

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.35.009
文章编号: 1005-8982 (2018) 35-0043-05

新进展研究 · 论著

血清 Dickkopf-1 蛋白在早期诊断股骨头坏死 及病情监测中的意义 *

李伟峰¹, 陈立新¹, 陈晓俊¹, 龚水帝¹, 庞凤祥¹, 何晓铭¹, 沈莹珊¹, 杨帆¹, 杨鹏¹,
何伟², 魏秋实³, 陈镇秋²

(1. 广州中医药大学 第一临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院
三骨科, 广东 广州 510405; 3. 广州中医药大学第一附属医院 三骨科保髋区,
广东 广州 510405)

摘要:目的 通过检测股骨头坏死患者血清 Dickkopf-1 (DKK-1) 蛋白含量变化, 探究其在早期诊断股骨头坏死及病情监测中的意义。**方法** 选取 2016 年 5 月—2016 年 11 月于广州中医药大学第一附属医院住院的股骨头坏死患者 67 例 (ARCO 分期: II 期 13 例、III 期 27 例、IV 期 27 例) 作为实验组, 并随机选取 67 例同期在该院体检中心体检正常者作为对照组, 采用 ELISA 法检测两组患者的血清 DKK-1 蛋白浓度, 比较并分析实验组与对照组、实验组内不同病因、不同 ARCO 分期患者的血清 DKK-1 蛋白浓度差异。**结果** 实验组血清 DKK-1 蛋白浓度高于对照组 ($P < 0.05$); 塌陷后患者血清 DKK-1 蛋白浓度高于塌陷前 ($P < 0.05$); 不同病因的患者血清 DKK-1 蛋白浓度比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 实验组 ARCO II、III 及 IV 期的患者血清 DKK-1 蛋白浓度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ROC 曲线分析提示血清 DKK-1 蛋白在诊断股骨头坏死塌陷时具有一定的敏感性和显著的特异性, 分别为 57.40% 和 100.00%。血清 DKK-1 蛋白浓度与 ARCO 分期呈正相关 ($P < 0.05$)。**结论** 血清 DKK-1 蛋白浓度与股骨头坏死患者的病情进展密切相关, 对早期诊断股骨头坏死及监测患者病情变化具有一定的参考意义, 可作为临床诊断及治疗的参考指标之一。

关键词: 股骨头坏死; Dickkopf-1/ 蛋白; 酶联免疫吸附测定; 早期诊断

中图分类号: R684

文献标识码: A

Significance of serum DKK1 protein in early diagnosis of osteonecrosis of femoral head and disease monitoring*

Wei-feng Li¹, Li-xin Chen¹, Xiao-jun Chen¹, Shui-di Gong¹, Feng-xiang Pang¹, Xiao-ming He¹,
Ying-shan Shen¹, Fan Yang¹, Peng Yang¹, Wei He², Qiu-shi Wei³, Zhen-qiu Chen²

(1. First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 2. No.3 Orthopaedic Department, the First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 3. Hip Preserving Ward of No.3 Orthopaedic Department, the First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

Abstract: Objective To detect the serum Dickkopf 1 (DKK1) protein level in patients with osteonecrosis of the femoral head, and explore its significance in early diagnosis and disease monitoring of osteonecrosis. **Methods** Sixty-seven patients with femoral head necrosis (ARCO stage: 13 cases in stage II, 27 cases

收稿日期: 2018-06-21

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No: 81573996)

[通信作者] 陈镇秋, E-mail: chenchenqiu2012@126.com; Tel: 020-36591211

in stage III, and 27 cases in stage IV) who were admitted to the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine from May to November 2016 were selected as the experimental group and 67 others who were normal from the Physical Examination Center of the same hospital in the same period were randomly selected as the control group. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the serum concentration of DKK1 protein in the two groups, and then the differences in serum DKK1 protein concentrations between the two groups and among the patients with different ARCO stages as well as different causes of femoral head necrosis in the control group were compared and analyzed. **Results** The serum DKK1 protein concentration in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The serum DKK1 protein level before collapse was higher than that after collapse ($P < 0.05$). ROC curve indicated that serum DKK1 protein level had certain sensitivity (57.40%) and significant specificity (100%) in the diagnosis of femoral head necrosis collapse. There was no significant difference in serum DKK1 protein concentration between the patients with different causes ($P > 0.05$). The serum DKK1 protein concentration was significant different among the patients with different ARCO stages ($P < 0.05$), and serum DKK1 protein concentration had a positive correlation with ARCO stages ($P < 0.05$). **Conclusions** Serum DKK1 protein level is closely related to the progression of osteonecrosis of the femoral head. It has certain reference significance to early diagnosis of femoral head necrosis and monitoring the disease procession. It can be used as one of the reference indicators for clinical diagnosis and treatment of the disease.

