

· 论 著 ·

慢性肾衰患者褪黑素水平、氧化应激、炎症水平与骨密度相关性研究

徐志平^{1*} 闻纯¹ 王丽²

1. 江苏医药职业学院基础教研室, 江苏 盐城 224005

2. 宁夏医科大学总医院肾脏内科, 宁夏 银川 750004

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 04-0485-05

摘要: **目的** 研究慢性肾功能衰竭维持性血液透析(MHD)中褪黑素(MT)水平、氧化应激和炎症状态与骨密度(BMD)的关系。**方法** 选择我院收治的94例慢性肾功能衰竭患者,于2016年5月至2019年2月接受MHD治疗3个月以上;按照BMD分为骨质疏松组(观察组, $n=49$)和非骨质疏松组(对照组, $n=45$)。通过酶联免疫吸附试验检测患者血清高级氧化蛋白产物(AOPP)、MT水平和炎症因子[肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6(IL-6)和IL-1](ELISA)。此外,通过硫代巴比妥酸(TBA)测定法检测血清中的丙二醛(MDA)水平,并检测腰椎BMD,然后进行相关性分析。**结果** 观察组MT水平显著低于对照组,但AOPP和MDA水平显著高于对照组($P<0.05$)。观察组炎症因子(TNF- α , IL-6和IL-1)水平明显高于对照组($P<0.05$)。此外,观察组腰椎BMD和T值明显低于对照组($P<0.05$)。Pearson相关分析显示AOPP、MDA、TNF- α 、IL-6和IL-1水平与BMD呈负相关,但MT与BMD呈正相关($P<0.05$)。**结论** MHD患者容易发生骨质疏松症;氧化应激和炎症程度与BMD呈负相关,但MT与BMD呈正相关。

关键词: 慢性肾功能衰竭;维持性血液透析;褪黑素;氧化应激;炎症;骨质疏松症

Correlation between melatonin level, oxidative stress, inflammation level and bone mineral density in patients with chronic renal failure

XU Zhiping^{1*}, WEN Chun¹, WANG Li²

1. Basic Teaching and Research Department of Jiangsu Medical Vocational College, Yancheng 224005, China

2. Department of Nephrology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

* Corresponding author; XU Zhiping, Email: xzp0277@163.com

Abstract: **Objective** The relationship of melatonin (MT) level, oxidative stress and inflammatory status with osteoporosis in the maintenance hemodialysis (MHD) of chronic renal failure was investigated. **Methods** Ninety-four patients with chronic renal failure treated in our hospital and received MHD for more than 3 months from May 2016 to February 2019 were selected and divided into the osteoporosis group (observation group, $n=49$) and the non-osteoporosis group (control group, $n=45$) based on whether osteoporosis was presented. Serum advanced oxidation protein products (AOPP), MT level and inflammatory factors [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1] in patients were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Moreover, the malondialdehyde (MDA) level in serum was detected using thibabutaric acid (TBA) assay and the spinal bone mineral density (BMD) was measured, followed by correlation analysis. **Results** The MT level in the observation group was significantly lower than that in the control group, but the levels of AOPP and MDA in the observation group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The levels of inflammatory factors (TNF- α , IL-6 and IL-1) in the observation group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). Besides, the spinal BMD and T-score in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). Pearson's correlation analysis showed that AOPP, MDA, TNF- α , IL-6 and IL-1 levels were negatively correlated with BMD, but MT was positively correlated with BMD ($P<0.05$). **Conclusion** Osteoporosis occurs easily in MHD patients; oxidative stress and inflammatory degree were negatively correlated with BMD, but MT was positively correlated with BMD.

