

氟性骨损伤患者血清中骨形成抑制蛋白 DKK-1 的表达

俞兵¹, 刘晓利², 刘克俭², 徐建², 王文朋², 何晓宏¹, 张裕曾²

摘要: [目的] 观察氟性骨损伤患者血清 dickkopf 相关蛋白 1(DKK-1) 水平, 分析氟性骨损伤的发生与 DKK-1 表达的相关性。[方法] 采用自行设计的“氟与健康”量表对氟暴露人群进行问卷调查, 在调查对象知情同意的前提下, 采集静脉血及随机中段尿用于检测血氟、尿氟及血清中 DKK-1 蛋白浓度, 并对其进行氟斑牙筛查及前臂正位 X 线检查。根据血氟浓度、氟斑牙及氟性骨损伤程度将调查对象分别分为不同氟负荷组、氟斑牙与否组及不同程度骨损伤组, 分析不同组别之间 DKK-1 的差异。[结果] 血清 DKK-1 在低、中、高氟负荷组的浓度分别为(19.60 ± 0.52)、(17.74 ± 0.80)、(14.31 ± 1.20) $\mu\text{g/L}$, 随氟负荷的增高血清 DKK-1 浓度依次降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。无氟斑牙组与氟斑牙组人群血清 DKK-1 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。无、轻、中、重度氟性骨损伤组血清 DKK-1 浓度分别为(19.16 ± 0.76)、(15.86 ± 1.35)、(13.27 ± 0.45)、(12.42 ± 0.04) $\mu\text{g/L}$; 骨损伤组血清 DKK-1 浓度均低于无骨损伤组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。[结论] 氟性骨损伤患者血清 DKK-1 表达水平较低, 提示高氟暴露可以致机体 DKK-1 蛋白表达下调, 导致氟性骨损伤的发生。

关键词: 氟性骨损伤; 血氟; 尿氟; dickkopf 相关蛋白 1

Expression of Serum DKK-1 Acted as Inhibitor of Bone Formation in Patients with Fluoride Bone Injury YU Bing¹, LIU Xiao-li², LIU Ke-jian², XU Jian², WANG Wen-peng², HE Xiao-hong¹, ZHANG Yu-zeng² (1. Enshi Center for Disease Control and Prevention, Hubei 445000, China; 2. School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei 430030, China). Address correspondence to LIU Ke-jian, E-mail: lkj484@sohu.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To observe the expression of dickkopf-1 (DKK-1) in serum of fluoride bone injury (FBI) patients and analyze the relationship between fluoride bone injury occurrence and DKK-1 expression levels. [Methods] General information of fluoride exposed population was collected by a self-designed questionnaire. Venous blood and random midstream urine were sampled from the subjects to detect their serum and urinary fluoride concentrations and serum DKK-1 protein levels followed by informed consent. Dental fluorosis inspection and orthophoric forearm radiography were also performed. Differences in DKK-1 expressions were analyzed among participants grouped by serum fluoride level, dental fluorosis, and skeleton fluorosis diagnostic criteria. [Results] The concentrations of DKK-1 in the low, middle, and high fluoride burden groups were (9.60 ± 0.52), (17.74 ± 0.80), and (14.31 ± 1.20) $\mu\text{g/L}$, respectively, and the difference was statistically significant among the three fluoride burden groups ($P < 0.05$). There was no significant difference in DKK-1 expressions between the dental fluorosis group and the no dental fluorosis group ($P > 0.05$). The levels of DKK-1 in the no, mild, moderate, and heavy FBI groups were (19.16 ± 0.76), (15.86 ± 1.35), (13.27 ± 0.45), and (12.42 ± 0.04) $\mu\text{g/L}$, respectively, with statistical differences ($P < 0.05$). [Conclusion] The level of DKK-1 is significantly decreased in patients with FBI. These results also indicate that long-term exposure to high level of fluoride can down-regulate DKK-1 expression and might induce occurrence of FBI.

Key Words: fluoride bone injury; serum fluoride; urine fluoride; dickkopf-1

氟性骨损伤(fluoride bone injury, FBI), 是由于机体长期摄入过量氟而引起的以骨代谢紊乱为主要病理特征的慢性代谢性骨病, 主要表现为广泛性骨质增

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号: 81072255)

[作者简介] 俞兵(1986—), 男, 学士, 医师; 研究方向: 职业卫生学;
E-mail: yubing56789@163.com

[通信作者] 刘克俭教授, E-mail: lkj484@sohu.com

[作者单位] 1. 恩施州疾病预防控制中心, 湖北 445000; 2. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院, 湖北 430030

