

RANKL/OPG 在青少年特发性脊柱侧凸患者低骨量发生机制中的作用

刘臻 邱勇 孙强 吴洁 陈军浩 陈蕾蕾 马薇薇

摘要：目的 从骨髓间质干细胞(MSCs)水平探讨 RANKL 及 OPG 与青少年特发性脊柱侧凸(AIS)患者骨量降低的关系。方法 46 例 12~17 岁志愿者分为 2 组,其中 AIS 组 30 例,年龄 12~17 岁,平均 14.1 岁。正常对照组 16 例,年龄 12~17 岁,平均 14.7 岁。AIS 组 Lenke 1 型 14 例 2 型 2 例 3 型 6 例,5 型 8 例。2 组均采用双能 X 线吸收测量仪测量 BMD 测量部位包括非优势侧股骨近端及腰椎。分别从 2 组志愿者髂前上棘处骨穿刺抽取 10ml 骨髓 肝素抗凝。体外密度梯度离心法分离培养 MSCs,扩增至 P₃ 代行表型鉴定,RT-PCR 法检测 2 组 MSCs 中 RANKL 及 OPG 的 mRNA 表达强度。结果 AIS 组腰椎(L₂~L₄)及股骨近端的 BMD 值明显低于正常对照组。AIS 组 RANKL 的 mRNA 表达显著强于对照组($P < 0.01$),而 OPG 的 mRNA 表达显著低于对照组($P < 0.01$)。结论 RANKL 及 OPG 在 MSCs 水平表达强度的异常可能与 AIS 骨量降低的分子机制相关。

关键词：RANKL; OPG; 脊柱侧凸; 青少年; 骨髓间质干细胞

The relationship between RANKL/OPG and the decreased bone mass in adolescent idiopathic scoliosis patients LIU Zhen, QIU Yong, SUN Qiang, et al. Spine Surgery, Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

Abstract : Objective To investigate the relationship between RANKL/OPG and the decreased bone mass of adolescent idiopathic scoliosis patients at the MSCs level. **Methods** This study covered 46 subjects(aged from 12 to 17), including patients with AIS and normal age-matched non-scoliosis children. AIS group was 30 patients , Normal group was 16 cases. The average Cobb angle of AIS group was 52.7°(ranging from 40°-105°). One spine surgeon was responsible for carrying out physical examination of normal control patients and ruling out the possibility of scoliosis , growth disorders and other chronic diseases. BMD of the lumbar spine and proximal femur was measured using dual energy X-ray absorptiometry in two groups. 10ml of the human bone marrow was obtained from anterior superior iliac spine under the sterile conditions , then anticoagulated by calparine , and the hMSCs were isolated by density gradient centrifuge from the mononuclear cells , and then were cultivated and subcultured *in vitro* . P₃ generation was analyzed by the flow cytometry to detect the surface antigens , whereafter expressive intensity of RANKL and OPG of hMSCs from two groups were detected by using RT-PCR. **Results** There were negative expression in hMSCs of CD₄₅-FITC、CD₁₄-PE、CD₃₄-PE and HLA-DR-PE , and then positive expression in that of CD₂₉-FITC、CD₄₄-FITC、CD₁₀₅-PE both 2 groups. BMD of the lumbar spine (L₂ ~ L₄) and proximal femur was obviously lower in AIS group than that of the control group. Expression of RANKL of MSCs had increased obviously in AIS group as compared with the control group($P < 0.01$). On the contrary , was the expression of OPG. **Conclusion** The abnormal expression of RANKL and OPG of hMSCs may be responsible for the molecule mechanism of the decreased bone mass of adolescent idiopathic scoliosis patients.