* 通信作者: 徐志平, Email: xzp0277@163.com

Key words: chronic renal failure; maintenance hemodialysis; melatonin; oxidative stress; inflammation; osteoporosis

骨质疏松(OP)是全身骨骼系统的一种临床常见病,以骨组织的微结构损伤和低骨量为特征,患者易发生骨折^[1]。慢性肾功能衰竭(CRF)的维持性血液透析(MHD)会出现感染、心血管疾病和OP等多种并发症。MHD患者OP发生率高达40%~60%,严重影响患者的生活质量^[2]。MHD患者常有氧化应激(OS)和微炎症状态,晚期氧化蛋白产物(AOPP)是反映机体OS状态的指标之一,丙二醛(MDA)是OS的终末代谢产物,可作为反映机体OS水平的指标;炎症状态主要表现为肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1(IL-1)水平的升高^[3]。褪黑素(melatonin, MT)是松果体分泌的一种激素,它不仅具有抗炎、抗氧化和调节睡眠的作用,而且通过多种途径促进成骨细胞的增殖和分化,抑制破骨细胞的增殖和分化,与OP密切相关^[4]。本研究通过检测慢性肾功能衰竭患者血液中MT、AOPP、丙二醛、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1(IL-1)的水平,分析它们是否参与OP的发生及其与BMD的关系。

1 材料和方法

1.1 一般材料

本研究纳入了2016年5月至2019年2月期间在我院长期接受MHD治疗的CRF患者94名。纳入标准:①符合慢性肾功能衰竭诊断标准的患者;②接受MHD超过3个月的患者;③签署知情同意书的患者。排除标准:①患有严重心脏、脑或肝脏疾病或伴有精神疾病的患者;②恶性肿瘤患者,孕妇或哺乳期妇女。根据是否涉及骨质疏松症,入选患者分为骨质疏松组(观察组, $n=49$)和非骨质疏松组(对照组, $n=45$)。两组间的基线数据差异无统计学意义($P>0.05$)(表1)。所有患者均使用血液透析机(Fresenius, Oberursel, 德国),将双腔导管置于颈部或右股静脉的右侧以建立心肺分流术;稀释置换液(上海长征药业有限公司, 中国上海)使用负压超滤泵和低分子量肝素(天津大通药业有限公司, 天津, 中国, 批准号NMPN H20020469)用于抗凝(第一剂量3000U, 加入500U/h, 置换率4.0 L/h),血流量保持在约200 mL/min。患者每次治疗4 h,每周接受3次透析。该研究得到了我院伦理委员会的批准,患者和/或监护人签署了书面知情同意书。

1.2 指标检测

使用双能X射线骨密度计(深圳XRAY电气有限公司, 中国深圳)测量腰椎(L_1-L_4)BMD, 图形分析区域分为总腰椎区域;计算T值。OP的判断标准:①正常骨量:T值 >-1 ;②骨量减少:T值 $=-1$ 至 -2.5 ;③OP:T值 <-2.5 。通过ELISA分析血清AOPP, 炎症因子(TNF- α , IL-6和IL-1)和MT的水平,并通过TBA检测MDA水平。从患者收集静脉血5 mL(禁食8 h后的早晨7:00),立即分离血清并置于 -80°C 冰箱中备用。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测量血清AOPP、MT、TNF- α 、IL-6和IL-1的水平。相关试剂盒由上海恒源生物科技有限公司(中国上海)提供,操作严格按照试剂盒的说明进行。将样品(1倍稀释)和100 μL 酶标记的溶液加入到反应板的微孔中,在 37°C 下孵育90 min。将板洗涤3次(每两次间隔15 s)后,加入显色剂A和B(各50 μL),在室温, 20°C , 黑暗中培养15 min。使用酶标仪(深圳SinoThinker Technology Co., Ltd., Shenzhen, China)在15 min内450 nm波长下读取OD值。然后计算AOPP、MT、TNF- α 、IL-6和IL-1的水平。通过硫代巴比妥酸(TBA)测定法检测血清MDA。将MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所, 南京, 中国)中的试剂A通过水浴加热至透明,加入340 mL双蒸水并均匀混合到试剂B中并在 4°C 下储存。在试剂C被60 mL双蒸水(95°C)完全溶解后,加入60 mL冰醋酸,混合均匀并在 4°C 下避光保存。将标准产物(10 nmol/mL四乙氧基丙烷)储存在 4°C 。操作步骤:①将标准品(1 mL)加入标准管中,将血清(0.1 mL)加入试管中,并将无水乙醇加入标准空白管中;②加入试剂A(0.1 mL)并均匀混合到标准管、标准空白试管和试管中,然后加入试剂B(0.1 mL);③将试剂C(0.1 mL)加入标准管,试管和标准空白管中,并将50%冰醋酸(0.1 mL)加入试验空白管中;④使用旋流混合器将溶液均匀混合,用保鲜膜拧紧管口,刺穿一个冒口,然后将管浸入热水(95°C)中40 min并在流水下冷却;⑤以 $2000\times g$ 离心10 min后,取上清液,用酶标仪测定波长532 nm的OD值,计算血清中MDA的水平。

