

· 临床研究 ·

血清 CCL4 水平和绝经后骨质疏松症严重程度相关性研究

杨剑¹ 李清雪² 仝瑞晓³ 陈景伟^{4*}

1.河北省优抚医院康复科,河北 石家庄 050051

2.石家庄市第四医院妇科,河北 石家庄 050011

3.邯郸市中医妇科,河北 邯郸 056000

4.河北中医学院中西医结合妇产科学教研室,河北 邯郸 050200

中图分类号: R58 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 10-1490-05

摘要: 目的 探讨血清 CCL4 水平与绝经后骨质疏松症(PMOP)严重程度的关系。方法 对 66 名 PMOP 女性,68 名绝经后非骨质疏松女性和 67 名健康育龄妇女进行研究。用双能 X 射线吸收测定法扫描评估骨密度。Oswestry 残疾指数和视觉模拟量表用于量化症状的活动功能和严重程度。用定量夹心酶联免疫吸附测定血清 CCL4 水平。结果 发现 CCL4 血清水平与骨密度呈显著负相关。此外,血清 CCL4 水平与视觉模拟评分和 Oswestry 残疾指数评分显著相关。结论 血清 CCL4 是评估 PMOP 女性疾病严重程度的潜在生物标志物。

关键词: CCL4;骨密度;绝经后骨质疏松症;疾病严重程度

Correlation between serum CCL4 level and severity of postmenopausal osteoporosis

YANG Jian¹, LI Qingxue², TONG Ruixiao³, CHEN Jingwei^{4*}

1. Department of Rehabilitation, Youfu Hospital, Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China

2. Department of Gynecology, Shijiazhuang No. 4 Hospital, Shijiazhuang 050011, China

3. Department of Gynecology, Bengbu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Handan 056000, China

4. Department of Obstetrics and Gynecology of Integrated Traditional and Western Medicine, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Handan 050200, China

* Corresponding author: CHEN Jingwei, E-mail: 3493201812@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the relationship between serum CCL4 level and the severity of postmenopausal osteoporosis (PMOP). **Methods** This research enrolled 66 PMOP females, 68 postmenopausal nonosteoporotic women and 67 healthy women of childbearing age. Bone mineral densities were assessed with dual X-ray absorptiometry scans. The Oswestry disability index and the visual analog scale were employed to quantify functional ability and severity of symptoms. Serum CCL4 levels were examined with a quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** We observed a significant negative correlation of CCL4 serum levels with bone mineral density. Furthermore, serum CCL4 concentrations were significantly related to the visual analog scale and Oswestry Disability Index scores. **Conclusion** Serum CCL4 is a potential biomarker to evaluate disease severity in PMOP females.

Key words: CCL4; bone mineral density; postmenopausal osteoporosis; disease severity

骨质疏松是人类骨骼的一种极其常见的疾病,其特点是骨强度下降,脆性骨折风险显著增加^[1]。女性比男性更常见,由于绝经后雌激素水平下降,其发病率显著增加^[2]。骨质疏松被认为是一种涉及

内分泌和遗传因素的多因素疾病。骨质疏松的主要诊断依据是骨密度以及腰痛^[3]。然而,骨密度降低和影像学改变,如骨小梁减少或骨折,通常被解释为中晚期骨质疏松的指征。为了早期发现骨质疏松患者骨代谢的变化,必须采用更新、更有效、更可靠的疾病监测手段。CCL4,又称巨噬细胞炎症蛋白-1 β ,

* 通信作者: 陈景伟, Email: 3493201812@qq.com

与破骨细胞活性和骨代谢疾病的病理进程有关^[4]。CCL4 对多种细胞具有潜在的趋化作用,包括对冠状动脉内皮细胞、未成熟树突状细胞、单核细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞等不同类型的细胞具有趋化作用。破骨细胞的迁移已被确定是包括骨质疏松在内的一些病理条件下的一个关键过程^[5]。一项横断面临床研究发现,骨质疏松患者的血清 CCL4 水平显著高于健康对照组^[6]。日前关于绝经后骨质疏松症患者血清 CCL4 水平和骨质疏松症严重程度日前研究有限,本研究的旨在探索绝经后骨质疏松症患者血清 CCL4 水平和骨密度之间的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

