

·骨髓炎·

血清BALP、NTX在糖尿病足骨髓炎患者中的表达及意义

彭汉书¹ 刘彬² 陈令斌^{1,2} 刘融²

【摘要】 目的 探讨骨碱性磷酸酶(BALP)、I型胶原交联氨基末端肽(NTX)在糖尿病足骨髓炎(DFO)患者血清中的水平及意义。方法 前瞻性选取2017年10月至2020年6月诊治的糖尿病足(DF)患者139例为研究对象,根据DF患者是否并发骨髓炎将其分为非骨髓炎组($n=59$)、骨髓炎组($n=80$)。比较两组患者的临床资料;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清BALP、NTX水平;采用受试者工作特征曲线(ROC)评价血清BALP、NTX对DFO的诊断价值;采用多因素Logistic回归分析糖化血红蛋白、WBC计数、血清BALP、NTX(对DFO发生的独立危险因素)。结果 骨髓炎组患者糖化血红蛋白、WBC计数、血清BALP、NTX水平均显著高于非骨髓炎组($P<0.05$),年龄、男/女比例、糖尿病病程、糖尿病肾病比例、溃疡史比例、冠心病比例、高血压比例与非骨髓炎组无明显差异($P>0.05$);血清BALP、NTX诊断DFO的曲线下面积(AUC)分别为0.836、0.863,截断值分别为99.98 mmol/L、9.45 nmol BCE/ μ M Cr,相应灵敏度分别为78.8%、75.0%,特异度分别为84.3%、88.1%;两者联合诊断DFO的AUC为0.908,其灵敏度、特异度分别为91.3%、83.1%;WBC计数(OR=1.847)、BALP(OR=1.278)、NTX(OR=1.243)均是影响DFO发生的危险因素($P<0.05$)。结论 DFO患者血清BALP、NTX水平均显著升高,两者均可能在DFO发病进展中具有重要作用,BALP、NTX联合可提高对DFO的诊断价值,有助于临床筛查DFO患者。

【关键词】 骨性碱性磷酸酶; I型胶原交联氨基末端肽; 糖尿病足; 骨髓炎

Expressions and significance of serum BALP and NTX in patients with diabetic foot osteomyelitis

Peng Hanshu¹, Liu Bin², Chen Lingbin^{1,2}, Liu Rong². ¹Department of Hand and Foot Surgery, ²Department of Orthopedics, Puren Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430080, China
Corresponding author: Liu Rong, Email: 54211540@qq.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the levels and significance of bone alkaline phosphatase (BALP) and cross-linked N-telopeptides of type I collagen (NTX) in patients with diabetic foot osteomyelitis (DFO). **Methods** From October 2017 to June 2020, 139 patients with diabetic foot (DF) who were diagnosed and treated were selected as research objects. According to whether DF patients complicated with osteomyelitis, they were divided into non osteomyelitis group ($n=59$) and osteomyelitis group ($n=80$). The clinical data of the two groups were compared. The levels of serum BALP and NTX were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), receiver operating characteristic curve (ROC) was used to evaluate the diagnostic value of serum BALP and NTX for DFO, and Multivariate Logistic regression analysis was used to analyze the influencing factors of DFO. **Results** The glycosylated hemoglobin, WBC count, serum BALP and NTX levels in osteomyelitis group were significantly higher than those in non osteomyelitis group ($P<0.05$). There were no significant differences in age, male/female ratio, course of diabetes, proportions of diabetic nephropathy, proportions of ulcer history, proportions of coronary heart disease and proportions of hypertension ($P>0.05$); the area under the curve (AUC) of serum BALP and NTX in the diagnosis of DFO was 0.836 and 0.863, the cut-off value was 99.98 mmol/L and 9.45 nmol BCE/ μ M Cr, respectively, the corresponding sensitivity was 78.8%, 75.0% and the specificity was 84.3% and 88.1%, respectively. The AUC of combined diagnosis was 0.908, and the sensitivity and specificity were 91.3% and 83.1% respectively; WBC

count, BALP and NTX were risk factors of DFO ($P<0.05$). **Conclusions** The levels of serum BALP and NTX in patients with DFO are significantly increased, and both of them may play an important role in the pathogenesis of DFO. BALP combined with NTX can improve the diagnostic value of DFO, which is helpful for clinical screening of DFO patients.

