

Dickkopf 相关蛋白 1 水平与膝骨关节炎影像学分级的相关性

王彦鹏¹ 孙明林^{1△} 张伟²

[摘要] **目的:**探讨血清和关节滑液中 Dickkopf 相关蛋白 1(DKK-1)水平与膝骨关节炎(KOA)患者影像学分级严重程度的相关性。**方法:**纳入 50 例 KOA 患者为观察组,同期健康体检者 20 例为对照组,采用 ELISA 法检测两组血清和观察组关节液中 DKK-1 水平。膝骨关节炎影像学严重程度分级采用 Kellgren-Lawrence 评分系统。分析血清和膝关节滑液 DKK-1 水平与 KOA 严重程度的相关性。**结果:**KOA 患者不同分级组及正常对照组血清 DKK-1 水平比较,差异有统计学意义($F=13.85, P<0.001$);不同分级 KOA 患者血清及关节滑液 DKK-1 水平差异有统计学意义($F=17.678, P<0.001$; $F=13.978, P<0.001$);血清及关节滑液 DKK-1 水平随着 K-L 分级越高而降低($P<0.05$);血清和关节滑液中 DKK-1 水平与 K-L 分级有相关性($r=-0.731, P<0.001$; $r=-0.690, P<0.001$);血清 DKK-1 水平与关节滑液 DKK-1 水平呈正相关性($r=0.725, P<0.001$)。**结论:**KOA 患者血清和关节滑液 DKK-1 水平显著降低,与 K-L 分级呈负相关。

[关键词] 膝骨关节炎; Dickkopf 相关蛋白 1; 凯尔格伦-劳伦斯分级

[中图分类号] R684 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)09-0022-03

Correlation between Level of Dickkopf-1 and Radiographic Grading of Knee Osteoarthritis

WANG Yanpeng¹ SUN Minglin^{1△} ZHANG Wei²

¹ Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China;

² Medical Team, The Seventh Detachment of Armed Police Force of Shanghai, Shanghai 201900, China.

Abstract Objective: To investigate the correlation between the level of serum and synovia Dickkopf-1 (DKK-1) and radiographic grading of Knee Osteoarthritis (KOA). **Methods:** 50 patients with KOA were enrolled into this study as observation group, and 20 healthy subjects as the control group. The levels of serum and synovia DKK-1 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Radiographic grading of KOA was performed according to the Kellgren-Lawrence (K-L) classification. Correlations between the level of serum and synovia DKK-1 and severity of KOA were analyzed. **Results:** The serum DKK-1 levels of KOA patients were significantly different between grading groups and normal control group ($F=13.85, P<0.001$). The levels of serum and synovia DKK-1 between patients with different grades of KOA were significantly different ($F=17.678, P<0.001$; $F=13.978, P<0.001$). The levels of serum and synovia DKK-1 decreased with increasing severity of K-L grading ($P<0.05$ or 0.01). The levels of serum and synovia DKK-1 were negatively correlated with the severity grade of K-L ($r=-0.731, P<0.001$; $r=-0.690, P<0.001$). The levels of serum DKK-1 was positively correlated with the levels of synovia DKK-1 ($r=0.725, P<0.001$). **Conclusion:** The levels of serum and synovia DKK-1 were extremely decreased in the patients with KOA, which were negatively correlated with K-L classification.

Keywords: knee osteoarthritis; Dickkopf-1; Kellgren-Lawrence classification

膝骨关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)是一种

中老年人常见的退行性骨关节疾病,以关节软骨破坏、软骨下骨硬化和继发滑膜炎为特征,其主要症状是疼痛和关节活动障碍。近年来研究证实, Wnt/ β -catenin 通路和 DKK-1 在 KOA 进展过程中软骨下骨重塑、骨形成与吸收方面发挥着重要的作用^[1]。DKK-1

¹ 武警后勤学院附属医院骨科中心(天津,300162)

