

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.32.004

兔膝关节损伤后软骨细胞中 OPG 与 RANKL 表达 *

刘晓冬 邢 军 魏 利 耿淑玲 田 军[△]

(哈尔滨医科大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:随着中国经济的高速发展,人民生活水平日益增高。体育运动,高能量机动车造成的膝关节损伤数量不断增加,关节软骨的损伤恢复一直不是很理想。针对其后期的恢复研究做了许多相关的实验。本实验通过对兔膝关节软骨细胞损伤后软骨细胞中 OPG(骨保护素)与 RANKL(核激活因子受体配体)两种因子在损伤后与正常软骨细胞中的表达的比较,探讨损伤后软骨细胞中 OPG 和 RANKL 的表达。**方法:**25 只大耳白兔随机分成 5 组,每组 5 只。前 4 组在 10 天完成 20 只兔左后腿膝关节软骨损伤动物模型,最后 1 组 5 只做手术对照组,术后处置相同。在术后 1 周,2 周,4 周,8 周时取膝关节软骨损伤处关节软骨制成标本对照组取正常膝关节软骨制成标本。应用 HE 染色观察软骨细胞恢复情况及 SP 免疫组化法检测软骨细胞中 OPG 与 RANKL 的表达。在光镜下观察,通过医学图像分析软件(media cybernetics image-proplus6.0)图片分析,测定镜下相对灰度值并计算每个标本的平均灰度值,单因素方差分析法进行数据分析。**结果:**OPG 在膝关节损伤后 2-4 周表达最高,4-8 周有下降趋势。RANKL 在膝关节软骨损伤后明显表达并逐步的呈升高趋势。实验组镜下观察表达较强烈,测定镜下平均灰度值与对照组有显著性差异($P<0.05$)。**结论:**1.OPG 在膝关节软骨损伤后显著性表达。2-4 周表达较高,4-8 周趋于降低。2.RANKL 在膝关节软骨损伤后显著表达,1-8 周呈平稳上升趋势。

关键词:膝关节损伤;软骨细胞;OPG;RANKL

中图分类号:Q-93-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)32-6216-04

The Expressions of OPG and RANKL in the Rabbit Injured Knee Joint Cartilage Cells*

LIU Xiao-dong, XING Jun, WEI Li, GENG Shu-ling, TIAN Jun[△]

(The second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

ABSTRACT Objective: With the rapid development of Chinese economy, the people's living standards are increasing. The number of knee injuries caused by doing sports and high-energy motor vehicle is increasing. But the restoration of the articular cartilage has not been very satisfactory. So a lot of research-related experiments were used to analyze their recovery in the current study. By comparing the expression of the two factors of OPG (osteoprotegerin) and RANKL (Ligand of receptor activator of NF- κ B, RANKL) between the injury and normal cartilage cells, we investigate the distribution of OPG and RANKL content of rabbit knee joint cartilage injury cells in different periods. **Methods:** 25 rabbits were randomly divided into five groups. There were five rabbits in each group. Among the five groups, the four groups were used to complete the animal models of 20 rabbits left hind knee cartilage injury during 10 days, and another one group were used to control group under the same disposal surgery. The rabbits in the first four groups were killed after 1 week, 2 weeks, 4 weeks, and 8 weeks, respectively. At the same time, the knee injury cartilages were made as the specimen to observe the structure. The rabbits of control group were killed in appropriate time when the rabbits were healed after surgery and stuffed knee cartilage. The recovery of Chondrocytes was observed by HE staining. The expression of the OPG and RANKL in chondrocytes were detected with SP immunohistochemical method. The medical image analysis software (media cybernetics image-proplus6.0) was used to analyze Image, calculate the relative gray value and the average gray value of each specimen under the light microscope; ANOVA was used to data analysis. **Results:** OPG expression was highest in 2-4 weeks after injury, while it showed a decrease trend in 4-8 weeks. RANKL expression after knee cartilage injury was clear and gradually increasing, which may have some correlation with the heal shaping process of cartilage injury. At the same time, more intense expression were observed in the experimental group. There were significant difference of the average gray value between the experimental group and the control group ($P<0.05$). **Conclusions:** 1.OPG expression was significant after knee cartilage injury. Higher expression appeared in 2-4 weeks. It shows decreasing trend in the 4-8 weeks. 2. RANKL expression was also significant, which showed steady upward trend in the 1-8 weeks.