Key words : RANKL ; OPG ; Scoliosis ; Adolescence ; Mesenchymal stem cells

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30672131)

作者单位：210008 南京 南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科(刘臻、邱勇、孙强、吴洁、马薇薇) , 南京大学医学院附属鼓楼医院科研部(陈军浩、陈蕾蕾)

通讯作者：邱勇 ,Email :drliuzhen@163.com

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)作为脊柱侧凸最常见的形式,病因及发病机理至今尚未阐明^[1,2]。有文献报道 AIS 患儿在青春发育期除表现为生长发育异常外,还普遍存在骨密度下降、骨量减低的现象^[3]。但该现象发生的确切分子机制目前尚不清楚。分子生物学研究表明核因子 κ B 受体活化子配体(receptor activator of NF κ B ligand, RANKL)及骨保护蛋白(osteoprotegerin, OPG)是调控破骨细胞分化成熟的两个关键分子^[4,8]。两者在骨质疏松的预防、发病以及治疗领域中作用的研究已取得阶段性进展,但迄今鲜见其在 AIS 骨量减低分子机制方面的相关文献报道。为此我们设想从骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)水平检测 RANKL 及 OPG 的 mRNA 表达,探求 AIS 骨量减低的可能分子机制。

1 材料和方法

1.1 一般资料和实验分组

本组共 46 例志愿者,实验组 30 例,均为 AIS 患儿,均为女性,年龄 12~17 岁,平均年龄 14.1 岁。正常对照组 16 例,为同年龄非脊柱侧凸患儿,均为女性,年龄 12~17 岁,平均年龄 14.7 岁。对于 AIS 患者均需行全脊髓 MRI 检查排除可能存在的中枢神经系统病变。本实验研究排除就诊前接受过任何形式(如支具、手术等)治疗的 AIS 患儿。实验组侧凸 Cobb 角 40°~105°,平均 52.7°。Lenke 分型^[9]: Lenke 1 型 14 例(Lenke 1 A-3 例,Lenke 1 AN 型 3 例,Lenke 1 B-1 例,Lenke 1 BN 6 例,Lenke 1 CN 1 例),Lenke 2 型 2 例(Lenke 2 AN 1 例,Lenke 2 BN 1 例),Lenke 3 型 6 例(Lenke 3 B+ 1 例,Lenke 3 CN 5 例),Lenke 5 型 8 例(Lenke 5 C+ 1 例,Lenke 5 CN 7 例)。根据 PUMC 分型^[10]则可分为 I 型 17 例(I a 型 9 例, I b 型 5 例, I c 型 3 例),II 型 13 例(II a 型 2 例, II b 1 型 4 例, II b 2 型 3 例, II c 1 型 2 例, II c 2 型 2 例)。正常对照组系非脊柱畸形住院治疗的患者,由同一名脊柱外科医生负责体格检查以排除脊柱侧凸、生长发育障碍及其他慢性疾病。其中股骨干骨折 4 例,骨盆骨折 2 例,腰椎间盘突出症 3 例,发育性腰椎管狭窄症 2 例,骨囊肿 2 例,股骨干骨折术后 1 例,腰椎间盘炎 1 例,左臂丛神经损伤 1 例。实验组及对照组均采用双能 X 线吸收测量仪(dual-energy X-ray absorptiometry, DEXA)测量骨密度,测量部位包括非优势侧股骨近端及腰椎,且实验组中每名 AIS 患儿骨密度与本实验对照组平均骨密度差值

均低于 1.0 (符合骨量减少诊断标准)^[11]。所有研究对象均排除恶性肿瘤、血液系统疾病、器质性内分泌疾病、神经系统疾病及骨代谢疾病,无长时间活动受限或过量运动者,且近年未用过影响骨代谢的药物(如降钙素、氟化物、活性维生素 D 制剂、皮质激素等)。麻醉成功后手术开始前,无菌条件下于志愿者髂前上棘处行骨穿刺抽取 10 ml 骨髓,肝素抗凝。