2017 年 4 月至 2019 年 4 月,66 例绝经后女性患者(包括 32 例腰椎骨折)诊断为 PMOP。骨质疏松定义为 T 值 <-2.5 。本研究的纳入标准:50 岁或以上绝经后骨质疏松症患者。排除标准包括有骨骼系统疾病、癌症、肾脏疾病、心力衰竭、缺血性心脏病和糖尿病的患者。此外,在 2 个月内接受了破骨细胞抑制剂和/或有机钙治疗的患者也被排除在外。同时选择 68 例骨密度正常的绝经后妇女[绝经后非骨质疏松妇女(PMNOP)]和 67 例育龄健康妇女作为对照组。本研究方案都得到医院伦理委员会的批准,所有受试者都签署书面知情同意书。

1.2 指标评估

采用 Oswestry 残疾指数(ODI)和视觉模拟评分法(VAS)评价 PMOP 患者的功能状态和症状严重程度。ODI 是对 10 种日常生活活动能力的评估,包括疼痛强度、旅行、社会活动、性活动、睡眠、站立、坐姿、步行、举重和个人卫生。严重程度评分越高,表示残疾程度越高。采用 10 cm 水平 VAS 量表评价下肢和腰痛的程度。研究方案将中度至重度疼痛定义为 $VAS>3$,而轻度疼痛由 $VAS<3$ 表示。

脊柱骨折的影像学评估基于脊柱成像的 Genant 半定量法^[7]。骨折分为 3 级,椎体高度降低 20%~25%、降低 26%~40%、降低 $>40\%$ 分别为 1 级、2 级和 3 级。

所有受试者在禁食过夜后进行静脉采血。血液被收集到空置管中,然后立即离心以减少糖酵解。血清样本在 -80°C 保存,直到检测为止。用定量双抗体夹心酶联免疫吸附试验试剂盒(Quantikine; R&D Systems, MN)对 PMOP、PMNOP 女性和健康对照者的 CCL4 水平进行盲法分析。CCL4 批内和批

间变异系数分别为 4.36% 和 3.25%。检测范围为 $31.2\sim 2\,000\text{pg/mL}$ 。检测炎症标志物 IL-6 和血清 I 型胶原 C 末端肽(CTX-I)水平。

1.3 统计学处理

通过 SPSS 21.0 软件分析所有研究的数据。结果以均数 $\pm$ 标准差或中位数(四分位数范围)表示。通过 Kolmogorov Smirnov 检验评估数据分布的正态性。使用 Mann Whitney U 检验或学生 t 检验分析两组之间血清 CCL4 水平的差异。通过单因素方差分析或 Kruskal Wallis 分析,然后进行 Tukey Posthoc 分析,确定三组之间的差异。行 Spearman 或 Pearson 相关分析以评估 CCL4 血清水平与疾病严重性相关性。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

表 1 描述了本研究的所有参与者的基线临床特征。患者队列包括 66 名 PMOP 女性,平均年龄(62.4 ± 5.1)岁;68 名年龄匹配的 PMNOP 女性,平均年龄(60.7 ± 4.4)岁和 67 名健康育龄妇女,平均年龄(42.7 ± 4.1)岁。一般人体特征参数(包括 BMI 和年龄)在 PMOP 和 PMNOP 组之间差异无统计学意义。与 PMNOP 和对照组相比,PMOP 中 IL-6 和 CTX-1 标志物显著升高。此外,观察到 PMOP 组患者的股骨颈和 L_1-L_4 BMD 显著低于 PMNOP 和健康对照组。

与 PMNOP 和对照相比,PMOP 中血清 CCL4 水平增加($P<0.05$),见表 1 和图 1。PMNOP 与健康对照组血清 CCL4 水平差异无统计学意义。此外,与 PMOP 中的非骨折组相比,骨折组血清 CCL4 水平显著升高($P<0.05$),见图 1。

