

· 论 著 ·

绝经后血清 BMP-7、OCN 水平与骨质疏松的相关性研究

余丽金¹ 温广宇^{1*} 崔红旺²

1. 海南现代妇女儿童医院,海南 海口 57000

2. 海南医学院第一附属医院,海南 海口 57000

中图分类号: R271.11 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 09-1306-05

摘要: **目的** 探究骨形态发生蛋白-7(BMP-7)、骨钙素(OCN)在绝经后骨质疏松(OP)患者血清中的水平与骨代谢指标骨特异性碱性磷酸酶(BAP)、I型胶原交联氨基末端肽(NTX)及骨密度(BMD)的相关性。**方法** 选取2017年5月至2019年3月收治的93例绝经女性OP患者作为OP组;并以同期来我院进行健康体检的86例绝经女性作为对照组进行研究;以实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测两组受试者血清BMP-7、OCN表达水平;以酶联免疫吸附法(ELISA)检测两组受试者血清BAP、NTX水平,计算BAP/NTX比值;利用双能X线骨密度仪测定两组受试者骨密度;分析OP患者血清BMP-7、OCN表达水平与骨代谢相关指标、BMD的相关性及BMP-7表达水平与OCN的关系;Logistic回归分析OP发生的影响因素。**结果** OP组患者雌二醇水平、血清BMP-7、OCN、BAP/NTX、BMD水平均明显低于对照组($t=11.962, 9.969, 12.823, 4.052, 18.215, P$ 均 <0.05);OP组患者血清BAP、NTX水平均明显高于对照组($t=4.014, 9.092, P$ 均 <0.05);OP患者血清BMP-7、OCN表达水平与BAP、NTX均呈负相关(P 均 <0.05),与BAP/NTX、BMD均呈正相关(P 均 <0.05),BMP-7表达水平与OCN呈正相关($P<0.05$);雌二醇、BMD是影响OP发生的保护因素($95\%CI=0.536\sim0.978, 0.335\sim0.916, P$ 均 <0.05),BAP、NTX是影响OP发生的危险因素($95\%CI=1.336\sim1.859, 1.427\sim2.357, P$ 均 <0.05)。**结论** 绝经女性血清BMP-7、OCN表达水平下调,BMP-7、OCN与骨代谢指标及BMD密切相关,两者可能与BAP、NTX、BMD相互影响,从而在OP发展进程中发挥作用。

关键词: 骨形态发生蛋白-7;骨钙素;绝经;骨质疏松;相关性

Study on the correlation between the levels of serum BMP-7 and OCN and osteoporosis in postmenopausal women

YU Lijin¹, WEN Guangyu^{1*}, CUI Hongwang²

1. Hainan Modern Women's and Children's Hospital, Haikou 57000, China

2. The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 57000, China

* Corresponding author; WEN Guangyu, Email: 15091945781@126.com

Abstract: Objective To investigate the correlation between the levels of serum bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), osteocalcin (OCN) in postmenopausal osteoporosis (OP) patients and bone metabolism indexes of bone specific alkaline phosphatase (BAP), type I collagen cross-linked peptide (NTX) and bone mineral density (BMD). **Methods** Ninety-three postmenopausal women with OP treated in the hospital from May 2017 to March 2019 were selected as OP group, and 86 postmenopausal women who had health examination in the same period were selected as the control group. The general data of the two groups were compared. The serum levels of BMP-7 and OCN in the two groups were measured using real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). The serum levels of BAP and NTX were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ratio of BAP/NTX was calculated. Bone mineral density was measured using dual energy X-ray absorptiometry. The relationship between the expression levels of BMP-7, OCN and bone metabolism related indexes, BMD, and the relationship between the expression levels of BMP-7 and OCN in OP patients were analyzed. Logistic regression was used to analyze the influencing factors of OP. **Results** The serum levels of estradiol, BMP-7, OCN, and BAP/NTX, and BMD in the OP group

基金项目: 国家自然科学基金项目(骨细胞程序性坏死通过上调 RANKL 促发绝经后骨质疏松发生的机制研究)(81760260)