Keywords: femur head necrosis; Dickkopf 1/proteins; enzyme-linked immunosorbent assay; early diagnosis

股骨头坏死 (osteonecrosis of the femoral head, ONFH) 是由多种病因造成的股骨头血液供应不足或中断, 引起骨细胞渐进性凋亡, 继而导致股骨头关节面塌陷的骨科疑难疾病, 好发于 20 ~ 40 岁青壮年^[1-2]。有研究表明骨重塑失衡和骨细胞凋亡是其病理改变过程中的重要环节^[3-4]。Dickkopf-1 (DKK-1) 是 Wnt 信号通路拮抗剂, 可抑制成骨细胞分化, 促进成骨细胞凋亡, 同时可刺激破骨细胞生成, 是骨量的关键调节因子^[5-6]。因此, 在 ONFH 病情进展中, 骨重塑失衡与骨细胞凋亡增加, 可能伴随着血清 DKK-1 蛋白浓度升高。本研究旨在探讨血清 DKK-1 蛋白与 ONFH 病情进展的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 5 月—2016 年 11 月于广州中医药大学第一附属医院住院的 ONFH 患者 67 例作为实验组。其中男性 46 例, 女性 21 例; 年龄 19 ~ 65 岁, 平均 (43.75 ± 11.35) 岁。纳入标准: ①符合 2016 年中华医学会骨科学分会关节外科学组制定的《股骨头坏死临床诊疗规范》的诊断标准^[7]; ②符合国际骨循环学会 (association research circulation osseous, ARCO) 的 II ~ IV 期患者; ③采血前未予任何干预措施。患者按病因分类: 创伤性 10 例、酒精性 24 例、激素性 23 例、特发性 10 例; 按 ARCO 分期分类: II 期 13 例、III

期 27 例、IV 期 27 例。选取同期在本院体检中心体检正常且排除酗酒、近半年使用过影响骨代谢药物或激素的健康群众 67 例作为对照组。其中男性 40 例, 女性 27 例; 年龄 19 ~ 65 岁, 平均 (42.64 ± 10.46) 岁。两组患者性别比例、平均年龄比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2/t=1.169$ 和 0.589 , $P=0.368$ 和 0.557)。患者既往无冠状动脉粥样硬化性心脏病、糖尿病、高血压及乙肝等慢性病史。本研究符合赫尔辛基宣言, 患者在纳入研究前均签署知情同意书并经医院伦理委员会批准 (编号: 20140307)。本研究在中国临床试验注册中心注册 (注册号: ChiCTR-RPC-15006290)。所有原始数据来自广州中医药大学第一附属医院关节骨科数据库系统 V1.0 (登记号: 2017SR274625)。

1.2 方法

1.2.1 血液标本采集 用真空采血管分别抽取两组研究对象的空腹静脉血约 2 ml, 置于 4℃ 冰箱自然凝固后 3 000 r/min 离心 5 min, 提取血清, 分装后置于一 80℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 DKK1 蛋白的检测 采用酶联免疫吸附法测定研究对象的血清 DKK-1 蛋白浓度, 试剂盒购自美国的 R & D 公司。检测严格按试剂盒说明书操作。

1.3 观察指标

①两组患者血清 DKK-1 蛋白浓度差异; ②不同病因、ARCO 分期之间的血清 DKK-1 蛋白浓度差异;

③实验组血清 DKK-1 蛋白浓度与 ARCO 分期的相关性分析;④血清 DKK-1 蛋白诊断股骨头坏死塌陷的特异性及敏感性。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计学软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用 t 检验或单因素方差分析,计数资料以构成比表示,比较用 χ^2 检验。相关分析采用 Spearman 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验组组内及与对照组组间血清 DKK-1 蛋白浓度比较

