

• 临床检验研究论著 •

TNF- α 抑制剂对强直性脊柱炎患者血清 Dickkopf-1 及相关指标的影响

韦蓉梅,董丽平,吴红慧,徐燕群
(广州市正骨医院检验科,广东广州 510045)

摘要:目的 比较强直性脊柱炎(AS)患者和健康者血清 Dickkopf-1(DKK-1)的水平,探讨 TNF- α 抑制剂对 AS 患者血清 DKK-1 水平的影响。方法 选取 56 例 AS 患者(AS 组)和 40 例健康志愿者(对照组)。在用 TNF- α 抑制剂治疗前和治疗后 3 个月,测定 AS 组患者血清 DKK-1、骨钙蛋白、骨保护素以及 I 型胶原 C-末端肽(CTX-1)水平,并对 AS 患者的 Bath 强直性脊柱炎疾病活动指数(BASDAI)进行评估。对照组人群进行同样的 4 项生化指标的检测。结果 AS 组血清 DKK-1 水平低于对照组($P < 0.05$),AS 组血清骨钙蛋白和骨保护素水平均高于对照组($P < 0.05$)。相比治疗前的基线水平与 AS 组患者采用 TNF- α 抑制剂治疗后 3 个月其血清 DKK-1 和 CTX-1 水平未发生明显变化($P > 0.05$),血清骨钙蛋白水平明显升高($P < 0.05$),血清骨保护素水平和 BASDAI 评分降低($P < 0.05$)。结论 AS 患者的血清 DKK-1 水平低于健康者,AS 患者采用抗 TNF- α 治疗后尽管可改善其 BASDAI 评分,但血清 DKK-1 水平不会发生明显变化。

关键词: 脊柱炎,强直性; DKK-1; 肿瘤坏死因子 α

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)16-2080-03

The effects of TNF- α blocking agents on the serum Dickkopf-1 and relative indicators levels in patients with ankylosing spondylitis

Wei Rongmei, Dong Liping, Wu Honghui, Xu Yanqun

(Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Orthopedic Hospital, Guangzhou, Guangdong 510045, China)

Abstract: Objective To compare the serum Dickkopf-1(DKK-1) level in patients with ankylosing spondylitis(AS) with that in healthy people and investigate the effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α) blocking agents on the serum DKK-1 levels in patients with AS. **Methods** 56 AS patients(AS group) and 40 healthy people(control group) were enrolled in the study. The levels of DKK-1, osteocalcin, osteoprotegerin, and C-terminal telopeptide of type I collagen(CTX-1) were measured in AS group before and 3 months after the initiating of anti-TNF- α therapy. For AS patients, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index(BASDAI) scores were also measured before and after anti-TNF- α therapy. **Results** Serum levels of DKK-1 were significantly lower in AS group than in the control group($P < 0.05$). Osteocalcin and osteoprotegerin levels were significantly higher in AS group than control group($P < 0.05$). Serum levels of DKK-1 and CTX-1 did not change after the 3-month anti-TNF- α therapy, while Osteocalcin level increased($P < 0.05$), and osteoprotegerin level and BASDAI scores decreased($P < 0.05$) significantly after the 3-months anti-TNF- α therapy. **Conclusion** Patients with AS have Lower serum DKK-1 levels compared with healthy people and the serum DKK-1 levels in patients with AS did not change after anti-TNF- α therapy despite the significant improvement in BASDAI scores. Low serum DKK-1 level could be related with the pathogenesis of new bone formation in AS.

Key words: spondylitis, ankylosing; Dickkopf-1; tumor necrosis factor-alpha

强直性脊柱炎(AS)是一种以脊柱炎为特征的慢性炎症性疾病,其炎症反应可侵蚀骨质,导致新骨形成,最终引起脊柱强直。肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 在 AS 的炎症反应中起重要作用。阿达木单抗,依那西普和英夫利昔单抗等 TNF- α 抑制剂可安全、有效地减轻 AS 的相关症状和体征,进而明显改善 AS 患者的生活质量,但这些药物不会对 AS 的骨重塑产生显著影响^[1-4]。Diarra 等^[5]研究表明,血清 DKK-1 水平在 AS 患者、类风湿性关节炎患者以及健康人群之间存在较大差异。本研究中对 AS 患者与健康人群的血清 DKK-1 和骨转换相关标志物水平进行分析,比较了 AS 患者采用 TNF- α 抑制剂治疗前和 3 个月后血清 DKK-1 及骨转换相关标志物水平的变化。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 10 月至 2011 年 3 月 56 例经 AS 改良纽约诊断标准^[6] 确诊的活动性 AS 患者作为 AS 组。研究经本院伦理委员会批准,并与研究对象签订知情同意书。AS 组患者的平均年龄(45.1 ± 9.6)岁,男性 47 例,女性 9 例;另随机选取 40 例非 AS 健康志愿者作为对照组,平均年龄(43.5 ± 8.6)岁,男性 31 例,女性 9 例。糖尿病,心脏病,急、慢