【Key words】 Bone alkaline phosphatase; Cross-linked N-telopeptides of type I collagen; Diabetic foot; Osteomyelitis

糖尿病足骨髓炎(diabetic foot osteomyelitis, DFO)是糖尿病常见并发症,高达60%糖尿病足(diabetic foot, DF)患者伴有骨髓炎^[1-2]。临床上,骨髓炎易被忽视,若诊疗不及时,其可导致截肢或其它严重并发症^[3],因此,临床寻找可有效诊断DFO的指标至关重要。目前,DFO发病机制尚未解释完全,但学者认为其与机体感染、免疫异常、炎症反应、骨代谢异常等有关^[4-5]。既往研究显示,骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)由成骨细胞分泌,是骨转换标志物,与骨质疏松病理发展过程关系密切^[6]。另外,I型胶原交联氨基末端肽(cross-linked N-telopeptides of type I collagen, NTX)在绝经后骨质疏松患者中水平明显升高,NTX可能在绝经后骨质疏松发生发展中起重要作用^[7]。但血清BALP、NTX在DFO中的水平及其诊断DFO的价值尚未发现相关报道。基于此,本研究通过检测DFO患者血清BALP、NTX水平,分析两者评估DFO的价值,以期临床诊治DFO提供一定依据。

资料与方法

一、一般资料

前瞻性选取2017年10月至2020年6月收治的139例DF患者进行研究,按照是否并发骨髓炎将患者分为非骨髓炎组59例和骨髓炎组80例。非骨髓炎组:男37例,女22例;年龄47~76岁,平均年龄(64±9)岁;糖尿病病程7~19年,平均病程(14±4)年。骨髓炎组:男53例,女27例;年龄48~77岁,平均年龄(65±9)岁;糖尿病病程7~20年,平均病程(14±4)年。非骨髓炎组与骨髓炎组性别构成比例、年龄、糖尿病病程比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。另外收集、记录两组受试者糖尿病肾病比例、溃疡史比例、冠心病比例、高血压比例、糖化血红蛋白及白细胞(white blood cell, WBC)计数等资料。

诊断标准:参考《糖尿病足诊治指南》^[8]有关DF判定标准进行诊断。纳入标准:(1)患者均符合DF

诊断标准;(2)患者病理检查资料均完整;(3)合并骨髓炎(DFO)患者均符合文献^[9]有关DFO诊断标准:存在DF,且至少符合以下条件的3项,足趾红肿,呈腊肠样变化;患足X片显示骨破坏/骨破裂/骨皮质缺损等骨髓炎变化;骨活检/溃疡深部组织致病菌培养显示阳性;溃疡处有骨头暴露;溃疡创面存在蜂窝织炎,可探至骨质。排除标准:(1)患足合并类风湿关节炎、外伤者;(2)合并肝功能异常、糖尿病酮症酸中毒、糖尿病酮症酸中毒等者;(3)合并认知障碍、焦虑、抑郁等精神类疾病者。

受试对象均自愿参与本研究,并签署知情同意书,且研究符合《赫尔辛基宣言》,报经本院伦理委员会批准后实施,医学伦理批号:2017-012号。

二、试剂与仪器

BALP酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(货号:YAD1888)购买于北京杰辉博高生物技术有限公司,NTX ELISA试剂盒(货号:GD-hj0820)购买于上海古朵生物科技有限公司。

酶标仪(型号:SuPerMax 3000FA)购买于上海闪谱生物科技有限公司。

三、方法

(一)样本收集

收集两组受试者确诊后治疗前空腹外周血3~4 mL,室温凝集,5 000 r/min离心6 min,分离上清液,保存于-20℃冰箱中,待检。

(二)ELISA法检测血清BALP、NTX水平

从-20℃冰箱中取出人BALP、NTX ELISA试剂盒内携带的标准品,依照说明书将其配制成一系列浓度标准品溶液,于450 nm处检测各标准品溶液的吸光度,制作标准品回归曲线;将血清样本解冻,平衡至室温,将样本加入酶标板中,放入37℃培养箱中,孵育,每孔分别加入含有BALP/NTX的生物素工作液,37℃孵育1 h,弃反应液,磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗3次;加入亲和素-过氧化物酶复合物工作液,37℃孵育45 min,弃反应液,

