

高原地区老年男性骨质疏松患者血清 HIF-1 α 、HIF-2 α 、VEGF 及骨代谢指标的相关性研究

李得春*

青海大学附属医院骨病与关节外科, 青海 西宁 810001

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 11-1328-05

摘要: 目的 探讨老年男性骨质疏松患者血清低氧诱导因子、血管内皮生长因子、骨钙素及骨转换生化指标水平的变化及其相关性。方法 采用酶联免疫吸附法 ELISA 检测 60 例老年骨质疏松组和 58 例正常老年男性对照组的血清低氧诱导因子、血管内皮生长因子、骨钙素及抗酒石酸酸性磷酸酶-5b (TRACP-5b), 双能 X 线骨密度测定仪测定三个区域的骨密度。结果 OP 组与健康对照组比较, 骨质疏松组患者的血清 BGP 水平和三个部位的骨密度值 BMD 明显下降, 同时血清 HIF-1 α 、VEGF 和 TRACP-5b 水平明显升高 ($P < 0.05$); 相关性结果显示, OP 组患者血清 HIF-1 α 与 VEGF、BGP 成明显的正相关 ($P < 0.05$), 而与 BMD 和 TRACP-5b 成负相关 ($P < 0.05$); 血清 VEGF 浓度与 BMD 之间存在着负相关性 ($P < 0.05$)。结论 在高原地区对于骨质疏松患者, 应注意补偿氧气减少缺氧性的损伤, 纠正缺氧状况, 并结合补充钙质增加锻炼等常规治疗措施, 能够有效的预防骨质疏松的发生及发展。

关键词: 高原地区; 低氧; 低氧诱导因子-1 α ; 低氧诱导因子-2 α ; 血管内皮生长因子; 骨质疏松

The correlation among serum hypoxia-inducible factor-1 α , hypoxia-inducible factor 2 α , vascular endothelial growth factor, and bone mineral density and bone metabolism in senior men with osteoporosis in Qinghai-Tibetan high plateau

LI Dechun

Department of Osteopathy and Joint Surgery, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai, China

Corresponding author: LI Dechun, Email: chileb@sina.cn

Abstract: **Objective** To study the association among HIF-1 α , HIF-2 α , VEGF, and bone metabolism in senior male with primary osteoporosis in Qinghai-Tibetan high plateau. **Methods** Sixty osteoporosis patients and 58 normal people were enrolled. Serum HIF-1 α , HIF-2 α , VEGF, BGP, and TRACP-5b were measured using ELISA method. BMD of the 3 regions was assessed with Durex GE image system. **Results** BGP and BMD of the 3 regions decreased significantly in OP group comparing to those in control group. TRACP-5b as well as serum HIF-1 α and VEGF increased. The correlation study indicated that HIF-1 α were positively correlated with VEGF and BGP, but negatively related with BMD and TRACP-5b in OP group ($P < 0.05$). VEGF was positively correlated with BMD ($P < 0.05$). **Conclusion** Patients with osteoporosis in high plateau region should pay attention to have oxygen supplement, in order to reduce damage due to hypoxia. They also need to have calcium supplement and more exercise, in order to prevent from osteoporosis.

Key words: High plateau region; Hypoxia; HIF-1 α ; HIF-2 α ; VEGF; Osteoporosis

骨质疏松症 (Osteoporosis) 是一种骨科系统常见病, 骨量损伤和骨质微架构的破坏及生成障碍是导致骨质脆性增加的直接原因^[1]。当前, 随着社会经济的发展 and 人口老龄化的加剧, 骨质疏松症将日趋严重^[2]。青海省地处青藏高原东部, 空气中的氧

分压较海平面低, 低氧构成了高原人群面临的主要健康威胁^[3]。目前的研究发现, 低氧是影响和调节骨生长代谢的重要因素^[4]。据临床观察已证实, 低氧引起骨折后修复愈合困难, 骨质密度降低, 导致骨质疏松等慢性骨损伤率增加。同时, 低氧可以通过低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF), 促使包括血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth

* 通讯作者: 李得春, Email: chileb@sina.cn

factor, VEGF)、胰岛素样生长因子、内皮素等氧感受基因表达水平的改变^[5]。同样的在成骨和破骨作用的动态中,低氧可以促进破骨作用的增加和局部血管生成作用的增加^[6,7]。总之,低氧是构成骨质疏松的重要危险因素之一,由此可见,对于高原低氧环境下有效的防治骨质疏松具有十分重要的意义。

本文采用血清酶联免疫吸附试验 ELISA 法,测定并比较高原地区老年男性骨质疏松患者与健康对照组血清中 HIF-1 α 、HIF-2 α 以及骨钙素及抗酒石酸酸性磷酸酶-5b (TRACP-5) 浓度改变与骨密度水平的相关性,从而探讨高原环境导致的慢性低氧与骨质疏松发生之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 病例资料

随机选取青海大学附属医院关节骨病科门诊和住院的骨质疏松男性患者共 60 人,健康对照 58 人,研究对象基本信息见表 1。

1.2 骨密度测定

应用双能 X 线吸收骨密度仪 (DEXA) (型号: GE LUNAR Prodigy); 测量腰椎 1-4、右侧股骨颈和股骨大粗隆三个部位合计为 BMD 测量值,单位为 g/cm^2 。

1.3 入选标准

诊断标准以骨密度值与青海地区同性别的峰值密度相比,减少 30% 以上认定为骨质疏松,并且伴有骨质疏松所引起的疼痛症状超过 3 周,在此之上,伴有:1) 同时伴有负重痛;2) 自发性腰背痛无法忍耐;3) 起坐、翻身、步行引起的疼痛但仍可勉强完成上述活动者;4) 因疼痛无法睡觉者。

1.4 排除标准

1) 放射 X 平片显示存在椎体压缩性骨折的患者;2) 患有明确诊断的类风湿关节炎、骨质疏松症、甲状腺功能亢进、甲状旁腺功能亢进以及其他骨代谢疾病;3) 因骨折使用石膏外固定期间或拆除后不到半年;4) 有腰椎间盘突出、变形性椎关节炎、椎管狭窄症、椎体滑脱、强直性脊柱炎等致痛疾病;精神病、老年痴呆、严重神经官能症等不能判断疗效、准确提供病情或不能配合;5) 无日常生活自理能力或长期卧床;在研究开始前 3 个月内连续接受过活化维生素 D 制剂、降钙素、皮质类固醇激素、雄激素、雌激素、其他荷尔蒙制剂治疗者;6) 研究开始前 6 个月内接受过选择性雌激素受体调节剂治疗者;

7) 患有严重肾脏、肝脏疾病,有癌症病史;8) 不具备按计划复诊能力,或不能遵守研究方案的任一条款者;9) 被研究者认为不符合入组标准,或对研究用药有潜在风险者。

1.5 血清指标测定

晨取外周静脉血 5 ml 置促凝采血管中静置后离心取上清,获得血清。采用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 法测定血清中 HIF-1 α 、HIF-2 α 、BGP、VEGF、TRACP-5b 浓度,ELISA 试剂盒购自武汉中美科技有限公司 (USCN)。酶标仪为美国 Bio-Tek 公司制造,型号为 EXL-200 型。

1.6 统计学分析

数据资料采用 SPSS17.0 统计软件进行分析处理,其中所有计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,显著性分析采用 t 检验,数据间的相关性分析采用 Pearson 相关分析法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象一般资料

OP 组和健康对照组研究对象均为高原居住 (海拔 2300 米) 超过 20 年,并在体重、身高、年龄、体重指数等指标比较无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 研究对象一般指标