表 1 受试者的基线临床特征参数及骨密度($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Subject's baseline clinical characteristics and bone mineral density ($\bar{x}\pm s$)

项目	对照组 ($n=67$)	PMNOP ($n=68$)	PMOP ($n=66$)
年龄/岁	42.7 ± 4.1	60.7 ± 4.4	62.4 ± 5.1
BMI/(kg/m^2)	22.6 ± 1.1	22.3 ± 1.2	22.5 ± 1.4
绝经时间/年	-	10.1 ± 2.3	11.1 ± 2.7
用药类型及病程	-	-	OI ($n=40$); OC ($n=14$); OI+OC ($n=12$)
CCL4/(pg/mL)	197.7 ± 4.0	208.2 ± 4.2	$697.1\pm 28.7^{* \#}$
IL-6/(pg/mL)	51.8 ± 2.6	$93.7\pm 3.3^{*}$	$133.9\pm 2.9^{* \#}$
CTX-1/(ng/mL)	0.32 ± 0.01	$0.53\pm 0.01^{*}$	$0.81\pm 0.01^{* \#}$
BMD(FN)/(g/cm^2)	1.07 ± 0.03	$0.95\pm 0.03^{*}$	$0.80\pm 0.01^{* \#}$
BMD(L_1-L_4)/(g/cm^2)	1.19 ± 0.02	$0.92\pm 0.01^{*}$	$0.83\pm 0.02^{* \#}$

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 PMNOP 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

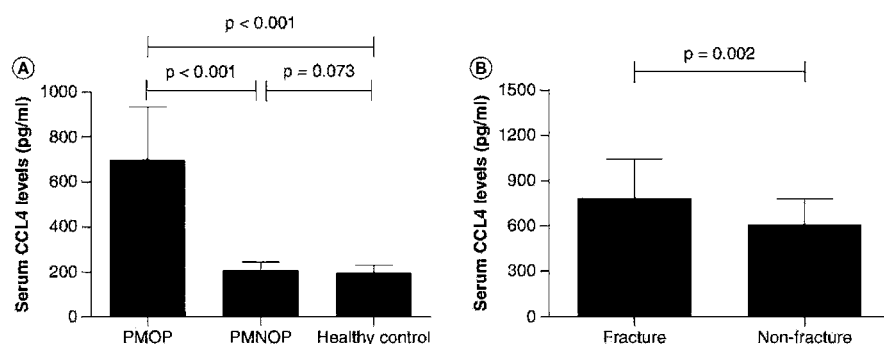


图 1 血清 CCL4 水平比较

Fig.1 Comparison of serum CCL4 levels

使用 Genant 分级系统, PMOP 相关骨折患者被分为 3 个不同的组。12 名患者被分为 1 级, 11 名被分为 2 级, 9 名被分为 3 级。Genant 3 级血清 CCL4 水平显著高于 Genant1 级 ($P < 0.05$)。虽然 Genant 3 级与 Genant 2 级、Genant 2 级与 Genant 1 级的差异无统计学意义; 但是呈现一种趋势, 具有较高 Genant 等级的患者表现出较高的血清 CCL4 水平。血清 CCL4 水平与 Genant 等级呈正相关 ($r = 0.580, P < 0.05$)。见图 2。

进一步检测血清 CCL4 水平以探讨其与 PMOP 患者的 BMD 和 Genant 分级的相关性。发现较高的 CCL4 水平与较低的股骨颈 BMD ($r = -0.396, P =$

0.001) 和较低的腰椎 (L_1-L_4) BMD 相关 ($r = -0.364, P = 0.003$), 见图 2。然而, PMNOP 与健康对照组比较, 血清 CCL4 水平与股骨颈和腰椎 BMD 无显著相关性。为了说明 CCL4 水平是否与 PMOP 的症状严重程度相关, 进一步探讨了血清 CCL4 水平和 VAS 以及 ODI 之间的关系。发现 CCL4 水平与 VAS ($r = 0.455, P < 0.001$) 和 ODI ($r = 0.499, P < 0.001$) 呈正相关, 见图 3。另外血清 CCL4 水平与 CTX-1 ($r = 0.432, P < 0.001$) 和 IL-6 ($r = 0.437, P < 0.001$) 也呈正相关, 见图 3。但血清 CCL4 水平与 PMNOP 和健康对照组的 CTX-1 和 IL-6 水平无显著相关性。

