

• 论 著 •

中老年骨关节炎患者肿瘤坏死因子- α 、钙网织蛋白表达与疾病严重程度的相关性*

刘小莉, 邹 明, 张 静, 张红梅
四川省骨科医院检验科, 四川成都 610041

摘 要:目的 研究中老年骨关节炎患者肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、钙网织蛋白(CRT)表达,以及二者与疾病严重程度的相关性。方法 选取 2018 年 3 月至 2020 年 2 月该院收治的中老年骨关节炎患者 95 例为病例组,进一步分为中度组 30 例,重度组 46 例,极重度组 19 例。另外选取因交叉韧带断裂行手术治疗的患者 60 例为对照组。获取所有研究对象关节滑膜组织和滑膜液,采用酶联免疫吸附试验法检测滑膜液中 TNF- α 、CRT 表达水平,免疫组化法检测滑膜组织中 TNF- α 、CRT 表达情况,比较不同病情患者 TNF- α 、CRT 水平,并分析二者与疾病严重程度的相关性。结果 中度组、重度组、极重度组骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平及滑膜组织中 TNF- α 、CRT 的吸光度值(A 值)均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);重度组、极重度组骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平及滑膜组织中 TNF- α 、CRT 的 A 值均明显高于中度组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);极重度组骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平及滑膜组织中 TNF- α 、CRT 的 A 值明显高于重度组,差异有统计学意义($P < 0.05$);TNF- α 在老年骨关节炎滑膜组织中的表达位于滑膜衬里层,且有大量炎性细胞浸润,CRT 的表达主要位于血管周围和滑膜衬里层,表达量较低;关节滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平与骨关节炎严重程度呈正相关($r = 0.667, P < 0.001; r = 0.704, P < 0.001$)。结论 中老年骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平随着病情加重呈上升趋势,二者有望成为该病临床诊断的潜在血清学指标。

关键词:中老年; 骨关节炎; 肿瘤坏死因子- α ; 钙网织蛋白; 疾病严重程度; 相关性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.24.012

中图法分类号:R446.9

文章编号:1673-4130(2021)24-2995-04

文献标志码:A

Expression of tumor necrosis factor- α and calreticulin in middle aged and elderly patients with osteoarthritis and their correlations with disease severity*

LIU Xiaoli, ZOU Ming, ZHANG Jing, ZHANG Hongmei

Department of Clinical Laboratory, Sichuan Orthopedic Hospital,
Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and calreticulin (CRT) in middle aged and elderly patients with osteoarthritis and their correlations with disease severity. **Methods** A total of 95 middle aged and elderly patients with osteoarthritis in Sichuan Orthopedic Hospital from March 2018 to February 2020 were enrolled in case group and divided into moderate group (30 cases), severe group (46 cases) and extremely severe group (19 cases). In addition, 60 healthy people in the same period were selected as control group. The expression of TNF- α and CRT in synovial fluid and synovial tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay and immunohistochemical method respectively. The TNF- α and CRT expression were compared among patients with different severity degrees, and their correlations with the disease severity were also analyzed. **Results** The expression, absorbance (A) value of TNF- α and CRT in moderate group, severe group and extremely severe group were significantly higher than those of control group ($P < 0.05$). The expression levels, A value of TNF- α and CRT in patients with different severity degrees were the highest in extremely severe group, followed by severe group, and which were the lowest in moderate group ($P < 0.05$). The expression of TNF- α in synovial tissue located in the synovial lining layer, with a large number of inflammatory cells infiltrating. The expression of CRT mainly located around the blood

* 基金项目:四川省干部保健科研立项项目(川干研 2020-602)。

作者简介:刘小莉,女,技师,主要从事骨科检验研究。

本文引用格式:刘小莉,邹明,张静,等.中老年骨关节炎患者肿瘤坏死因子- α 、钙网织蛋白表达与疾病严重程度的相关性[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(24): 2995-2998.

vessels and in the synovial lining layer, and the expression level was relatively low. The expression of TNF- α and CRT in synovial fluid of joint positively correlated with the severity of the disease ($r=0.667, P<0.001$; $r=0.704, P<0.001$). **Conclusion** Elevated levels of TNF- α and CRT in the synovial fluid of middle aged and elderly patients with osteoarthritis positively correlate with the severity of the disease, so the two indicators are expected to become potential serological indicators for clinical diagnosis of the disease.