Table 1 General parameters of the study subjects

组别	例数 (人)	年龄 (岁)	身高 (cm)	体重 (kg)
对照组	58	68.8 $\pm$ 11.2	151.3 $\pm$ 12.1	56.1 $\pm$ 11.2
实验组	60	67.9 $\pm$ 10.3	152.4 $\pm$ 11.9	53.3 $\pm$ 18.7
P 值	-	0.325	0.690	0.164

2.2 研究对象血液学结果

同时采用全自动血细胞分析仪测定两组人员血红蛋白、红细胞压积等,两组数据比较也未见显著性差异,同时采用血气分析仪,测定动脉血血氧饱和度值以及动脉血氧分压值,具体结果见表 2。

表 2 血液学指标

Table 2 Blood indexes of the study subjects

组别	SaO ₂ (%)	PaO ₂ (mmHg)	Hb (g/L)	Hct (%)
对照组	92.23 $\pm$ 18.33	72.33 $\pm$ 11.6	173.3 $\pm$ 9.1	68.7 $\pm$ 7.2
实验组	85.17 $\pm$ 15.11	59.62 $\pm$ 10.3	184.4 $\pm$ 11.9	63.3 $\pm$ 8.7
P 值	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

2.3 研究对象骨密度测定值的比较

采用双向 X 射线法,测定研究对象机体等三处

部位的骨密度值 BMD 的大小,结果发现 OP 组患者的 BMD 显著性低于对照组人员,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),结果见图 1。

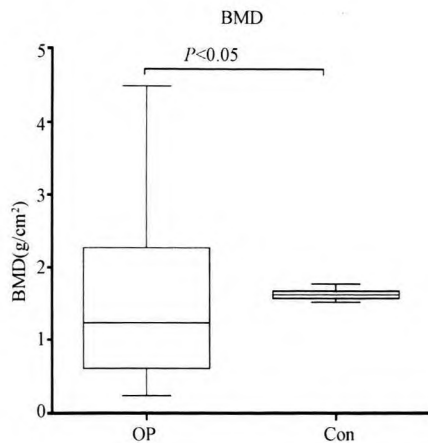


图 1 OP 组与对照组研究对象骨密度值

Fig. 1 BMD of patients in OP and control group.

2.4 两组研究对象血清 HIF-1 α 、HIF-2 α 、BGP、VEGF、TRACP-5b 水平的比较

采用酶联免疫吸附试验 ELISA 法测定 OP 组和对照组的血清中 HIF-1 α 、HIF-2 α 、BGP、TRACP-5b 含量水平,结果发现,OP 组患者的 HIF-1 α 、BGP 的浓度显著性下降, $P < 0.05$,而 VEGF 和 TRACP-5b 的水平显著性升高, $P < 0.05$ 。结果见表 3。

2.5 相关性分析

为了明确 OP 组研究对象体内缺氧状态与骨密度值之间是否存在相关性,采用相关性分析,结果发现,OP 组患者中血清 HIF-1 α 浓度与 VEGF 和 BGP 有正相关关系 ($P < 0.05$),而与 BMD、TRACP-5b 之间存在着负相关性 ($P < 0.05$); HIF-2 α 浓度与 BMD、VEGF、BGP 和 TRACP-5b 之间未发现具有相关性;血清 VEGF 浓度与 BMD 之间存在着负相关性 ($P < 0.05$),结果见表 4。

表 3 血清活性因子浓度水平

Table 3 Serum concentrations cytokines and proteins

组别	HIF-1 α (ng/ml)	HIF-2 α (ng/ml)	VEGF (ng/ml)	BMD (g/cm ²)	BGP (ng/ml)	TRACP-5b (mIU/ml)
对照组	5.3 $\pm$ 1.2	6.3 $\pm$ 2.2	55 $\pm$ 19.7	2.1 $\pm$ 1.4	5.8 $\pm$ 0.71	3.98 $\pm$ 0.29
实验组	8.8 $\pm$ 2.7	6.1 $\pm$ 3.1	132 $\pm$ 18.3	1.1 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 0.56	5.83 $\pm$ 0.67
P 值	<0.001	0.656	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 4 OP 组患者骨代谢与 HIF-1 α 、HIF-2 α 及 VEGF 相关性分析

