

软骨 X 型胶原研究进展

白小文 吕社民 白 偲

(西安医科大学地方性骨病研究所, 西安 710061)

摘要 软骨 X 型胶原是由软骨肥大区细胞特异表达合成的非微纤维形成性胶原, 在软骨内骨化过程中发挥着重要的作用, 可能与基质降解、钙化、血管侵入有关。文章就其分子特点、基因结构、功能及其与疾病的关系进行综述。

关键词 软骨, X 型胶原, 基因, 骨关节疾病

软骨组织中至少存在五种类型的胶原, 即: II、VI、IX、X 和 XI 型胶原。这些不同类型的胶原分子聚合形成细胞外基质的网状结构^[1]。X 型胶原存在于 II~XI 型基质网络中, 局限地分布于软骨肥大区和骨修复过程中的骨痂中。由于它的局限性分布, 暂时性表达以及在软骨内骨化过程中的作用等这些独特的属性而尤为受人关注, 成为近年来有关胶原研究的热点之一。早在 1981 年 Gibson 从来源于完整的鸡胚胸骨软骨细胞培养中发现了一种新型的短链胶原, 这种短链胶原随细胞培养时间的延长而增加, 因电泳带位于 G 带, 称为 G 胶原, 后来又被称为 64K 胶原、SC 胶原 (short-chain collagen)。1984 年以来统称为 X 型胶原。近年来随着免疫学和分子生物学技术的发展, 对 X 型胶原的研究有了较大的进展。

1 X 型胶原的分子结构

X 型胶原是由三条相同的 α 肽链组成的短链非微纤维形成性胶原, 长度仅是间质胶原 (如 II 型) 的一半。下面以鸡 X 型胶原为例来叙述其分子结构。完整的 X 型胶原分子其分子量为 59 000, 包括三个部分, 即: 三螺旋区 (COL)、C 端非胶原区 (NC₁) 和 N 端非胶原区 (NC₂)。NC₁ 和 NC₂ 区含有较多的芳香族氨基酸 (aa), 虽然这两段非胶原区与其他类型前胶原的附加肽很相似, 但并不易被水解, 存在于

完整的 X 型胶原分子中, 可能具有独特的功能, 诸如促进蛋白多糖的聚集、增加 X 型胶原 59 000 分子复性的速度^[2,3]。完整的 X 型胶原经过胃蛋白酶消化, 除去非胶原区变为 45 000 的 COL 区。

COL 区由 460 aa 组成, 138 nm 长, 在重复的 Gly-Xaa-Yaa 三肽结构中, 含有八个不连续的三肽结构, 其中五个为 Gly-Xaa-Gly, 三个为 Gly-Xaa-Yaa-Gly。在牛 X 型胶原分子的 COL 区, 其中的一个 Gly-Xaa-Gly 型被 Gly-His-Cys-Thr-Pro-Cys-Arg-Pro 取代, 羊 COL 区可能也有类似的结构存在, 这种形式含有两个 Cys 残基易于在胶原分子间形成二硫键, 而人、小鼠和鸡等 X 型胶原 COL 区则不含这种键。在三个不连续的 Gly-Xaa-Yaa-Xaa-Yaa-Gly 中, 其中两个以 Gly-Ile 开始, 是对哺乳动物胶原酶敏感的位点, 具有保守性, 在鸡 COL 区位于 Gly⁹²-Ile⁹³和 Gly⁴²⁰-Ile⁴²¹残基间, 在人、牛、小鼠则位于 Gly⁹⁵-Ile⁹⁶、Gly⁴²³-Ile⁴²⁴。第三个 Gly-Xaa-Yaa-Xaa-Yaa 在小鼠 X 型胶原分子中同样代表了酶裂解位点, 但这个位点在种间没有保守性。X 型胶原如果 α 肽链没有羟化, 则不能形成三螺旋结构。Rachel 等在离体实验缺乏含有羟化酶微粒体的软骨细胞培养条件下合成的 X 型胶原, 可被糜蛋白酶和胰蛋白酶消化^[3], 羟化

不足的胶原变性温度 (T_m) 降低. 这说明 X 型胶原三螺旋的稳定性取决于脯氨酰和赖氨酰羟化的程度. 牛 X 型胶原经胶原酶降解产生一个 32 000 的裂解产物, 含有二硫键, 变性温度为 42 C, 它的功能意义尚不清楚^[4~6].

