

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002313

回顾性分析血尿酸和骨质疏松症的相关性及其调控机制研究

杜鹤尧, 陈宗涛

(陆军军医大学第一附属医院健康管理中心, 重庆 400038)

【摘要】目的:分析人体氧化还原状态与尿酸代谢和腰椎骨密度的相关性,并初步探讨血尿酸影响骨密度的机制。**方法:**选择在陆军军医大学第一附属医院体检的无基础疾病的健康人群,询问患者病史,测量身高、体质量,计算体质指数。空腹采集肘静脉血,采用全自动生化分析仪检测血尿酸等生化指标,以 SPSS 23.0 软件进行分析,确定血尿酸代谢和骨密度的相关性;再利用血尿酸和过氧化氢处理类成骨瘤细胞 MG-63,分析细胞活性,初步探讨血尿酸在骨密度中的作用。**结果:**与骨量正常组相比,骨质疏松组血尿酸明显偏低,而胆固醇则与骨密度呈负相关;且在细胞试验中过氧化氢能显著促进成骨细胞凋亡,而作为内源性抗氧化剂的血尿酸能逆转过氧化氢的凋亡诱导作用。**结论:**血尿酸代谢和骨密度密切相关,且可能与机体氧化还原状态相关。

【关键词】氧化应激;尿酸代谢;骨质疏松症**【中图分类号】**R68**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-06-08

Correlation between blood uric acid and osteoporosis and its regulation mechanism

Du Heyao, Chen Zongtao

(Department of Health Management, First Affiliated Hospital of Army Military Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the correlation among redox state, uric acid metabolism and bone density of lumbar spine, and to preliminarily discuss the mechanism of uric acid on bone density. **Methods:** Healthy people without basic disease receiving physical examination in our hospital were selected, their medical history was recorded, and the BMI was calculated by measuring the height and weight. Elbow venous blood was collected on an empty stomach and biochemical indexes such as blood uric acid were detected by automatic biochemical analyzer. The correlation between uric acid metabolism and bone density was determined by SPSS 23.0 software. The osteoblastoma cell line MG-63 was treated with uric acid and hydrogen peroxide to analyze the cell activity, preliminarily discussing the role of uric acid in influencing bone density. **Results:** Compared with the normal bone mass group, the blood uric acid was significantly lower than that in the osteoporosis group, while the cholesterol was negatively correlated with bone density. Hydrogen peroxide significantly promoted osteoblast apoptosis in the cell experiment; uric acid, as an endogenous antioxidant, was able to reverse the apoptosis-inducing effect of hydrogen peroxide. **Conclusion:** Uric acid metabolism is closely related to bone density, and may be related to the body's redox status.

【Key words】oxidative stress; uric acid metabolism; osteoporosis

血液中的尿酸(uric acid, UA)作为嘌呤代谢的终产物,积极参与机体代谢调节。血尿酸表现出的两面性可能在机体代谢调节中十分重要:一方面,血尿酸在低浓度时可充当还原剂,在消除自由基方面发挥作用;但当其浓度达到一定水平之后,血尿

酸又能促进氧化,促进疾病的发生发展^[1-2]。研究表明,正常浓度 UA 是机体内源性的抗氧化剂,而骨质疏松的发生发展与骨细胞内氧化应激增加或抗氧化能力下降有关^[3]。由此可以推测 UA 与骨质疏松的发生有密切关系。本文通过对 10 283 例无基础疾病患者的骨密度、血尿酸、胆固醇等生化指标分析,探究血尿酸与骨质疏松症的关系;通过细胞试验初步探明血尿酸在氧化应激调节类成骨细胞凋亡中的作用。

作者介绍:杜鹤尧, Email: 64442276@qq.com,

研究方向:健康管理工作。

通信作者:陈宗涛, Email: chenongtao@126.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190923.1658.002.html>

(2019-09-25)

1 资料与方法

1.1 对象

所选病例均为陆军军医大学第一附属医院健康管理中心 2014 至 2018 年度体检人员样本 10 283 例,其中男性 5 587 例,女性 4 696 例,年龄 45~60 岁,平均年龄 (50.8 ± 6.1) 岁。纳入标准:年龄 45~60 岁。排除标准:患有糖尿病、慢性肾功能不全、恶性肿瘤,长期服用激素、维生素 D 类和免疫抑制剂等影响骨密度药物的患者。