生硬化、肌腱韧带钙化。骨周骨化是发生于骨周软组织的钙化和骨化的骨骼病变, 也是氟性骨损伤致病致残致瘫的主要原因^[1]。研究发现 Wnt/ β -catenin 信号转导通路是调控成骨细胞分化和骨基质形成的关键途径^[2]。Dickkopf 相关蛋白 1(DKK-1) 作为 Wnt/ β -catenin 通路的重要调控蛋白, 在骨组织的形成、代谢过程中发挥重要作用, 但氟性骨损伤的发生过程中 DKK-1 的作用机制研究尚未见报道。本研究以高氟暴露地区人

群为调查对象,探讨DKK-1在氟性骨损伤发生过程中的表达及其与氟性骨损伤的相关性,为氟性骨损伤的防治提供依据。

1 对象与方法

1.1 调查对象

根据《地方性氟中毒病区划分标准》(GB 17018—1997)与当地卫生部门历年氟危害监测数据,选择煤烟型地方性氟中毒高发地区为调查对象。采用自行设计的“氟与健康”量表,对在该地区居住20年以上的居民进行问卷调查,内容包括年龄、性别、居住年限、现患疾病、既往史及服用药物情况,并在每个调查点随机采集5户居民的居室环境空气及主要食物(包括经烟煤熏烤的玉米、土豆、辣椒、大豆等)以测定氟含量。经华中科技大学同济医学院伦理委员会同意,在调查对象知情同意的原则下采集空腹静脉血及随机中段尿,并对其进行氟斑牙筛选与前臂正位X线检查。

1.2 调查方法

参照《地方性氟骨症诊断标准》(WS 192—2008)及《氟斑牙诊断标准》(WS/T 208—2011)进行诊断与分组,采用氟离子选择电极法测定血氟、尿氟,酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒测定血清DKK-1蛋白浓度。

1.3 分组方法

将所有调查对象按血氟浓度的四分位数分为3组,大于上四分位数(P_{75})的为高氟负荷组,小于下

四分位数(P_{25})的为低氟负荷组,其余为中氟负荷组。参照氟斑牙诊断标准,将调查对象分为无氟斑牙组及氟斑牙组。同时,参照《地方性氟骨症诊断标准》,并根据氟性骨损伤的程度将调查对象分为无骨损伤组和轻、中、重度骨损伤组,对不同分组对象进行性别、年龄、血氟、尿氟、血清DKK-1水平的比较。

1.4 统计分析

采用双录入法数据输入,EpiData 3.02建立数据库,SPSS 18.0进行统计学分析与处理。分组资料组间比较采用 χ^2 检验;连续性资料多组间比较采用单因素方差分析、LSD检验和SNK检验,采用t检验进行两组样本均数的比较;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 基本情况

共选择调查对象195人,其中男性69人,女性126人;年龄30~70岁,平均(51.3 ± 10.7)岁,血氟浓度(0.34 ± 0.09)mg/L,尿氟浓度(2.31 ± 0.90)mg/L,居住环境空气中平均氟含量为(0.0043 ± 0.0003)mg/m³,主要食物(包括经烟煤熏烤的玉米、土豆、辣椒、大豆等)中平均氟含量为(0.6435 ± 0.0620)mg/kg。

2.2 不同氟负荷人群血清DKK-1水平

由表1可见,经 χ^2 检验和方差分析,不同氟负荷组性别和年龄之间差别无统计学意义($P>0.05$);DKK-1浓度在低、中、高氟负荷组依次降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表1 不同氟负荷人群血清DKK-1水平($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Serum levels of DKK-1 in population with different fluoride burden

组别(Group)	n	性别(Gender)		年龄(岁)Age(Years)	血氟(mg/L)Serum fluoride	尿氟(mg/L)Urinary fluoride	DKK-1(μg/L)
		男(Male)	女(Female)				
低氟负荷(Low fluoride burden)	55	16	39	48.86 ± 10.53	0.26 ± 0.03	1.39 ± 0.19	19.60 ± 0.52
中氟负荷(Medium fluoride burden)	61	24	37	49.72 ± 8.96	0.32 ± 0.02	$2.22 \pm 0.12^*$	$17.74 \pm 0.80^*$
高氟负荷(High fluoride burden)	79	29	50	53.05 ± 12.81	0.42 ± 0.09	$3.04 \pm 0.93^*$	$14.31 \pm 1.20^*$

[注]*:与低氟负荷组比较(Compared with the low fluoride burden group), $P<0.05$ 。

2.3 氟斑牙人群血清DKK-1水平

表2可见,经 χ^2 检验,无氟斑牙组与氟斑牙组之间性别差异无统计学意义($P>0.05$);经t检验,氟斑牙组年龄大于无氟斑牙组,差异有统计学意义($P<0.05$);无氟斑牙组与氟斑牙组人群血清DKK-1水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 氟性骨损伤人群氟负荷及DKK-1水平