性感染病史以及尿液或血生化分析异常的患者均已排除。对于研究中正接受系统的非甾体类抗炎药、甲氨蝶呤或柳氮磺胺吡啶治疗患者,允许其继续按疗程服药。

1.2 方法 经临床医生与患者沟通病情并交代各类 TNF- α 抑制剂的相关信息后,由患者自行选择阿达木单抗,依那西普和英夫利昔单抗三种 TNF- α 抑制剂之一进行抗 TNF- α 治疗。依那西普采用皮下注射给药,每次 25 mg,每周 2 次,连用 12 周;阿达木单抗也皮下注射给药,每次 40 mg,每隔 1 周 1 次,直至第 12 周;英夫利昔单抗采用静脉输液方式给药,每次 5 mg/kg,在 0、2、6 及 14 周时应用。在 3 种 TNF- α 抑制剂用药前和用药疗程完成后 3 个月,采集 AS 患者静脉血检测其红细胞沉降率(ESR)、C-反应蛋白(CRP)水平。血液标本采集后,以 $3\,000 \times g$ 离心 15 min 提取血清,之后置于 $-80\,^{\circ}\text{C}$ 下储存直至进行检测分析。采用酶联免疫法按照试剂盒说明书,检测血清 DKK-1、骨钙蛋白、骨保护素以及 I 型胶原 C-末端肽(CTX-1)水平,检测试剂盒均购自德国 IBL 免疫生物学实验室。对于对照组研究对象,也采用相同的方法检测上述生化指标。另外,还采用 Bath 强直性脊柱炎疾病活动指数(BASDAI)^[7] 评估

AS 组患者的疾病活动程度。

1.3 统计学处理 所有数据的统计处理均采用 SPSS17.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以率表示;AS 组 TNF- α 抑制剂用药前与健康对照组之间的数据比较采用 Student t 检验或四格表 χ^2 检验;AS 组 TNF- α 抑制剂用药前、后之间的数据比较采用配对 t 检验。检验水准均取双侧 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况 所有 56 例 AS 患者中,20 例的 AS 疾病只累及脊柱关节,另外 36 例存在脊柱和外周关节相伴受累;12 例患者存在眼葡萄膜炎病史;6 例接受依那西普治疗,22 例接受英夫利西单抗治疗,21 例接受阿达木单抗治疗。AS 组与对照组在年龄、性别构成比方面比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 AS 组与对照组基线水平的血清生化指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

分组	年龄(岁)	性别(男/女)	DKK-1(pg/mL)	CTX-1(ng/mL)	骨钙蛋白(ng/mL)	骨保护素(pmol/L)
AS 组($n=56$)	45.1 $\pm$ 9.6	47/9	12 321 $\pm$ 6 136	0.41 $\pm$ 0.28	14.5 $\pm$ 5.6	3.5 $\pm$ 1.1
对照组($n=40$)	43.5 $\pm$ 8.6	31/9	20 811 $\pm$ 5 671	0.35 $\pm$ 0.20	8.9 $\pm$ 3.4	2.0 $\pm$ 1.0
t 值	0.840	0.633	6.895	1.160	5.623	6.838
P 值	0.403	0.426	0.000	0.249	0.000	0.000

表 2 AS 组 TNF- α 抑制剂治疗前、后血清生化指标检测结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=56$)

检测时间	DKK-1 (pg/mL)	CTX-1 (ng/mL)	骨钙蛋白 (ng/mL)	骨保护素 (pmol/L)	BASDAI (分)	ESR (mm/h)	CRP (ng/dL)
抗 TNF- α 治疗前基线水平	12321 $\pm$ 6136	0.41 $\pm$ 0.28	14.5 $\pm$ 5.6	3.5 $\pm$ 1.1	7.7 $\pm$ 1.9	26.0 $\pm$ 23.9	1.7 $\pm$ 2.0
抗 TNF- α 治疗后 3 个月	11726 $\pm$ 5961	0.47 $\pm$ 0.36	17.6 $\pm$ 4.5	3.1 $\pm$ 1.2	3.8 $\pm$ 1.7	7.0 $\pm$ 7.1	0.1 $\pm$ 0.2
t 值	0.520	0.984	3.229	1.839	11.447	5.703	5.957
P 值	0.459	0.173	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000