* 通信作者: 温广宇, Email: 15091945781@126.com

were significantly lower than those in the control group ($t=11.962, 9.969, 12.823, 4.052, 18.215$, respectively, all $P < 0.05$). The serum levels of BAP and NTX in the OP group were significantly higher than those in control group ($t=4.014, 9.092$, respectively, both $P < 0.05$). The expressions of BMP-7 and OCN were negatively correlated with BAP and NTX in OP patients (all $P < 0.05$), and positively correlated with BAP / NTX and BMD ($P < 0.05$). The expression of BMP-7 was positively correlated with OCN ($P < 0.05$). Estradiol, BMP-7, OCN, and BMD were the protective factors of OP (95% $CI=0.536-0.978, 0.374-0.825, 0.438-0.913, 0.335-0.916$, respectively, $P < 0.05$). BAP and NTX were the risk factors of OP (95% $CI=1.336-1.859, 1.427-2.357$, respectively, $P < 0.05$). **Conclusion** The expressions of BMP-7 and OCN in postmenopausal women are down-regulated. BMP-7 and OCN are closely related to bone metabolism index and BMD, and they may interact with BAP, NTX, and BMD, and play a role in the development of OP.

Key words: bone morphogenetic protein-7; osteocalcin; menopause; osteoporosis; correlation

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是绝经后女性发生较多的一种全身性骨病, 以骨量减少及骨组织微结构病变为临床特征, 可增加骨骼脆性, 易引发骨折, 严重影响患者生活质量^[1]。OP 发病机制尚未完全阐明, 但已有研究表明, 其发病与骨代谢异常有关。研究显示, 骨形态发生蛋白-7 (bone morphogenetic protein-7, BMP-7) 是作为骨形态发生蛋白家族的成员, 可募集人间充质干细胞 (human mesenchymal stem cells, hMSC) 至骨折部位, 改变 hMSC 迁移、侵袭能力, 其具有治疗骨质疏松性骨折的潜力^[2]。另外, 骨钙素 (osteocalcin, OCN) 是非胶原酸性糖蛋白之一, 在骨钙代谢中发挥重要作用, 其在卵巢低反应患者中呈低水平, 采用温阳补肾法结合运动指导可有效提高 OCN, 减少患者发生 OP 的风险^[3]。但 BMP-7、OCN 在 OP 患者血清中的水平与患者骨代谢指标及骨密度的关系研究鲜少。本研究旨在分析绝经后 OP 患者 BMP-7、OCN 水平与骨代谢有关指标及骨密度的相关性, 从而为临床防治 OP 提供一定参考依据。

1 材料和方法

1.1 临床资料

选取 2017 年 5 月至 2019 年 3 月于本院诊治的绝经女性 OP 患者 93 例为 OP 组, 其中年龄 50~70 岁; 身体质量指数 (body mass index, BMI) 为 (18.69~26.15) kg/m^2 , 绝经时间 3~15 年, 所有患者符合《中国人骨质疏松症诊断标准专家共识》^[4] 有关 OP 判定标准。OP 患者纳入标准: ①患者均进行骨密度 (bone mineral density, BMD) 检查确诊; ②自愿参与本项研究者。排除标准: ①合并类风湿关节炎、骨肿瘤、甲状旁腺功能亢进、甲状腺功能亢进等疾病者; ②合并肝、肾、心血管系统、血液系统等严重疾病者; ③一年内进行卵巢摘除、发生骨折者; ④合并雌激素依赖性肿瘤者; ⑤近期服用过钙制剂、肝素、雌

激素、维生素 D 等影响骨代谢的药物者。并以同期来我院进行体检健康的绝经女性 86 例为对照组, 其中年龄 49~68 岁, BMI 为 (18.73~26.34) kg/m^2 , 绝经时间 3~14 年。