² 武警上海总队第七支队后勤处卫生处

[△]通信作者 E-mail:165318413@qq.com

是于 1998 年首次在两栖动物非洲蟾蜍胚胎细胞中被发现,编码为 DKK-1,相对分子质量在 21k 左右,具有 266 个氨基酸残基,有 2 个富含胱氨酸的区域的一种分泌型糖蛋白,是 Wnt 信号通路的天然抑制因子。人 DKK-1 基因位于 10 号染色体 10q11 上。DKK-1 通过与 Wnt 信号转导途径相应的受体来调控细胞的分化、增殖、迁移或癌变,并且对 Wnt 介导的骨重塑起到关键的调节作用,而抑制 Wnt 信号通路是 OA 中骨吸收和替换失衡的关键因素,干预 Wnt 信号通路可能是治疗 OA 的一种新的治疗方法^[2,3]。DKK-1 通过与 Wnt 竞争结合受体复合体 LRP5/6 来抑制 Wnt 信号通路^[4]。研究证实,DKK1 的分泌是骨关节炎中骨重塑的主要调节剂。DKK1 抑制成骨细胞分化,但也降低骨保护素的表达,导致破骨细胞增加。临床研究发现,OA 患者血清 DKK-1 水平下降^[5],但有关 DDK-1 与 KOA 严重程度的相关性研究极少。本研究将探讨血清和关节滑液中 DKK-1 水平与 KOA 影像学严重程度的相关性以及 DKK-1 在 KOA 发病中的作用,现报告如下。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

选择 2014 年 10 月至 2016 年 8 月在本院诊断为 KOA 患者 50 例,选择 20 例膝关节 X 片 K-L 分级为 0 级的健康体检者为对照组。

1.2 Kellgren-Lawrence 分级标准

根据 Kellgren-Lawrence 分级对膝关节炎严重程度进行评估分组,分为 K-L I 级 15 例,II 级 12 例,III 级 13 例,IV 级 10 例。

1.3 纳入标准

1)所有患者均符合中华医学会各科分会制定的膝骨关节炎诊断标准,至少有一侧膝关节符合膝骨关节炎放射学诊断标准^[6]。2)经医院伦理委员会批准,患者自愿同意参与本研究,并签署知情同意书。

1.4 排除标准

1)有感染和炎症性关节,膝关节外伤史;2)有激素用药史,既往曾接受 KOA 药物及其他治疗,包括服用 NSAID、关节腔内注射药物等。

1.5 方法

1.5.1 血清及关节滑液采集 受试者晨起空腹采集静脉血 5 mL,离心取上清液,−80 ℃ 保存待测。观察组根据病情在膝关节注射玻璃酸钠治疗前采用严格无菌穿刺技术抽取关节滑液 1~5 mL,对于关节滑液较少的患者,在注射玻璃酸钠之前先注射数毫升生理盐水,再回抽。回抽的关节滑液经离心后取上清液分装 EP 管中,−80 ℃ 保存待测。由于受伦理学限制,并未抽取对照组膝关节滑液。

1.5.2 DKK-1 水平检测 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清和关节滑液中 DKK-1 水平。人 DKK-1 ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学方法

应用 SPSS18.0 软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布和方差齐者,两组间比较采用 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 法。相关性分析采用 Pearson 法, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

KOA 患者中:男 28 例,女 22 例;年龄 52~73 岁,平均年龄(57.6±7.8)岁;体质量指数(BMI)(24.3±4.5)kg/m²。对照组中:男 12 例,女 8 例;年龄 35~64 岁,平均年龄(53.9±8.3)岁。两组受试者一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 两组患者一般资料比较

组别	例数	性别比 (男/女)	年龄(岁) ($\bar{x} \pm s$)	BMI(kg/m ²) ($\bar{x} \pm s$)
观察组	50	28/22	57.6±7.8	24.3±4.5
对照组	20	12/8	53.9±8.3	22.8±3.7
检验量	$\chi^2=1.761$			$t=1.321$
P	0.083			0.191

2.2 KOA 患者不同分级组及正常对照组血清 DKK-1 水平比较

KOA 患者不同分级组及正常对照组血清 DKK-1 水平比较,差异有统计学意义($F=13.85, P < 0.001$)。见表 2。

表 2 不同分级 KOA 患者与正常对照组血清 DKK-1 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	DKK-1(pg/mL)
正常对照组	20	112.37±38.52
K-L I 级组	15	92.57±13.23
K-L II 级组	12	77.64±16.56
K-L III 级组	13	65.25±12.28
K-L IV 级组	10	52.52±15.68
F	13.85	
P	0.000	

2.3 不同分级 KOA 患者血清及关节滑液 DKK-1 水平比较

不同分级 KOA 患者血清及关节滑液 DKK-1 水平具有显著性差异($F=17.678, P < 0.001; F=13.978, P < 0.001$);进一步两两比较,血清及关节滑液 DKK-1 水平随着 K-L 分级的增加而逐渐降低($P < 0.05$),见图 1。