NC₁ 区含有 162 aa, 其中存在一个 Cys 残基, 但并不形成二硫键, 尤为值得注意的是 NC₁ 区含有 13 个 Tyr 残基和一个未被确认的 N 连接寡糖附着点. NC₁ 区很可能在 X 型胶原的聚集发挥重要的作用. NC₁ 区和 COL 区一样具

有较高的保守性.

NC₂ 区由 52 aa 组成, 包含 18 aa 的信号肽和 34 aa 的 NC₂, 和 COL、NC₁ 明显不同, 其氨基酸组成在种间具有较大的变异性. 现将鸡、人、小鼠、牛、羊的 X 型胶原分子的组成汇总如表 1.

X 型胶原分子由 COL、NC₁ 和 NC₂ 三个功能区组成, 而每个功能区的氨基酸组成及特点是由其特异的基因结构决定的.

表 1 不同种属间 X 型胶原分子组成的差异

	完整的分子		COL 区		NC ₁ 区	NC ₂ 区	
	分子量	氨基酸 (aa)	分子量	氨基酸 (aa)	氨基酸 (aa)	信号肽 (aa)	NC ₂ (aa)
鸡	53 000	674	45 000	460	162	18	34
人	59 000	680	45 000	463	161	18	38
鼠	59 000	680	45 000	463	161	18	38
牛	63 000	674	45 000	463	155	18	38
羊	63 000	NR	49 000	NR	NR	NR	NR

NR: 表示未见报道.

2 X 型胶原分子的基因

小鼠 X 型胶原基因 (COL10a-1) 由 7.2 kb 组成, 定位于第 10 条染色体 (人 COL10A-1 定位于第 6 条染色体的 q²¹~q^{22.3} 区). 由三个外显子 (exon) 和两个内含子 (intron) 组成. COL10a-1 明显不同于其他类型的胶原基因, 其主要特点是完整的 COL 区由一个大的 exon₃ 编码. exon₁ 含有两个 TATA 盒子为转录起始点, 编

码 5' 非翻译区 (5'-UT), 被大约 500 bp 的 intron₁ 与 exon₂ 分隔开. Exon₂ 和 exon₃ 之间是大约 3 000 bp 的 intron₂. Exon₂ 编码部分 5' -UT 区、18 aa 的信号肽和 NC₂ 区的 $33 \frac{1}{3}$ aa. Exon₃ 编码 NC₂ 区的 $4 \frac{2}{3}$ aa、463 aa 的 COL 区和 161 aa 的 NC₁ 区及 3' -UT 区. 不同种属的 X 型胶原基因结构有一定的差异, 汇总于表 2.

表 2 不同种属 X 型胶原基因结构的比较

	exon ₁	intron ₁	exon ₂	intron ₂	exon ₃		
					编码区	3'-UT	全部
小鼠	61 或 207	563	169	3414	1886	993	2914
人	NR	NR	169	~3200	1886	1041	2927
牛	141	NR	169	NR	1868	955	2824
鸡	97	670	159	~2000	1889	240	2136

NR: 表示未见报道, ~: 表示大约数据.

X 型胶原基因各个区域在种间有所不同, 表 3 表示人、牛、羊、鸡与小鼠 COL 10a-1 不同区域相同碱基的百分比. 从表 3 可以看出人和小鼠的 X 型胶原基因最相近. NC₂ 区变异度大, COL 和 NC₁ 区具有很高的保守性, 有报道 NC₁ 区氨基酸水平为 94%, 核酸水平为 87%.

表 3 人、牛、鸡与小鼠 COL10a-1 不同区域相同碱基对百分比^[7]

	信号肽	NC ₂ 区	COL 区	NC ₁ 区	完全序列
人	86.3 (83.3)	87.0 (81.5)	85.0 (86.2)	86.4 (92.0)	82.5 (87.0)
牛	83.0 (72.0)	80.0 (71.0)	82.0 (82.0)	83.5 (86.5)	80.0 (82.0)
鸡	68.0 (55.0)	67.0 (43.0)	70.0 (71.0)	75.0 (71.5)	68.0 (69.4)

括号内为相同氨基酸残基的百分比.

