

· 论 著 ·

血清脂质运载蛋白 2、骨代谢指标与中年女性骨密度相关性研究

张月辉¹ 姜虹¹ 矫亚男² 栾树礼^{1*}

1. 青岛市海慈医疗集团干部保健科, 山东 青岛 266000

2. 青岛市海慈医疗集团针推康复二病区, 山东 青岛 266000

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 12-1739-04

摘要: 目的 观察血清脂质运载蛋白 2 (lipocalin 2, LCN2)、骨代谢指标与中年女性骨密度的相关性。方法 分析 253 名汉族女性资料, 通过双能 X 线吸收测定法测量其腰椎和股骨颈的骨密度 (bone mineral density, BMD), 测量 LCN2、I 型胶原的羧基末端交联肽 (type I collagen cross-linked-telopeptide, CTX)、骨钙蛋白 (osteocalcin, OCN) 和肌酐 (creatinine, Scr) 的血清水平。结果 LCN2 与腰椎和股骨颈的 BMD 呈负相关。LCN2 和 CTX、OCN、年龄、Scr 之间呈显著正相关。调整年龄和 Scr 后, LCN2、BMDs 和 OCN 之间的相关性消失, 但 LCN2 仍与 CTX 呈正相关。LCN2 的血清浓度在有和没有骨质疏松性骨折的受试者之间没有显示出显著差异。在多变量回归分析中, LCN2 是血清 CTX 变化的主要决定因素之一。结论 在中年女性中, 血清 LCN2 水平、BMD 和 OCN 之间的关系受到年龄和 Scr 的干扰。虽然 LCN2 与 CTX 呈正相关, 但相关性非常小。

关键词: 脂质运载蛋白 2; I 型胶原的羧基末端交联肽; 骨钙蛋白; 骨密度

Correlation between serum lipocalin 2, bone metabolic markers and bone mineral density in middle-aged women

ZHANG Yuehui¹, JIANG Hong¹, JIAO Yanan², LUAN Shuli^{1*}

1. Department of Cadre Health, Qingdao Haici Medical Group, Qingdao 266000

2. Second Disease Area, Department of Needle Pushing Rehabilitation, Qingdao Haici Medical Group, Qingdao 266000, China

* Corresponding author; LUAN Shuli, Email: 1215775436@qq.com

Abstract: **Objective** The correlation between serum lipid transporter 2 (LCN2), bone metabolic markers and bone mineral density in middle-aged women was observed. **Methods** This cross-sectional study analyzed 253 previously enrolled Han Chinese women. BMDs of the lumbar spine and femoral neck were measured using dual energy X-ray absorptiometry. Serum levels of lipocalin 2 (LCN2), carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type-I collagen (CTX), osteocalcin (OCN) and serum creatinine (Scr) were measured. **Results** LCN2 was inversely correlated with BMDs at the lumbar spine and femoral neck. A significant positive correlation between LCN2 and CTX, OCN, age, and Scr was also observed. After adjusting for age and Scr, the correlation among LCN2, BMDs and OCN disappeared, but LCN2 was still positively associated with CTX. The circulating concentration of LCN2 showed no significant difference between subjects with and without osteoporotic fractures. In multivariate regression analysis, LCN2 was one of the main determinants for changes in serum CTX. **Conclusion** In women, the relationships among serum LCN2 level, BMDs, and OCN were confounded by age and Scr. Although LCN2 was positively correlated with CTX, the correlation was very weak.

Key words: lipocalin2; carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type-1 collagen; osteocalcin; bone mineral density

骨量由成骨细胞介导的骨形成和破骨细胞介导的骨重吸收的动态平衡来维持^[1]。骨质疏松症是最常见的骨骼疾病, 表现为骨量降低, 骨微观结构受

损, 骨折风险增加^[2]。由于骨质疏松性骨折的发病率高, 前期已经进行了大量研究以确定参与骨重建的因子。脂质运载蛋白 2 (lipocalin 2, LCN2), 也称为中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白, 是一种 25kDa 的分泌蛋白, 可结合并转运小的疏水物质^[3]。

