差异则无统计学意义,说明肥胖能促进 OA 的发生和发展[14-16]。

HSS 评分高的患者软骨损伤相对较轻。HSS 评分提高与软骨脂联素表达水平的升高有关,这与本文的内侧、外侧软骨脂联素表达水平差异相符。内翻畸形可以引起膝关节受力不均,加剧 OA。内翻畸形患者内翻角的增大,导致内侧胫骨平台受力不均,软骨磨损加剧,本研究结果表明内翻角增大与软骨中脂联素表达水平升高有关,提示软骨脂联素的表达水平与软骨损伤程度也有关,软骨磨损加剧和脂联素表达水平升高的关系仍需进一步研究。

本研究通过患者软骨样本研究脂联素的表达水平,比用培养的软骨细胞更能准确反映 OA 患者关节软骨的损伤程度,同时从一个关节获得两种损伤程度不同的软骨标本进行比较,可排除年龄、性别、BMI 和其他因素的干扰,结果更准确。手术同时获取软骨标本,其损伤程度的判断比通过影像学、组织学诊断更准确。在外侧胫骨平台取非Ⅳ级损伤软骨作为对照,这样可减少或避免取内侧胫骨平台非Ⅳ级损伤软骨作对照时和Ⅳ级损伤软骨混杂,结果更有意义。

鉴于脂联素的表达水平与 OA 软骨的损伤程度有关,下一步还需研究软骨脂联素表达水平与 OA 损伤程度产生联系的机制,确定脂联素在检测 OA 疾病和评估 OA 疗效方面的准确定位。目前,已经有学者提出,脂联素有望成为各种疾病易于检测的稳定的生物标志物[17]。

【参考文献】

[1] Gandhi R, Kapoor M, Mahomed NN, *et al*. A comparison of obesity related adipokine concentrations in knee and shoulder osteoarthritis patients[J]. Obes Res Clin Pract, 2015, 9(4): 420-423. DOI: 10.1016/j.orcp.2015.02.003.

[2] Wang Q, Cai J, Wang J, *et al*. Down regulation of adiponectin receptors in osteoarthritic chondrocytes[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 70(1): 491-497. DOI: 10.1007/s12013-014-9946-z.

[3] Richter M, Trzeciak T, Owecki M, *et al*. The role of adipocytokines in the pathogenesis of knee joint osteoarthritis[J]. Int Orthop, 2015, 39(6): 1211-1217. DOI: 10.1007/s00264-015-2707-9.

[4] Thijssen E, van Caam A, van der Kraan PM, *et al*. Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity induced osteoarthritis[J]. Rheumatology(Oxford), 2015, 54(4): 588-600. DOI: 10.1093/rheumatology/ke u464.

[5] Karvonen-Gutierrez CA, Zheng HY, Mancuso P, *et al*. Higher leptin and adiponectin concentrations predict poorer performance-based physical functioning in midlife women: the Michigan Study of Women's Health across the Nation[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2016, 71(4): 508-514. DOI: 10.1093/gerona/glv123.

[6] Altman R, Asch E, Bloch D, *et al*. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association[J]. Arthritis Rheum, 1986, 29(8): 1039-1049. DOI: 10.1002/art.1780290816.

[7] Mittag F, Leichtle CI, Schlumberger M, *et al*. Clinical outcome after infected total knee and total hip arthroplasty[J]. Acta Ortop Bras, 2016, 24(1): 43-47. DOI: 10.1590/1413-7852 20162401150767.

[8] 邱婕萸真, 侯旭宏, 贾伟平. 我国成人超重、肥胖和腹型肥胖的流行特点[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2014, 13(11): 872-875. DOI: 10.3724/SP.J.1264.2014.000199.
Qiu JYZ, Hou XH, Jia WP. Epidemic characteristics of overweight, obesity and abdominal obesity in Chinese adult population[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2014, 13(11): 872-875. DOI: 10.3724/SP.J.1264.2014.000199.

[9] Outerbridge RE. Further studies in etiology of chondromalacia of the patella[J]. J Bone Joint Surg Br, 1964, 4: 179-182.

[10] Francin PJ, Abot A, Guillaume C, *et al*. Association between adiponectin and cartilage degradation in human osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2014, 22(3): 519-526. DOI: 10.1016/j.joca.2014.01.002.

[11] Kidwai SS, Siddiqi SA, Nazir L, *et al*. Relationship of anthropometric measures with knee osteoarthritis in diabetes mellitus[J]. Pak J Med Sci, 2016, 32(5): 1077-1081. DOI: 10.12669/pjms.325.10425.

[12] Neumann E, Junker S, Schett G, *et al*. Adipokines in bone disease[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(5): 296-302. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.49.

[13] Nihan CL, Saime AY, Fatna DE, *et al*. Adiponectin: is it a biomarker for assessing the disease severity in knee osteoarthritis patients[J]? Int J Rheum Dis, 2015, 11: 1-8. DOI: 10.1111/1756-185X.12790.

[14] Poonpet T, Honsawek S. Adipokines: biomarkers for osteoarthritis[J]? World J Orthop, 2014, 5(3): 319-327. DOI: 10.5312/wjo.v5.i3.319.

[15] Syrbe U, Callhoff J, Conrad K, *et al*. Adipokine serum levels in patients with ankylosing spondylitis and their relation to clinical parameters and radiographic spinal progression[J]. Arthritis Rheum, 2014, 67(3): 678-685. DOI: 10.1002/art.38968.

[16] Junker S, Frommer KW, Krumbholz G, *et al*. Expression of adipokines in osteoarthritis osteophytes and their effect on osteoblasts[J]. Matrix Biol, 2016, S0945-S0953. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.11.005.

[17] Bluher M, Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century[J]. Metabolism, 2015, 64(1): 131-145. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.10.016.

(编辑:王彩霞)