Key words: middle aged and elderly; osteoarthritis; tumor necrosis factor- α ; calreticulin; disease severity; correlation

骨关节炎是以关节表面软骨遭到破坏,而周围骨性组织增生为病理特征的关节病,可导致受累关节产生疼痛,活动时加重,久不活动时僵硬感^[1]。骨关节炎在年龄超过 50 岁的人群中发病率较高,严重影响中老年人的身体健康及生活质量。骨关节炎病变部位分泌物的检测对反映关节代谢状态有重要作用,检测其中特异性分子将有助于判断该病的病理变化,对临床早期诊断具有重要意义^[2]。肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是一种促炎性细胞因子,参与免疫反应、炎症反应等,在重症类风湿关节炎患者血液中可发现 TNF- α 升高^[3]。钙网织蛋白(CRT)是一种内质网主要钙结合蛋白,参与机体多种生理、病理过程。据报道, CRT 与类风湿关节炎患者关节滑膜炎性反应和血管形成有关^[4]。目前,对于中老年骨关节炎患者体内 TNF- α 、CRT 水平的相关研究较少。本研究以 95 例中老年骨关节炎患者为研究对象,探讨中老年骨关节炎患者体内 TNF- α 、CRT 表达情况,并分析二者水平与疾病严重程度的关系,为中老年骨关节炎的临床诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 3 月至 2020 年 2 月本院收治的 95 例中老年骨关节炎患者纳入病例组。纳入标准:(1)符合骨关节炎诊断标准^[5], X 线片等影像学检查结果显示滑膜、骨赘增生,半月板、侧副韧带磨损及膝关节内外翻畸形;(2)年龄 55~80 岁;(3)对本研究内容知情,并签署同意书。排除标准:(1)合并急性或慢性感染性疾病、出血性疾病;(2)合并严重骨质疏松、骨纤维异常或骨性融合;(3)合并心、肝、肾、肺功能障碍。病例组包括男 55 例,女 40 例;年龄 55~80 岁,平均(65.12 $\pm$ 2.07)岁;病程 1~5 年,平均(3.46 $\pm$ 1.03)年;单膝患病 83 例,双膝患病 12 例;病理类型包括软骨型 12 例,滑膜型 18 例,游离体型 7 例,半月板型 15 例,混合型 43 例。根据 Michel Lequesen 膝骨关节炎严重度分级指数(ISOA)^[6]将 95 例中老年骨关节炎患者分为中度组 30 例,重度组 46 例,极重度组 19 例。另外选取同期因交叉韧带断裂行手术治疗的患者 60 例为对照组,留取其滑膜液和手术切除的正常滑膜组织,其中:男 29 例,女 31 例;年龄 56~80 岁,平均(64.52 $\pm$ 4.67)岁。病例组和对照组一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具

有可比性。本研究经本院医学伦理委员会审批通过。

1.2 方法

1.2.1 获取关节滑膜组织和滑膜液 在关节镜检查或行膝关节腔穿刺、冲洗术及其他相应手术时,注入 1.0 mL 的生理盐水,反复回抽、注入 3 遍,将最后一次抽出的液体注入生化管中,以 3 000 r/min 离心 5 min,于 20℃冰箱保存备用。取关节滑膜组织,大小 2 cm $\times$ 2 cm,甲醛固定,室温保存。

1.2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 TNF- α 、CRT 水平 采用 ELISA 法检测滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平,ELISA 法检测试剂盒由默沙克生物科技有限公司提供。

1.2.3 吸光度值(A 值)检测 吸取 100 μ L 关节滑膜液、稀释标准品,36%孵箱避光孵育 90 min,加入生物素化抗体,孵育 60 min,加入酶结合物,再次孵育 30 min,加入显色底物孵育 15 min,加入终止液,于 450 nm 波长检测 A 值,绘制标准曲线。

1.2.4 免疫组化法检测滑膜组织中 TNF- α 、CRT 表达情况 取滑膜组织标本,浸腊包埋后,依次进行切片、烤片、脱蜡水化、封闭内源性酶;BSA 溶液孵育 1 h,加入兔抗人 TNF- α 抗体及 CRT 抗体,孵育 1 h,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染细胞,并进行脱水、透明、封片,观察结果。阳性细胞呈棕褐色,阴性表达呈淡黄色或浅棕色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;等级资料相关分析采用 Spearman 相关。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同严重程度骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平比较 中度组、重度组、极重度组骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);重度组、极重度组骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平明显高于中度组,差异均有统计学意义($P<0.05$),极重度组骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平明显高于重度组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 滑膜组织中 TNF- α 、CRT 的表达情况 正常滑