1.3 统计学处理

使用SPSS 19.0软件处理数据。测量数据以均数 $\pm$ 标准差,并使用 t 检验;计量数据以比率表示,并使用卡方检验。Pearson的相关系数用于相关性分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

两组患者氧化应激和 MT 水平的比较,如表 2 所示;观察组 AOPP 和 MDA 水平显著高于对照组,但 MT 水平显著低于对照组($P<0.05$)。

两组患者炎症因子水平的比较,如表 3 所示;观察组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 水平显著高于对照组($P<$

0.05)。

腰椎骨密度和 T 值比较,如表 5 所示。观察组中腰椎的 BMD 和 T 值均显著低于对照组($P<0.05$)。

氧化应激,炎症和 MT 水平与 BMD 的相关性分析如图 1 所示,Pearson 相关分析显示 AOPP、MDA、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 水平与 BMD 呈负相关,但 MT 与 BMD 呈正相关($P<0.05$)。

表 1 两组患者的基线数据

Table 1 Baseline characteristics of patients in the two groups

项目	对照组 ($n=45$)	观察组 ($n=49$)	t 值/ χ^2 值	P 值
性别(男/女)	25/20	29/20	0.022	0.883
年龄(岁)	35~70	35~65		
平均年龄(岁)	46.6 $\pm$ 8.4	46.9 $\pm$ 8.5	0.166	0.869
病程(月)	13.6 $\pm$ 3.5	13.3 $\pm$ 3.4	0.525	0.601
BMI(kg/m^2)	22.43 $\pm$ 3.27	21.87 $\pm$ 3.58	0.790	0.432
血糖(mmol/L)	5.78 $\pm$ 1.15	5.63 $\pm$ 1.24	0.607	0.545
总胆固醇(mmol/L)	6.12 $\pm$ 0.73	6.09 $\pm$ 0.68	0.206	0.837
三酰甘油(mmol/L)	2.38 $\pm$ 1.27	2.52 $\pm$ 1.34	0.519	0.605

表 2 两组患者氧化应激和 MT 水平的比较

Table 2 Comparisons of oxidative stress and MT level between the two groups of patients

组别	n	AOPP ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	MDA (nmol/L)	MT(pg/mL)
观察组	49	108.95 $\pm$ 15.13	5.97 $\pm$ 1.47	19.76 $\pm$ 3.38
对照组	45	43.69 $\pm$ 9.06	2.73 $\pm$ 0.86	24.43 $\pm$ 3.27
t 值		25.091	12.894	6.797
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

表 3 两组患者炎症因子水平的比较(ng/L)

Table 3 Comparisons of inflammatory factor levels between the two groups of patients (ng/L)

组别	n	TNF- α	IL-6	IL-1
观察组	49	49.98 $\pm$ 3.15	53.48 $\pm$ 3.35	47.28 $\pm$ 3.19
对照组	45	37.83 $\pm$ 3.04	41.45 $\pm$ 3.23	35.39 $\pm$ 3.17
t 值		18.996	17.693	18.106
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

表 4 腰椎骨密度(BMD)和 T 值的比较

Table 4 Comparisons of lumbar spine bone mineral density (BMD) and T -score

组别	n	BMD (g/cm^2)	T 值
观察组	49	0.73 $\pm$ 0.12	-3.75 $\pm$ 0.93
对照组	45	0.91 $\pm$ 0.13	-1.03 $\pm$ 0.86
t 值		6.981	14.683
P 值		<0.001	<0.001

3 讨论

OP 是由骨代谢紊乱(骨吸收大于骨形成)引起的,其特征在于每单位体积的骨质量减少和骨脆性增加,并且它将持续发展并且容易导致骨折^[5]。临

表 5 氧化应激,炎症和 MT 水平与 BMD 的相关性分析

Table 5 Correlation analysis of oxidative stress, inflammation and MT level with BMD