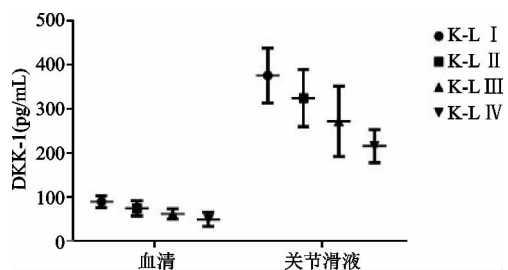


图1 不同 K-L 分级 KOA 患者血清、关节滑液 DKK-1 水平比较

2.4 相关性分析

血清和关节滑液中 DKK-1 水平与 K-L 分级呈显著相关性 ($r = -0.731, P < 0.001$; $r = -0.690, P < 0.001$)。血清 DKK-1 水平与关节滑液 DKK-1 水平呈正相关 ($r = 0.725, P < 0.001$), 见图 2。

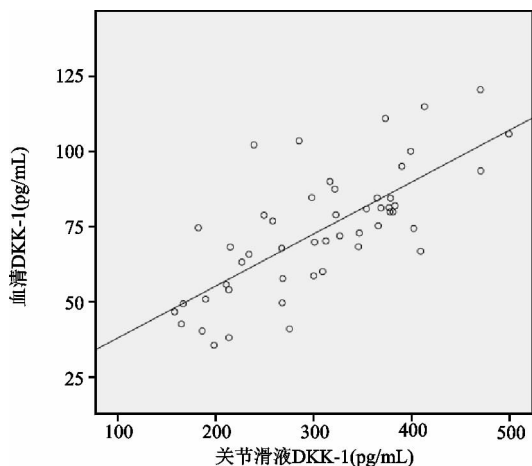


图2 血清 DKK-1 与关节滑液 DKK-1 水平的相关性分析

3 讨论

生物标记物作为一种简便快捷的指标,不仅能从分子水平探讨发病机制,还能较为准确地评价疾病早期损害,在一定程度上为临床医生诊断 OA 提供参考依据。血清及关节滑液中生物标记物的检测对于 OA 是一种敏感的非侵袭性诊断方法^[7]。本研究发现 KOA 患者血清 DKK-1 水平明显低于对照组, KOA 患者随着 K-L 分级水平的增大,血清及关节滑液 DKK-1 水平逐渐下降,表明 DKK-1 在 KOA 发病过程中起到重要的作用,可作为评价 KOA 患者影像学进展的血清学指标。

目前 DKK-1 在 OA 发病机制中的作用仍有争议, DKK-1 在 OA 发病机制中可能起到促进或抑制 OA 进展的作用。一方面,研究认为 DKK-1 具有延缓骨形成和软骨下骨重塑的作用。过表达 DKK-1 转基因小鼠其软骨下骨分数及骨赘体积减少,小鼠成骨细胞 VEGF 表达减少,从而减少了软骨细胞基质金属蛋白酶(MMPs)mRNA 的表达,因此减轻了关节软骨的损害,推测 DKK-1 通过抑制 VEGF 表达来改善 OA 严重程度^[8]。熊建斌等^[3]研究表明,在兔 KOA 模型中,关节腔内注射 DKK-1 能明显改善兔 KOA 的病理表现和 Mankins 评分。软骨细胞 DKK-1 高表达可抑制 OA 软骨破坏, DKK-1 的保护作用与抑制 Wnt 通路活

性的因子 MMP13 有关, DKK-1 可作为 OA 治疗的靶点^[9]。OA 患者给予体外冲击波治疗,免疫组化显示 DKK-1 表达增加, VEGF 下降,进一步支持 DKK-1 的保护作用^[10]。另一方面,也有研究认为, DKK-1 的表达增加与 KOA 的发生、发展密切相关。KOA 软骨中 DKK-1 的高表达可促进下游信号因子释放,导致软骨细胞肥大和软骨细胞外基质分解,促进软骨退变^[11]。Weng 等^[12]研究发现, DKK-1 促进体外软骨细胞凋亡,干预 DKK-1 表达可改善 OA 诱导的软骨细胞凋亡、软骨丢失及软骨下骨破坏,减轻 KOA 动物的滑膜炎^[13]。有研究证实, DKK-1 可通过 TNF- α 诱导类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞迁移,从而失去接触抑制的锚着非依赖性生长,对软骨组织有侵蚀作用^[14]。因此, DKK-1 在 OA 疾病发生、发展中的作用还有待于进一步研究阐明。