所有受试者或其家属签署知情同意书, 所用研究方法符合伦理学要求, 且经本院伦理委员会审核、批准。

1.2 主要试剂与仪器

TRIzol Reagent (货号: S30876) 购买于上海源叶生物科技有限公司; Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (货号: 69001-3) 购买于上海子起生物科技有限公司; 2×SYBR Green qPCR Master Mix (货号: JK-R2010) 购买于上海晶抗生物工程有限公司; 人骨特异性碱性磷酸酶 (bone-specific alkaline phosphatase, BAP) 酶联免疫吸附剂测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购买于美国 METRI 生物系统公司; 人 I 型胶原交联氨基末端肽 (type I collagen cross-linked opeptide, NTX) ELISA 试剂盒购买于 Ostex International 公司。

紫外分光光度计 (型号: DU-730) 购买于上海普迪生物技术有限公司; ABI 7500Fast 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 仪 (型号: StepOne TM) 购买于美国应用生物系统公司 (上海); 双能 X 线骨密度仪 (型号: Prodigy 型) 购买于通用电气医疗系统贸易发展 (上海) 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样本采集与预处理: 收集两组受试者清晨空腹肘静脉血 5~6 mL, 自然凝集, 3 600 r/min 离心 8 min, 收集上层血清, 分装, 于 -80 °C 冰箱中保存, 待检。

1.3.2 qRT-PCR 法检测血清 BMP-7、OCN 表达水平: 将血清样本从 -80 °C 冰箱中取出, 冻融, 参考 TRIzol 试剂盒说明书抽提总 RNA, 检测其浓度、纯度及完整性。依据 Revert Aid First Strand cDNA

Synthesis Kit 说明书配制反应体系,将 RNA 反转录成 cDNA。最后,参照扩增反应试剂盒 2x SYBR Green qPCR Master Mix 说明书配制反应体系,在一定条件下进行扩增和检测。BMP-7、OCN 以 GAPDH 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算两者表达水平,其相应引物序列如表 1。

表 1 BAP、NTX 及内参 GAPDH 的引物序列

Table 1 Primer sequences of BAP, NTX, and GAPDH

名称	正向引物 5'—3'	反向引物 5'—3'
BMP-7	TGCAAGATCAAACCGCAAC	CAGCCTGCAAGATAGCCATT
OCN	TGGAGACCGAAGCAGACAA	CAGCTGATCTTATGGAACC
GAPDH	CAGGAGCATTGCTGATGAT	GAAGGCTGGGGCTCATTT

1.3.3 ELISA 法检测血清 BAP、NTX 水平:取出冻存血清样本,解冻,严格按照 BAP、NTX ELISA 试剂盒说明书检测两组受试者血清 BAP、NTX 水平。

1.3.4 骨密度检测:受试者侧卧于检查床,使其脊柱与扫描检查床平行屈髋屈膝,腰椎平靠侧位定位器,受试者右拳放于床面,右臂与肩部垂直,与检查床呈 90°,利用双能 X 线骨密度仪检测腰椎 (L₂-

L₄)、股骨颈、Ward 三角区及大转子的 BMD,取其平均值即为受试者个体 BMD。参考文献[5],仪器检测骨密度精度<1%变异系数,X 射线管最大管电压 76 kV。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 24.0 软件统计分析所得实验数据。符合正态分布的计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较行 t 检验;采用 Pearson 法分析 OP 患者血清 BMP-7、OCN 表达水平与骨代谢相关指标、BMD 的相关性及 BMP-7 表达水平与 OCN 的关系;采用 Logistic 回归分析 OP 发生的影响因素。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

与对照组相比,OP 组患者雌二醇水平明显降低 ($P < 0.05$),年龄、BMI、绝经时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 2。

表 2 两组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of general data between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄/岁	BMI/(kg/m ²)	绝经时间/年	雌二醇/(pmol/L)
对照组	86	59.0±8.7	22.85±2.36	7.78±2.36	42.06±10.24
OP 组	93	59.6±8.9	23.08±2.43	8.02±2.58	26.18±7.39
t 值	—	0.524	0.641	0.648	11.962
P 值	—	0.601	0.522	0.518	<0.001