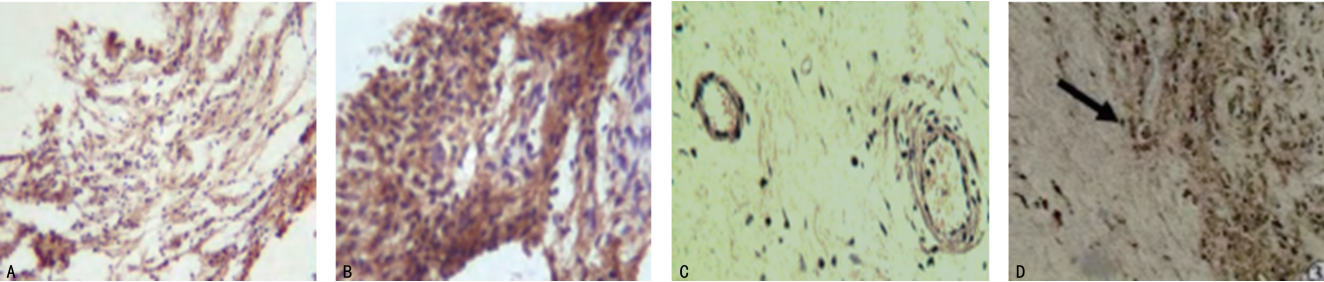
膜组织中未见 TNF- α 表达(图 1A),TNF- α 在中老年骨关节炎滑膜组织中呈阳性表达,表达位于滑膜衬里层,且有大量炎性细胞浸润(图 1B);CRT 在正常滑膜组织中呈阴性表达(图 1C),在中老年骨关节炎滑膜组织中呈阳性表达,表达主要位于血管周围和滑膜衬里层,表达量较低(图 1D)。

2.3 各组滑膜组织中 TNF- α 、CRT 的 A 值比较 中度组、重度组、极重度组骨关节炎患者滑膜组织中 TNF- α 、CRT 的 A 值明显大于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);重度组、极重度组骨关节炎患者滑膜组织中 TNF- α 、CRT 的 A 值明显大于中度组,差异均有统计学意义($P<0.05$),极重度组骨关节炎患者滑膜组织中 TNF- α 、CRT 的 A 值明显大于重度组,差

异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 1 不同严重程度骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	TNF- α (ng/mL)	CRT(ng/mL)
对照组	60	10.23 $\pm$ 2.07	1.23 $\pm$ 0.19
中度组	30	13.54 $\pm$ 2.71 ^a	3.84 $\pm$ 0.82 ^a
重度组	46	18.03 $\pm$ 3.31 ^{ab}	4.28 $\pm$ 1.02 ^{ab}
极重度组	19	21.49 $\pm$ 3.86 ^{abc}	5.73 $\pm$ 0.94 ^{abc}
<i>F</i>		107.58	250.86
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与中度组比较,^b $P<0.05$;与重度组比较,^c $P<0.05$ 。



注:A 为正常滑膜组织中 TNF- α 表达情况;B 为中老年骨关节炎滑膜组织中 TNF- α 表达情况;C 为正常滑膜组织中 CRT 表达情况;D 为中老年骨关节炎滑膜组织中 CRT 表达情况。

图 1 TNF- α 、CRT 在滑膜组织中的表达($\times 400$)

表 2 各组滑膜组织中 TNF- α 、CRT 的 A 值比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	TNF- α	CRT
对照组	60	0.009 4 $\pm$ 0.000 5	0.005 4 $\pm$ 0.000 1
中度组	30	0.076 3 $\pm$ 0.020 1 ^a	0.053 2 $\pm$ 0.010 2 ^a
重度组	46	0.200 3 $\pm$ 0.060 7 ^{ab}	0.138 9 $\pm$ 0.053 7 ^{ab}
极重度组	19	0.391 7 $\pm$ 0.080 4 ^{abc}	0.420 7 $\pm$ 0.075 6 ^{abc}
<i>F</i>		425.62	560.07
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与中度组比较,^b $P<0.05$;与重度组比较,^c $P<0.05$ 。