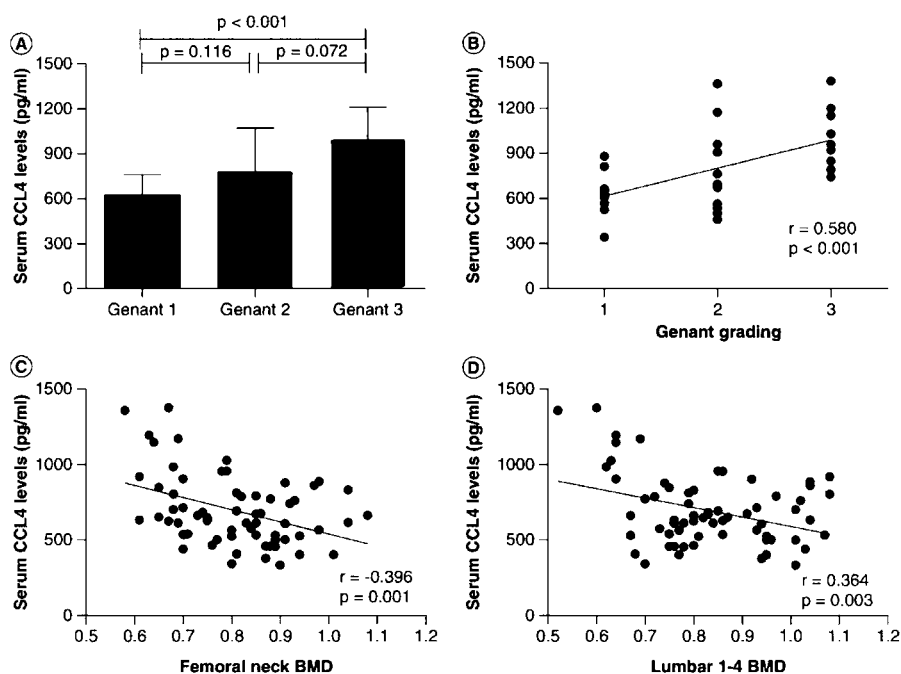


图 2 血清 CCL4 水平与 Genant 分级和 BMD 之间的相关性

Fig.2 Associations between serum CCL4 level and Genant grade and BMD

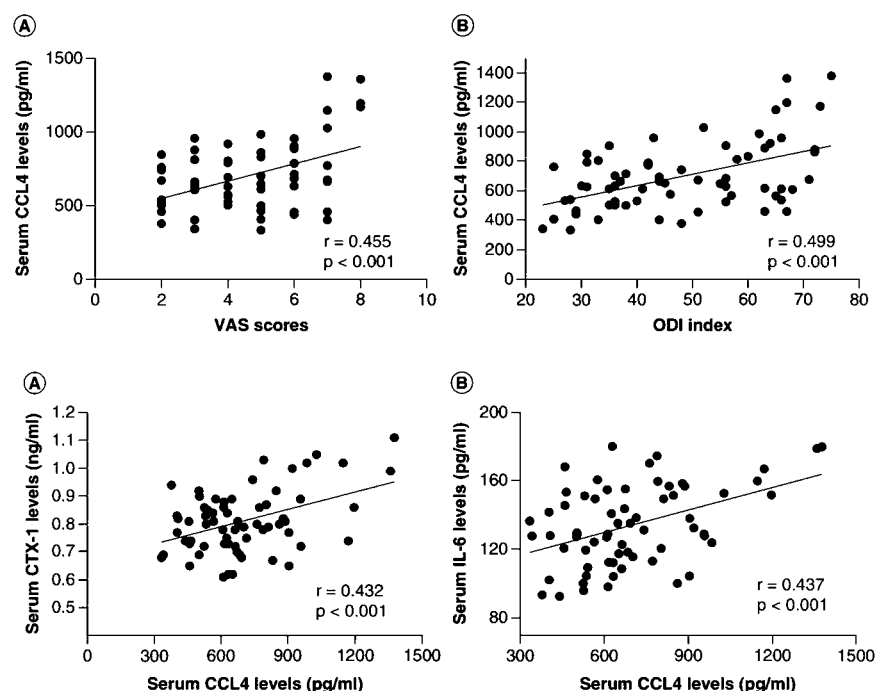


图3 血清 CCL4 水平与 VAS 评分、Oswestry 指数、血清 I 型胶原和 IL-6 水平的相关性

Fig.3 Association of serum CCL4 levels with VAS scores, Oswestry indices, serum type I collagen and IL-6 levels

3 讨论

本研究旨在确定 PMOP 患者血清 CCL4 水平与疾病严重程度之间的关系。本研究发现和健康对照组相比,PMOP 血清 CCL4 水平显著升高。此外,血清 CCL4 水平与 PMOP 女性中较低的 BMD、骨折、临床严重程度和骨质疏松相关标志物呈相关性。在调整年龄和 BMI 后,这些差异仍然很大。

现有研究^[8]证实,免疫系统对骨质疏松症的发病机制有重要作用,炎症趋化因子在骨质疏松症中起关键作用的是骨重建因子。通过参与刺激破骨细胞祖细胞的成熟和迁移,趋化因子信号与经典 M-CSF/RANKL 介导的破骨细胞分化途径有关^[9]。以前的研究,包括小鼠和原代人类细胞培养的遗传实验,已经证明趋化因子在生理条件下影响破骨细胞的分化和迁移^[10-11]。本研究发现 CCL4 水平与股骨颈和 L₁-L₄ 腰椎的 BMD 呈负相关。此外,CCL4 水平与椎体骨折的影像学分级呈正相关。这两项研究结果表明 CCL4 可能在破骨细胞活性中起重要作用。