* 通信作者: 栾树礼, Email: 1215775436@qq.com

最初认为 LCN2 通过结合和隔离细菌铁载体而具有抗菌作用^[4]。随后的研究^[5]表明 LCN2 在脂肪细胞上表达,而最近研究^[6]表明 LCN2 主要由成骨细胞表达,其表达水平至少比脂肪细胞高 10 倍。在病理条件下,在不同细胞类型和组织中诱导 LCN2 表达^[7-8]。因此,LCN2 涉及多种病理生理条件,如肥胖和胰岛素抵抗、肾脏疾病、心血管疾病、炎症和脑功能障碍。LCN2 通常被认为是骨稳态中的机械-敏感基因。在模拟微重力条件下,小鼠成骨细胞中出现 LCN2 基因的上调^[9]。此外,在经历 15 天卧床休息的健康受试者中观察到血清 LCN2 水平逐渐增加,这是一种易于发生骨质流失的病症^[10]。与这些发现相反,Lu 等^[11]的研究发现当骨髓基质细胞与 LCN2 共同培养时,成骨细胞谱系分化增强。考虑到体外和小鼠研究中这些相互矛盾的发现,笔者希望知道 LCN2 是否与人类骨代谢具有某种关系。因此,开展了以下横断面研究,探讨门诊女性血清 LCN2、骨转换标志物、骨密度(bone mineral density, BMD)和骨质疏松性骨折之间的关系。

1 材料和方法

1.1 一般临床资料

2017 年 1 月至 2018 年 6 月期间,选取 253 名 35~85 岁的绝经前和绝经后健康门诊女性入组。所有参与者均为居住在当地的汉族女性。患有可能导致骨代谢异常疾病的个体如涉及心脏、肺、肝和(或)肾脏的慢性疾病、糖尿病、任何癌症的病史、类风湿性关节炎、慢性腹泻、炎症肠病等均被排除在外。服用已知影响骨代谢药物的妇女,包括但不限于糖皮质激素、选择性雌激素受体调节剂、激素替代疗法、双膦酸盐、特立帕肽、选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂、左旋甲状腺素等也被排除在外。通过所有参与者完成的问卷调查获得包括年龄和绝经状态的一般临床数据。骨质疏松性骨折是在低能量下出现的前臂、髌部和(或)脊柱骨折。询问受试者骨折时的年龄、部位、数量和时间,但没有医疗记录或 X 光片确认骨折的诊断。同时记录受试者的身高和体重。

1.2 方法

使用双能 X 线骨密度仪(GE-Lunar Prodigy, GE Healthcare, Madison, WI)测量所有受试者的腰椎和髌部 BMD(g/cm^2)。在禁食过夜后获得所有受试者的血液样品,离心后将血清多次等份,并储存在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 直至使用。使用人脂质运载蛋白-2/NGAL

Quantikine ELISA 试剂盒(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)稀释 20 倍后测量血清 LCN2 的浓度。检测内和测定间 CV 变异系数分别小于 5% 和 8%。根据制造商的检测步骤使用商业试剂盒检测 I 型胶原交联羧基末端肽(type I collagen cross-linked-telopeptide, CTX)水平和骨钙素(osteocalcin, OCN)。使用自动生化分析仪(Unicel DxC800, Beckman Coulter, US)测量肌酐(creatinine, Scr)。所有血清参数分批测量。该研究方案经我院伦理委员会批准且获得每个参与者的知情同意。

1.3 统计学分析

使用 Kolmogorov-Smirnov 检验来评估变量的正态分布。正常分布的数据显示为均数 $\pm$ SD,而倾斜的分布式变量包括年龄、身高、体重、Scr、OCN、CTX、LCN2 表示为中位数(四分位数间距)。计算 Spearman 相关系数以描述 LCN2 与各种变量之间的相关性。部分相关分析用于调整年龄和 Scr。通过 Mann-Whitney *U* 检验比较两组之间的差异。进行 ANOVA 以比较 LCN2 的四分位数之间的差异。为了控制年龄和 Scr,采用协方差分析。为了更精确地定义 LCN2 和 CTX 之间的关系,使用 CTX 作为因变量与年龄、体质量指数(bone mass index, BMI)、OCN、腰椎和股骨颈的 BMD、LCN2 及绝经状态作为独立变量进行多变量逐步回归分析。*P* 值小于 0.05 被认为有统计学意义。使用 SPSS 20.0 统计软件进行所有统计学分析。