表1 两组糖尿病足患者临床资料比较(例, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	男/女 (例)	糖尿病病程 (年)	糖尿病肾病 (有/无, 例)	溃疡史 (有/无, 例)	冠心病 (有/无, 例)	高血压 (有/无, 例)	糖化血红蛋白 (%, $\bar{x} \pm s$)	WBC计数 ($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm s$)
非骨髓炎组	59	64 \pm 9	37/22	14 \pm 4	20/39	17/42	27/32	25/34	8.3 \pm 2.7	6.4 \pm 2.3
骨髓炎组	80	65 \pm 9	53/27	14 \pm 4	36/44	25/55	33/47	26/54	10.3 \pm 3.0	9.0 \pm 2.6
t/χ^2 值		0.492	0.186	0.251	1.74	0.096	0.282	1.425	3.99	6.068
P值		0.624	0.666	0.802	0.187	0.757	0.595	0.233	<0.001	<0.001

PBS洗3次;加显色液,37℃孵育25 min,加10 μ L终止液,于450 nm处检测各样本吸光度值,依据标准曲线计算血清BALP、NTX浓度。

四、统计学方法

本研究实验数据利用SPSS 25.0(IBM,美国)软件进行统计分析。计量资料采用Kolmogorov-Smirnov检验是否符合正态分布,符合正态分布的年龄、糖尿病病程、WBC计数、糖化血红蛋白、血清BALP、NTX水平以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行独立样本 t 检验;计数资料男/女占比、糖尿病肾病、溃疡史、冠心病、高血压占比以“例”表示,行 χ^2 检验;采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)评价血清BALP、NTX诊断DFO的价值;多因素Logistic回归分析DFO发生的影响因素。检验水准 α 值取双侧0.05。

结 果

一、两组临床资料比较

与非骨髓炎组相比,骨髓炎组患者糖化血红蛋白、WBC计数均显著升高($P < 0.05$),年龄、男/女比例、糖尿病病程、糖尿病肾病比例、溃疡史比例、冠心病比例、高血压比例无明显差异($P > 0.05$),详见表1。

二、两组血清BALP、NTX水平比较

与非骨髓炎组相比,骨髓炎组患者血清BALP、NTX水平均明显升高($P < 0.05$)。详见表2。

三、血清BALP、NTX对DFO的诊断价值

ROC曲线显示,血清BALP对DFO诊断的曲线下面积(area under curve, AUC)为0.836(95% CI: 0.768, 0.903),截断值为99.98 mmol/L,约登指数为0.635,其灵敏度、特异度分别为78.8%、84.3%;NTX对DFO诊断的AUC为0.863(95% CI: 0.802, 0.924),截断值为9.45 nmol BCE/ μ M Cr,约登指数为0.631,其灵敏度、特异度分别为75.0%、88.1%;两

者联合诊断DFO的AUC为0.908(95% CI: 0.859, 0.957),约登指数为0.744,其灵敏度、特异度分别为91.3%、83.1%。详见图1。

表2 两组血清BALP、NTX水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BALP(mmol/L)	NTX(nmol BCE/ μ M Cr)
非骨髓炎组	59	90 \pm 17	7.4 \pm 2.1
骨髓炎组	80	116 \pm 23	13.3 \pm 4.6
t 值		7.314	9.165
P值		<0.001	<0.001

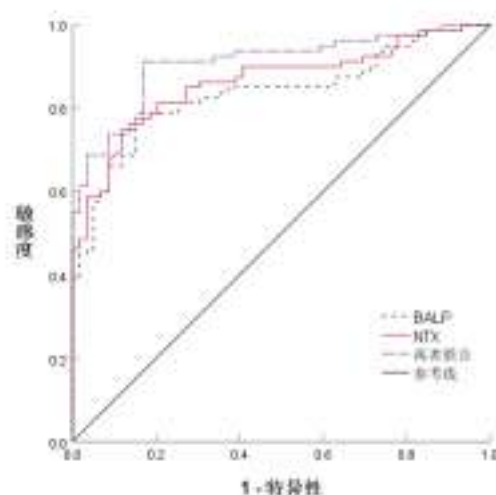


图1 血清BALP、NTX诊断DFO的ROC曲线

四、影响DFO发生的多因素Logistic回归分析

依据糖化血红蛋白(均值:10.28%)、WBC计数(均值: $8.96 \times 10^9/L$)、血清BALP(均值:115.73 mmol/L)、NTX(均值:13.34 nmol BCE/ μ M Cr)均值分为高水平(\geq 均值定义为1)、低水平($<$ 均值定义为0)。以是否发生DFO为因变量(发生=1,否=0),将单因素比较有差异的糖化血红蛋白、WBC计数、血清BALP、NTX纳入自变量,进行多因素Logistic回归分析,结果显示,WBC计数[OR=1.847(1.217, 2.804),