变量	r 值	P 值	变量	r 值	P 值
TNF- α	-0.487	-0.401	AOPP	-0.406	-0.424
IL-6	-0.401	-0.417	MDA	-0.424	0.439
IL-1	-0.417	-0.406	MT	0.439	0.015

床上,BMD 通常用于 OP 诊断。骨骼系统中松质骨(60%~75%)集中在人体腰椎,因此 MHD 患者腰椎 BMD 的测量可以反映骨矿物质含量的早期变化。此外,松质骨的骨转换率高于皮质骨,对各种代谢刺激更敏感。此外,其骨量积累将比皮质骨更早达到峰值,因此腰椎 BMD 的测量具有更高的敏感性^[6]。过去,人们认为 CRF 患者伴随 OP 的机制是患者体内钙磷代谢紊乱降低了体内维生素 D 的水平,从而导致代谢性酸中毒和继发性甲状旁腺功能亢进。近年来,随着研究的深入,人们已经认识到接受长期 MHD 的 CRF 患者的骨代谢将由多种激素和细胞因子共同调节,从而导致 OPG/RANKL 系统在体内的异常表达水平和功能障碍,最终影响破骨细胞的分化和功能并诱导 OP^[7]。MT 是松果体分泌的一种吲哚神经内分泌激素,也是目前已知的最强的自由基清除剂^[8]。研究表明,CRF 患者的 MT 分泌明显低于正常人群,尤其是夜间 MT 峰值消失的 MHD 患者^[9]。人体正常状态下具有完善的抗氧化机制,它可以通过酶催化和无酶催化消除氧自由基,从而起到抗氧化作用^[10]。当体内防御系统功能低下时,氧化还原反应将失去平衡,导致活性氧(ROS)的积累,

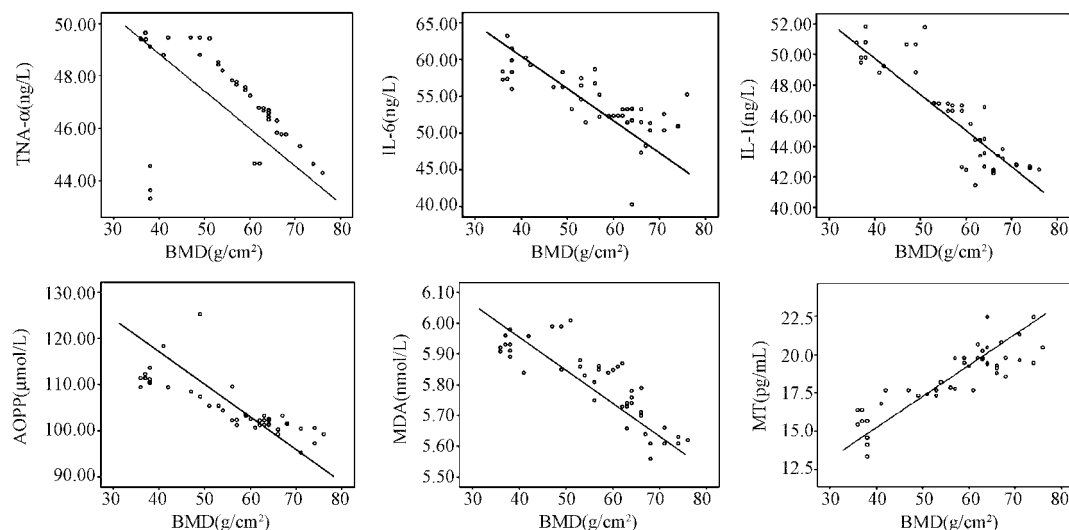


图1 AOPP、MDA、TNF- α 、IL-6、IL-1 和 MT 水平与 BMD 的相关性分析

Fig.1 Correlation analysis of AOPP, MDA, TNF- α , IL-6, IL-1 and MT levels with BMD

氧化和抗氧化之间的不平衡,其中氧化占主导地位,导致 OS^[11]。AOPP 是 OS 状态下白蛋白产生的一种双精氨酸蛋白质交联剂。MDA 是一种有毒物质,由体内超氧阴离子对细胞膜中不饱和脂肪酸的过氧化作用产生^[12]。