有关 X 型胶原基因表达的调控, 近年来有不少研究报道, 诸如视黄酸、激素、细胞因子、c-myc、 β -甘油磷酸等. 在 X 型胶原基因的 5' -UT 端可能存在视黄酸连接位点, 以促进其表达^[8]. c-myc 是一种正常的内源性的核蛋白, 可促进软骨细胞的增生, 但维持其不成熟状态, 其机理很可能是 c-myc 与 X 型胶原基因启动子 5' 末端的功能性序列结合, 抑制 X 型胶原基因的表达^[9]. Coe 等^[10]用 β -甘油磷酸处理肥大软骨细胞, 增加了 X 型胶原 mRNA 的转录, 同时伴有 PP^{60c-src} 激酶活性的改变. 这说明 X 型胶原基因表达调控同样涉及了蛋白磷酸化过程, 至于其确切的调控机理仍有待于进一步的研究. 但 X 型胶原基因暂时性的由肥大区软骨细胞表达, 无疑在软骨内骨化过程中发挥重要的作用.

3 X 型胶原的功能

在骺板软骨内骨化过程中, 软骨细胞经过了细胞形态、基因表达等一系列分化成熟过程, 这个过程根据基因表达的变化至少可以分为两个阶段. 第一个阶段, 当软骨细胞开始分化时, I 型胶原基因表达迅速减少、消失, II、IX 型渐进性增加, 达到高峰. 第二个阶段当软骨细胞分化到增生末期时, II、IX 型胶原减少, 开始合成 X 型胶原, 在肥大区软骨细胞 X 型胶原的合

该区碱基改变多发生在密码子第三个碱基的摇摆位点, 属沉默突变, 所以其氨基酸水平相似度较核酸水平高. 而在 5' -UT 端种间不存在有意义的相似性. 3' -UT 端具有 AATAA 尾, 只有人和牛 3' -UT 相似度为 70%, 其他种间碱基序列明显不同.

成达到高峰, 并产生大量的基质小泡和碱性磷酸酶^[11]. 这充分说明 X 型胶原在软骨内骨化过程中的重要意义. 关于 X 型胶原的功能目前有下列三种观点.

3.1 X 型胶原与钙化的关系

这是最早提出的观点, 认为 X 型胶原与基质小泡连接. 在分离的 32 000 的 α_1 肽链中大约有 15 个钙结合点, Ca²⁺ 以特异性的剂量依赖方式与 α_1 肽链相连, 在矿化中发挥起始作用^[12]. 但是 Pool 等^[13]的实验并未发现 X 型胶原和矿化沉积起始灶之间有任何关系, 在钙化的基质中 X 型胶原并不连接在基质小泡或 Ca²⁺ 上. Inao 用不同的滤膜滤过基质小泡和 X 型胶原, 根据滤过情况和滤过膜的孔径验证了 X 型胶原并不连接在基质小泡上.

3.2 X 型胶原与基质降解的关系

X 型胶原的 COL 区连接到 II 型胶原微纤维上, 可能改变微纤维的特性, 使其更易降解. 离体实验中 X 型胶原 COL 区因有两个裂解位点比 II 型胶原更易被哺乳动物胶原酶降解^[14]. 基于这些特点提示 X 型胶原在肥大区的合成很可能是在软骨内骨化过程中提供一种易于被骨质取代的基质成分, 以易于钙化. X 型胶原分子虽然链短, 只有 138 nm 长, 但实际上可能由于 COL 区存在极强的非共价键而使该胶原分

子非常稳定, 变性温度为 47℃, 明显高于 I (42℃)、II (44℃)、V (41℃), 需要 1 mol/L CaCl_2 并加热到 100℃ 20 min 才能打开其组成链. 在成熟的关节软骨中, 还有少量的 X 型胶原, 存在于长骨末端. 所以 X 型胶原也并不完全意味着导致软骨基质的降解.