2.2 两组血清 BMP-7、OCN、骨代谢指标、BMD 水平比较

与对照组相比,OP 组患者血清 BMP-7、OCN、

BAP/NTX、BMD 表达水平明显降低 ($P < 0.05$),OP 组患者 BAP、NTX 水平明显升高 ($P < 0.05$)。详见表 3。

表 3 两组血清 BMP-7、OCN、骨代谢指标、BMD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum BMP-7, OCN, bone metabolism index, and BMD between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BMP-7	OCN	BAP/(U/L)	NTX/ (nmolBCE/mL)	BAP/NTX	BMD
对照组	86	1.04±0.30	1.08±0.32	25.91±7.56	13.16±3.60	1.98±0.62	-1.79±0.38
OP 组	93	0.65±0.22	0.58±0.19	31.36±10.28	18.95±5.12	1.64±0.50	-3.12±0.57
t 值	—	9.969	12.823	4.014	9.092	4.052	18.215
P 值	—	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 OP 患者血清 BMP-7、OCN 表达水平与骨代谢相关指标及 BMD 的相关性

Pearson 法分析显示,OP 患者血清 BMP-7 表达水平与 BAP、NTX 均呈负相关 ($P < 0.05$),与 BAP/NTX、BMD 均呈正相关 ($P < 0.05$);OP 患者血清 OCN 表达水平与 BAP、NTX 均呈负相关 ($P < 0.05$),

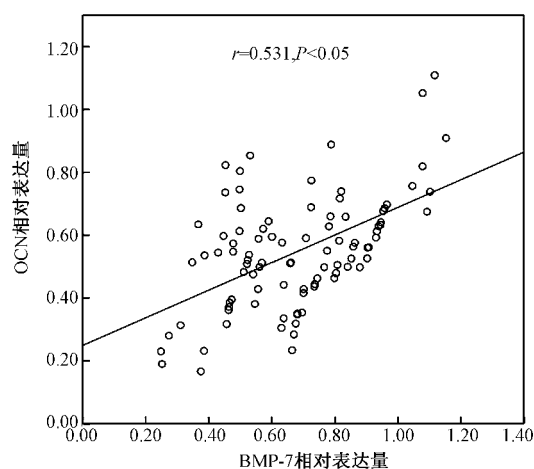
与 BAP/NTX、BMD 均呈正相关 ($P < 0.05$)。详见表 4。

2.4 OP 患者血清 BMP-7 表达水平与 OCN 的关系

Pearson 法分析显示,OP 患者血清 BMP-7 表达水平与 OCN 水平呈正相关 ($r = 0.531, P < 0.05$)。详见图 1。

表 4 OP 患者血清 BMP-7、OCN 表达水平与骨代谢指标、BMD 的相关性**Table 4** Correlation of serum BMP-7 and OCN expression and bone metabolism index and BMD in OP patients

指标	BMP-7		OCN	
	r 值	P 值	r 值	P 值
BAP	-0.392	<0.001	-0.406	<0.001
NTX	-0.433	<0.001	-0.518	0.006
BAP/NTX	0.378	<0.001	0.385	<0.001
BMD	0.549	<0.001	0.462	<0.001

**图 1** OP 患者血清 BMP-7 表达水平与 OCN 的关系**Fig.1** The relationship between the level of serum BMP-7 expression and OCN in OP patients

2.5 影响 OP 的 Logistic 回归分析

以雌二醇、BAP、NTX、BAP/NTX、BMD 为自变量,以是否发生 OP 为因变量,行 Logistic 回归分析,结果显示,雌二醇、BMD 是影响 OP 发生的保护因素 ($P<0.05$),BAP、NTX 是影响 OP 发生的危险因素 ($P<0.05$)。详见表 5。

表 5 Logistic 回归分析 OP 的影响因素**Table 5** Influencing factors of OP in Logistic regression analysis

指标	β	SE	Wald	P 值	OR	95% CI
雌二醇	-0.323	0.107	9.112	0.001	0.724	0.536~0.978
BAP	0.455	0.225	4.089	0.010	1.576	1.336~1.859
NTX	0.606	0.232	6.823	0.004	1.834	1.427~2.357
BAP/NTX	-0.022	0.108	0.041	0.983	0.978	0.548~1.746
BMD	-0.591	0.100	34.928	<0.001	0.554	0.335~0.916