经 χ^2 检验,氟性骨损伤不同组别之间性别差异无

表2 氟斑牙人群血清DKK-1水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Serum levels of DKK-1 in population with dental fluorosis

组别 Group	n	性别(Gender)		年龄(岁) Age(Years)	DKK-1(μg/L)
		男 Male	女 Female		
无氟斑牙组 No dental fluorosis	39	11	28	46.37 ± 8.52	17.22 ± 2.27
氟斑牙组 Dental fluorosis	156	58	98	$52.10 \pm 11.05^*$	16.79 ± 2.46

[注]*:与无氟斑牙组比较(Compared with the no dental fluorosis group), $P<0.05$ 。

统计学意义 ($P > 0.05$)，而中、重度骨损伤组患者年龄大于无骨损伤和轻度骨损伤组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与无骨损伤组相比，所有骨损伤组(轻、中、重

度)的血氟、尿氟水平均较高，血清 DKK-1 浓度均较低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，且随着损伤程度的加重，DKK-1 水平呈下降趋势，见表 3。

表 3 氟性骨损伤人群氟负荷及 DKK-1 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Fluoride burden and serum levels of DKK-1 in population with fluoride bone injury

组别 (Group)	n	性别 (Gender)		年龄 (岁) Age (Years)	血氟 (mg/L) Serum fluoride	尿氟 (mg/L) Urinary fluoride	DKK-1 (μg/L)
		男 (Male)	女 (Female)				
无骨损伤组 No fluoride bone injury	84	26	58	45.37 ± 9.56	0.28 ± 0.03	1.64 ± 0.38	19.16 ± 0.76
轻度骨损伤组 Mild fluoride bone injury	83	29	54	48.23 ± 10.81	0.35 ± 0.02 [△]	2.42 ± 0.14 [△]	15.86 ± 1.35 [△]
中度骨损伤组 Medium fluoride bone injury	21	12	9	52.57 ± 8.20 [△]	0.47 ± 0.06 [△]	3.59 ± 0.76 [△]	13.27 ± 0.45 [△]
重度骨损伤组 Severe fluoride bone injury	7	2	5	56.38 ± 7.81 [△]	0.65 ± 0.02 [△]	5.25 ± 0.19 [△]	12.42 ± 0.04 [△]

[注][△]: 与无骨损伤组比较 (Compared with the no fluoride bone injury group), $P < 0.05$ 。

3 讨论

氟是人体必需的微量元素之一，当人体氟超过负荷时，会扰乱正常的骨骼代谢，引起病理学变化，最终导致氟性骨损伤^[3]。近年来，Wnt/β-catenin 信号转导通路在骨形成中的作用逐渐引起人们的重视，被认为是调控成骨细胞分化和骨基质形成的关键途径^[2]，Wnt/β-catenin 信号转导通路激活，β-catenin 水平上升，使骨形成增加，反之则骨形成减少^[4]。

DKK1 是由 DKK1 基因编码的一种分泌性糖蛋白，人类 DKK-1 基因位于 10 号染色体 10q11^[5]。DKK-1 作为 Wnt/β-catenin 信号转导通路重要调控因子，在细胞分化、成熟、增殖过程中起到十分重要的作用。DKK-1 能够与细胞膜上的 Wnt 受体 LRP5/6 结合，从而阻断 Wnt/β-catenin 信号转导通路的传导^[6-7]。有研究发现，在 DKK-1 基因敲除的小鼠中，DKK-1 表达功能的缺失会导致小鼠骨量的增加，而 DKK-1 的过度表达会导致小鼠骨量的下降^[8]。

本次调查高氟地区人群血氟浓度为 (0.34 ± 0.09) mg/L，尿氟浓度为 (2.31 ± 0.90) mg/L，而有研究发现，氟骨症病人血氟水平是 (0.22~0.53 mg/L)^[9]，与本次调查结果相似。

本调查结果发现，骨损伤组(轻、中、重度)血氟、尿氟水平均高于无骨损伤组。血氟、尿氟水平在轻、中、重度骨损伤组呈升高趋势。这提示，血氟作为机体氟负荷的敏感指标，也可以作为骨骼出现形态学变化的重要指示依据。然而氟斑牙组与无氟斑牙组，血清 DKK-1 水平差异无统计学意义，这尚需要进一步研究。

本研究结果还发现，骨损伤组血清 DKK-1 浓度低

于无骨损伤组，差异有统计学意义，且血清 DKK-1 水平随着氟负荷的升高呈下降趋势，细胞学实验证实，随着染氟浓度的升高，DKK-1 水平呈下降趋势^[10]。高氟可导致机体 DKK-1 蛋白表达下调，从而对 Wnt/β-catenin 信号通路的抑制作用下降，导致 β-catenin 降解减少，引起成骨活跃，最终导致氟性骨损伤骨周骨化的发生。提示 DKK-1 可能是氟性骨损伤骨周骨化过程中较为重要的调控靶点，建议将其作为氟性骨损伤早期损伤诊断的参考指标。