Table 4 Correlation analysis between bone metabolic indexes with HIF-1 α , HIF-2 α , and VEGF in OP group

组别	VEGF	BMD	BGP	TRACP-5b
HIF-1 α				
r 值	0.378	-0.531	-0.594	0.579
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
HIF-2 α				
r 值	0.215	-0.185	-0.219	0.306
P 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
VEGF				
r 值	-	-0.496	-0.311	0.098
P 值	-	<0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

骨代谢局部微环境包括血管内皮细胞,软骨细胞,成骨细胞,破骨细胞等形成紧密联系的空间结构,在骨代谢、发育、成骨作用和骨质重构作用中这些细胞群体的相互作用与交流,在骨质疏松的发生中起到重要的调节作用^[8]。低氧对骨代谢具有重要的调节作用,而且低氧可以通过多个环节同时参

与并调节骨代谢的作用^[4,9]。例如,成骨细胞表现为明显的氧感受作用对局部氧浓度的变化反应敏感^[10],同时血液循环是破骨细胞的主要前体细胞的来源^[11],但同时为骨代谢作用提供生长因子的来源,低氧对局部血管生成作用起到重要的调节作用^[12]。

本研究发现青海高原地区老年妇女 OP 患者骨密度水平显著性低于对照组,这一结果提示高原地区的缺氧环境可能诱发骨质疏松的发生,这与 Bouvard B 等报道的结果较为一致,而且低氧分压下的成骨细胞成骨作用抑制的报道相符^[13]。同时低氧诱导 HIF-1 α 的高表达, HIF-1 α 通路可对成骨细胞有重要的调节作用,此发现可用转基因过表达或敲除 HIF-1 α 基因,从而观察 HIF-1 α 基因诱变小鼠的成骨细胞代谢和分子的效果^[14],结果证实,敲除 HIF-1 α 基因的小鼠,表现出急剧增加的骨体积,而 HIF-1 α 过表达小鼠,骨骼的直径相对减小^[5]。Rankin EB 等报道, HIF-1 α 高表达的成骨细胞可以上调增加血管生成因子的高表达,同时可以促进骨形成作用,促进局部骨组织增加血液供给量^[10]。研

究发现小鼠成骨细胞增生和凋亡作用同时受到 HIF1- α 通路分子调节,同时研究发现,缺氧增加了成骨细胞核向 HIF1- α 基因的核易位,促进 VEGF mRNA 的表达和上调^[15]。同样, Li W 等报道, HIF-2 α 同时存在于 HIF-1 α 高表达的骨组织中,但是,只有当 HIF-1 α 基因敲除或缺失的内皮细胞才会血管显示增加 HIF-2 α 的表达,对于局部缺氧的感受性, HIF-1 α 的作用强于 HIF-2 α ^[16]。我们的研究结果证实,高原地区的骨质疏松患者体内只有 HIF-1 α 的高表达,但是并没有 HIF-2 α 的表达,这一现象同样支持这样的结论, HIF-1 α 的氧感受作用明显强于 HIF-2 α 。