1.2 主要仪器和试剂

胎牛血清(PAA 公司),0.25%胰酶(Hyclone 公司),Ficoll-Paque 分离液(1.077×10^3 g/L Amersham 公司),低糖 DMEM 培养基(含青霉素、链霉素各 100 u/ml)(Hyclone 公司),荧光标记小鼠抗人抗体 CD₄₅-FITC、CD₂₉-FITC、CD₄₄-FITC、CD₁₄-PE、CD₃₄-PE、CD₁₀₅-PE、HLA-DR-PE(BD 公司),FACSCalibur 型流式细胞仪(Becton Dickinson 公司),CK 40 相差显微镜(Olympus 公司),Megafuge 1.0R 冷冻离心机(Heraeus 公司),Trizol Reagent(Invitrogen 公司),琼脂糖(Promega 公司),电泳仪(Bio-Rad 公司),MJ-100 型 PCR 仪(MJ 公司),RT-PCR 试剂盒(BD 公司),双能 X 线吸收测量仪(Lunar 公司)。

1.3 MSCs 的体外分离、培养、扩增

将 10 ml 抗凝骨髓分装入两支 15 ml 离心管中, PBS 洗涤 2~3 次,每次洗涤后 1600 rpm 离心 6 min。Ficoll-Paque 分离液与骨髓以 4:6 的比例混合。2500 rpm 离心 30 min。将白膜层吸至另一 15 ml 离心管中 PBS 洗涤 2 次。反复吹打制成单个细胞。分装入 5 ml 低糖 DMEM 培养体系中(含胎牛血清 10%)。培养瓶置入 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的条件下培养。接种后 24 h 和 72 h 各换液 1 次,以后每隔 2~3 天换液 1 次。待原代单个核细胞铺满瓶底后用 0.25% 胰酶消化,按 1:3 比例传至 P₃ 代,培养条件同原代。

1.4 MSCs 的表型鉴定^[6]

待 P₃ 代单个核细胞铺满瓶底后,细胞铲将其刮下,相差显微镜下记数板记数。取 1×10^6 个细胞, FACSCalibur 型流式细胞仪行表型鉴定。选用荧光标记小鼠抗人抗体 CD 29-FITC、CD 44-FITC、CD 45-FITC、CD 14-PE、CD 105-PE、CD 34-PE、HLA-DR-PE。

1.5 MSCs 总 RNA 的抽提^[13]

取 1×10^6 个细胞,1 ml Trizol 孵育 5 min(15~30℃)。0.2 ml 氯仿 孵育 3 min。4℃10000 g 离心 15 min。取上层水相 0.5 ml 异丙醇 孵育 10 min(15~30℃)摇匀。4℃10 000~12 000 g 离心 10 min,见 RNA 沉淀。75%酒精 1 ml 震荡混匀,4℃7000 g 离

心 5 min ,重复 2 次。风干酒精 ,去离子水重悬 RNA 沉淀 ,比色法测定样本 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值 ,计算总 RNA 浓度。

1.6 RT-PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳^[13]

采用 BD 公司的 Titanium™ 一步法 RT-PCR 试剂盒在 MJ-200 型 PCR 仪上进行 RT-PCR 反应 ,RANKL 上游引物序列为 :5'-AGCGTCGCCCTGTTCTTCTA-3' ,下游引物序列为 :5'-ATGGGATGTCGGTGGCATT-3'。扩增产物为 343bp。OPG 上游引物序列为 :5'-CCCTTGCCCTGACCACTACTA-3' ,下游引物序列为 :5'-GCTTGCACCACTCCAAATCC-3'。扩增产物为 210 bp。两者 RT-PCR 反应条件相同均为 :50℃ 1 h ,94℃ 5 min ,94℃ 45 s ,58℃ 1 min ,72℃ 1 min ,再循环 29 次 (从第 3 步始) ,72℃ 延伸 10 min ,12℃ 结束。PCR 扩增产物在浓度为 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳 ,TBE 缓冲液终浓度为 0.5×。采用 Smartview 2001 生物电泳图像分析系统对电泳条带灰度值进行半定量分析。

1.7 统计学处理

全部数据处理均采用 SPSS 13.0 统计软件。组间差异比较使用独立样本 t 检验 ,P < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMD 检测结果