2.4 滑膜液 TNF- α 、CRT 水平与骨关节炎严重程度的相关性分析 TNF- α 、CRT 水平与骨关节炎严重程度呈正相关($r=0.667, P<0.001; r=0.704, P<0.001$)。

3 讨 论

骨关节炎是一种慢性关节病,表现为关节疼痛、关节变形及关节活动受限等。中老年人是骨关节炎高发群体,75 岁以上人群中发病率高达 80%,60 岁以上人群中发病率为 50%^[7]。该病的发生与肥胖、衰老、炎性反应及创伤等多种因素有关。人体关节表面有一层光滑组织,主要保证关节活动顺畅性,而老年人许多组织器官开始衰老,关节软骨磨损变薄,关节边缘形成骨刺,进而引发骨关节退行性病变^[8-9]。随着分子生物学不断发展,血清中分子标志物的检测成

为临床判断各种疾病进展的重要辅助手段。

TNF- α 作为常见促炎性细胞因子,参与局部炎症反应,具有杀伤靶细胞、促细胞凋亡及内皮细胞活化作用,参与许多关节疾病,如类风湿关节炎、骨关节炎等。杨荣等^[10]发现,膝关节炎患者血清中 TNF- α 水平明显上升,并随着关节炎严重程度的增加呈不断升高趋势。赵娜等^[11]的研究显示,创伤性膝骨关节炎患者血清中 TNF- α 水平[(41.40 $\pm$ 14.63)ng/L]明显高于健康对照者[(24.53 $\pm$ 10.37)ng/L]。TNF- α 在骨关节炎发病机制中最关键的作用是上调基质金属蛋白酶的表达,诱导炎症反应发生,还可刺激软骨细胞合成白细胞介素(IL)-6、IL-8 等,进一步增加炎症反应^[12]。本研究结果显示:对照组 TNF- α 水平明显低于中度组、重度组和极重度组骨关节炎患者,重度组、极重度组骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 水平明显高于中度组,极重度组骨关节炎患者明显高于重度组,即 TNF- α 表现为随病情加重逐渐上升趋势;TNF- α 在正常滑膜组织中呈阴性表达,在骨关节炎患者滑膜组织中呈阳性表达,A 值的变化趋势与其在滑膜液中的变化情况一致。经相关性分析发现,TNF- α 水平与中老年骨关节炎严重程度呈正相关($r=0.667, P<0.001$),说明 TNF- α 能够促进中老年骨关节炎进展,加重病情,这主要与 TNF- α 对关节软骨的破坏有关,其通过刺激软骨降解酶及介导前列腺素合成分泌,破

坏软骨组织,促进骨吸收。CRT 是内质网钙结合蛋白,普遍存在于生物细胞中,在细胞质、细胞表面及细胞外基质中均有表达。研究报道,CRT 参与类风湿关节炎的病理过程,与患者关节滑膜炎性反应有紧密联系^[13]。滑膜血管翳的形成是关节炎的重要病理表现,新生血管向滑膜液输送炎症细胞,同时为滑膜异常增生提供氧气和营养物质,使滑膜长期处于炎症反应状态,增加血管翳的侵袭性^[14]。CRT 可通过多种途径参与血管翳的形成,其中关节炎的共享表位是其主要作用途径,通过该途径参与固有免疫的信号转导,最终促使血管翳形成^[15]。丁红梅等^[16]研究发现,活动期类风湿关节炎患者体内 CRT 水平较稳定期高,同时与 IL-6、TNF- α 等炎症因子水平呈正相关。本研究发现:CRT 在病例组各亚组患者滑膜液及滑膜组织中的水平均高于对照组,同时随着疾病严重程度呈不断上升趋势,提示该指标与骨关节炎疾病进程有一定关系。相关分析显示,CRT 水平与骨关节炎疾病严重程度呈正相关($r=0.704, P<0.001$),提示 CRT 会加重老年骨关节炎病情。本研究还发现:TNF- α 在中老年骨关节炎滑膜组织中的表达位于滑膜衬里层,有大量炎性细胞浸润;CRT 表达主要位于血管周围和滑膜衬里层,表达量较低。

综上所述,中老年骨关节炎患者滑膜液中 TNF- α 、CRT 水平升高,并随着病情加重呈上升趋势,二者水平与该病严重程度呈正相关。TNF- α 、CRT 有望成为临床诊断中老年骨关节炎的潜在血清学指标。

参考文献

[1] 孙晓迪,潘寅兵.老年骨性关节炎的诊治进展[J].实用老年医学,2017,31(1):14-19.