3 讨 论

Diarra 等^[5]研究表明,DKK-1 在 AS 的关节结构重塑中起重要作用,AS 的关节病理学会影响骨形成调节因子,继而导致 AS 病变关节的新骨吸收或形成过程发生变化。Wnt 基因合成蛋白在成骨细胞发生中起关键作用,在胚胎发育中即可调节骨骼系统的发生和形成^[8]。Wnt 蛋白家属的多个成员可与间充质细胞质膜上的受体复合物结合,产生的分子信号通过胞内 β -catenin 蛋白作用引起成骨细胞分化^[9]。Wnt 信号通路受多个负调节蛋白家族成员的调节,DKK 即为其中一种。DKK 属于富半胱氨酸蛋白家族成员之一,至少存在 DKK-1, DKK-2, DKK-3 和 DKK-4 等 4 种形式,其中研究最多的为 DKK-1。DKK-1 具有抑制 Wnt 信号通路的功能,可与 LPR5/6 受体、细胞表面共受体以及 Kremen-1/2 等结合,促进受体复合物的内化过程,进而减弱 Wnt 信号。Morvan 等^[10]研究发现,DKK-1 单等位基因的缺失可引起小鼠的骨量增加。另有研究表明,DKK-1 在骨髓瘤细胞的异常表达与多发性骨髓瘤的骨侵蚀增加有关^[11]。

本研究显示,AS 患者的血清 DKK-1 水平低于对照组。AS 患者的病变关节发生炎性破坏后,DKK-1 抑制介导的 Wnt 信号通路传递减少会导致骨形成增加,表现为骨赘生长活跃^[5]。经典的 Wnt 蛋白可诱导骨保护素蛋白表达,进而引起核因子 κ B(NF- κ B)受体激活物介导的配体骨吸收抑制^[12]。本

2.2 AS 组与对照组基线水平的血清生化指标检测 AS 组患者血清 DKK-1 水平低于对照组 ($P < 0.05$),CTX-1 水平与对照组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。AS 组的血清骨钙蛋白和骨保护素水平均高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 反映 AS 活动性的指标评估 BASDAI 评分,CRP 及 ESR 指标,AS 组患者采用 TNF- α 抑制剂治疗前后差异有统计学意义 ($P < 0.05$),治疗后上述三项指标均得以显著改善,见表 2。

2.4 AS 组患者 TNF- α 抑制剂治疗后的血清生化指标 血清 DKK-1 和 CTX-1 水平未发生明显变化 ($P > 0.05$),血清骨钙蛋白水平升高 ($P < 0.01$),血清骨保护素水平降低 ($P < 0.05$),见表 2。血清 DKK-1、骨钙蛋白、骨保护素以及 CTX-1 水平在不同 TNF- α 抑制剂类型的各亚组间无统计学意义 ($P > 0.05$)。

研究表明,在骨赘形成过程中,AS 患者的血清 DKK-1 水平降低,同时伴有骨钙蛋白和骨保护素水平升高,与之前 Diarra 等^[5]学者的研究推理基本一致。

有研究显示采用 TNF- α 抑制剂治疗后 AS 患者的血清骨钙蛋白水平将会升高^[13-15]。TNF- α 在 AS 中既是一种关键的促炎因子,同时也是一种强效的骨生成抑制因子。TNF- α 通过抑制促进骨生成的 Wnt 信号而发挥其生物学效应,但 AS 患者采用 TNF- α 抑制剂治疗后,其骨生成机制不再受到 TNF- α 的抑制,进而导致血清骨钙蛋白水平升高。另外,在本研究中,AS 患者采用 TNF- α 抑制剂治疗后其血清骨保护素水平降低。骨保护素是 RANK 配体的引诱物受体,TNF- α 抑制剂的应用会导致 RANK 配体表达增加,而骨保护素的产生更多受 RANK 配体的影响而表现为其血清水平降低,而不是受 Wnt 信号的影响表现为其血清水平升高,AS 患者采用 TNF- α 抑制剂治疗后表现为血清骨保护素水平降低主要是由于 RANK 配体表达增加所致。

总之,AS 患者的血清 DKK-1 水平低于健康人群,AS 患者的低血清 DKK-1 水平与其新骨生成的病理生理机制有关。AS 患者采用抗 TNF- α 治疗后尽管可改善其 BASDAI 评分,但血清 DKK-1 水平不会发生明显变化。

参考文献

[1] van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, et al. Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(7): 2136-2146.

[2] Davis JC, van der Heijde D, Dougados M, et al. Reductions in health-related quality of Life in patients with ankylosing spondylitis and improvements with etanercept therapy [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 53(4): 494-501.

[3] van der Heijde D, Landewé R, Einstein S, et al. Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5): 1324-1331.

[4] van der Heijde D, Landewé R, Baraliakos X, et al. Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(10): 3063-3070.

[5] Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling[J]. *Nat Med*, 2007, 13(2): 156-163.

[6] van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria[J]. *Arthritis Rheum*, 1984, 27(4): 361-368.