AIS 组腰椎 (L₂ ~ L₄) 及股骨近端的 BMD 值明显低于正常对照组 ,两组各部位 BMD 结果见表 1。

表 1 AIS 组与 N 组腰椎及股骨近端 BMD (g/cm² , $\bar{x} \pm s$)

分组	腰椎	股骨颈	大转子	Ward's 三角
AIS 组 (n = 30)	0.86 ± 0.12	0.80 ± 0.09	0.68 ± 0.09	0.72 ± 0.12
N 组 (n = 16)	0.98 ± 0.15	0.94 ± 0.15	0.80 ± 0.17	0.89 ± 0.14
t 值	-2.166	-4.105	-3.140	-3.501
P 值	0.035	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 MSCs 体外培养结果

AIS 组及 N 组均分离培养、传代成功。

2.3 MSCs 的形态学特点

培养 24 h :有较多圆形单个核细胞贴壁 (图 1)。培养 72 h :单个核细胞由圆形向梭形转化。部分细胞两极伸出细长胞浆突起 ,集落样生长 (图 2)。

2.4 P₃ 代 MSCs 表型鉴定结果

2 组 MSCs CD 14-PE、CD 34-PE、CD 45-FITC、HLA-DR-PE 检测均为阴性 ,CD 29-FITC、CD 44-FITC、CD 105-PE 检测均为阳性。与文献报道一致^[6] (图 3)。

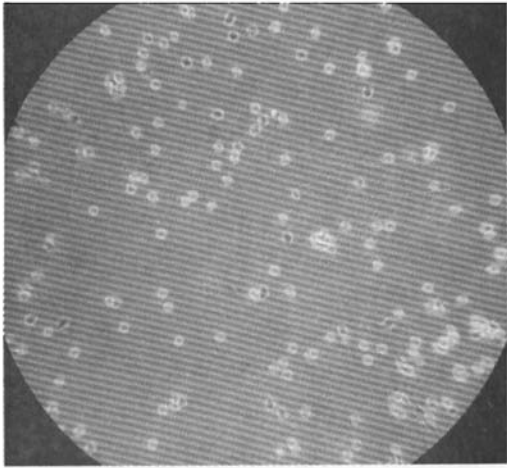


图 1 P₀ 代培养 24 h MSCs:较多圆形单个核细胞贴壁 (× 200)

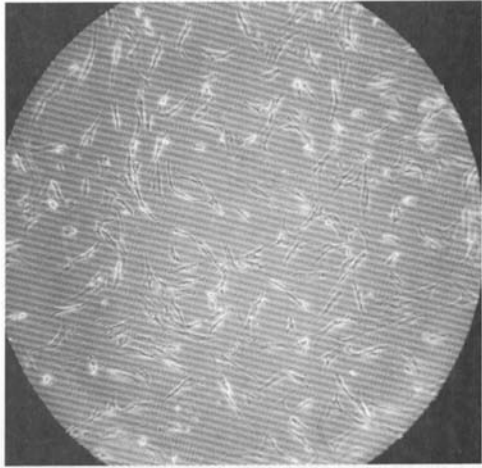


图 2 P₀ 代培养 72 h MSCs:单个核细胞由圆形向梭形转化 (× 200)

2.5 RT-PCR 检测结果

2 组抽提的总 RNA 经比色法测定其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均在 1.8 ~ 2.0 范围内。AIS 组 RANKL 的 mRNA 表达显著强于对照组 (t = 7.701 ,P < 0.01) (图 4) ,OPG 的 mRNA 表达显著低于对照组 (t = -4.923 ,P < 0.01) (图 5) ,经计算 AIS 组 RANKL/OPG 比值显著大于对照组 (t = 6.732 ,P < 0.01 表 2)。

表 2 各组 MSCs RANKL、OPG 及 RANKL/OPG 表达强度 ($\bar{x} \pm s$)

分组	RANKL	OPG	RANKL/OPG
AIS 组 (n = 30)	62.23 ± 5.8	47.44 ± 3.48	1.31 ± 0.21
N 组 (n = 16)	37.57 ± 4.8	54.28 ± 3.46	0.61 ± 0.20
t 值	7.701	-4.923	6.732
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

