

强直性脊柱炎患者外周血DKK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子A表达及与疾病的相关性

· 研究原著 ·

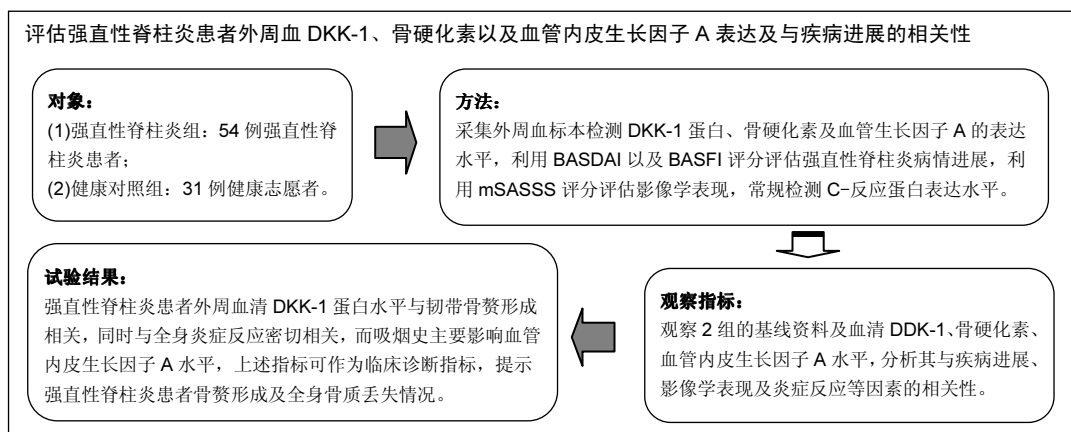
卢仲琳, 官众(青海大学附属医院创伤骨科, 青海省西宁市 810001)

引用本文: 卢仲琳, 官众. 强直性脊柱炎患者外周血 DKK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子 A 表达及与疾病的相关性[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(32):5085-5090.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.32.001

ORCID: 0000-0002-1264-1804(卢仲琳)

文章快速阅读:



卢仲琳, 男, 1981年生, 河北省行唐县人, 汉族, 2003年青海医学院(现青海大学医学院)毕业, 主治医师, 主要从事四肢、关节及脊柱创伤等治疗方面的研究。

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2017)32-05085-06
稿件接受:2017-06-26

文题释义:

DKK-1: 从全身角度而言, DKK-1 不仅在扁骨中骨细胞表达, 也在管状骨中出现表达, DKK-1 水平与脊椎骨密度 Z 值呈负相关表现, 高 DKK-1 水平可能提示椎体骨折风险相关, DKK-1 与炎症因子相互作用参与上述结果形成。强直性脊柱炎患者也发现有不同程度的骨质疏松。因此, 血清 DKK-1 的浓度不仅与局部韧带骨赘形成有关, 也参与系统性炎症和全身性骨量丢失的病理过程(通过对成骨细胞抑制以及破骨细胞激活)。

骨硬化素: 是经典 Wnt 通路的抑制剂, 有韧带骨赘形成的强直性脊柱炎患者其骨硬化素水平较低, 而强直性脊柱炎患者和健康对照组的骨硬化素水平差异无显著性意义。部分研究提示, 骨硬化素水平在强直性脊柱炎患者中显著降低, 在影像学提示严重病变的强直性脊柱炎患者中也有降低。

摘要

背景: 现阶段, 强直性脊柱炎的发生率呈现逐年升高的趋势, 极易导致患者出现残疾, 因此需要重视强直性脊柱炎的合理治疗, 深入分析疾病进展的相关因素, 以此制定、实施相应的治疗方案。

目的: 检测 Wnt 通路 DKK-1 蛋白(Dickkopf-1)、骨硬化素以及血管内皮生长因子 A 在强直性脊柱炎患者体内的表达水平, 评估上述指标与病情进展的相关性。

方法: 从强直性脊柱炎患者中招募研究对象, 同时招募与其匹配的健康志愿者, 收集上述研究对象基线资料及相关病史, 采集外周血标本检测 DKK-1 蛋白、骨硬化素及血管内皮生长因子 A 的表达水平, 利用 Bath 强直性脊柱炎疾病活动评分以及 Bath 强直性脊柱炎功能评分评估强直性脊柱炎病情进展, 利用改良斯洛克强直性脊柱炎脊柱评分评估影像学表现, 常规检测 C-反应蛋白表达水平, 采用 Spearman 相关分析以及多重线性回归分析 DKK-1 蛋白、骨硬化素及血管内皮生长因子 A 与疾病进展、影像学表现及炎症反应等因素的相关性。