Key words: Knee-joint injury; Cartilage cells; OPG; RANKL

Chinese Library Classification: Q-93-33 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)32-6216-04

* 基金项目:黑龙江省教育厅项目(12541333)

作者简介:刘晓冬(1985-),男,硕士研究生,住院医师,创伤骨科;电话:0451-86296592, E-mail: eryuanliuxiaodong@163.com

△ 通讯作者:田军, E-mail: tianjun1961@163.com

(收稿日期:2014-05-10 接受日期:2014-05-30)

前言

中国经济的高速发展使人民生活水平日益增高,机械运动及外伤等造成的膝关节损伤患者的数量不断增加,关节软骨损伤的恢复在其治疗及预后中起很大作用。针对软骨损伤的研究有很多实验^[1],诸如:(1)软骨内固定;(2)降低关节面应力及保持关节活动;(3)关节镜下关节腔灌洗和清理术;(4)关节面钻孔及微骨折术;(5)移植技术(包括细胞移植、软组织移植、软骨/骨软骨移植等);(6)组织工程化软骨的合成和替代;(7)基因治疗;(8)药物疗法等等。本实验通过观察兔膝关节在损伤后的不同时期 OPG 和 RANKL 表达的不同,来探讨分析在膝关节软骨损伤后细胞因子对软骨细胞的恢复中可能存在的作用。一直以来人们对破骨细胞中 OPG 和 RANKL 的表达比较热门并几近明确^[2],但对其在软骨细胞的表达及作用没有相应的关注,而本实验希望通过此实验可以使大家关注于软骨细胞损伤后细胞中 OPG 和 RANKL 的表达分布,对损伤后软骨细胞的恢复有一定的作用^[3]。使在分子生物学领域中对软骨损伤的治疗及预后有一定的帮助。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

25 只健康成年中国大白兔(哈尔滨医科大学动物中心提供),体重 2.0-2.5 kg,雌雄不限。RANKL 多克隆抗体、OPG 多克隆抗体、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色盒(北京博士德生物材料公司)。

1.2 实验动物分组及模型制备

随机分成 5 组(7 d、14 d、28 d、56 d 组),每组 5 只,其中 20 只兔,左后腿制作膝关节软骨损伤模型手术,5 只兔左后腿作对照。

1.3 标本采集和处理

4 组动物分别于手术后 1、2、4、8 周处死,分别取左膝关节损伤部位软骨 20 份制成石蜡包埋标本与未损伤软骨 5 份石蜡包埋。大体形态学观察标本后,标本脱钙及制作切片,HE 染色观察;脱钙标本以免抗 OPG、RANKL 为一抗进行 SABC 免疫组化染色观察。

1.4 统计分析

首先通过光镜下观察 HE 染色切片,选取组织染色均匀的部分,在同一数码相机用相同参数照相后,用专业 media cybernetics image-proplus6.0 图像分析软件对阳性染色区域的平均光密度值测量。测量结果用平均数和标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,并采用 SPSS10.0 作单因素方差分析。 $\alpha=0.05$,当 $p<0.05$ 提示差异有统计学意义,当 $P>0.05$ 提示差异无统计学意义。

2 结果

2.1 术区大体形态观察

术后 7 d, 膝关节软骨损伤部位被薄层白色透明包膜部分包绕,触之较软,无肉芽组织充填,液性渗出明显,损伤区与周围软骨的界线清楚。术后 14 d 损伤部位大部分被包膜包绕,肉芽组织坚硬有弹性,触之较韧,表面光滑,肉眼见液性渗出明显减少,界线较之前模糊。术后 28 d 后纤维组织部分数量增多,创面由鲜红色转变为淡黄色,基本愈合,外观与正常膝关节软骨大部位相似。术后 56 d 时创面变为灰白色,损伤区与正常区界线无明显界限。对照组:膝关节软骨部分无明显变化。

2.2 组织学观察

术后 7 d, HE 染色可见损伤区肉芽组织中有少量的炎症细胞,中性粒细胞和成纤维细胞伴疏松结缔组织组成。有大量结缔组织、间充质细胞及少量软骨细胞增生。术后 14 d 有极少量巨噬细胞,纤维组织,包膜及周围组织无增生血管。可见较多量的软骨细胞增生。术后 28 d, 细胞呈球形,有明显的软骨陷窝,细胞排列整齐,新生软骨细胞与周围正常细胞形态一致。术后 56 d, HE 染色见新生的软骨细胞呈长梭形,无陷窝,基质含胶原纤维,相互平行,与周围正常软骨细胞形态基本一致。对照组:术后 7 d~56 d, HE 染色,可见正常软骨组织细胞,周围组织可见有轻度炎症反应,软骨细胞无明显变化。