实验组和对照组血清 DKK-1 蛋白浓度分别为 (68.03 ± 32.53) 和 (54.78 ± 30.46) pg/ml, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 2.433$, $P = 0.016$), 实验组血清 DKK-1 蛋白浓度高于对照组。实验组塌陷前与塌陷后的 ONFH 患者血清 DKK-1 蛋白浓度分别为 (45.68 ± 17.50) 和 (73.41 ± 33.11) pg/ml, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = -4.186$, $P = 0.000$)。实验组创伤性、酒精性、激素性和特发性 ONFH 患者血清 DKK-1 蛋白浓度分别为 (58.18 ± 39.67)、(72.53 ± 29.37)、(64.60 ± 26.20) 和 (74.96 ± 45.34) pg/ml, 经单因素方差分析, 差异无统计学意义 ($F = 0.685$, $P = 0.565$)。实验组 ARCO II 期、III 期和 IV 期 ONFH 患者血清 DKK-1 蛋白浓度分别为 (45.68 ± 17.50)、(71.56 ± 32.16) 和 (75.26 ± 34.54) pg/ml, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 4.280$, $P = 0.018$), 其中 II 期与 III 期患者血清 DKK-1 蛋白浓度比较, 差异有统计学意义 ($F = 7.523$, $P = 0.016$), II 期与 IV 期患者血清 DKK-1 蛋白浓度比较, 差异有统计学意义 ($F = 4.823$, $P = 0.006$), III 期与 IV 期患者血清 DKK-1 蛋白浓度比较, 差异无统计学意义 ($F = 0.000$, $P = 0.662$)。

2.2 ONFH 患者血清 DKK-1 蛋白浓度与 ARCO 分期的相关性

血清 DKK-1 蛋白浓度与 ARCO 分期呈正相关 ($r = 0.281$, $P = 0.021$)。见图 1。

2.3 血清 DKK-1 蛋白诊断 ONFH 塌陷的敏感性 & 特异性

采用 ROC 曲线分析 ONFH 患者塌陷前及塌陷后血清 DKK-1 蛋白浓度, 结果显示: 曲线下面积为

0.754, 敏感性为 57.40% ($31/54$) ($95\%CI: 0.633, 0.851$); 特异性为 100.00% ($0/13$), cut-off 值为 >71.71 pg/ml。见图 2。

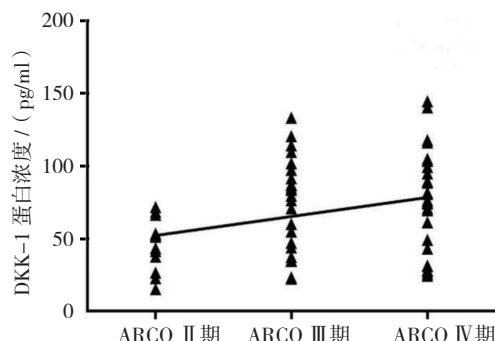


图 1 血清 DKK-1 蛋白浓度与 ONFH ARCO 分期的相关性

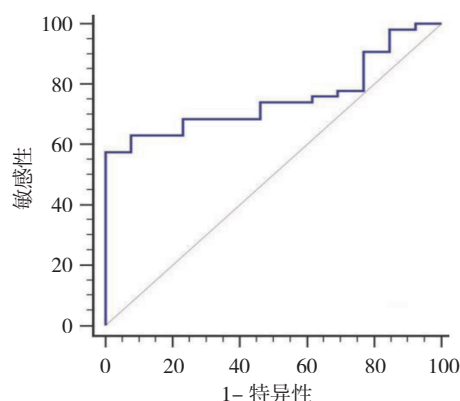


图 2 血清 DKK-1 蛋白诊断 ONFH 塌陷的 ROC 曲线

3 讨论

ONFH 是导致青壮年髋关节功能障碍的常见疾病之一^[8]。在未进行有效治疗的情况下, 80% 的 ONFH 患者在 1 ~ 3 年内会发展为股骨头塌陷, 大多数患者晚期会发展为严重的髋关节骨关节炎, 不可避免的要行人工髋关节置换术^[9]。在中国, 初次行人工髋关节置换术的费用是 8 000 ~ 10 000 美元, 对患者造成巨大的经济负担^[10]。因此, 早期发现及诊断 ONFH, 保留患者自身髋关节, 对患者及社会都大有益处。而预防和纠正塌陷直接关系到保髋治疗的效果^[11]。