[7] Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, et al. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index[J]. *J Rheumatol*, 1994, 21

(12): 2286-2291.

[8] Miller JR. The Wnts[J]. *Genome Biol*, 2002, 3(1): reviews3001. 1-reviews3001. 15.

[9] Holmen SL, Giambernardi TA, Zylstra CR, et al. Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both Lrp5 and Lrp6[J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(12): 2033-2040.

[10] Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass[J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(6): 934-945.

[11] Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(26): 2483-2494.

[12] Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation[J]. *Dev Cell*, 2005, 8(5): 751-764.

[13] Uderhardt S, Diarra D, Katzenbeisser J, et al. Blockade of dickkopf (DKK)-1 induces fusion of sacroiliac joints[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(3): 592-597.

[14] Briot K, Roux C, Gossec L, et al. Effects of etanercept on serum biochemical markers of cartilage metabolism in patients with spondyloarthropathy[J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(2): 310-314.

[15] Visvanathan S, van der Heijde D, Deodhar A, et al. Effects of infliximab on markers of inflammation and bone turnover and associations with bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(2): 175-182.

(收稿日期: 2013-04-12)

(上接第 2079 页)

溶酶作用下裂解所产生的 X(x)、Y(y)、D(d)、E(e)碎片的统称, FDP 自身有抗凝血酶及抗血小板聚集作用, 抑制纤维蛋白多聚体的生成, 在生理情况下可防止微循环内血栓形成, 是综合反映纤溶亢进的指标, 反映纤溶活性的总水平。本研究结果显示早产儿的 FDP 高于足月儿, 说明体内纤溶活性加强, 这也是早产儿易出血原因之一。

综上所述, 早产儿存在凝血功能降低和继发性纤溶亢进为主的潜在凝血功能异常。胎龄越小, 易容易出现凝血功能紊乱。同时研究结果表明 D-二聚体随着胎龄的变化有明显性改变, 可以作为反映新生儿凝血和纤溶功能紊乱的敏感、特异的指标^[13]。评估 PT、APTT、FIB、FDP 水平, 可以早期发现凝血功能异常, 早期干预, 指导临床正确使用调节凝血-纤溶功能的药物, 如预防性补充维生素 K、普通肝素、低分子肝素、凝血酶原复合物浓缩剂、纤维蛋白原制剂、新鲜血浆等^[14], 避免凝血机制失控, 对于防治新生儿尤其是早产儿出血的发生及提高救治水平有重要意义, 提高早产儿的生存质量。

参考文献

[1] Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances[J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(1): 110-124.

[2] Volpe JJ. *Neurology of the newborn*[M]. 5th ed. USA, Michigan: W. B. Saunders, 2008.

[3] Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of human coagulation system in the healthy premature infant[J]. *Blood*, 1988, 72(5): 1651-1657.

[4] Andrew M, Vegh P, Johnston M, et al. Maturation of the hemo-

static system during childhood[J]. *Blood*, 1992, 80(8): 1998-2005.

[5] Ignjatovic V, Lai C, Summerhayes R, et al. Age-related differences in plasma proteins: how plasma proteins change from neonates to adults[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17213.

[6] Pichler E, Pichler L. The neonatal coagulation system and the vitamin K deficiency bleeding-a mini review[J]. *Wien Med Wochenschr*, 2008, 158(13-14): 385-395.

[7] 张国荣, 孟静, 范秀芳. 检测凝血功能对预防早产儿出血的意义[J]. *中国儿童保健杂志*, 2007, 15(1): 81-83.

[8] 王晶. 红细胞压积与 PT APTT FIB 的相关性[J]. *内蒙古医学杂志*, 2009, 41(12): 1467-1468.

[9] 张金莲, 高革, 司予北. 早产儿凝血指标检测的临床意义[J]. *实用儿科临床杂志*, 2004, 19(2): 155-156.

[10] Kaneko T, Wada H. Evaluation of FDP and D-dimer for the diagnosis of DIC[J]. *Rinsho Byori*, 2011, Suppl 147(Suppl 147): 79-83.

[11] Ignjatovic V, Ilhan A, Monagle P. Evidence for age-related differences in human fibrinogen[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2011, 22(2): 110-117.

[12] Tripodi A. D-dimer testing in laboratory practice[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(9): 1256-1262.

[13] Niessen RW, Lamping RJ, Peters M, et al. Fetal and neonatal development of antithrombin III plasma activity and liver messenger RNA levels in sheep[J]. *Pediatr Res*, 1996, 39(4 Pt 1): 685-691.

[14] Forbes TJ, Hijazi ZM, Young G, et al. Pediatric catheterization laboratory anticoagulation with bivalirudin. [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2011, 77(5): 671-679.

(收稿日期: 2013-01-08)