2.3 免疫组化观察

OPG 在膝关节软骨细胞术后第 7 d 可见弱阳性表达;术后第 14 d 见阳性表达,14 d 组的染色比 7 d 组染色深;至第 28 d 新生软骨细胞表达最强,损伤恢复细胞有弱阳性表达,56 d 时 OPG 染色表达强度明显降低。OPG 免疫组化切片用 media cybernetics image-proplus6.0 图像分析系统进行分析,测定光密度值,损伤区软骨细胞的 OPG 表达与对照组相比,差异具有显著性($P<0.01$)。

表 1 OPG 的表达
Table 1 OPG expression

Groups	$\bar{x} \pm s$	F-value	P-value
Control group	75.53 $\pm$ 8.71	363.61	<.0001
Experimental group			
7d	190.94 $\pm$ 7.76		
14d	200.79 $\pm$ 8.27		
28d	207.65 $\pm$ 6.12		
56d	188.46 $\pm$ 12.33		

RANKL 术后 7 d 组损伤软骨细胞中 RANKL 弱阳性表达;术后 14 d 可见 RANKL 阳性表达;28 d 组损伤软骨细胞中 RANKL 表达较 14 d 组强,以新生及恢复损伤的软骨细胞中表

达明显;56 d 组损伤软骨细胞中 RANKL 表达明显增强。RANKL 主要在软骨损伤 28 d~56 d 时表达。RANKL 的免疫组化切片用 media cybernetics image-proplus6.0 图像分析系统进行分析,

测定光密度值,损伤区软骨细胞 RANKL 免疫组化表达与对照组相比,具有显著差异($P<0.01$)。

表 2 RANKL 的表达

Table 2 RANKL expression

Groups	$\bar{x} \pm s$	F-value	P-value
Control group	67.37 $\pm$ 4.43	465.60	<.0001
Experimental group			
7d	171.89 $\pm$ 1.48*		
14d	182.29 $\pm$ 6.10*		
28d	191.42 $\pm$ 6.51*		
56d	191.16 $\pm$ 6.97*		

3 讨论

骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)^[4] 是于 1997 年分别被美国和日本两个研究组以不同的方法发现的,属于肿瘤坏死因子超家族受体成员,以分泌蛋白的形式发挥作用,能特异性的抑制破骨细胞的形成,又名破骨细胞生成抑制因子(orthoclase genesis inhibitory factor, OCIF)^[5]。它是含有 401 个氨基酸残基的肝素结合分泌型糖蛋白,含 7 个结构域(D1-D7),有 21 个氨基酸的信号肽和 380 个氨基酸的成熟肽。其 N-端 D1-D4 富含半胱氨酸,参与配基结合, C-末端区域含两个与死亡结构域同源的基团(D5, D6)以及包含 1 个肝素结合位点和 1 个半胱氨酸残基的区域(D7)其与 TNF 受体超家族的成员具有高度的保守性^[6]。OPG 蛋白有单体和二聚体两种形式,主要以二聚体形式存在于细胞外基质中,与单体相比二聚体具有更强的生物学活性。OPG 除了在破骨细胞和成骨细胞中较高的表达外,在心脏、肾、肝、脾、骨髓等多种组织中均有广泛表达^[7]。其表达受多种激素和细胞因子的调控,如 1,25(OH)2D3, PGE2, 糖皮质激素等抑制 OPG 的表达,而 Ca^{2+} 、转化生长因子 β (TGF- β) 则能促进 OPG 的表达,其调节机制目前尚不完全清楚^[8]。

核激活因子受体配体(Ligand of receptor activator of NF- κ B RANKL)是 1998 年由 Yasuda H 应用分子克隆的方法在小鼠基质细胞互补 DNA 文库中分离出的^[9],也属 TNF 受体配体超家族成员,它能诱导破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞,能被 OPG 拮抗。OPG 被发现后,人们很快认识到 OPG 可能就是识别成骨细胞/基质细胞表达的破骨细胞分化因子的关键^[10]。事实上,在 OPG 被发现的同年, Wong BR 和 Anderson DM 两个研究组就分别发现了属于 TNF 受体配体超家族的新成员 - 肿瘤坏死因子相关活化诱导因子 (TNF related activation induced cytokine, TRANCE)^[11]和核激活因子受体配体(Ligand of receptor activator of NF- κ B, RANKL)^[12]。ODF 也属 TNF 受体配体超家族成员,它可以诱导破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞,这一过程能被 OPG 拮抗^[13]。后证实 ODF 与之前发现的能促进 T 细胞发育、增强树突状细胞功能的 TRANCE/RANKL 是同一种蛋白质,提示 ODF 在破骨细胞发育和免疫系统中发挥重要的调节作用^[14]。同年, Lacey DL 等发现了 OPGL(osteoprotegerin ligand)^[15],它能够与破骨细胞谱系的造血祖细胞相结合,促进破骨细胞的发育^[16]。在体外 OPGL 可以直接激活成熟的破骨细胞,短期应用于正常成年小鼠可以引起与破骨细胞活化相关的系统性高钙血症,上述作用无论在体内还是在体外均可被