1.2 资料采集和骨密度测量

询问患者病史,测量身高、体质量,计算体质指数 (body mass index, BMI)。采集肘静脉血,使用全自动生化分析仪检测空腹血糖、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、尿酸值。采用美国 GE 公司的 LUNAR 双能 X 射线骨密度测量仪,按照标准操作规程操作,严格控制误差,检测患者腰椎 L₁~L₄ 和全髌骨的骨密度 (g/cm³)。专人专职操作,依据世界卫生组织定义的骨质疏松症诊断标准进行判断,且骨质流失体现出明显的性别差异,在女性中骨质疏松比率更高。结果见表 1。

表 1 研究对象的一般情况

项目	男性	女性
年龄(岁)	50.82 ± 5.20	51.30 ± 4.70
BMI(kg/m ²)	25.20 ± 2.70	23.80 ± 3.30
骨质疏松率(%)	24.20	29.70
尿酸(μmol/L)	376.60 ± 48.40	348.70 ± 67.60
总胆固醇(mmol/L)	5.10 ± 0.87	5.20 ± 1.01
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.60 ± 0.57	2.50 ± 0.78
空腹血糖(mmol/L)	5.90 ± 0.40	5.50 ± 1.50

1.3 细胞试验材料和方法

1.3.1 材料 人类成骨肉瘤细胞 MG-63 购自美国模式培养细胞库 (American Type Culture Collection, ATCC); 细胞培养基及胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂购自北京索莱宝生物公司; Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自美国 BD Bioscience 公司; 一抗及相关二抗购自美

国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3.2 细胞培养 MG-63 细胞培养于由 90% 的 DMEM 培养基、10% FBS 及 1% 双抗组成的培养基中。待细胞融合度达到 90% 左右时胰酶消化细胞,进行传代。

1.3.3 Western blot 组织或细胞中的蛋白采用 RIPA 裂解液于冰上进行提取,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后,按照 50 μg 的剂量将蛋白样品加到 10% 的 SDS-page 中进行电泳,电泳后进行转膜,后将膜用 5% 的脱脂牛奶进行封闭室温孵育 1 h,一抗工作液 4 ℃ 孵育过夜,洗膜后孵育相应的二抗工作,然后用化学发光试剂盒检测杂交信号。

1.3.4 CCK-8 检测细胞增殖 消化细胞并进行细胞计数,后按照 5 000 个/孔的密度将细胞种植于 96 孔板中,待细胞贴牢后过氧化氢和料算处理 (6 h 后更换新鲜培养基),置于 37 ℃ 培养箱中继续培养。分别于转染后的 24 h、48 h、72 h 向培养基中加入 10 μL CCK-8 溶液,将其置于 37 ℃ 培养箱中继续培养 90 min,然后于酶标仪上检测 450 nm 处的光密度。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡 处理细胞 48 h 后,0.25% 胰酶消化细胞,血清中止,收集细胞,PBS 重悬后按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒相关说明进行 Annexin V 和 PI 染色,然后上机检测,随后应用 FlowJo 7.6 进行数据分析。

1.4 统计学处理

本研究中的所有数据均表示为均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$),组间非配对 *t* 检验及线性相关分析,组间差异使用 Graphpad 版本 8.0 的方差分析 (ANOVA)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般资料

对 10 283 例试验对象测定腰椎 L₁~L₄ 和全髌骨的骨密度 T 值,将骨密度 T 值作为分组参考的依据,分为骨量正常组 (T ≥ 1.0)、骨量减少组 (-2.5 < T < -1.0)、骨质疏松症组 (T ≤ -2.5) 3 组。BMI 无统计学差异。骨质疏松症组血糖、总胆固醇、血低密度脂蛋白胆固醇高于骨量减少组及骨量正常组,且有统计学差异。骨质疏松症组尿酸低于骨量减少组及骨量正常组,且有统计学差异 (表 2)。