表3 多因素 Logistic 回归分析 DFO 发生的影响因素

指标	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>wald</i>	<i>P</i> 值	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>
糖化血红蛋白(低水平 vs 高水平)	0.149	0.105	2.021	0.155	1.161	0.945, 1.426
WBC 计数(低水平 vs 高水平)	0.614	0.213	8.298	0.004	1.847	1.217, 2.804
BALP(低水平 vs 高水平)	0.685	0.224	9.341	0.002	1.983	1.278, 3.076
NTX(低水平 vs 高水平)	0.645	0.218	8.754	0.003	1.906	1.243, 2.922

$P=0.004$], BALP[$OR=1.983(1.278, 3.076)$, $P=0.002$], NTX[$OR=1.906(1.243, 2.922)$, $P=0.003$]均是影响 DFO 发生的独立危险因素($P<0.05$)。详见表 3。

讨 论

一、糖尿病足患者可继发骨髓炎

DF 患者骨髓与皮质骨发生细菌感染时可引发骨髓炎(DFO),初期感染位置多为软骨组织,而后转变到骨组织,引起骨改变^[10]。DF 在中老年人中发生率较高,高血糖使患者免疫力低下,进而使机体较易发生细菌感染,从而引发 DFO^[11]。目前,临床多采用 X 线片、MRI 等检查 DFO,但其具有一定限制,因此,寻找可有效、费用低廉、简便、快速诊断 DFO 的指标,及时干预,对改善 DFO 患者生存状况有一定积极意义^[12]。

二、BALP、NTX 在糖尿病足患者中的水平

BALP 是一种糖蛋白,其可通过水解多种磷酸酯及磷酸,从而缓解其对骨矿化的抑制作用,有利于骨形成;BALP 可高效评估人体钙营养状况,也可作为骨形成、转化及骨活性增加的生物学标志物^[13-14]。近期研究显示, BALP 在绝经后骨质疏松患者中水平较高,经白藜芦醇治疗后, BALP 水平降低,可能通过影响骨形成及骨吸收平衡状态,从而在绝经后骨质疏松中发挥重要作用^[15]。本研究中骨髓炎组患者血清 BALP 水平明显高于非骨髓炎组,提示 BALP 可能在 DFO 发病进展中起作用,推测 DFO 患者感染后,影响足骨结构稳定性,造成骨关节及周围骨组织的力学改变,损坏骨代谢平衡,足骨为适应新力学状态进而形成了新的骨破坏与骨吸收平衡,成骨细胞在形成新的骨代谢平衡过程中发挥重要功能,并释放 BALP 入血,从而引起 DFO 患者血清 BALP 水平显著上升,但具体机制有待进一步探究证实。

NTX 是具有交联 $\alpha 2$ 氮端肽定位、独特氨基酸序列的 I 型胶原纤维分子间交联物,其可反映破骨细胞活性,可作为评估骨破坏的有效标志物,具有最高

特异性^[16]。研究发现, NTX 在 2 型糖尿病骨质疏松患者中水平显著升高,经阿仑膦酸钠治疗后,其水平明显降低, NTX 可能通过影响破骨细胞活性,进而影响骨代谢平衡,从而参与影响 2 型糖尿病骨质疏松发生发展^[17]。本研究中骨髓炎组患者血清 NTX 水平明显高于非骨髓炎组,提示 NTX 可能在 DFO 中具有重要作用,究其原因,机体感染后,损伤骨组织、引起骨代谢平衡紊乱,机体为维持活动,在足骨处形成新的骨代谢平衡,在此过程中破骨细胞起重要作用,机体释放 NTX 入血,从而造成 DFO 患者血清 NTX 水平升高,但仍需深入研究其作用机制。

本研究显示,血清 BALP、NTX 诊断 DFO 的 AUC 分别为 0.836、0.863,当血清 BALP 水平高于 99.98 mmol/L 或血清 NTX 高于 9.45 nmol BCE/ μ M Cr 时, DFO 发生几率较高,提示血清 BALP、NTX 对 DFO 有一定诊断价值,血清 BALP、NTX 联合诊断 DFO 的 AUC 为 0.908,相应灵敏度为 91.3%,特异度为 83.1%,提示两者联合可提高对 DFO 诊断的灵敏度,可一定程度增加对 DFO 的诊断效能。进一步研究显示, WBC 计数、BALP、NTX 均是影响 DFO 发生的危险因素,提示 WBC 计数、血清 BALP、NTX 水平升高均会增加 DFO 发生风险,及时监控上述指标,有助于及时诊治 DFO。