OPG 拮抗。基因测序分析表明 TRANCE、RANKL、ODF、OPGL 为同一种物质,美国骨矿研究会于 2002 年将其统一命名为核因子 κ B 受体活化因子配体常用缩写名称 RANKL。RANKL 是一种 II 型跨膜蛋白,人类 RANKL 由 317 个氨基酸组成,在体内以膜结合型和可溶性两种形式存在,两种类型都可以与其天然诱饵受体 OPG 结合而失去生物学活性^[17]。RANKL mRNA 在骨和骨髓中含量最高,在淋巴组织(淋巴结、胸腺、脾、胎肝、派氏集合淋巴结)含量也很高。多种细胞因子和激素可影响其表达,如糖皮质激素、1,25(OH)2D3、IL-1、IL-6、IL-11、IL-17、TNF- α 、PGE2、PTH^[18,19]等均可刺激其产生,而 TGF- β 则对其表达有抑制作用。RANKL 可促进破骨细胞分化,增强成熟破骨细胞的活力,抑制破骨细胞凋亡。破骨细胞前体细胞分化为成熟破骨细胞的过程必须有低水平巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 和 RANKL^[20]。RANKL 基因敲除小鼠表现为严重的骨硬化症和出牙缺陷,体内缺乏破骨细胞,并伴有免疫系统的异常,如 T/B 淋巴细胞早期分化缺陷,缺乏淋巴结,胸腺发育不良,而脾脏和派氏集合淋巴结结构正常。注射外源性的 RANKL 后症状缓解,并有破骨细胞形成,说明 RANKL 不仅是重要的破骨细胞分化因子,同时参与了淋巴结的发生及淋巴细胞的发育。

OPG、RANKL、RANK 这 3 种因子是分别由不同学科领域的研究者从不同角度分别在不同细胞中发现。OPG、RANKL 这两种新的骨代谢因子是直接控制破骨细胞生成的功能因子^[21]。软骨愈合过程中可能也通过这一细胞代谢通路介导了软骨改建与塑形。在软骨愈合过程中,软骨细胞产生的 RANKL 与软骨细胞前体细胞表面的 RANK 受体结合发挥功能,使软骨细胞前体细胞分化成具有功能活性的软骨细胞^[22];另一方面,软骨细胞分泌的 OPG 作为 RANKL 的诱饵受体,竞争性地结合 RANKL,抑制软骨细胞性骨吸收功能,从而达到软骨愈合和软骨塑形的动态平衡。

本实验发现,OPG 在软骨组织中表达,主要存在于软骨组织中的损伤软骨细胞胞膜上,其中以恢复期表达最强,在软骨周围的软组织中也少量表达与对照组有显著差异($P<0.01$)。在本实验中,软骨细胞第 7 d 可见 OPG 阳性表达;损伤后第 14 d 见软骨细胞阳性表达更明显,至第 28 d 软骨细胞表达最强,而 56 d 时 OPG 表达强度呈降低趋势。这种表达变化是与软骨细胞形成恢复变化一致的。本实验研究发现,RANKL 在软骨细胞损伤后表达明显,7 d 组,14 d 组,28 d,56 d 呈平稳的上升趋势。软骨细胞这种表达变化与软骨愈合过程中后期的塑形变化

规律是一致的,说明 RANKL 可能在软骨塑形过程中起主要调节作用。有研究表明,随着成骨细胞分泌 OPG 的增多,达到一定的量就会导致软骨细胞合成 RANKL 增多,并激活 RANKL 的功能,使 RANKL 作用于软骨细胞的骨吸收功能,从达到软骨塑形的动态平衡。