· 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献：

- [1] SHASHI A, KUMAR M, BHARDWAJ M. Incidence of skeletal deformities in endemic fluorosis [J]. Trop Doct, 2008, 38(4): 231-233.
- [2] LIU G, VIJAYAKUMAR S, GRUMOLATO L, et al. Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells [J]. J Cell Biol, 2009, 185(1): 67-75.
- [3] SONG YE, TAN H, LIU KJ, et al. Effect of fluoride exposure on bone metabolism indicators ALP, BALP and BGP [J]. Environ Health Prev Med, 2011, 16(3): 158-163.
- [4] DAY TF, GUO X, GARRETT-BEAL L, et al. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis [J]. Dev Cell, 2005, 8(5): 739-750.
- [5] CHAMORRO MN, SCHWARTZ DR, VONICA A, et al. FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin

(下转第 586 页)

采用广义相加模型建立感染性腹泻预测预警模型。结果表明,建立的感染性腹泻预测模型对预测数据与实际数据吻合程度较好,能反映本市感染性腹泻流行季节特征。根据对感染性腹泻预警预测研究结果,将预测模型用于疾病预防控制机构对感染性腹泻发病进行预测预警,可以更早识别相关的风险,根据预警级别的划分,有针对性地开展感染性腹泻病的预警和防治工作。

根据感染性腹泻预警系统对于 2009—2010 年数据预警的验证结果,提出用于市民健康气象服务预报策略建议。运用腹泻指数(表示市民发生腹泻的难易程度)为市民提供相应的防病提示。

本研究所建立的感染性腹泻预测模型只纳入了气温和湿度因素,但是影响感染性腹泻发病和流行的因素还有很多,有待在下一步工作中进行深入研究,以进一步提高模型预测的准确率。

本研究方法与同步应用软件通用性强,只要有模型需要的相关资料,即可运行建模,并试行发布预报。试行期间,可根据数据的积累对模型进行不断修正和完善,并对预报启动时间和等级进行调整。上海市疾病预防控制中心与气象局合作,为气象部门提供较准确的感染性腹泻气象预报产品,可为上海市民提供感

染性腹泻预防预警服务。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 裴青和. 感染性腹泻的研究现状[J]. 传染病信息, 2007, 20(4): 193-196.
- [2] NYLUND CM, DENSON LA, NOEL JM. Bacterial enteritis as a risk factor for childhood intussusception: a retrospective cohort study[J]. J Pediatr, 2010, 156(5): 761-765.
- [3] BALDI F, BIANCO MA, NARDONE G, et al. Focus on acute diarrhoeal disease[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(27): 3341-3348.
- [4] 张德山, 孙培源, 赵娜, 等. 北京市感染性腹泻疾病的医疗气象预报与应用研究[J]. 气象, 2008, 34(10): 91-95.
- [5] 张颖, 毕鹏. 气候变化与传染病关系述评[J]. 中国健康教育, 2008, 24(10): 781-783.
- [6] 陶芳芳, 赵耐青, 何懿, 等. 广义相加模型在细菌性痢疾预警中的应用[J]. 中国卫生统计, 2012, 29(4): 481-483.
- [7] 张姝丽, 孙培源, 张德山, 等. 北京地区细菌性痢疾医疗气象预报模式及流行风险水平评估[J]. 气候与环境研究, 2009, 14(6): 673-677.

(收稿日期: 2012-11-23)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 张晶; 校对: 洪琪)

(上接第 575 页)

- and FGF-20 is implicated in cancer and development[J]. Embo J, 2005, 24(1): 73-84.
- [6] MAO B, WU W, LI Y, et al. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf protein[J]. Nature, 2001, 411(6835): 321-325.
- [7] SEMENOV MV, TAMAI K, BROTT BK, et al. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6[J]. Cur Biol, 2011, 21(12): 951-961.
- [8] BALEMANS W, PITERS E, CLEIREN E, et al. The binding between sclerostin and LRP5 is altered by Dkk-1 and by high-

- bone mass LRP5 mutation[J]. Calcif Tissue Int, 2008, 82(6): 445-453.
- [9] 周振荣, 赵妙珍, 金岩, 等. 改水后对氟骨症患者生化指标影响的探讨[J]. 中国地方病防治杂志, 1997, 12(1): 50-51.
- [10] LIU XL, LI CC, LIU KJ, et al. The influence of fluoride on the expression of inhibitors of Wnt/β-catenin signaling pathway in rat skin fibroblast cells[J]. Biol Trace Elem Res, 2012, 148(1): 117-121.

(收稿日期: 2012-12-28)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 张晶; 校对: 洪琪)