综上所述, BALP、NTX 在 DFO 患者血清中均呈高水平,两者均可能在 DFO 发生发展中具有一定作用,两者联合可一定程度提高诊断 DFO 的价值,检测两者水平有利于临床筛查 DFO 患者。但本研究未深入探讨 BALP、NTX 在 DFO 中生物学调节机制,后期将增加临床研究样本量进行深入探究。

参 考 文 献

- 1 Lázaro MJ, García ÁY, Tardáguila-García A, et al. Optimal management of diabetic foot osteomyelitis: challenges and solutions [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2019, 12(1): 947-959.
- 2 Nie X, Gao L, Wang L, et al. Atherogenic Index of Plasma: A Potential Biomarker for Clinical Diagnosis of Diabetic Foot Osteomyelitis.

- [J]. Surg Infect, 2020, 21(1):9-14.
- 3 É F. [Surgical management of diabetic foot osteomyelitis] [J]. Rev Prat, 2019, 69(6): 628-632.
- 4 Johani K, Fritz BG, Bjarnsholt T, et al. Understanding the microbiome of diabetic foot osteomyelitis: insights from molecular and microscopic approaches [J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(3): 332-339.
- 5 Velissaris D, Pantzaris ND, Platanaki C, et al. Procalcitonin as a diagnostic and prognostic marker in diabetic foot infection. A current literature review [J]. Rom J Intern Med, 2018, 56(1): 3-8.
- 6 Marini S, Barone G, Masini A, et al. The Effect of Physical Activity on Bone Biomarkers in People With Osteoporosis: A Systematic Review [J]. Front Endocrinol, 2020, 11(10): 689-695.
- 7 Gurban CV, Balaş MO, Vlad MM, et al. Bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis and their correlation with bone mineral density and menopause duration [J]. Rom J Morphol Embryol, 2019, 60(4):1127-1135.
- 8 中国医疗保健国际交流促进会糖尿病足病分会. 中国糖尿病足诊治指南[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(4):251-258.
- 9 Lázaro-Martínez JL, Tardáguila-García A, García-Klepzig JL. Diagnostic and therapeutic update on diabetic foot osteomyelitis [J]. Endocrinol Diabetes Nutr, 2017, 64(2): 100-108.
- 10 Aragón-Sánchez J, Lipsky B. Modern management of diabetic foot osteomyelitis. The when, how and why of conservative approaches [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2018, 16(1): 35-50.
- 11 李萌, 张会峰, 肖二辉, 等. 糖尿病足患者骨髓炎病原菌分布特点及药敏分析[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2020, 36 (2): 120-126.
- 12 周春豪, 张红安, 方佳, 等. 糖尿病足骨髓炎的骨科诊治进展[J]. 中华创伤骨科杂志, 2019, 21(7):636-640.
- 13 马晓龙, 刘强, 吴斗, 等. 骨转换标志物在骨质疏松诊治中的分析评价及临床应用前景[J]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2018, 4(1): 52-56.
- 14 杨利, 李强, 阚志芸, 等. 阿仑膦酸钠对糖尿病骨质疏松症患者骨代谢的影响[J]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2020, 6(6):351-356.
- 15 蒋华, 韩岩峰, 罗琳, 等. 白藜芦醇对绝经后骨质疏松女性骨代谢和氧化代谢产物水平的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(4):108-112.
- 16 O'Brien EC, Kilbane MT, McKenna MJ, et al. Calcium intake in winter pregnancy attenuates impact of vitamin D inadequacy on urine NTX, a marker of bone resorption [J]. Eur J Nutr, 2018, 57(3): 1015-1023.
- 17 刘福志, 张殿尧, 吴香萍. 阿仑膦酸钠治疗 2 型糖尿病骨质疏松病人的效果及对骨代谢指标的影响 [J]. 安徽医药, 2019, 23(6): 1230-1233.
- (收稿日期:2020-09-02)
(本文编辑:吕红芝)

彭汉书, 刘彬, 陈令斌, 等. 血清 BALP、NTX 在糖尿病足骨髓炎患者中的表达及意义 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2021, 7(6): 359-363.