充足的血液供给是骨骼细胞代谢的重要保障,而且成骨和破骨细胞需要大量氧气和钙磷等物质的输入,人体心输出量 10% 用来参与骨骼系统的血供,同时骨代谢局部丰富的微血管系统又是血供的保障^[17]。VEGF 是具有双向调节因子,可同时作用于成骨和破骨细胞,并保持两者处于动态的平衡之中^[18]。研究表明, VEGF 通过充当自分泌和/或旁分泌因子刺激成熟的成骨细胞的分化^[12]。VEGF 可以诱导骨细胞被激活的多种信号传导途径基因的表达,包括前列腺素 E1 和 E2, 转化生长因子 β (TGF- β), 骨形态发生蛋白 (BMPs), 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1), 内皮素-1 等, 涉及低氧诱导因子 α (HIF- α) 分子途径在所有这些途径的调控途径^[19]。从功能上来说, VEGF 依赖性血管生成作用, 刺激骨折后骨修复作用^[20]。同时, 骨折愈合期的发育软骨内成骨程序等多个发育阶段, VEGF 在新成立的软骨痂产生刺激软骨血管生成, 而且外源性血管内皮生长因子可以增强实验动物中骨断裂的修复作用^[8]。同时, 软骨细胞进行细胞凋亡, 随后由破骨细胞的创伤组织的重塑骨结构, 随后促进矿化作用^[21]。因此, 在骨创伤组织中 VEGF 表达可认为在长骨发育中起重要的调节作用。Liu Y 等报道, VEGF 受体 Flt 使用 IgG 抗体在小鼠骨折模型中可以显著降低血管生成, 骨形成和抑制骨痂矿化作用^[22]。血管内皮生长因子参与了血管生成对软骨细胞的分化, 破骨细胞的招募和成骨细胞的增殖, VEGF 及其受体 (VEGFR-1/受体 Flt-1 和 VEGFR-2/的 Flk-1) 可以高表达肥大的软骨细胞和成骨作用的关系^[15]。在促进成骨作用的同时, 也有研究已经证实, VEGF 促进成骨细胞的增殖和迁移, 促进破骨作用^[23]。

我们的结果显示, OP 组患者体内 VEGF 表达水

平的增高, 提示骨质疏松发生时体内血管新生作用供给并没有减少, 至少 VEGF 浓度在 OP 组反而有所增加; 同时, OP 患者体内的血氧分压有所下降, 提示 OP 患者体内的缺氧情况存在, 这一缺氧诱导了 VEGF 的表达, 但是 VEGF 的增加, 可能同时增加了成骨和破骨作用, 且二者的水平并未达到平衡, 破骨作用强于成骨作用, 因此, 本研究结果提示, 高原地区的骨质疏松患者中 VEGF 主要增高了破骨作用而抑制了成骨作用。

本研究提示我们对高原地区的老年男性患者, 除治疗骨质疏松的原发性疾病外, 还要加强对骨密度的监测, 同时还应该增加对于缺氧诱导因子和氧饱和度的检测。对于长期居住高原的骨质疏松患者尤其是 75 岁以上患者, 当 $\text{SaO}_2 < 90\%$, $\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$ 时, 应建议患者长期家庭氧疗, 尤其在夜间吸氧, 可以显著改善机体的缺氧状态, 减缓骨质疏松的进一步发展。总之, 在高原地区, 对于骨质疏松患者, 应注意补偿氧气减少的缺氧性损伤, 纠正缺氧状况, 并结合补充钙质增加锻炼等常规治疗措施, 能够有效的预防骨质疏松的发生及发展。

【参 考 文 献】

- [1] Force UPST. Screening for Osteoporosis: Us Preventive Services Task Force Recommendation Statement [J]. Annals of internal medicine, 2011, 154:356.
- [2] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: Now and the Future [J]. The Lancet, 2011, 377:1276-1287.
- [3] Jiang C, Chen J, Liu F, et al. Chronic Mountain Sickness in Chinese Han Males Who Migrated to the Qinghai-Tibetan Plateau: Application and Evaluation of Diagnostic Criteria for Chronic Mountain Sickness [J]. BMC public health, 2014, 14: 701.
- [4] Maes C, Carmeliet G, Schipani E. Hypoxia-Driven Pathways in Bone Development, Regeneration and Disease [J]. Nature Reviews Rheumatology, 2012, 8:358-366.
- [5] Wagegg M, Gaber T, Lohanatha FL, et al. Hypoxia Promotes Osteogenesis but Suppresses Adipogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in a Hypoxia-Inducible Factor-1 Dependent Manner [J]. PloS one, 2012, 7:e46483.
- [6] Jing Zhao. Hypoxia and Osteogenesis and Osteoblast Cells Metabolisms [J]. Chinese Tissues and Engineer Research, 2012, 16:5277-5280.
- [7] Wenkui Gao, Wei Wang, Wang Deyuan, et al. Hypoxic Effects on Osteoblast Activity and Related Mechanisms [J]. Journal of Western National Defence Medicine, 2012, 32:409-412.
- [8] Kular J, Tickner J, Chim SM, et al. An Overview of the Regulation of Bone Remodelling at the Cellular Level [J]. Clinical biochemistry, 2012, 45:863-873.