3.3 X 型胶原与血管入侵的关系

血管侵入因子可使软骨细胞增生、X 型胶原合成增加. 基于血管入侵、基质矿化、X 型胶原的生成、软骨细胞的肥大都发生在胚胎第 8~9 天内, 认为 X 型胶原的出现, 改变了细胞外基质的性质, 有助于血管的侵入. 而且血管侵入因子影响的是 X 型胶原的合成, 而不是基质的矿化. 但是矿化和血管入侵谁先发生尚不清楚^[15].

上述有关 X 型胶原功能的三种假说均不完善, 也许 X 型胶原在基质破坏、血管入侵、基质矿化中都起作用, 或者只作用于软骨内骨化过程中的一个关键位点, 使得呈链锁关系的这三个过程互相激发, 最后被骨质取代, 完成其软骨内骨化过程. 不管如何, X 型胶原也只有在维持其正常的结构、数量及分布的状态下, 才能保证其功能的正常发挥, 否则会导致其功能紊乱, 影响软骨发育和代谢.

4 X 型胶原与疾病的关系

有关 X 型胶原与特定的某种疾病的意义尚不完全明了, 但是在一些骨关节疾患中发现 X 型胶原的异常改变. 在骨关节炎中, 肥大软骨细胞生成的 X 型胶原明显增加, 呈团状排列的软骨细胞周围 II 型胶原减少或消失, 而 X 型胶原增多, 导致软骨细胞表型的改变. 一些新生的骨疣或外生性骨赘中也可检测到 X 型胶原. 这说明骨关节炎时某些因子的刺激作用诱导软骨细胞分化成肥大细胞, 不再合成由 VI、XI 型胶原、硫酸软骨素、蛋白多糖组成的功能性软骨基质成分^[16]. X 型胶原合成增加是否是软骨基质退化的结果, 还是 X 型胶原影响了软骨基质的稳定性, 以利于钙化, 尚不完全清楚, 但确实观察到软骨基质退化后期 X 型胶原表达的

增加.

在维生素 D_3 缺乏的佝偻病软骨基质中, X 型胶原合成增加约占胶原总量的 27.9% (正常约为 6%), 其 CNBr 裂解的肽段 3 和 5 发生异常. 也许佝偻病软骨 X 型胶原的合成增加是一种代偿性的反应, 以便为软骨钙化提供最大的钙化面积^[17]. 这个结果与报道的维生素 D_3 可抑制 X 型胶原的合成相一致. 但是也有报道佝偻病 X 型胶原合成减少, 维生素 D_3 可促进 X 型胶原基因的转录, 所以维生素 D_3 对 X 型胶原的合成和代谢的影响仍有待于资料的积累.

基于 X 型胶原在软骨内骨化过程中的重要作用, 推论 X 型胶原基因的突变可能与某些遗传性软骨发育不良性疾病有关. Sweetman 等^[18]分析该疾病病人的 COL10A-1, 发现编码区有七个碱基突变, 但只有第七个碱基的改变导致 Val 被 Met 替代, 可能与疾病发生有关. Wallis 等^[19]分析了两个无关家族的 Schmid 型软骨发育不良病人的 COL10A-1, 发现两个突变位点, 改变了胶原分子结构, 其中一个是在 NC_1 区第 598 位保守位点 Tyr 被 Asp 替代, 但在一个家族中出现表型差异, 八个成员中, 五个发生该疾病; 另一个突变位点是第 614 位 Leu 被 Pro 替代, 它的影响作用是散发的, 病人的母亲和兄弟未受影响. 所以在 X 型胶原 NC_1 区一定氨基酸的改变可能会削弱 X 型胶原多肽链参与链与链之间连接的能力, 影响三螺旋的形成, 使细胞外基质中 X 型胶原减少, 导致其功能紊乱, 造成软骨发育异常. 但是有些碱基的突变普遍存在群体中, 并不引起 X 型胶原结构的异常. 如在家族性多发性软骨发育不良的病人的 X 型胶原分子中发现第 545 aa Gly 被 Arg 取代, 但并不是该病的病因.