结果与结论: ①2 组 DKK-1 蛋白、血管内皮生长因子 A 以及骨硬化素水平差异无显著性意义; ②血沉、C-反应蛋白较高以及无韧带骨赘强直性脊柱炎患者的 DKK-1 蛋白水平显著增高($P < 0.05$), 与骨硬化素水平显著相关($r=0.592$, $P=0.000$); ③具有吸烟史、血沉及 C-反应蛋白增高、Bath 强直性脊柱炎疾病活动评分及 Bath 强直性脊柱炎功能评分较高的强直性脊柱炎患者其外周血血管内皮生长因子 A 水平较高; ④多重线性回归分析提示, 血沉、C-反应蛋白、韧带骨赘骨硬化素水平是 DKK-1 蛋白增高的独立影响因素($P \leq 0.001$), 吸烟史、血沉、C-反应蛋白是血管内皮生长因子 A 水平的独立影响因素($P < 0.05$); ⑤结果提示, 强直性脊柱炎患者外周血清 DKK-1 蛋白水平与韧带骨赘形成相关, 同时与全身炎症反应密切相关, 而吸烟史主要影响血管内皮生长因子 A 水平, 上述指标可作为临床诊断指标, 提示强直性脊柱炎患者骨赘形成及全身骨质丢失情况。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 强直性脊柱炎; DKK-1 蛋白; 骨硬化素; 血管内皮生长因子 A

主题词:

脊柱炎, 强直性; 血管内皮生长因子 A; 组织工程

Lu Zhong-lin, Attending physician, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Serum levels of Dickkopf-1, sclerostin and vascular endothelial growth factor A and their correlation with ankylosing spondylitis progression

Lu Zhong-lin, Guan Zhong (Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The incidence of ankylosing spondylitis (AS) presents a trend of rising year by year, accompanied by a higher disability. Therefore, fully understanding the related factors to the development of AS is of great significance to develop a rational treatment scheme.

OBJECTIVE: To evaluate the expression levels of Dickkopf-1 and sclerostin in Wnt signaling pathway as well as vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) in the AS patients, and to evaluate their correlation with AS progression.

METHODS: AS patients and healthy volunteers were recruited, and their baseline data and medical history were collected. The expression levels of Dickkopf-1, sclerostin, VEGF-A and C-reactive protein in the peripheral blood were detected; the AS progression was evaluated by Bath AS Disease Activity Index and Bath AS Functional Index; the imaging performance was assessed by modified Stoke AS Spine Score; the correlation of Dickkopf-1, sclerostin and VEGF-A with AS progression, imaging performance and inflammatory reaction was analyzed by Spearman's rank correlation analysis and multiple linear regression analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: No significant differences were found in the expression levels of Dickkopf-1, sclerostin and VEGF-A between two groups ($P > 0.05$). The AS patients without syndesmophyte and with higher erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein level appeared with an significant increase in the Dickkopf-1 level ($P < 0.05$), which was significantly related to sclerostin level ($r=0.592$, $P=0.000$). The AS patients with the history of smoking, increase in erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein, as well as higher Bath AS Disease Activity Index and Bath AS Functional Index presented with a higher level of VEGF-A. Multiple linear regression analysis showed that erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, syndesmophyte and sclerostin level were the independent factors affecting the Dickkopf-1 level ($P \leq 0.001$); the history of smoking, erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein were the independent factors affecting VEGF-A ($P < 0.005$). These results suggest that in AS patients, the Dickkopf-1 level is related to syndesmophyte and systemic inflammatory response, while the history of smoking affects VEGF-A level. Therefore, all above indicators can be used to evaluate osteophyte formation and bone mass loss.

Subject headings: Spondylitis; Ankylosing; Vascular Endothelial Growth Factor A; Tissue Engineering

Cite this article: Lu ZL, Guan Z. Serum levels of Dickkopf-1, sclerostin and vascular endothelial growth factor A and their correlation with ankylosing spondylitis progression. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(32):5085-5090.

0 引言 Introduction

近年来研究结果提示,强直性脊柱炎早期影像学表现、急性炎症反应增强^[1-3]、疾病活动性评分增高以及吸烟史等是强直性脊柱炎患者脊柱病变的危险因素。尽管抗肿瘤坏死因子药物(anti-TNF)可以有效地改善早期临床症状及相关生化指标^[4],影像学检查结果也有部分好转,但是尚无充分的循证医学证据支持上述药物可以逆转强直性脊柱炎骨结构性改变^[5]。因此,对于韧带骨化、关节融合等骨骼结构性病理改变的形成机制研究仍具有重要的临床意义,可以为强直性脊柱炎保守治疗提供基础。