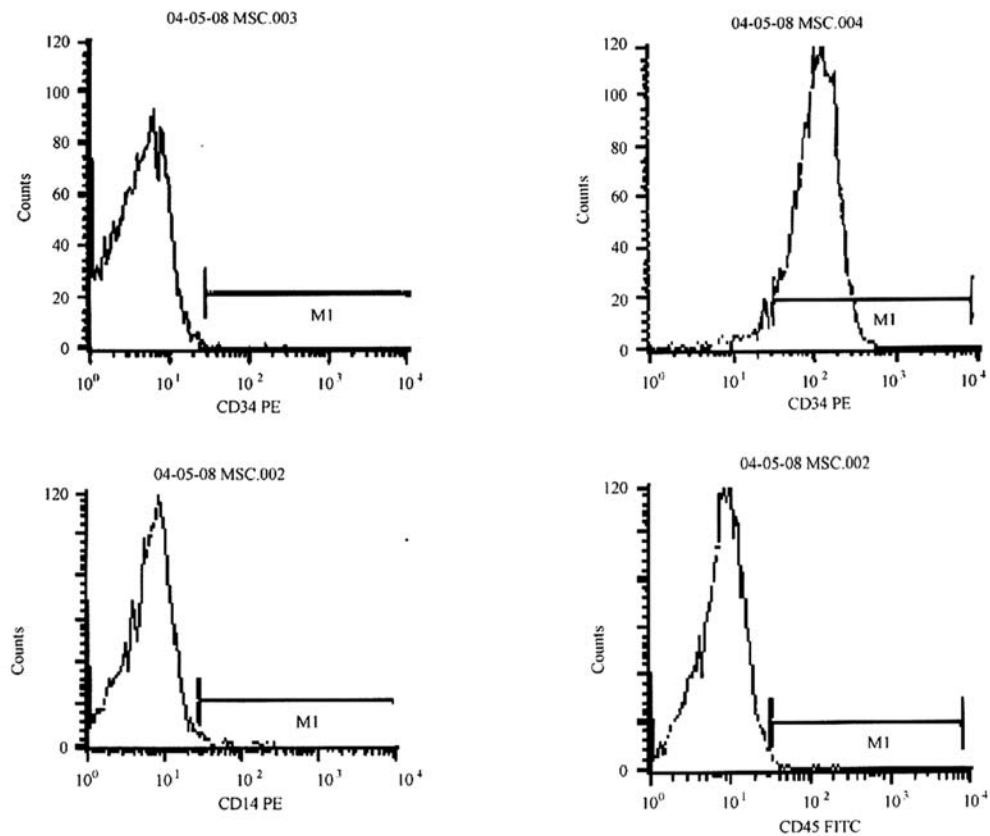


图 3 MSCs 表型鉴定结果图

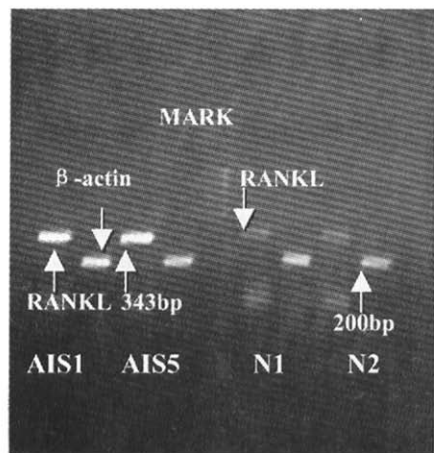


图 4 AIS 与 N 组 RANKL mRNA 表达强度

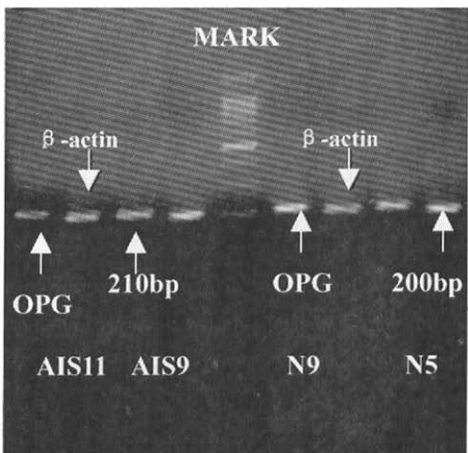


图 5 AIS 与 N 组 OPG mRNA 表达强度

3 讨论

AIS 作为一种复杂的脊柱三维畸形 ,除表现为青春期生长发育异常外 ,还普遍存在全身性骨量减低的现象。早在 1982 年 Burner^[14]就率先报道 AIS

患儿存在骨量降低的现象。近年的研究发现 ,AIS 患儿的骨密度(bone mineral ensity ,BMD)显著低于同年龄健康者 ,这不仅表现在病变部位 ,甚至在非病变部位也是如此。Cheng 等^[3,15]通过对 301 名(AIS 81 例 ,同年龄正常对照 220 名)12 ~ 14 岁青少年腰椎

及双侧股骨近端 BMD 检测发现 ,AIS 患儿 3 个年龄段 BMD 值均低于正常对照。吴洁^[16]在进行了类似的研究后同样发现 ,AIS 患儿各部位的 BMD 值均明显低于对照组。本组 30 例 AIS 患者 BMD 测量结果与上述文献报道一致 ,但该现象发生的确切分子机制目前尚不清楚。

近年来临床上 AIS 患儿身材瘦高以及四肢纤细修长的现象正引起越来越多学者对 AIS 生长发育异常本身及 AIS 骨量降低与生长发育异常之间存在关系的关注。Ylikoski^[17]通过对 1500 例芬兰 AIS 女孩的研究发现 ,她们的矫正身长也要显著高于 11 ~ 15 岁健康女孩的平均身长。其中 11 ~ 13 岁 ,身高甚至无需矫正都要高于同年龄对照组。