2 结果

所有参与者一般临床特征如表 1 所示。与绝经前妇女相比,绝经后妇女年龄更大,身高更矮,BMI 和 Scr 水平更高。腰椎和股骨颈的 BMD 明显降低。同时观察到更快的骨转换,如通过显著升高血清 OCN 和 CTX 的水平。绝经后妇女的骨质疏松性骨折比绝经前妇女更常见(分别为 28.83% 和 9.64%)。绝经后女性的 LCN2 水平显著高于绝经前女性($P<0.05$)。

血清 LCN2 与骨密度和骨转换生物标志物 Spearman 相关分析表明,LCN2 与腰椎和股骨颈的 BMD 呈负相关。LCN2 与骨吸收标志物 CTX、骨形成标志物 OCN、年龄和 Scr 之间呈显著正相关(表 2)。为了控制年龄和肾功能对血清 LCN2 水平与 CTX、OCN 和 BMD 之间关系的潜在影响,笔者在首次调整年龄后重新分析了 LCN2、BMD 和骨转换标志物之间的相关性。血清 LCN2 与 CTX 保持正相

关;然而,LCN2、OCN 和 BMD 之间的相关性消失了。在进一步调整 Scr 后,LCN2 仍然与 CTX 呈正相关(表 2)。根据是否具有骨质疏松性骨折史,将所有参与者分为两组。通过 Mann-Whitney *U* 检验进行比较。对于有和没有骨质疏松性骨折的受试者,血清 LCN2 浓度没有显著统计学意义($P>0.05$)。除与 LCN2 呈正相关外,CTX 与年龄和 OCN 呈正相关,与

腰椎和股骨颈 BMD 及 BMI 呈负相关。绝经后妇女的 CTX 较绝经前血清水平显著增加($P<0.05$)。

为了确定导致血清 CTX 变化的因素,进一步进行了多变量逐步回归分析,显示 OCN、绝经状态、LCN2 和腰椎 BMD 作为 CTX 的预测因子,占血清 CTX 变异的 54.1% ($P<0.001$)。LCN2 仅占血清 CTX 变化的 0.3%(表 3)。

表 1 绝经前和绝经后妇女的一般临床特征,骨密度和血清骨生化指标

Table 1 Anthropometrics, BMDs, and serum bone biochemical markers in the entire cohort, pre- and post-menopausal women

项目	例数 ($n=253$)	绝经前 ($n=83$)	绝经后 ($n=170$)	<i>P</i> 值
年龄/年	56.5±5.6	42.3±2.6	59.7±6.6	<0.001
身高/cm	160.4±7.6	162.7±5.8	158.7±6.7	<0.001
体重/kg	59.2±5.6	58.6±5.6	59.7±5.6	0.143
BMI/(kg/m ²)	23.3±3.45	21.87±2.89	23.35±3.45	<0.001
Scr/(μmol/L)	56.45±7.8	52.50±7.3	58.00±8.7	0.004
腰椎 BMD/(g/cm ²)	1.04±0.15	1.23±0.15	1.01±0.13	<0.001
股骨颈 BMD/(g/cm ²)	0.83±0.14	0.97±0.15	0.79±0.15	<0.001
OCN/(ng/mL)	18.23±2.33	14.12±1.45	19.23±2.07	<0.001
CTX/(ng/mL)	0.42±0.03	0.26±0.04	0.4±0.05	<0.001
伴随骨折/ <i>n</i>	58	9	49	0.006
LCN2/(ng/mL)	42.52±4.8	38.34±6.7	43.67±7.6	0.012

表 2 LCN2 和 BMD 与骨转换生物标志物之间的相关系数

Table 2 Coefficients of correlations between LCN2 and BMD and bone turnover biomarkers

项目	<i>r</i>	<i>P</i> 值	<i>r</i> [*]	<i>P</i> 值 [*]	<i>r</i> [#]	<i>P</i> 值 [#]
年龄	0.20	<0.001	-	-	-	-
身高	-0.07	0.015	-0.01	0.523	-0.03	0.253
体重	0.01	0.966	0.002	0.922	0.00	0.914
BMI	0.02	0.300	0.001	0.934	0.01	0.833
Scr	0.22	<0.001	0.25	<0.001	-	-
腰椎 BMD	-0.06	0.009	0.03	0.245	0.01	0.617
股骨颈 BMD	-0.13	<0.001	-0.01	0.503	-0.02	0.605
OCN	0.05	0.045	0.01	0.535	0.01	0.657
CTX	0.10	<0.001	0.05	0.033	0.05	0.008