研究表明,经典型Wnt信号通路是成骨细胞增殖、分化以及成熟的必需通路^[6-7],而DKK-1(Dickkopf-1)和骨硬化素是参与成骨过程的相关通路的关键性抑制因子^[8]。肿瘤坏死因子转基因所致强直性脊柱炎大鼠模型中可以发现DKK-1的阻断剂具有促进软组织骨化的作用^[9],此外在小鼠强直性脊柱炎模型体内发现经典型Wnt信号通路过度激活^[10],DKK-1和骨硬化素水平显著降低。上述研究提示,DKK-1和骨硬化素的水平改变可能与过度骨化有关^[11]。但是临床研究结果提示,血清DKK-1和骨硬化素水平与影像学表现无显著相关。上述研究结果差异与研究对象、混杂因素以及Wnt信号通路广泛表达有关。血管内皮生长因子A是促进血管生成物质,参与软骨化成骨过程。研究提示血管内皮

生长因子A水平增高提示强直性脊柱炎患者脊椎病变严重,但上述研究未排除吸烟史、代谢性疾病以及糖尿病等导致血管异常的因素^[12],需要进一步研究以明确上述结论。

综上所述,DKK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子A水平可能受到基线资料以及诊治过程多种因素影响,相关较为精确的研究尚未见大量报道。文章将利用基线资料匹配方法以及多重线性回归分析,排除相关因素感染,评估Dkk-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子A的血清含量,上述指标与强直性脊柱炎患者的临床病史、评分、影像学表现和全身炎症状态的相关性,分析上述指标的独立影响因素。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 横断面研究。

1.2 时间及地点 于2012年1月至2015年1月在青海大学附属医院创伤骨科完成。

1.3 材料 试剂由美国贝克曼公司提供,仪器为Beckman-Coulter Immage,血清定量试剂盒为Quantikine(美国R&D公司提供),检测步骤主要根据试剂盒测试步骤由ALISAI全自动酶标测定仪进行。

1.4 对象 采用横断面研究方法,于2012至2015年招募青海大学附属医院门诊及住院就诊的患者严格按照排除/纳入标准纳入研究,同时根据纳入研究的强直性脊柱炎研

研究对象基线资料, 招募匹配的健康志愿者。本试验方案均经研究对象知情同意, 相关方案获得本院伦理委员会批准。

纳入标准: ①按照相关诊疗指南标准诊断为强直性脊柱炎; ②未经抗肿瘤坏死因子药物治疗。

排除标准: ①具有骨质疏松病史; ②肝肾功能异常; ③心血管疾病、糖尿病以及代谢综合征病史; ④患有恶性肿瘤或者其他影响实验评估的严重疾病; ⑤近6个月内使用抗骨质疏松药物、糖皮质激素类药物、高剂量服用非类固醇抗炎药物(平均非类固醇抗炎药摄入指数 ≥ 50)以及大量使用抗风湿药物。

1.5 方法

1.5.1 资料收集 利用研究对象门诊及住院就诊医疗记录, 包括门诊就诊记录、入院记录、住院病程记录、体温单、查体记录、影像学资料以及既往就诊记录等, 详细统计研究对象基线资料如年龄、性别、症状持续时间以及HLA-B27阳性情况。行症状评估以及体格检查, 计算患者体质量指数以及年吸烟量。健康志愿者作为健康对照组, 统计年龄、性别、体质量指数、吸烟状态等基线指标。

1.5.2 临床量表、全身炎症情况以及影像学检查评估 利用Bath强直性脊柱炎疾病活动评分(bath ankylosing spondylitis disease activity index, BASDAI)、Bath强直性脊柱炎功能指数(bath ankylosing spondylitis functional index, BASFI)评估强直性脊柱炎研究对象的临床症状及疾病进展情况。由临床医师评估, 采用视觉模拟评分系统评估BASDAI和BASFI的评分, 分值范围为0-100分。利用血沉以及C-反应蛋白作为炎症急性反应评估指标, 入院或门诊就诊时常规检查血沉和C-反应蛋白。常规拍摄骨盆(包含骶髂关节)和脊柱的正侧位片作为影像学评估依据。强直性脊柱炎研究对象的影像学表现用改良斯托克强直性脊柱炎脊柱评分(modified stroke ankylosing spondylitis spine score, mSASSS)评估。对于超过3个阶段椎体缺失的病例, 不纳入本次研究范围。缺失椎体少于3个节段的病例, 其缺失脊柱节段的评分采用总体同阶段椎体评分的平均值代替。强直性脊柱炎的影像学评定标准为至少在一个椎体边缘其mSASSS评分超过2分(至少出现1个椎旁骨赘)。影像学评估由两名放射科医师完成, 本研究中对于mSASSS评分系统, 观察者自身一致性系数分别为0.992(95%可信区间为0.965-0.996), 0.995(95%可信区间为0.981-0.998), 观察者间一致性系数为0.991(95%可信区间为0.972-0.994), 上述一致性系数均较好。

另外, 根据BASDAI、BASFI、血沉、C-反应蛋白以及影像学表现进行分组分析, 分组标准如下所述: BASDAI和BASFI评分超过40分视为评分增高, 低于40分为评分降低, 血沉高于20 mm/h以及C-反应蛋白水平超过5 mg/L视为血沉以及C-反应蛋白水平增高。