[2] 闻振坤,郭建斌,张育民.骨关节炎早期诊断生物学标志物的研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2017,31(11):1142-1144.

[3] MIN S,WANG C,LU W,et al. Serum levels of the bone turnover markers dickkopf-1,osteoprotegerin, and TNF- α in knee osteoarthritis patients[J]. Clin Rheumatol,2017,36(10):2351-2358.

[4] 焦亚冲,黄珊珊,万春友,等.类风湿关节炎成纤维样滑膜

细胞中钙网织蛋白经 NF- κ B 通路上调 c-FLIP 的表达[J].天津医药,2018,46(2):113-117.

[5] 中华医学会骨科学分会.骨关节炎诊治指南(2007 年版)[J].中国临床医生,2008,27(1):28-30.

[6] LEQUESNE M G,SAMSON M. Indices of severity in osteoarthritis for weight bearing joints[J]. J Rheumatol Suppl,1991,27:16-18.

[7] JIN W S,CHOI E J,LEE S Y,et al. Relationships among obesity,sarcopenia,and osteoarthritis in the elderly[J]. J Obes Metab Syndr,2017,26(1):36-44.

[8] MOBASHERI A,RAYMAN M P,GUALILLO O,et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol,2017,13(5):302-311.

[9] YIN X,WANG J Q,YAN S Y. Reduced miR-26a and miR-26b expression contributes to the pathogenesis of osteoarthritis via the promotion of p65 translocation[J]. Mol Med Re,2017,15(2):551-558.

[10] 杨荣,李跃红,张浩,等.血清 MMP-9,TNF- α 水平与膝骨关节炎严重程度及骨密度的相关性研究[J].现代实用医学,2019,31(8):1048-1050.

[11] 赵娜,康利宝.创伤性膝骨关节炎患者血清 IL-6,TNF- α ,瘦素水平表达与影像学 K-L 分级的相关性[J].现代检验医学杂志,2019,34(5):139-142.

[12] 袁发许,胡松,黄丽霞,等.基于基因芯片的 TNF- α 诱导骨关节炎细胞模型生物信息学分析[J].中国比较医学杂志,2019,29(7):53-60.

[13] 刘宜昕,魏蔚,王阳,等. TNF- α 和 CRT 双信号对 RA 患者滑膜组织 NLRP3 炎症小体的活化作用[J].检验医学,2020,35(4):363-369.

[14] MARTA K,DARIUSZ S,JOANNA C,et al. miRNA expression in the cartilage of patients with osteoarthritis[J]. J Orthop Surg Res,2017,12(3):51-53.

[15] 刘宜昕.肿瘤坏死因子- α /钙网织蛋白双信号促进类风湿关节炎 NLRP3 炎症小体活化的分子机制研究[D].天津:天津医科大学,2019.

[16] 丁红梅,刘建华,贾曙光,等.钙网织蛋白在早期类风湿关节炎中的表达及其与自身抗体和炎性细胞因子的关系[J].天津医药,2018,46(1):84-87.

(收稿日期:2021-02-12 修回日期:2021-09-22)

(上接第 2994 页)

ischemic stroke[J]. Circ Res,2017,121(8):905-907.

[12] VIJAYAN M,KUMAR S,YIN X,et al. Identification of novel circulatory microRNA signatures linked to patients with ischemic stroke[J]. Hum Mol Genet,2018,27(13):2318-2329.

[13] DONG P,IHIRA K,XIONG Y,et al. Reactivation of epigenetically silenced miR-124 reverses the epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits invasion in endometrial cancer cells via the direct repression of IQGAP1 expression[J]. Oncotarget,2016,7(15):20260-20270.

[14] CHISTIYAKOV D A,SOBENIN I A,OREKHOV A N,et al. Human miR-221/222 in physiological and atherosclerotic vascular remodeling [J]. Biomed Res Int, 2015,2015:354517.

[15] DOLZ S,GÓRRIZ D,TEMBL J I,et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers of stenosis progression in asymptomatic carotid stenosis[J]. Stroke,2017,48(1):10-16.

(收稿日期:2021-02-12 修回日期:2021-07-17)