有关血清及关节滑液的 DKK-1 水平与 KOA 影像学严重程度之间的关系研究极少。Honsawek 等^[15]研究发现, KOA 患者血清 DKK-1 水平显著低于健康对照组,血清及关节滑液中 DKK-1 水平与 KOA 关节损伤严重程度呈负相关, DKK-1 可作为评价 KOA 严重程度的生物标记物,在 OA 退变过程中发挥重要的作用。本研究发现血清 DKK-1 水平与关节滑液水平呈正相关,关节滑液 DKK-1 水平高于血清, DKK-1 主要来源于局部组织包括炎性滑膜、软骨和软骨下骨以及关节外组织。随着 K-L 分级增大,关节滑液 DKK-1 分泌减少,释放入血的 DKK-1 水平越少,表明 KOA 患者 DKK-1 血循环及局部表达均显著下降, DKK-1 可能起到保护关节软骨的作用。将 DKK-1 水平与膝关节影像学结果相结合,能全面评估 OA 患者的严重程度。

综上所述, KOA 患者血清和关节滑液 DKK-1 水平显著降低,与 K-L 分级呈负相关。本研究不足之处在于单中心实验研究,样本量偏少,不可避免会对结果带来一定的误差,在后续的研究中,需要进一步扩大样本量,对 DKK-1 水平与 OA 患者临床功能评分的关系进行分析,并对行膝关节置换的 OA 患者,留取部分标本进行免疫组化等方面的检测,以期进一步阐明 DKK-1 在 OA 中的作用机制。

参考文献

- [1] Pickarski M, Hayami T, Zhuo Y, et al. Molecular changes in articular cartilage and subchondral bone in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2011, 12: 197.
- [2] 谢建民, 赵成. 强直性脊柱炎患者血清 Dkk-1 水平与骨影像学变化的相关分析[J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(5): 13-17.
- [3] 熊建斌, 彭伟秋, 孙宏志. Dkk-1 干预对骨关节炎的治疗作用[J]. 广西医科大学学报, 2014, 31(5): 738-740.

- [4] 姜博,廉永云. Dkk-1 蛋白的研究现状、进展及临床意义[J]. 医学与哲学(B),2012,33(1):36-38.
- [5] 甘坤宁,熊健斌. Dkk-1 与骨关节炎的关系[J]. 吉林医学,2012,33(6):1171.
- [6] 邱贵兴. 骨关节炎诊治指南[J]. 中华关节外科杂志,2007,1(4):281-284.
- [7] Patra D,Sandell LJ. Evolving biomarkers in osteoarthritis[J]. J Knee Surg,2011,24(4):241-249.
- [8] Funck-Brentano T,Bouaziz W,Marty C,et al. Dkk-1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone ameliorates osteoarthritis in mice[J]. Arthritis Rheumatol,2014,66(11):3028-3039.
- [9] Oh H,Chun CH,Chun JS. Dkk-1 expression in chondrocytes inhibits experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice[J]. Arthritis Rheum,2012,64(8):2568-2578.
- [10] Wang CJ,Huang CY,Hsu SL,et al. Extracorporeal shock-wave therapy in osteoporotic osteoarthritis of the knee in rats;an experiment in animals[J]. Arthritis Res Ther,2014,16(4):R139.
- [11] 马龙,吴疆,胡志伏,等. Runx2、Dkk-1 和 PTH1R 在大鼠膝骨关节炎模型软骨中的表达及意义[J]. 宁夏医科大学学报,2016,38(7):738-742.
- [12] Weng LH,Wang CJ,Ko JY,et al. Inflammation induction of Dickkopf-1 mediates chondrocyte apoptosis in osteoarthritic joint[J]. Osteoarthritis Cartilage,2009,17(7):933-943.
- [13] Weng LH,Wang CJ,Ko JY,et al. Control of Dkk-1 ameliorates chondrocyte apoptosis, cartilage destruction, and subchondral bone deterioration in osteoarthritic knees[J]. Arthritis Rheum,2010,62(5):1393-1402.
- [14] Choe JY,Hun Kim J,Park KY,et al. Activation of Dickkopf-1 and focal adhesion kinase pathway by tumour necrosis factor α induces enhanced migration of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford),2016,55(5):928-938.
- [15] Honsawek S,Tanavalee A,Yuktanandana P,et al. Dickkopf-1(Dkk-1) in plasma and synovial fluid is inversely correlated with radiographic severity of knee osteoarthritis patients[J]. BMC Musculoskelet Disord,2010,11:257.

(收稿日期:2016-02-07)