表 2 各组检测指标对比

项目	骨量正常 ¹	骨量减少 ²	骨质疏松 ³	P 值
年龄(岁)	48.80 ± 4.20	50.20 ± 5.10	54.20 ± 6.50	$P_{1-2}=0.117$ $P_{1-3}<0.001$
BMI(kg/m ²)	24.80 ± 2.13	24.70 ± 2.88	24.10 ± 2.55	$P_{1-2}=0.944$ $P_{1-3}=0.094$
尿酸(μmol/L)	345.70 ± 42.10	349.10 ± 28.10	317.70 ± 45.90	$P_{1-2}=0.117$ $P_{1-3}<0.001$
总胆固醇(mmol/L)	5.00 ± 1.01	5.20 ± 1.92	6.20 ± 1.33	$P_{1-2}=0.528$ $P_{1-3}<0.001$
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.50 ± 0.80	3.40 ± 1.00	4.70 ± 1.55	$P_{1-2}<0.001$ $P_{1-3}<0.001$
空腹血糖(mmol/L)	5.20 ± 0.20	5.40 ± 1.50	6.10 ± 1.60	$P_{1-2}=0.430$ $P_{1-3}<0.000 1$

2.2 骨质疏松症患者的单因素分析

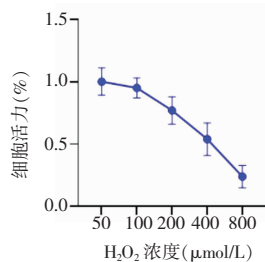
骨密度和低密度脂蛋白胆固醇、尿酸的单因素相关性分析,对计量资料进行 Pearson 相关性分析,结果显示尿酸与骨密度 T 值呈正相关($P<0.0001$),即尿酸水平越高,骨密度 T 值越高,而骨密度和低密度脂蛋白胆固醇与骨密度 T 值呈负相关($P<0.0001$),即低密度脂蛋白胆固醇水平越高,骨密度 T 值越低(表 3)。

表 3 骨密度和尿酸、低密度脂蛋白胆固醇单因素相关性分析

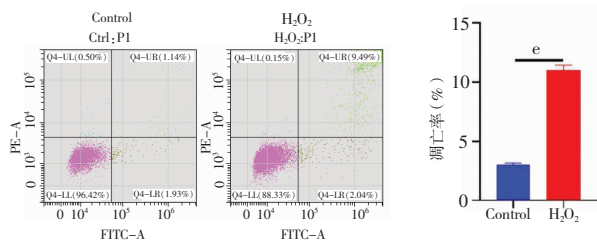
变量	R	P
尿酸($\mu\text{mol/L}$)	0.49	<0.0001
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	-0.35	<0.0001

2.3 过氧化氢促进类成骨肉瘤细胞 MG-63 凋亡

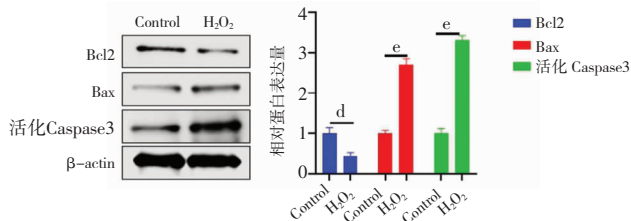
为了探讨氧化应激在骨质流失中的作用,分别应用 CCK-8、流式细胞术、Western blot 检测过氧化氢对成骨肉瘤细胞 MG-63 细胞的增殖、凋亡影响。由图 1A 所知,过氧化氢能降低细胞活力,且与对照组相比,其细胞凋亡也明显增加($P<0.0001$)(图 1B)。同时,过氧化氢处理以后,活化的 Caspase 3 表达也大量增加($P<0.0001$),而抗凋亡蛋白 Bcl2 表达下调($P=0.005$)、凋亡蛋白 Bax 表达明显上调($P<0.0001$)(图 1C)。以上结果表明过氧化氢能促进成骨肉瘤细胞 MG-63 细胞的凋亡。



A. H₂O₂ 对细胞活力的影响



B. 流式细胞术测定 H₂O₂ 对细胞凋亡的影响



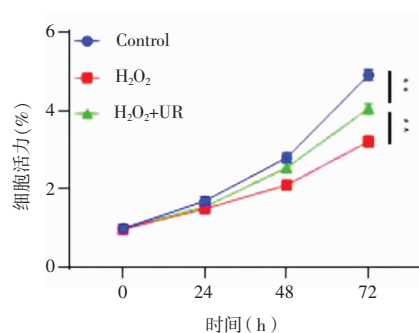
C. Western blot 测定 H₂O₂ 对细胞凋亡的影响

注:A,CCK-8 测定不同浓度过氧化氢对细胞活力的影响;B:流式细胞术测定过氧化氢对细胞凋亡的影响;C:Western blot 测定过氧化氢对细胞凋亡的影响;d:与对照组相比, $P<0.05$;e:与对照组相比, $P<0.01$