近年发现 Wnt 信号通路与骨重塑密切相关, 其中研究最多的是经典 Wnt/ β -catenin 信号通路^[12]。Wnt 蛋白与卷曲蛋白在细胞外与受体 LRP5/6 结合形成复合物, 启动和激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。此通路一方面可促进成骨细胞增殖和分化, 主导骨骼的发育

和修复,另一方面可抑制破骨细胞分化,减少骨吸收^[12-13]。

在骨骼系统中, DKK-1 由成熟的成骨细胞和骨细胞分泌产生, 是骨代谢和关节重塑的调节因子^[14]。DKK-1 可通过与受体 LRP5/6 结合而阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路, 减少成骨细胞增殖并增加其凋亡, 同时可诱导破骨细胞分化和成熟、促进骨吸收, 进而破坏骨稳态, 引起一系列骨病^[5]。MANARA 等^[15]研究发现 DKK-1 表达增加, 可促进成骨细胞凋亡, 减少骨形成, 影响骨重塑。DKK-1 蛋白是成骨细胞的有效负调节因子^[16]。

目前, 越来越多的研究发现, ONFH 与骨细胞、成骨细胞凋亡和骨重塑失衡密切相关^[3, 17]。因此理论上血清 DKK-1 蛋白浓度会随着 ONFH 患者病情发展而升高。本实验结果表明, 实验组血清 DKK-1 蛋白浓度与对照组比较, 在 ONFH 患者中升高, 塌陷后较塌陷前升高, 且与 ARCO 分期呈正相关, 由 ROC 曲线可知, 血清 DKK-1 蛋白在诊断股骨头坏死塌陷时具有一定的敏感性和特异性。从 ROC 曲线计算的 cut-off 值有助于确定塌陷的临界值, 此临界值可能为塌陷的征兆。因此, 检测血清 DKK-1 蛋白浓度有助于监测 ONFH 患者病情进展, cut-off 值可作为临床预测股骨头塌陷的参考指标。

本实验结果也表明, 不同病因的患者血清 DKK-1 蛋白浓度比较无差异, 这可能是由于各种病因的 ONFH 均可造成骨重塑失衡、骨细胞凋亡。有学者通过动物实验研究发现激素性坏死的小鼠股骨头内, 成骨细胞数量和骨量明显低于对照组, 且伴有 DKK-1 表达增加^[16-17]。魏秋实等^[18]研究发现, 激素性与酒精性 ONFH 标本内空骨陷窝率明显增高, 存在骨细胞凋亡。MUTIJIMA 等^[19]研究发现不同病因的 ONFH 标本内成骨细胞和骨细胞凋亡显著高于非 ONFH。上述学者的研究表明不同病因的 ONFH 均存在骨细胞凋亡, 所以理论上不同病因的 ONFH 患者血清 DKK-1 蛋白浓度均会升高。

综上所述, 血清 DKK-1 蛋白浓度与股骨头坏死患者病情发展密切相关, 在临床上, 可作为 ONFH 早期诊断及治疗的参考指标之一, 也可为今后 ONFH 的病情监测及预防塌陷提供一定的理论依据。但目前对于 DKK-1 参与 ONFH 的具体过程仍未完全了解, 还需进一步的实验研究, 其临床价值同样也需要更有力的临床研究来证实。

参 考 文 献:

- [1] VILLA J C, HUSAIN S, VAN DER LIST J P, et al. Treatment of pre-collapse stages of osteonecrosis of the femoral head: a systematic review of randomized control trials[J]. HSS J, 2016, 12(3): 261-271.
- [2] MOYA-ANGELER J, GIANAKOS A L, VILLA J C, et al. Current concepts on osteonecrosis of the femoral head[J]. World J Orthop, 2015, 6(8): 590-601.
- [3] CHEN X J, YANG F, CHEN Z Q, et al. Association of reduced sclerostin expression with collapse process in patients with osteonecrosis of the femoral head[J]. Int Orthop, 2018, 42(7): 1675-1682.
- [4] NARAYANAN A, KHANCHANDANI P, BORKAR R M, et al. Avascular necrosis of femoral head: a metabolomic, biophysical, biochemical, electron microscopic and histopathological characterization[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10721-10736.
- [5] MADAN B, MCDONALD M J, FOXA G E, et al. Bone loss from Wnt inhibition mitigated by concurrent alendronate therapy[J]. Bone Res, 2018, 6: 17-26.
- [6] BRUNETTI G, PAPADIA F, TUMMOLO A, et al. Impaired bone remodeling in children with osteogenesis imperfecta treated and untreated with bisphosphonates: the role of DKK1, RANKL, and TNF-alpha[J]. Osteoporos Int, 2016, 27(7): 2355-2365.
- [7] 李子荣. 股骨头坏死临床诊疗规范 [J]. 中国矫形外科杂志, 2016(01): 49-54.
- [8] MONT M A, CHERIAN J J, SIERRA R J, et al. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: where do we stand today? a ten-year update[J]. J Bone Joint Surg Am, 2015, 97(19): 1604-1627.
- [9] MONT M A, JONES L C, HUNGERFORD D S. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(5): 1117-1132.
- [10] ZHAO D W, YU M, HU K, et al. Prevalence of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head and its associated risk factors in the chinese population: results from a nationally representative survey[J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128(21): 2843-2850.
- [11] 何伟. 如何把握股骨头坏死患者的保髋治疗时机 [J]. 中国骨与关节杂志, 2016(02): 82-86.
- [12] BARON R, KNEISSEL M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments[J]. Nat Med, 2013, 19(2): 179-192.
- [13] WEIVODA M M, RUAN M, HACHFELD C M, et al. Wnt signaling inhibits osteoclast differentiation by activating canonical and noncanonical cAMP/PKA pathways[J]. J Bone Miner Res, 2016, 31(1): 65-75.
- [14] RACHNER T D, GOBEL A, BENAD-MEHNER P, et al. Dickkopf-1 as a mediator and novel target in malignant bone disease[J]. Cancer Lett, 2014, 346(2): 172-177.

- [15] MANARA M, SINIGAGLIA L. Bone and TNF in rheumatoid arthritis: clinical implications[J]. RMD Open, 2015, 1(Suppl 1): e65.
- [16] WANBY P, NOBIN R, VON S P, et al. Serum levels of the bone turnover markers dickkopf-1, sclerostin, osteoprotegerin, osteopontin, osteocalcin and 25-hydroxyvitamin D in Swedish geriatric patients aged 75 years or older with a fresh hip fracture and in healthy controls[J]. J Endocrinol Invest, 2016, 39(8): 855-863.
- [17] WEINSTEIN R S, HOGAN E A, BORRELLI M J, et al. The pathophysiological sequence of glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in male mice[J]. Endocrinology, 2017, 158(11): 3817-3831.
- [18] 魏秋实, 杨帆, 陈晓俊, 等. 激素性与酒精性股骨头坏死患者骨标本坏死区域病理与显微结构特点分析[J]. 中国修复重建外科杂志, 2018(07): 866-872.
- [19] MUTIJIMA E, De MAERTELAER V, DEPREZ M, et al. The apoptosis of osteoblasts and osteocytes in femoral head osteonecrosis: its specificity and its distribution[J]. Clin Rheumatol, 2014, 33(12): 1791-1795.

(李科 编辑)

欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年, 系中国科技论文统计源期刊、北大中文核心期刊、中国核心学术期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊, 被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录。本刊是中华人民共和国教育部主管的综合性医学学术期刊, 以服务于广大医药卫生科技人员, 促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学湘雅医院主办, 湖南省湘雅医学期刊社有限公司出版。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果, 以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。读者为广大医药卫生工作者。

《中国现代医学杂志》为旬刊, 国际标准开本(A4), 全刊为彩色印刷, 无线胶装。内芯采用 90 g 芬欧汇川雅光纸(880×1 230 mm), 封面采用 200 g 紫鑫特规双面铜版纸(635×965 mm)印刷, 每个月 10、20、30 日出版。定价 25 元/册, 全年 900 元。公开发行, 国内统一刊号: CN 43-1225/R; 国际标准刊号: ISSN 1005-8982; 国内邮发代号: 42-143。欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅, 漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。

联系地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国现代医学杂志》发行部, 邮编: 410008

电话: 0731-84327938; 传真: 0731-89753837; E-mail: journal@zgxdyx.com

唯一官方网址: www.zgxdyx.com