1.5.3 血清DDK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子A水平检测 静脉采集强直性脊柱炎和健康研究对象外周血,

所有样本离心后置于 -80°C 保存, 使用ELISA方法统一检测DDK-1、骨硬化素和血管内皮生长因子A水平。解冻外周血清, 用ELISA试剂盒(南京建工生物有限公司)提供的稀释液稀释5倍, 分别加入ELISA试剂盒中提供的预包被96孔板内, 分别加入100 μL 稀释后样品和标准品, 37°C 孵育90 min。移除上清液, 清洗液清洗3次。每孔加入100 μL 亲和素-过氧化物酶复合物, 37°C 孵育30 min。移除上清液, 清洗液清洗5次。每孔加入100 μL TMB显色液, 37°C 避光反应30 min以内, 加入TMB终止液。酶标仪读数, 吸收波长450 nm。通过标准曲线计算样品中相应指标的浓度。

1.6 主要观察指标 观察强直性脊柱炎组与健康对照组的基线资料及血清DDK-1、骨硬化素、血管内皮生长因子A水平, 多重线性回归分析亚组的DDK-1、骨硬化素及血管内皮生长因子A水平与疾病进展的相关性。

1.7 统计学分析 采用SPSS 21.0统计软件包进行分析, 计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两两比较采用 t 检验; 计数资料组间比较及两两比较采用卡方检验。相关性分析采用Spearman分析。对于偏态分布指标进行对数处理, 多重线性回归分析相关指标的独立影响因素, $P < 0.05$ 被认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 参与者数量分析 2012至2015年门诊及住院就诊强直性脊柱炎患者共106例进入招募流程, 根据排除标准筛选后, 共有54例患者纳入研究。根据54例强直性脊柱炎患者的基线数据情况, 共31例健康志愿者匹配纳入研究。分组流程图见图1。

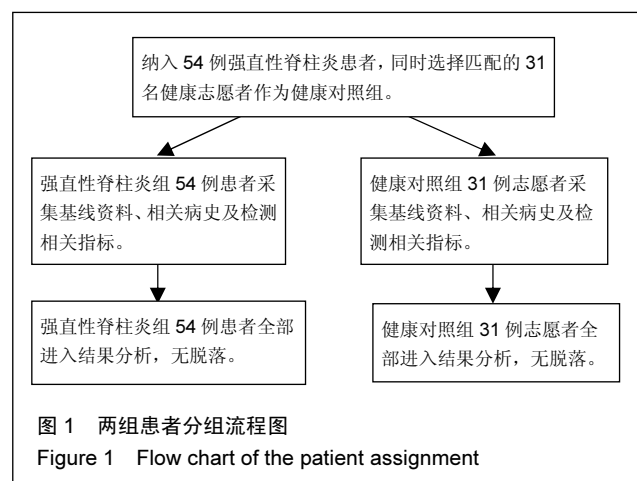


图 1 两组患者分组流程图

Figure 1 Flow chart of the patient assignment

2.2 基线资料对比 2组基线资料经统计学检验, 差异无显著性意义, 如表1所示。强直性脊柱炎组平均血清DDK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子A水平均值均高于健康对照组, 经统计学检验, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 提示匹配后强直性脊柱炎组与健康对照组的外周血清相关生化指标差异无显著性意义。

表 1 强直性脊柱炎组与健康对照组的基线资料及血清 DKK-1、骨硬化素、血管内皮生长因子 A 水平

Table 1 Baseline data and the expression levels of Dickkopf-1, sclerostin and vascular endothelial growth factor A in the patients with ankylosing spondylitis and healthy volunteers

参数	强直性脊柱炎组 (n=54)	健康对照组 (n=31)	P 值
年龄($\bar{x}\pm s$, 岁)	39.2 $\pm$ 1.3	38.7 $\pm$ 2.0	0.365
性别(男/女, n)	51/3	30/1	0.634
体质量指数($\bar{x}\pm s$, kg/m ²)	25.2 $\pm$ 0.5	25.3 $\pm$ 0.4	0.932
症状持续时间($\bar{x}\pm s$, h)	12.1 $\pm$ 1.2	-	
人类白细胞抗原 B27(阳性, n)	28	-	
吸烟现状(n)	26	16	0.843
既往吸烟史(n)	43	25	0.536
血沉($\bar{x}\pm s$, mm/h)	28.4 $\pm$ 1.9	-	
C-反应蛋白(mg/L)	14.3 $\pm$ 2.5	-	
BASDAI 评分($\bar{x}\pm s$)	40.3 $\pm$ 1.9	-	
BASFI 评分($\bar{x}\pm s$)	42.9 $\pm$ 1.5	-	
mSASS 评分($\bar{x}\pm s$)	26.1 $\pm$ 2.7	-	
DKK-1($\bar{x}\pm s$, ng/L)	1 632.5 $\pm$ 103.0	1 384.8 $\pm$ 113.9	0.154
骨硬化素($\bar{x}\pm s$, ng/L)	353.4 $\pm$ 37.2	271.4 $\pm$ 16.8	0.518
血管内皮生长因子 A($\bar{x}\pm s$, ng/L)	323.5 $\pm$ 15.5	291.1 $\pm$ 14.9	0.064