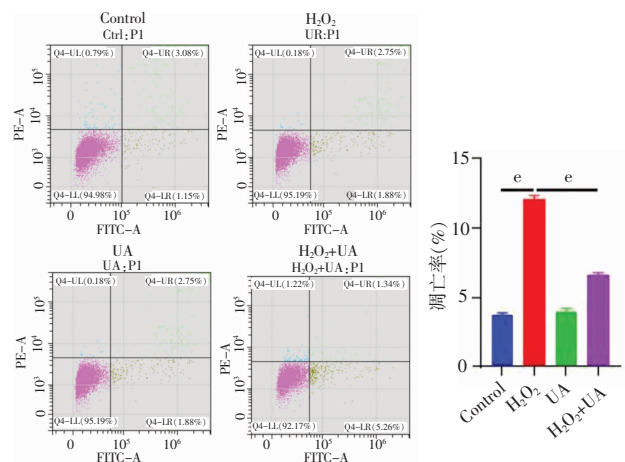
图 1 过氧化氢和诱导 MG-63 凋亡

2.4 尿酸能抑制过氧化氢诱导的 MG-63 细胞凋亡

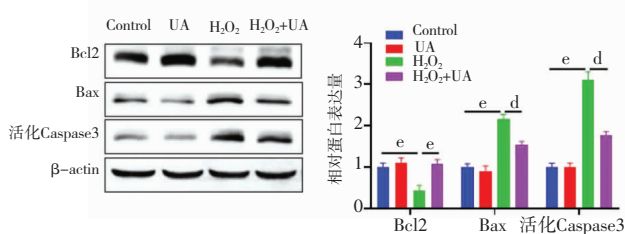
为了探究 UA 是否能调节过氧化氢诱导的成骨肉瘤细胞 MG-63 凋亡,多篇文献都证明成骨细胞凋亡与骨质疏松呈正相关^[4-5]。为了验证 UA 是否能调节过氧化氢诱导的成骨肉瘤细胞 MG-63 凋亡,本研究在过氧化氢处理成骨肉瘤细胞 MG-63 的基础上以 UA 对这一模型进行了干预。由图 2A 可知,加入 UA 后过氧化氢对细胞生长的抑制作用被解除了($P=0.00014$)。此外,试验结果显示,同过氧化氢处理组相比,UA 干预组 MG-63 细胞的凋亡明显减少($P<0.0001$),而 UA 本身并不影响细胞凋亡(图 2B)。Western blot 结果也显示,UA 能逆转过氧化氢诱导的活化 Caspase 3 表达上调、Bcl2 表达减弱($P<0.0001$)。以上结果表明 UA 可以影响过氧化氢诱导的细胞凋亡(图 2C)。



A. UA 和 H₂O₂ 对细胞增殖的影响



B. 流式测定 UA 和 H₂O₂ 对细胞凋亡的影响



C. Western blot 测定 UA 和 H₂O₂ 对细胞凋亡的影响

注:A,CCK-8 测定尿酸对过氧化氢诱导细胞活力的影响;B:流式细胞术测定尿酸对过氧化氢诱导细胞凋亡的影响;C:Western blot 测定尿酸对过氧化氢诱导细胞凋亡的影响;d:与对照组相比, $P<0.05$;e:与对照组相比, $P<0.01$

图 2 尿酸能抑制过氧化氢诱导的 MG-63 细胞凋亡

4 讨论

随着中国人口老龄化的加剧,骨质疏松症已然成为威胁中老年人身体健康的重要因素之一^[6],且其患病率在未来数年内都将保持高速增长,给社会及家庭带来的损失将无法估量,因此早期预防和治疗就变得尤为重要。