3 讨论

绝经后 OP 是临床常见的由内分泌、遗传、物理等多种因素所致的一种代谢性骨病,其致残率、致死率均高,对女性生命安全及健康构成极度威胁^[6]。

因此,寻找可早期诊治评估 OP 的有效指标,并动态监测指标水平,对改善生存质量具有积极意义。

BMP-7 是广泛分布于血液、骨膜、骨胶原纤维、骨髓基质中的转化生长因子 β 超家族成员,在骨和软骨细胞分化,骨和软骨的形成、发育、缺损修复等生物学过程中具有重要调控作用^[7-8]。Schwartz 等^[9]通过研究发现仅在 BMP-7 刺激的牛腱标本、原代成骨细胞、成纤维细胞等培养物中出现组织的骨化区和碳酸钙样结构,BMP-7 对体外肌腱-骨整合的生物学过程具有积极作用,其治疗韧带损伤具有潜在的辅助价值。另有研究显示,BMP-7 在骨折患者血清中表达异常,经丹参注射液治疗后,其水平表达上调,BMP-7 可促进骨间充质干细胞向成软骨细胞、成骨细胞分化,促使钙盐沉积,形成新骨,其可能参与并影响骨折愈合过程^[10]。以上研究表明,BMP 异常表达可能与骨形成、代谢、修复等关系密切。本研究中 OP 组患者血清 BMP-7 表达下调,提示 BMP-7 可能在 OP 发展进程中发挥一定作用。猜测绝经后女性卵巢功能减退、雌激素显著减少,雌激素可能影响 BMP-7 表达,BMP-7 进而影响成骨细胞的分化及活性,从而在 OP 过程中起一定作用。雌激素如何影响 BMP-7 表达的机制有待进一步研究。

OCN 主要是由骨细胞分泌的一种维生素 K 依赖性钙结合蛋白,与成骨活性密切相关,在骨钙代谢中起重要作用,可一定程度反映骨形成、骨转化的程度,其对诊断钙代谢异常、OP 等疾病具有重要价值^[11-12]。相关研究显示 OCN 在原发性 OP 女性患者血清中呈异常表达,与 BMD 具有一定相关性,其水平有利于诊断绝经后 OP^[13]。另有研究指出,OCN 在老年 OP 患者血清中呈低水平,经唑来膦酸治疗后,其水平显著上升,OCN 可能在老年 OP 发生发展进程中发挥一定作用^[14]。以上研究证实,表达异常的 OCN 可能与各种 OP 骨代谢疾病有关。本研究中 OP 组患者血清 OCN 表达水平明显降低,与俞菁等^[14]研究趋势相符,提示 OCN 可能参与并影响 OP 发生发展过程。推测 OCN 可能降低骨细胞的活性,影响骨形成及骨吸收的平衡,进而影响 OP 发病过程。

在正常骨代谢中,成骨细胞形成新骨与破骨细胞吸收旧骨构成动态平衡,进行骨重建,一旦骨吸收超过骨形成,会引起 OP。BAP 是一种位于成骨细胞表面的特异性糖蛋白,可反映成骨细胞的活性,是具有较好诊断效能的骨形成指标,而 NTX 是骨 I 型胶原特异性降解的低分子肽,是较好的骨吸收生物

标志物^[15-16],两者比值可助于鉴别个体是否易患OP及是否存在快速骨量丢失。本研究显示,OP组患者BAP、NTX水平明显升高,BAP/NTX比值明显降低,提示BAP、NTX均可能参与绝经女性OP疾病的发展,且OP疾病以NTX代表的骨吸收占主要优势,两者水平检测有助于判定是否发生OP及病情评估。国内外研究认为,OP患者BMD水平明显低于正常人,BMD是判定OP发生的常用指标。本研究显示,BMD在OP患者中水平明显降低,与前人研究^[17]一致,提示BMD水平有助于评估OP病情进展程度。