破骨细胞来源于单核细胞/巨噬细胞前体细胞,后者又是造血祖细胞的后代。骨吸收是一个动态过程,需要破骨细胞分化,激活和迁移到再吸收部

位^[12]。在一项体外细胞研究中,在向培养基中加入特异性抗 CCL4 抗体后,RANKL 诱导的迁移破骨细胞数量显著下降^[13]。在多发性骨髓瘤细胞中,CCL4 可能是溶骨性病变发展中的主要破骨细胞激活因子^[14]。所有这些发现都暗示 CCL4 是破骨细胞活性所必需的。本研究表明血清 CCL4 水平与疼痛和功能显著相关。

研究认为神经系统通过控制骨重建和局部血流来调节骨组织生物学的性能^[15]。实际上,已经发现周围神经系统密切调控骨骼功能。高度支配骨骼系统的神经纤维包括富含肽的降钙素基因相关肽阳性纤维和受体激酶 A 中的 A-δ 原肌球蛋白等^[16]。尽管年龄导致骨质量减少,但支配骨骼的神经元数量在整个人的生命周期内保持相对静止^[17]。骨骼中神经连接的存在直接影响骨重建,维持内部动态平衡并控制合成代谢和分解代谢的骨代谢。一项涉及使用小鼠 PSLN 模型的研究调查了 CCL4 如何影响神经性疼痛^[18]。发现经历坐骨神经损伤的小鼠模型在施万细胞和损伤部位的巨噬细胞中具有 CCL4 表达的增加。此外,CCL4 抗体能够减轻这些病理特征。

总之,这些发现表明 CCL4 可能是促进 PMOP 患者疼痛感的重要因素。我们进一步检查了血清 CCL4 水平与骨转换标志物 CTX-1 以及骨质疏松症

相关炎症标志物 IL-6 之间的关系。已经证实血清 CTX-1 值在骨吸收加速的条件下升高;通过分析血清 CTX-1 水平,可以检测到骨质疏松症中骨转换增加以及继发于绝经后骨吸收增加^[19]。IL-6 已被确定为炎症细胞因子,主要在绝经后期刺激破骨细胞转化^[20]。本研究表明血清 CCL4 与血清 CTX-1 和 IL-6 之间的显著相关性。