氧化还原稳态对机体的正常运作至关重要,氧化过程和还原过程是一个涉及人体生长、发育的对立统一的过程。当机体的氧化还原状态偏移超过一定限度时,这一过程可对机体产生损伤,从而引起各种疾病。例如 DNA 双螺旋结构的发现者 Watson^[7] 2014 年发表在《柳叶刀》杂志上的一篇文章就认为 2 型糖尿病是一种氧化还原疾病,而自由基清除失衡导致的 DNA 损伤累积也被认为是癌症的重要诱因。血尿酸在机体的氧化应激调节中承担着重要角色^[8-9],而对血尿酸本身在机体中承担的作用一直存在争议。血尿酸作为一种抗氧化剂,当血清中氧自由基水平明显上调时,血尿酸水平也会上调,是机体氧化水平的标志物^[10];而超高水平的血尿酸反而会促进氧化应激的发生,导致内皮细胞功能紊乱^[11]。本研究结果显示骨质疏松组血尿酸明显低于骨量减少组及骨量正常组,且具有统计学差异,血尿酸与骨密度 T 值呈正相关,提示高尿酸可能对预防骨质疏松具有保护作用。一项观察性研究表明尿酸可能有助于防止骨质流失^[12],而上海一项基于 4 256 名绝经后女性的研究也发现患有高尿酸血症的患者患上骨质疏松症的概率较小^[13]。这些结果共同提示了高血尿酸也许是骨密度的保护性因素。目前,对于血尿酸影响骨密度的具体机制还未完全阐明,仅有血尿酸通过(Wnt)-3 α / β -catenin 信号通路影响骨密度的报道。而本研究实验发现,尿酸能抑制过氧化氢诱导的成骨细胞 MG-63 细胞凋亡,可保护类成骨瘤细胞免受氧化应激的损害,这为尿酸影响骨密度作用机制拓宽了新的认知。

综上所述,本研究表明骨质疏松症在中老年人群中与血尿酸一定程度上呈负相关,且血尿酸影响骨密度的可能机制是调节细胞氧化应激,从而影响

成骨细胞凋亡。虽然本研究不仅为骨质疏松症的发生机制丰富了新的内容,同时也为骨质疏松症的防治提供了新的思路,但对于血尿酸控制范围的具体数值还有待更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Jin M, Yang F, Yang I, et al. Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2012, 17:656-669.
- [2] 吕 锦. 尿酸与神经系统疾病关系的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30(7):666-667.
- [3] 赵 娜, 李素梅, 方星星, 等. 老年糖尿病患者骨密度与血尿酸水平的相关研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(7):784-788.
- [4] Zhao W, Zhang WL, Yang B, et al. NIPA2 regulates osteoblast function via its effect on apoptosis pathways in type 2 diabetes osteoporosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 513(4):883-890.
- [5] Yan TB, Li C, Jiao GJ, et al. TIMP-1 suppressed by miR-138 participates in endoplasmic reticulum stress-induced osteoblast apoptosis in osteoporosis[J]. Free Radic Res, 2018, 52(2):223-231.
- [6] 李青松. 多节段腰椎后路椎体间及后外侧融合椎弓根螺钉内固定治疗老年骨质疏松骨折合并胸腰椎后凸畸形[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(4):512-517.
- [7] Watson JD. Type 2 diabetes as a redox disease[J]. Lancet, 2014, 383(9919):841-843.
- [8] Ya BL, Liu Q, Li HF, et al. Uric acid protects against focal cerebral ischemia/reperfusion-induced oxidative stress via activating Nrf2 and regulating neurotrophic factor expression[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018:6069150.
- [9] Li Z, Shen Y, Chen Y, et al. High uric acid inhibits cardiomyocyte viability through the Erk/p38 pathway via oxidative stress[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(3):1156-1164.
- [10] Pingmuangkaew P, Tangvarasittichai O, Tangvarasittichai S. Association of elevated serum uric acid with the components of metabolic syndrome and oxidative stress in abdominal obesity subjects[J]. Indian J Clin Biochem, 2015, 30(3):286-292.
- [11] Verzola D, Ratto E, Villaggio B, et al. Uric acid promotes apoptosis in human proximal tubule cells by oxidative stress and the activation of NADPH oxidase NOX 4[J]. PLoS One, 2014, 9(12):e115210.
- [12] Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, et al. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(4):1523-1527.
- [13] Yan DD, Wang J, Hou XH, et al. Association of serum uric acid levels with osteoporosis and bone turnover markers in a Chinese population[J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(4):626-632.

(责任编辑:唐秋姗)