注: * 为调整年龄后的部分系数; # 为调整年龄和 Scr 后的部分系数。

表 3 在多元逐步回归分析中确定血清 LCN2 变化的因素

Table 3 Factors determining the variations in serum LCN2 in multiple stepwise regression analysis

项目	β	标准差	标准 β	调整后的 $R^2/\%$	R^2 改变	<i>P</i> 值
OCN	0.017	0.001	0.683	52.5	0.524	<0.001
绝经状态	0.044	0.012	0.071	53.2	0.006	0.001
LCN2	0.001	0.000	0.060	53.8	0.004	0.004
腰椎 BMD	-0.071	0.014	-0.063	54.1	0.003	0.004

3 讨论

此次研究主要发现了 LCN2 与 BMD 呈负相关并与 OCN 呈正相关,但这两种相关性在调整年龄和

Scr 后均消失。LCN2 显示与骨质疏松性骨折无关。尽管 LCN2 与骨吸收标记物 CTX 呈正相关,但相关性的幅度非常低并且可能在生理学上不相关。有研究^[11]表明,LCN2 对全骨髓细胞中的破骨细胞具有生成作用。当小鼠骨髓单核细胞与 LCN2 共同培养时也观察到增强的破骨细胞生成^[10]。此外,机械固定的小鼠每个骨表面的破骨细胞表面增强(Oc.S/BS),血清和骨表达的 LCN2 水平更高^[10]。在接受头部向下倾斜卧床休息的受试者中发现血清中 LCN2 浓度增加以及尿 CTX 水平升高,这是一种模仿微重力引起的骨和肌肉损失的状态^[12]。在这项研究中,当在生理条件下对走动的女性进行 LCN2 和骨吸收标记物 CTX 之间的相关性评估时,这两个标志物仅微弱相关。由于 LCN2 对 CTX 变化的贡献几乎可以忽略不计,因此无法确定它们之间的真实相关性。

在此次研究中发现的 LCN2 和骨转换标志物之间的弱相关或无效相关可以进一步解释 LCN2 与 BMD 之间缺乏相关性,因为骨重建是 BMD 最重要的决定因素之一。最近的小鼠研究^[12]进一步证实了 LCN2 与 BMD 之间关系的缺失。结果表明,在生理条件下,LCN2 缺失特异性地在成骨细胞中或全局显示出正常的骨表型,如 BMD、骨体积分数和小梁数。这些发现也在另外的人体研究^[13]中得到了回

应,表明血清 LCN2 和 BMD 之间没有关联。除了骨转换标志物和 BMD 之外,还在人类中研究了 LCN2 与骨折相关结果之间的关系。一项涉及 1 009 名老年女性的前瞻性研究,尽管基线高于 LCN2 预测值,在 5 年的随访中,任何骨质疏松性骨折和髌部骨折相关住院风险增加,基线 LCN2 水平在有或没有普遍骨折的参与者之间没有差异^[14]。同样,在目前的研究中,也没有发现有和没有骨质疏松性骨折的受试者之间血清 LCN2 浓度的差异。包括此次研究在内的所有这些发现表明,至少在生理条件下,血清 LCN2 浓度与骨代谢几乎没有关联。但是,在解释这些数据时,应考虑其他几个因素,如 BMI、肾功能和年龄。结果显示,肥胖者血清 LCN2 浓度通常较高^[15],超重和肥胖者 LCN2 水平升高与 BMI 呈正相关^[15]。

与肥胖个体的发现相反,在此次对相对瘦的受试者的研究中,LCN2 和 BMI 之间既没发现有正相关也没有负相关。笔者认为这一发现很重要。骨骼被证明是瘦小鼠循环 LCN2 的主要起源,而有报道显示在 3T3-L1 前脂肪细胞的脂肪形成过程中 LCN2 的表达上调超过 3 个数量级^[5];并且肥胖小鼠和受试者中 LCN2 的脂肪组织表达显著升高^[5]。更重要的是,LCN2 脂肪组织含量的增加与血清 LCN2 浓度呈正相关^[15]。这些发现,包括此次研究结果表明,在超重和肥胖个体中,循环 LCN2 的主要贡献者可能是脂肪组织,因为它的质量要大得多。而在精益受试者中,主要来源可能是骨骼。血清 LCN2 长期以来被认为是急性肾损伤的早期生物标志物并且参与慢性肾功能衰竭^[16]。肾小管细胞中 LCN2 的表达增加和肾损伤时 LCN2 的清除减少都是肾脏疾病中血清 LCN2 升高的原因。