创伤、骨性关节炎(OA)以及关节软骨病都能造成软骨组织的损伤,软骨组织的损伤可在多个关节发病,但多数发生在髋关节和膝关节,我国多以累及膝关节为主,严重影响患者的生活质量。能够找到对损伤愈合的恢复有明显作用的方式方法,一直是我们所不懈追求的目标。RANKL/RANK/OPG 系统对多种骨丢失相关疾病(骨质疏松症、类风湿关节炎、强直性脊柱炎、良恶性肿瘤的骨转移、假体周围的骨溶解等)都具有重要意义,是极具发展前途的基因治疗靶位。由于 OPG/RANKL 系统在破骨细胞的日渐清晰,机理的基本完善,在北欧的一些国家已经开始在绝经期女性中应用 OPG(骨保护素)预防骨质疏松的发生。而对于软骨细胞的作用及机制还处于专研之中,随着机理的日趋完善,这些促进 OPG 分泌的因子及其本身对损伤后的软骨细胞的愈合都可能有一定的作用。本实验针对软骨细胞损伤后 OPG 与 RANKL 的表达进行了实验性的研究,证明了其在软骨损伤后表达的基本趋势,在分子生物学领域对软骨损伤的治疗会有一定帮助的,未来希望通过对软骨细胞损伤进一步的研究,OPG 与 RANKL 在软骨细胞的生长及损伤修复中的作用被不断的研究清楚。

参考文献(References)

- [1] Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, et al. Interaction between insulin-like growth factor-1 with other growth factors in serum depleted culture medium for human cartilage engineering [J]. Med J Malaysia, 2004, 59(Suppl B): 7-8
- [2] Veineux N, Spector M. Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II co-agen-glycosaminoglycan scaffolds invitro[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(4): 278-286
- [3] Mikic B. Multiple effects of GDF-5 deficiency on skeletal tissues: implications for therapeutic bioengineering [J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(3): 466-476
- [4] Hiraki Y, Shukunami C. Chondromedulin-isanovel cartilage specific growth-modulating factor[J]. Podiatry Nichol, 2000, 14(7): 602-605
- [5] Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering [J]. Trends Biotechnology, 1998, 16(5): 224-248
- [6] Stone KR, Steadman JR, Rockery WG, et al. Regeneration of meniscal cartilages scaffold: Analysis of preliminary data [J]. Bone Joint Surg Am, 1997, 79(12): 1770-1777
- [7] Vacanti CA, Kim W, Upton J, et al. Tissue-engineered growth of bone and cartilage [J]. Transplant Proc, 1993, 25(1): 1019-1022
- [8] Sims CD, Butler PE, Cao YL, et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes[J]. Plast Reconstr Surg, 1998, 101(6): 1580-1587
- [9] Hsu FY, Chueh S, Wang YJ. Microspheres of hydroxyapatite reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth[J]. Biomaterials, 1999, 20(20): 1931-1936
- [10] Anita B, Robe S. Molecular and cell biology of TGF- β [J]. Miner and Electrolyte Metab, 1998, 24: 111-119
- [11] Keller K, Schulz MB, G6pferich A, et al. Insulin in tissue engineering of cartilage: a potential model system for growth factor application[J]. J Drug Target, 2001, 9(6): 439-448
- [12] Mitsua KI Tokud A. Histoiosical study of spontaneous osteoarthritis in the knee joint of guinea pigs [J]. Journal of Orthopedic science, 1997, 2(4):248-258
- [13] Weil L, Hierpe A, Brismar BH, et al. Effect of load on articular cartilage matrix and the development of guinea-pig osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 9 (5): 447-453
- [14] Hedi Liu, Xingjian Li. The Influencer and Mechanism of Action of TRAIL on Human Cell Lines[J]. Chin Med J, 2002, 115(3): 150-153
- [15] Ma YL, Rick L. Catabolic Effects of Continuous Human PTH(1-38) in Vivo Is Associated with Sustained Stimulation of RANKL and Inhibition of Osteoprotegerin and Gene- associated Bone Formation[J]. Endocrinology, 2001, 142(9): 4047-4054
- [16] Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 234(1): 137-142
- [17] Saika M, moue D, Kido S, et al. 17-Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor- α [J]. Endocrinology, 2001, 142(6): 2205-2212
- [18] Mitani M, Miura Y, Saura R, et al. Estrogen specifically stimulates expression and production of osteoprotegerin from rheumatoid synovial fibroblasts[J]. In J Mol Med, 2005, 15(5): 827-832
- [19] Fan X, Roy E, Zhu L, et al. Nitric oxide regulates receptor of nuclear factor-kappa B and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells[J]. Endocrinology, 2004, 14(5): 751-759
- [20] Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, et al. Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stromal cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 24 (7): 338-341
- [21] Sasaki N, Kusano E, Ando Y, et al. Changes in osteoprotegerin and markers of bone metabolism during glucocorticoid treatment in patients with chronic glomerulonephritis[J]. Bone, 2002, 30(6): 853-858
- [22] Bergh JJ, Xu Y, Farach-Carson MC. Osteoprotegerin expression and secretion regulated by calcium influx through the L-type voltage-sensitive calcium channel [J]. Endocrinology, 2004, 145 (1): 426-436