- [9] Koh MY, Powis G. Passing the Baton: The Hif Switch [J]. Trends in biochemical sciences, 2012, 37:364-372.
- [10] Rankin EB, Wu C, Khatri R, et al. The Hif Signaling Pathway in Osteoblasts Directly Modulates Erythropoiesis through the Production of Epo [J]. Cell, 2012, 149:63-74.
- [11] Chen D, Li Y, Zhou Z, et al. Synergistic Inhibition of Wnt Pathway by Hif-1 α and Osteoblast-Specific Transcription Factor Osterix (Ox) in Osteoblasts [J]. PloS one, 2012, 7:e52948.
- [12] Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and Bone Repair [J]. Drug discovery today, 2003, 8:980-989.
- [13] Bouvard B, Abed E, Yéléhé-Okouma M, et al. Hypoxia and Vitamin D Differently Contribute to Leptin and Dickkopf-Related Protein 2 Production in Human Osteoarthritic Subchondral Bone Osteoblasts [J]. Arthritis research & therapy, 2014, 16:459.
- [14] Johnson RW, Schipani E, Giaccia AJ. HIF Targets in Bone Remodeling and Metastatic Disease [J]. Pharmacology & therapeutics, 2015, 150:169-77.
- [15] Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, et al. Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Directly Enhances Osteoclastic Bone Resorption and Survival of Mature Osteoclasts [J], FEBS letters, 2000, 473:161-164.
- [16] Wuyin Li, Litao Cai, Yun Zhang, et al. Intra - Articular Resveratrol Injection Prevents Osteoarthritis Progression in a Mouse Model by Activating Sirt1 and Thereby Silencing Hif - 2 α [J]. Journal of Orthopaedic Research, 2015, 33 (7):1061-1070.
- [17] Marenzana M, Arnett TR. The Key Role of the Blood Supply to Bone [J]. Bone Research, 2013, 1:203.
- [18] Clarkin CE, Gerstenfeld LC. Vegf and Bone Cell Signalling. An Essential Vessel for Communication [J]? Cell biochemistry and function, 2013, 31:1-11.
- [19] Haeusler G, Walter I, Helmreich M, et al. Localization of Matrix Metalloproteinases, (Mmps) Their Tissue Inhibitors, and Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) in Growth Plates of Children and Adolescents Indicates a Role for Mmps in Human Postnatal Growth and Skeletal Maturation [J]. Calcified tissue international, 2005, 76:326-335.
- [20] Kolar P, Gaber T, Perka C, et al. Human Early Fracture Hematoma Is Characterized by Inflammation and Hypoxia [J]. Clin Orthop Relat Res, 2011, 469(11):3118-3126.
- [21] Liu Y, Berendsen AD, Jia S, et al.: Intracellular Vegf Regulates the Balance between Osteoblast and Adipocyte Differentiation [J]. The Journal of clinical investigation, 2012, 122:3101.
- [22] Liu Y, Olsen BR. Distinct Vegf Functions During Bone Development and Homeostasis [J]. Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis, 2014, 62:363-368.
- [23] Yang Q, McHugh KP, Patntirapong S, et al. Vegf Enhancement of Osteoclast Survival and Bone Resorption Involves Vegf Receptor-2 Signaling and B 3-Integrin [J]. Matrix Biology, 2008, 27:589-599.

(收稿日期: 2015-04-23)