本研究结果显示观察组 MT 水平显著低于对照组,但 AOPP 和 MDA 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$),表明 CRF 患者 OP 具有明显的氧化-抗氧化系统不平衡,因为 AOPP 不仅来自 ROS,而且也是 OS 的结果。此外,MDA 具有强烈的细胞毒性,会引起大分子(蛋白质、脂类和核酸)的交联聚合,其含量直接反映了脂质过氧化的速率和强度,可以作为指标。自由基损伤的严重程度,间接反映了氧自由基损伤的过程。降低的 MT 水平可能与 OS 有关,并且在 CRF 患者中与 OP 相互作用。CRF 患者的蛋白尿和高肾素-血管紧张素活性可刺激机体的炎症反应,并抑制 T 淋巴细胞免疫功能并导致免疫功能障碍^[13]。TNF- α 是一种重要的单核炎症因子,IL-6 是白细胞介素家族的一员,也是急性期反应中的淋巴细胞因子,在免疫反应中发挥多种作用^[14]。此外,IL-1 也是白细胞介素家族的重要成员之一,包括 IL-1 α 和 IL-1 β ,其中 IL-1 β 是炎症过程中重要的炎性细胞因子之一^[15]。本研究结果显示,观察组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$),提示 CRF 患者的微炎症更为明显。

本研究结果显示, AOPP、MDA、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 水平与 BMD 呈负相关,但 MT 与 BMD 呈正相关 ($P < 0.05$),因为足够的 MT 会减少形成和激活骨

痂,从而抑制骨吸收并增加骨量^[16]。此外,MT 可诱导生长激素的分泌,其协同应用可促进新骨的形成。但随着 MHD 的扩展,患者容易发生松果体钙化;钙化面积越大,MT 分泌越少,患者更容易发生 OP,这表明 MT 与 OP 呈负相关。炎症因子,如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1,通常表现出促进骨吸收和抑制骨形成的作用;特别地,TNF- α 可以诱导成骨细胞中的基质细胞表达并刺激破骨细胞活化。IL-1 可促进破骨细胞前体细胞增殖和分化,增强破骨细胞活性,使骨吸收大于骨形成并诱导 OP^[17]。当氧化剂-抗氧化功能在体内不平衡时,它将抑制成骨细胞前体细胞分化为成骨细胞,抑制成骨细胞的矿化并诱导其死亡。AOPP 通过激活 NF- κ B 途径抑制成骨细胞样细胞的增殖和分化。此外,MDA 可以抑制蛋白质和核酸合成,降低酶活性,导致体内抗氧化物质减少,从而逐渐减少骨量。OS 刺激破骨细胞生长和分化后,破骨细胞反过来会产生更多的 ROS,加剧对体内抗氧化防御机制的破坏并形成恶性循环,最终导致广泛的 OP^[18]。

总之,MHD 患者易患 OP,并且存在显著的 OS 和炎症状态;患者的 MT 水平,OS 和炎症程度与 OP 密切相关。临床探讨其关系对降低接受 MHD 的 CRF 患者 OP 的发生率具有重要意义。

【参考文献】

- [1] Lash RW, Nicholson JM, Velez L, et al. Diagnosis and management of osteoporosis [J]. Prim Care, 2009, 36 (1): 181-198.