从上述四个方面可以看出 X 型胶原许多方面不同于其他类型的胶原, 诸如组织分布、细胞表达、分子特点、基因结构、生物学特性等方面, 也正是由于 X 型胶原的这些独特性, 决定了它在软骨内骨化过程中的重要作用. 尽管其确切的功能尚不清楚, 但是随着人们进一步的研究, 通过分析其分子结构、探讨其基因调

控、检测其与软骨细胞及其他基质成分之间的联系、鉴定其基因突变性功能缺陷,有利于阐明X型胶原的作用机理,这将对一些病因不明的骨关节疾患的研究具有重要的理论和临床意义。

参 考 文 献

- 1 Eyre D R, Wu J J. *J Rheumatol*, 1987; **14**: 25
- 2 Chen Q, Linsenmay C, Gu H *et al.* *J Cell Biol.* 1992; **117**: 687
- 3 Middleton R B, Bulleid N J. *Biochem J*, 1993; **296**: 511
- 4 Thomas J T, Kwan A P L, Grant M E *et al.* *Biochem J*, 1991; **273**: 141
- 5 Elima K, Eerola L, Rosati R *et al.* *Biochem J*, 1993; **289**: 274
- 6 Apte S S, Seldin M F, Hayashi M *et al.* *Eur J Biochem*, 1992; **206**: 217
- 7 Kong S Y C, Kwan K M, Lau E T *et al.* *J Biochem*, 1993; **213**: 99
- 8 Iwamoto M, Eleanor B G, Sherrill L. *Exp-Cell-Res*, 1993; **205**: 213
- 9 Iwamoto M, Kimitoshi Y, Phylcis L V *et al.* *J Biochem*, 1993; **268**: 9654
- 10 Coe M R, Summers T A, Parsons S J *et al.* *Bone Miner*, 1992; **18**: 91
- 11 Patrizio C, Beatrice D, Giorgia M *et al.* *J Cell Biol*, 1988; **106**: 461
- 12 Kirsch J, Von der Mark K. *FEBS Lett*, 1991; **294**: 149
- 13 Pool R A, Pidoux I. *J Cell Biol*, 1989; **109**: 2547
- 14 Schmid T M, Mayne R, Jeffrey J J *et al.* *J Biol Chem*, 1986; **261**: 4184
- 15 Rooney P, Wang M, Kamar P *et al.* *J Cell Sci*, 1993; **105**: 213
- 16 Aigner T, Reichenberger E, Bertling W *et al.* *Virchows Arshio B Cell Pathology*, 1993; **63**: 205
- 17 Anthony M, Reginato I M, Shapiro J W *et al.* *J Biol Chem*, 1988; **263**: 9938
- 18 Sweetman W A, Rash B, Sykes B *et al.* *Am J Hum Genet*, 1992; **514**: 841
- 19 Wallis G A, Rash B, Sweetman W A *et al.* *Am J Hum Genet*, 1994; **54**: 169

Advances in the Study of Cartilaginous Type X Collagen. Bai Xiaowen, Lu Shemin, Bai Cai (*Institute of Endemic Bone Diseases, Xian Medical University, Xian 710061, China*).

Abstract Recent advances in the molecular characteristics, gene structure, functions of type X collagen and its relation to diseases were introduced. Type X collagen consists of three identified α peptides and is assigned to the non-fibril-forming collagen synthesized primarily by hypertrophic chondrocyte in growth plate cartilage. Complete type X collagen molecule includes COL, NC₁ and NC₂ domains in which COL domain, a main peptide, has two cleavage sites sensitive to collagenase. Short as is its chain, type X collagen displays a very stable property, and its melting temperature is up to 47°C. The gene of type X collagen, unlike other interstitial collagens, is composed of three exons and two introns, and the entire COL domain is encoded by a large exon——exon₃ which condenses the gene information. Type X collagen plays an important role during endochondral ossification and seems to be related to matrix degradation, mineralization and/or vascular invasion. Distribution and quantity abnormalities of type X collagen were observed in some osteoarticular disorders, such as osteoarthritis and rachitis. The mutations of type X collagen gene coding for NC₁ domain make the mutant polypeptides difficultly associate with each other, impair supramolecular assemblies and lead to its disfunction in growth cartilage, which appears to elicit given inheritable chondrodysplasias.

Key words cartilage, type X collagen, gene, osteoarticular diseases