在目前的研究中,参与者通常具有正常的肾功能,并且还观察到 LCN2 和 Scr 之间的显著正相关。然而,即使在调整 Scr 后,LCN2 和 CTX 之间的正相关仍然存在。可以认为,血清 LCN2 与骨转换标志物、骨密度和骨质疏松性骨折之间缺乏有意义的关联,是由于此次研究中 LCN2 的血清浓度相对较低。总之,笔者提供的线索表明,在生理条件下的非卧床健康女性中,血清 LCN2、BMD 和 OCN 之间的相关性因年龄和 Scr 而混淆。血清 LCN2 浓度与 CTX 呈非常弱的相关,与骨质疏松性骨折无关。然而,在生理条件下 LCN2 和 CTX 之间的这种低正相关性是否会夸大并且对于衰老或在诸如制动、长期卧床休息、肾损伤的某些病理条件下具有临床意义,值得进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] 王彦伟,张亦凡,李志辉,等.阿法骨化醇增加伊班膦酸钠治疗绝经后骨质疏松症的疗效[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(10):1332-1336.
- [2] Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects [J]. Journal of Clinical Investigation, 2005, 115(12): 3318.
- [3] Tsutomu M, Hiroyasu K, Yasushi Y, et al. Lipocalin 2 Enhances Migration and Resistance against Cisplatin in Endometrial Carcinoma Cells [J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155220.
- [4] Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron [J]. Nature, 2004, 432(7019): 917-921.
- [5] Yan QW, Yang Q, Mody N, et al. The Adipokine Lipocalin 2 Is Regulated by Obesity and Promotes Insulin Resistance [J]. Diabetes, 2007, 56(10): 2533-2540.
- [6] Mosialou I, Shikhel S, Liu JM, et al. MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2 [J]. Nature, 2017, 543(7645): 385-390.
- [7] Viau A, Karoui KE, Laouari D, et al. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans [J]. Journal of Clinical Investigation, 2010, 120(11): 4065-4076.
- [8] Mucha M, Skrzypiec AE, Schiavon E, et al. Lipocalin-2 controls neuronal excitability and anxiety by regulating dendritic spine formation and maturation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(45): 18436-18441.
- [9] Capulli M, Rufo A, Teti A, et al. Global transcriptome analysis in mouse calvarial osteoblasts highlights sets of genes regulated by modeled microgravity and identifies a “mechanoresponsive osteoblast gene signature” [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2010, 107(2): 240-252.
- [10] Rucci N, Capulli M, Piperni SG, et al. Lipocalin 2: a new mechanoresponding gene regulating bone homeostasis [J]. Journal of Bone & Mineral Research, 2015, 30(2): 357-368.
- [11] Lu M, Xia L, Liu YC, et al. Lipocalin produced by myelofibrosis cells affects the fate of both hematopoietic and marrow microenvironmental cells [J]. Blood, 2015, 126(8): 972-982.
- [12] Kim HJ, Ohk B, Kang WY, et al. Deficiency of Lipocalin-2 Promotes Proliferation and Differentiation of Osteoclast Precursors via Regulation of c-Fms Expression and Nuclear Factor-kappa B Activation [J]. Journal of Bone Metabolism, 2016, 23(1): 8-15.
- [13] Cervellati C, Bonaccorsi G, Bergamini CM, et al. Association between circulatory levels of adipokines and bone mineral density in postmenopausal women [J]. Menopause, 2016, 23(9): 1.
- [14] Lim WH, Wong G, Lim EM, et al. Circulating Lipocalin 2 Levels Predict Fracture-Related Hospitalizations in Elderly Women: A Prospective Cohort Study [J]. Journal of Bone & Mineral Research, 2015, 30(11): 2078-2085.
- [15] Rashad NM, El-Shal AS, Etewa RL, et al. Lipocalin-2 expression and serum levels as early predictors of type 2 diabetes mellitus in obese women [J]. Iubmb Life, 2017, 69(2): 88-97.
- [16] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis [J]. American Journal of Kidney Diseases, 2009, 54(6): 987-989.

(收稿日期: 2018-07-21;修回日期: 2018-10-29)