表注: BASDAI: Bath 强直性脊柱炎疾病活动指数; BASFI: Bath 强直性脊柱炎功能指数; mSASS: 改良斯托克强直性脊柱炎脊柱评分。

表 3 DKK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子 A 水平与疾病相关影响因素的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of the expression levels of Dickkopf-1, sclerostin and vascular endothelial growth factor A with disease-related factors

自变量	DKK-1		骨硬化素		血管内皮生长因子 A	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
年龄	-0.311	0.019	-0.281	0.034	-0.134	0.334
体质量指数	-0.323	0.015	-0.177	0.189	-0.025	0.855
症状持续时间	-0.247	0.064	-0.074	0.586	-0.096	0.477
吸烟量	-0.162	0.294	0.054	0.709	0.158	0.301
血沉	0.221	0.099	-0.095	0.482	0.284	0.032
C-反应蛋白	0.164	0.233	-0.112	0.408	0.285	0.032
BASDAI	-0.317	0.066	-0.232	0.083	0.349	0.008
BASFI	-0.143	0.280	-0.160	0.235	0.275	0.039
mSASS	-0.227	0.051	-0.167	0.215	0.033	0.807
DKK-1			0.592	0.000	0.219	0.102
硬化素					-0.022	0.868

表注: BASDAI: Bath 强直性脊柱炎疾病活动指数; BASFI: Bath 强直性脊柱炎功能指数; mSASS: 改良斯托克强直性脊柱炎脊柱评分。

2.3 DKK-1、骨硬化素及血管内皮生长因子 A 的亚组分析见表 2。

按照血沉和 C-反应蛋白水平分组的亚组中, 高血沉和 C-反应蛋白研究对象的 DKK-1 水平与血沉和 C-反应蛋白水平正常的研究对象相比, 经 *t* 检验, 差异有显著性意义 ($P=0.007$, 0.021)。

有韧带骨赘的研究对象 DKK-1 与无韧带骨赘的相比, 经 *t* 检验, 差异有显著性意义 ($P=0.005$), 提示有韧带骨赘患者

表 2 DKK-1、骨硬化素及血管内皮生长因子 A 的亚组分析 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Subgroup analysis of the expression levels of Dickkopf-1, sclerostin and vascular endothelial growth factor A

分组因素	n	DKK-1(ng/L)	骨硬化素 (ng/L)	血管内皮 生长因子 A(ng/L)
吸烟现状	无	28 1 869.2 $\pm$ 198.6 ^a	421.4 $\pm$ 68.5	292.2 $\pm$ 25.1
	有	29 1 398.1 $\pm$ 137.2	295.6 $\pm$ 28.2	359.6 $\pm$ 16.6 ^{ab}
既往吸烟史	无	12 1 764.8 $\pm$ 178.2 ^a	479.6 $\pm$ 118.1 ^a	233.6 $\pm$ 25.4 ^a
	有	45 1 593.4 $\pm$ 148.7	324.8 $\pm$ 34.4	351.3 $\pm$ 16.9 ^{ab}
血沉	正常	21 1 192.5 $\pm$ 135.0	313.2 $\pm$ 30.8	266.0 $\pm$ 14.7
	增高	36 1 884.4 $\pm$ 164.9 ^{ab}	383.1 $\pm$ 56.0	361.8 $\pm$ 21.0 ^{ab}
C-反应蛋白	正常	14 1 120.2 $\pm$ 156.0	302.3 $\pm$ 24.9	261.3 $\pm$ 18.5
	增高	43 1 795.3 $\pm$ 147.0 ^{ab}	375.3 $\pm$ 48.5	347.7 $\pm$ 18.6 ^{ab}
BASDAI	低	31 1 811.3 $\pm$ 183.2 ^a	370.4 $\pm$ 47.9	294.7 $\pm$ 24.1
	高	26 1 397.0 $\pm$ 146.8	341.8 $\pm$ 59.1	364.4 $\pm$ 15.5 ^{ab}
BASFI	低	27 1 675.1 $\pm$ 214.9	341.6 $\pm$ 53.5	290.0 $\pm$ 18.3
	高	30 1 533.6 $\pm$ 134.2	361.3 $\pm$ 51.3	359.4 $\pm$ 23.1 ^{ab}
韧带骨赘	无	13 2 061.3 $\pm$ 132.6 ^a	514.5 $\pm$ 47.0 ^a	308.5 $\pm$ 30.1
	有	44 1 484.2 $\pm$ 148.1 ^b	310.9 $\pm$ 34.2	331.8 $\pm$ 18.1