- [2] Shigematsu T, Muraoka R, Sugimoto T, et al. Risedronate therapy in patients with mild-to-moderate chronic kidney disease with osteoporosis: post-hoc analysis of data from the risedronate phase III clinical trials [J]. BMC Nephrol, 2017,18(1): 66.
- [3] Oh DJ, Kim HR, Lee MK, et al. Profile of human β -defensins 1,2 and proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) in patients with chronic kidney disease [J]. Kidney Blood Press Res, 2013, 37(6): 602-610.
- [4] Zhang WL, Meng HZ, Yang RF, et al. Melatonin suppresses autophagy in type 2 diabetic osteoporosis [J]. Oncotarget, 2016, 7(32): 52179-52194.
- [5] Tanaka T, Latorre MRDO, Jaime PC, et al. Risk factors for proximal femur osteoporosis in men aged 50 years or older [J]. Osteoporos Int, 2001,12(11): 942-949.
- [6] Izadyar S, Golbarg S, Takavar A, et al. The effect of the lumbar vertebral malpositioning on bone mineral density measurements of the lumbar spine by dual-energy X-ray absorptiometry [J]. J Clin Densitom, 2016,19(3): 277-281.
- [7] Cosman F, Beur SJD, Leboff MS, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis [J]. Osteoporos Int, 2014,25(10): 2359-2381.
- [8] Arnao MB, Hernández-Ruiz J. Functions of melatonin in plants: a review [J]. J Pineal Res, 2015,59(2): 133-150.
- [9] Pinto AR, Silva NCD, Pinato L. Analyses of melatonin, cytokines, and sleep in chronic renal failure [J]. Sleep Breath, 2016,20(1): 339-344.
- [10] Tocher DR, Mourente G, Avander E, et al. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. Aquacult Nutrit, 2015,8(3): 195-207.
- [11] Michael M, Piyanuj R, Young Seun C, et al. Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011,35(3): 769-783.
- [12] Xun T, Guang R, Yang B, et al. Advanced oxidation protein products induce hypertrophy and epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubular cells through induction of endoplasmic reticulum stress [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 816-828.
- [13] Norouzi J, Yadollahpour A, Mirbagheri SA, et al. Predicting renal failure progression in chronic kidney disease using integrated intelligent fuzzy expert system [J]. Comput Math Methods Med, 2016,2016:6080814.
- [14] EM B, TA D, JD P, et al. The systemic myokine response of decorin, interleukin-6 (IL-6) and interleukin-15 (IL-15) to an acute bout of blood flow restricted exercise [J]. Eur J Appl Physiol, 2018,118(12): 2679-2686.
- [15] Yang L, Zhang J, Wang G. The effect of sodium hyaluronate treating knee osteoarthritis on synovial fluid interleukin -1 β and clinical treatment mechanism [J]. Pakistan J Pharmaceut Sci, 2015,28(1 Suppl): 407.
- [16] Yoo YM, Han TY, Han SK. Melatonin suppresses autophagy induced by clinostat in preosteoblast MC3T3-E1 cells [J]. Int J Mol Sci, 2016,17(4): 526.
- [17] Zong Y, Sun L, Liu B, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells [J]. PLoS One, 2012,7(8): e44107.
- [18] Nurdiana N, Mariati N, Noorhamdani N, et al. Effects of Labisia pumila on oxidative stress in rat model of post-menopausal osteoporosis [J]. Asian Pacific J Reproduct, 2016, 5(5): 391-394.

(收稿日期: 2019-04-12;修回日期: 2019-05-06)

(上接第 484 页)

- [12] 刘海蔚,高勇义,陈开宁,等. 国产重组人甲状旁腺素(1-34)和降钙素治疗绝经后妇女骨质疏松症的疗效观察[J]. 中国妇幼保健,2014,29(6): 934-937.
- [13] 金成春,鲍广全. 甲状旁腺激素联合鲑鱼降钙素治疗老年骨质疏松合并 GardenI 型股骨颈骨折临床疗效观察[J]. 中国骨质疏松杂志,2017,23(4): 502-505.
- [14] Liu DB, Sui C, Wu TT, et al. Association of bone morphogenetic protein (BMP)/Smad signaling pathway with fracture healing and osteogenic ability in senile osteoporotic fracture in humans and rats[J]. Med Sci Monit, 2018,24: 4363-4371.
- [15] Chisalita SI, Chong LT, Wajda M, et al. Association of insulin-like growth factor-1, bone mass and inflammation to low-energy distal radius fractures and fracture healing in elderly women attending emergency care[J]. Orthop Surg, 2017,9(4): 380-385.
- [16] Ding Q, Sun P, Zhou H, et al. Lack of endogenous parathyroid hormone delays fracture healing by inhibiting vascular endothelial growth factor mediated angiogenesis[J]. Int J Mol Med, 2018,42(1): 171-181.
- [17] 康献刚,王志强. 骨折愈合过程中细胞因子的作用[J]. 中国修复重建外科杂志,2008,22(7): 877-879.

(收稿日期: 2019-03-19;修回日期: 2019-04-13)