本研究通过分析OP患者血清BMP-7、OCN水平与骨代谢及BMD指标的相关性,结果显示,BMP-7、OCN表达水平均与BAP、NTX呈负相关,与BAP/NTX、BMD呈正相关,提示BMP-7、OCN可能与BAP、NTX、BMD相互作用,协同影响OP发生、发展。进一步研究显示BMP-7在OP患者血清中的表达水平与OCN呈正相关,提示,两者可能相互影响,从而共同在OP发展过程中起作用。此外,研究显示雌二醇、BMD是影响OP发生的保护因素,BAP、NTX是影响OP发生的危险因素,提示雌二醇、BMD水平降低,BAP、NTX升高均有可能增加OP发生风险,及时监控雌二醇、BMD、BAP、NTX水平有助于及早防治OP。

综上所述,BMP-7、OCN在OP患者血清中呈低表达,两者与骨代谢指标BAP、NTX及BMD具有一定相关性,两者可能在OP患者的骨代谢中发挥作用。但本研究取样较少,可能会导致结果出现一定程度偏差,后期将加大样本量进行更深入的探究。

【参 考 文 献】

[1] Villiers TJ, Altomare C, Particco M, et al. Effects of ospemifene on bone in postmenopausal women[J]. Climacteric, 2019, 22(5):442-447.

[2] Haasters F, Docheva D, Gassner C, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients reveal reduced migration and invasion upon stimulation with BMP-2 or BMP-7[J]. Biochem

Biophys Res Commun, 2014, 452(1):118-23.

[3] 王晓霜, 黄好, 万锐杰, 等. 温阳补肾法结合运动指导对预防卵巢巢低反应患者骨质疏松的效果[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(5):638-640.

[4] 张智海, 刘忠厚, 李娜, 等. 中国人骨质疏松症诊断标准专家共识[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(9):1007-1010.

[5] 王冀苏. 血清胆红素水平与绝经后骨质疏松症相关性的临床分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(7):926-929.

[6] Goh M, Nguyen HH, Khan NN, et al. Identifying and addressing osteoporosis knowledge gaps in women with premature ovarian insufficiency and early menopause: A mixed-methods study[J]. Clin Endocrinol, 2019, 91(4):498-507.

[7] Deng J, Wu J, Zhu Y, et al. Inhibition of MicroRNA-9 Improves Fracture Healing by Modulating the Bone Morphogenetic Protein-7 Pathway[J]. Pharmacology, 2019, 104(5):352-358.

[8] Li L, Jiang Y, Lin H, et al. Muscle injury promotes heterotopic ossification by stimulating local bone morphogenetic protein-7 production[J]. J Orthop Translat, 2019, 18(7):142-153.

[9] Schwarting T, Lechler P, Struwer J, et al. Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) influences tendon-bone integration in vitro[J]. PLoS One, 2015, 10(2):6833-6839.

[10] 陈泽钦, 洪友钦, 陈振, 等. 丹参注射液对PILON骨折愈合及BMP-7、TGF- β 1及bFGF表达的影响[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(22):2732-2734.

[11] Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Hirata M. Osteocalcin and its endocrine functions[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 132:1-8.

[12] Karsenty G. Update on the biology of osteocalcin[J]. Endocr Pract, 2017, 23(10):1270-1274.

[13] Singh S, Kumar D, Lal AK. Serum osteocalcin as a diagnostic biomarker for primary osteoporosis in women[J]. J Clin Diagn Res, 2015, 9(8):4-7.

[14] 俞菁, 王玮琴. 唑来膦酸对老年骨质疏松患者骨密度及血清相关骨代谢标志物水平的影响[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(4):552-554.

[15] Tripathi T, Gupta P, Sharma J, et al. Bone-specific alkaline phosphatase - a potential biomarker for skeletal growth assessment[J]. J Orthod, 2018, 45(1):4-10.

[16] Chubb SA, Mandel C, Vasikaran S. Comparison of clinical cut-points and treatment targets for urine NTX and plasma β CTX-I in osteoporosis[J]. Clin Biochem, 2016, 49(7):529-533.

[17] 刘悦, 顾海峰. 骨质疏松症患者骨密度与血清激素水平的关系[J]. 中华全科医学, 2017, 15(12):2086-2088.

(收稿日期: 2019-12-19;修回日期: 2020-01-14)