表注: BASDAI: Bath 强直性脊柱炎疾病活动指数; BASFI: Bath 强直性脊柱炎功能指数; mSASS: 改良斯托克强直性脊柱炎脊柱评分。与表 1 健康对照组数据相比, ^a $P < 0.05$; 与同因素中另一组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表 4 DKK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子 A 水平独立影响因素的多重线性回归分析

Table 4 Multiple linear regression analysis of the expression levels of Dickkopf-1, sclerostin and vascular endothelial growth factor A

独立自变量	模型 1		模型 2	
	β 值	P 值	β 值	P 值
DKK-1 线性回归分析				
吸烟现状	-0.011	0.912	0.018	0.872
血沉	0.515	0.000	-	-
C-反应蛋白	-	-	0.409	0.001
BASDAI	-0.338	0.064	-0.347	0.079
韧带骨赘	-0.382	0.001	-0.175	0.139
年龄	0.244	0.071	0.174	0.221
体质量指数	-0.019	0.863	-0.062	0.601
骨硬化素	0.506	0.000	0.548	0.000
骨硬化素线性回归分析				
韧带骨赘	0.006	0.963	-	-
年龄	-0.251	0.052	-	-
DKK-1	0.532	0.000	-	-
血管内皮生长因子 A 线性回归				
吸烟现状	0.240	0.088	0.269	0.059
血沉	0.227	0.043	-	-
C-反应蛋白	-	-	0.197	0.033
BASDAI	0.161	0.274	0.113	0.467
BASFI	0.106	0.431	0.181	0.163
既往吸烟史	0.465	< 0.001	0.499	< 0.001

表注: BASDAI: Bath 强直性脊柱炎疾病活动指数; BASFI: Bath 强直性脊柱炎功能指数。

DKK-1 显著降低。有韧带骨赘的研究对象骨硬化素水平与无韧带骨赘的相比, 经 *t* 检验, 差异无显著性意义 ($P=0.061$)。

具有吸烟史的亚组中血管内皮生长因子 A 水平均显著增高 ($P=0.010$, 0.040), 高血沉和 C-反应蛋白研究对象其血管内皮生长因子 A 水平与血沉和 C-反应蛋白水平正常的研究对

象相比, 经 t 检验, 差异有显著性意义($P=0.001, 0.005$)。

高BASDAI和BASFI评分的研究对象其血管内皮生长因子A水平与低评分的研究对象相比, 经 t 检验, 差异有显著性意义($P=0.002, 0.002$)。

2.4 DKK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子A水平与疾病相关影响因素的相关性分析 如表3所示。结果提示, DKK-1与年龄、体质指数呈负相关, 与骨硬化素水平正相关。DKK-1水平与症状持续时间呈负相关($r=-0.247, P=0.064$), 与BASDAI评分负相关($r=-0.317, P=0.066$), 但差异并无显著性意义。骨硬化素与年龄负相关; 血管内皮生长因子A水平与血沉、C-反应蛋白、BASDAI和BASFI评分呈正相关。

2.5 多重线性回归分析 分别对DKK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子A水平进行多重线性回归分析, 构建相应回归模型, 回归系数为相应指标影响因素的相关度, $P < 0.05$ 视为回归系数具有意义。

如表4所示, 对于DKK-1水平, 血沉($\beta=0.515, P=0.000$)、C-反应蛋白($\beta=0.409, P=0.001$)、有无韧带骨赘($\beta=-0.382, P=0.001$)、骨硬化素水平($\beta=0.506, P=0.000$)为独立影响因素。

血管内皮生长因子A水平与吸烟史密切关联, 模型1中, $\beta=0.465, P < 0.001$; 模型2中, $\beta=0.499, P < 0.001$ 。另外, 血管内皮生长因子A水平与血沉($\beta=0.227, P=0.043$)以及C-反应蛋白水平($\beta=0.197, P=0.033$)密切相关。

3 讨论 Discussion

本研究结果提示, 血清DKK-1总量、骨硬化素以及血管内皮生长因子A水平与强直性脊柱炎患者吸烟病史、临床症状及功能评分、全身炎症反应以及影像学表现具有相关性, 上述指标可能在新骨形成的病理生理过程中发挥重要作用。本研究通过严格纳入排除标准排除其他可能干扰因素的影响。本研究中强直性脊柱炎患者并未接受抗骨质疏松药物、糖皮质激素、抗风湿药物以及高浓度非类固醇抗炎药以及抗肿瘤坏死因子拮抗剂治疗^[13], 另外, 严格匹配筛选健康对照组, 可以减少其他混杂干扰因素, 如性别、年龄以及体质指数等指标的影响, 研究结论较为可靠。