综上,本研究发现,与 PMNOP 和健康对照者相比,PMOP 患者血清 CCL4 水平显著升高。较高的 CCL4 水平与症状和影像学严重程度增加以及较低的 BMD 相关。目前的研究表明 CCL4 具有能够预测 PMOP 疾病严重程度的生物标志物的潜力。

【参 考 文 献】

- [1] Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014,142:155-170.
- [2] Nakamura K, Saito T, Kobayashi R, et al. Physical activity modifies the effect of calcium supplements on bone loss in perimenopausal and postmenopausal women: subgroup analysis of a randomized controlled trial [J]. Arch Osteoporos, 2019, 14 (1): 17.
- [3] Wang YC, Chiang JH, Hsu HC, et al. Decreased fracture incidence with traditional Chinese medicine therapy in patients with osteoporosis: a nationwide population-based cohort study [J]. BMC Complement Altern Med, 2019,19(1): 42.
- [4] Yoshie O, Imai T, Nomiya H. Chemokines in Immunity [J]. Adv Immunol, 2001,78(78): 57-110.
- [5] Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2006,7(1-2): 123-139.
- [6] Fatehi F, Mollahosseini M, Hassanshahi G, et al. CC chemokines CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5 are elevated in osteoporosis patients [J]. J Biomed Res, 2017, 31 (5): 468-470.
- [7] Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management [J]. Lancet Neurol, 2018,17(4): S1474442218300255.
- [8] Galliera E, Locati M, Mantovani A, et al. Chemokines and bone remodeling [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2008,21(3): 485-491.
- [9] Stern SM, Ferguson PJ. Autoinflammatory bone diseases [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2013,39(4): 735-749.
- [10] Ikić MM, Flegar D, Kovačić N, et al. Increased chemotaxis and activity of circulatory myeloid progenitor cells may contribute to enhanced osteoclastogenesis and bone loss in the C57BL/6 mouse model of collagen-induced arthritis [J]. Clin Exp Immunol, 2016,186(3): 321-335.
- [11] Katarina Glise S, Petra J, Martina Jones K, et al. Chemokine receptor expression on monocytes from healthy individuals [J]. Clin Immuno, 2015,161(2): 348-353.
- [12] Sucur A, Jajic Z, Artukovic M, et al. Chemokine signals are crucial for enhanced homing and differentiation of circulating osteoclast progenitor cells [J]. Arthritis Res Therapy, 2017, 19 (1): 142.
- [13] Xuan W, Feng X, Qian C, et al. Osteoclast differentiation gene expression profiling reveals chemokine CCL4 mediates RANKL-induced osteoclast migration and invasion via PI3K pathway [J]. Cell Biochem Funct, 2017,35(3): 171-177.
- [14] Masahiro A, Kenji H, Javier W, et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1α and MIP-1β in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma [J]. Blood, 2002,100(6): 2195.
- [15] 徐帅,李世昌,孙朋. 神经肽 Y 介导的骨代谢及运动干预调控研究 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2018, 11 (2): 193-199.
- [16] Zylka MJ, Rice FL, Anderson DJ. Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd [J]. Neuron, 2005,45(1): 17-25.
- [17] Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, et al. The effect of aging on the density of the sensory nerve fiber innervation of bone and acute skeletal pain [J]. Neurobiol Aging, 2012, 33 (5): 921-932.
- [18] Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y, et al. CC-chemokine ligand 4/macrophage inflammatory protein-1β participates in the induction of neuropathic pain after peripheral nerve injury [J]. Eur J Pain, 2012,16(9): 1271-1280.
- [19] 马倩倩,张萌萌,高远,等. 1228 例健康人群血清 CTX-1、TRACP、BALP、OC 水平与腰椎骨密度的相关性 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016,22(8): 958-961.
- [20] 万晓华,李章赵. 白细胞介素-1、-6 mRNA 在去势大鼠骨组织中的表达及其意义 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11 (4): 418-422.

(收稿日期: 2019-05-31;修回日期: 2019-08-01)