本研究采用ELISA酶联吸附免疫法检测外周血DKK-1含量, 未检测功能性DKK-1含量。既往研究中强直性脊柱炎患者外周血总DKK-1与功能性DKK-1测量结果均有报道^[14-15]。动物实验研究指出强直性脊柱炎发病过程中DKK-1的正常生理功能发生异常。由于本研究不仅评估DKK-1与骨形成的关系, 同时也评估DKK-1与基线资料, 全身性急性炎症、疾病活动度以及功能评分等相关性, 因此采用外周血DKK-1总量检测。

本研究发现, 强直性脊柱炎患者外周血清中DKK-1与血管内皮生长因子水平较健康对照组有所增高, 但是差异无显著性意义, 与部分研究报道较为一致^[8]。另有研究提

示, 强直性脊柱炎或者其他类型脊柱病变患者体内DKK-1水平显著增加, 可能与疾病进展中产生的肿瘤坏死因子上调DKK-1表达有关。本研究样本量较小, 且入选患者的全身炎症以及相应炎症因子分泌水平并未达到高值, 因此可能出现差异无显著性意义。但是在亚组分析中C-反应蛋白增高、BASDAI、BASFI增高组以及无韧带骨赘组, 其DKK-1和血管内皮生长因子A水平均高于正常对照组。

本研究提示, DKK-1水平可能与全身炎症情况密切相关, 与较大规模的临床试验结果较为一致。基础研究提示DKK-1水平与反应炎症的指标、骨硬化素等具有正相关性^[16], 在早期脊柱脊髓炎病例中发现上述指标的协同增高。肿瘤坏死因子作为强促炎因子, 可以促进DKK-1在成骨细胞内的表达, 进而导致骨硬化素的表达。此外, 高浓度的DKK-1可能与无韧带骨赘有相关性, 反映在强直性脊柱炎患者影像学表现为mSASSS评分较低。既往研究提示mSASSS评分为0分的强直性脊柱炎患者, 其体内DKK-1的水平高于mSASSS超过20分的患者。前瞻队列研究发现DKK-1水平较高的患者骨赘形成可能性较低^[17]。但是也有研究提示强直性脊柱炎动物模型中DKK-1不具有作用LRP5/6受体的功能, 因此不能下调Wnt信号通路的表达, 通过该通路参与骨生成。上述结果略有争议, 需要进一步深入研究。

从全身角度而言, DKK-1不仅在扁骨中骨细胞表达, 也在管状骨中出现表达, DKK-1水平与脊椎骨密度Z值呈负相关表现, 高DKK-1水平可能提示椎体骨折风险相关, DKK-1与炎症因子相互作用参与上述结果形成。强直性脊柱炎患者也发现有不同程度的骨质疏松。因此, 血清DKK-1的浓度不仅与局部韧带骨赘形成有关, 也参与系统性炎症和全身性骨量丢失的病理过程(通过对成骨细胞抑制以及破骨细胞激活)。

骨硬化素也是经典型Wnt通路的抑制剂, 有韧带骨赘形成的强直性脊柱炎患者其骨硬化素水平较低, 而强直性脊柱炎患者和健康对照组的骨硬化素水平差异无显著性意义。部分研究提示, 骨硬化素水平在强直性脊柱炎患者中显著较低, 在影像学提示严重病变的强直性脊柱炎患者中也有降低。本研究发现, 骨硬化素与年龄因素呈负相关性, 与上述研究不一致。考虑到骨硬化素水平受到疾病活动以及遗传背景因素等影响。

强直性脊柱炎患者炎症状态严重, 急性炎症反应蛋白水平高时, 其血管内皮生长因子A水平也增高。血管内皮生长因子水平与炎症指标、疾病活动及功能指标具有正相关, 其中炎症因子是血管内皮生长因子的独立影响因素, 由于血管内皮生长因子A是含量丰富、功能强大的促血管形成因子, 参与固有免疫调节^[12], 因此上述相关具有病理生理学基础。既往研究提示吸烟病史与强直性脊柱炎活动性增高及影像学表现恶化相关。本研究结果未明确DKK-1和骨硬化素与吸烟因素的关系, 但是研究结果较为肯定血管内皮生长因子A水平与吸烟具有强关联, 在正常健康对照中吸

烟者其血管内皮生长因子A水平高于非吸烟者。结合文献, 考虑动物长期暴露在吸烟环境中可以导致破骨细胞活动异常, 可以促进细胞异常增殖和分化, 慢性吸烟因素可以导致炎症因子紊乱、平滑肌重塑以及上皮细胞过度增殖, 上述病理过程均有低氧诱导因子以及血管内皮生长因子A参与。本研究结果提示, 吸烟因素可能通过上调血管内皮生长因子A表达, 影响强直性脊柱炎患者疾病活动评分与影像学变化。另外, 尼古丁对成骨细胞作用可能参与强直性脊柱炎影像学改变, 尼古丁对成骨细胞的促增殖功能具有剂量依赖性, 会提高碱性磷酸酶活性以及局部钙离子浓度。

本研究存在一定局限性: ①作为横断面研究, 缺乏前瞻性观察; ②对于强直性脊柱炎患者未进行系统的双能X射线检查, 强直性脊柱炎全身骨密度指标未纳入研究, 但本研究已排除具有骨质疏松病史病例, 且男性占主要比例, 可以减少相关因素的混杂。本研究结论需要大样本多中心实验进一步验证。

综上所述, 本研究结果提示DKK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子A与新骨形成以及全身炎症状态有关, 临床常规检测DKK-1、骨硬化素以及血管内皮生长因子A有助于预测患者骨质丢失以及韧带骨化形成情况, 吸烟可能通过血管内皮生长因子A相关通路参与强直性脊柱炎发病过程。

致谢: 感谢所有同意参与试验的患者及患者家属, 感谢青海大学附属医院创伤骨科全体医师的大力支持。

作者贡献: 卢仲琳负责实验设计、实验实施、评估及随访。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 研究用人体组织的实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Solmaz D, Kozaci D, Sari I, et al. Oxidative stress and related factors in patients with ankylosing spondylitis. *Eur J Rheumatol*. 2016;3(1):20-24.
- [2] Caglayan M, Sarac O, Kosekahya P, et al. Biomechanical evaluation of cornea in patients with ankylosing spondylitis. *Int Ophthalmol*. 2016.

- [3] Nadkar MY, Warriar SR, Singh AO. Clinical profile of ankylosing spondylitis with special reference to hip involvement. *J Assoc Physicians India*. 2016;64(1):70.
- [4] Rudwaleit M, Landewe R, Sieper J. Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis. *N Engl J Med*. 2016;375(13):1302-1303.
- [5] Yang C, Ding P, Wang Q, et al. Inhibition of Complement Retards Ankylosing Spondylitis Progression. *Sci Rep*. 2016;6:34643.
- [6] Ikegame M, Tabuchi Y, Furusawa Y, et al. Tensile stress stimulates the expression of osteogenic cytokines/growth factors and extracellular proteins in the mouse cranial suture at the site of osteoblast differentiation. *Biomed Res*. 2016;37(2):117-126.
- [7] Karner CM, Esen E, Chen J, et al. Wnt Protein Signaling Reduces Nuclear Acetyl-CoA Levels to Suppress Gene Expression during Osteoblast Differentiation. *J Biol Chem*. 2016;291(25):13028-13039.
- [8] Ustun N, Tok F, Kalyoncu U, et al. Sclerostin and Dkk-1 in patients with ankylosing spondylitis. *Acta Reumatol Port*. 2014;39(2):146-151.
- [9] Coskun BN, Oksuz MF, Ermurat S, et al. Neutrophil lymphocyte ratio can be a valuable marker in defining disease activity in patients who have started anti-tumor necrosis factor (TNF) drugs for ankylosing spondylitis. *Eur J Rheumatol*. 2014;1(3):101-105.
- [10] Camirand A, Goltzman D, Gupta A, et al. The Role of Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) in Osteoblast Response to Microgravity: Mechanistic Implications for Osteoporosis Development. *PLoS One*. 2016;11(7):e160034.
- [11] Tayfur O, Kilic L, Karadag O, et al. Tuberculous bursitis of the greater trochanter mimicking ankylosing spondylitis. *Eur J Rheumatol*. 2015;2(1):31-32.
- [12] Sakellariou GT, Anastasilakis AD, Bisbinas I, et al. Circulating periostin levels in patients with AS: association with clinical and radiographic variables, inflammatory markers and molecules involved in bone formation. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(5):908-914.
- [13] Mitulescu TC, Stavaru C, Voinea LM, et al. The role of Vitamin D in immuno-inflammatory responses in Ankylosing Spondylitis patients with and without Acute Anterior Uveitis. *J Med Life*. 2016;9(1):26-33.
- [14] Li DH, He CR, Liu FP, et al. Annexin A2, up-regulated by IL-6, promotes the ossification of ligament fibroblasts from ankylosing spondylitis patients. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:674-679.
- [15] Machado NP, Nogueira E, Oseki K, et al. Clinical characteristics and frequency of TLR4 polymorphisms in Brazilian patients with ankylosing spondylitis. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*. 2016;56(5):432-440.
- [16] Hossan T, Nagarajan S, Baumgart SJ, et al. Histone Chaperone SSRP1 is Essential for Wnt Signaling Pathway Activity During Osteoblast Differentiation. *Stem Cells*. 2016;34(5):1369-1376.
- [17] Fabiani C, Vitale A, Lopalco G, et al. Different roles of TNF inhibitors in acute anterior uveitis associated with ankylosing spondylitis: state of the art. *Clin Rheumatol*. 2016.