而发育成熟后她们的身长优势与对照组相比不复存在。Cheng 等^[15,18]在检测发现 AIS 组 3 个年龄段 BMD 值均低于对照组的同时也发现 AIS 患儿肢体长度明显超过正常组的儿童。上述现象说明 ,AIS 患儿体内可能存在以软骨内化骨形式完成的骨纵向生长加速造成的生长发育不平衡 ,且 AIS 患儿存在的以骨量减低为特征的骨代谢异常与生长发育异常之间可能存在相关性。

正常骨代谢是通过骨吸收和骨重建过程维持动态平衡的。其中破骨细胞(osteoclast OC)的分化和成熟是骨吸收的中心环节。分子生物学研究表明 ,RANKL 又称为骨保护素配体(OPGL)或破骨细胞分化因子 ,是调控 OC 分化成熟的关键分子 ,主要在 MSCs 及成骨细胞(osteoblast OB)中表达 ,其后与 OC 膜上 RANKL 配体 RANK 结合 ,刺激 OC 分化、活化并抑制其凋亡 ,从而维持骨生长发育的动态平衡^[19]。OPG 又称为破骨细胞生成抑制因子 ,被 MSCs 作为局部因子表达的同时作为 RANKL 的特异性抑制物 ,通过与 RANKL 的结合 ,竞争性抑制 OC 的分化和活性^[20-22]。由此可知 ,骨吸收的关键是 OC ,而调控 OC 分化和成熟的关键分子 RANKL 和 OPG 主要是由 MSCs 表达的。作为中胚层起源的原始细胞 ,MSCs 不仅具有很强的自我更新能力 ,而且体外分离培养时遗传背景稳定 ,传 2 ~ 3 代后也不会丧失其正常的核型及端粒酶活性^[23-24] ,更为重要的是 MSCs 经传代后细胞数量已能满足分子生物学检测的需要。为此我们设想从 MSCs 水平探讨调控 OC 分化成熟的分子机制 ,通过检测细胞因子 RANKL 和 OPG 的核酸表达水平 ,从分子水平揭示 AIS 患儿骨量减低的可能原因。

本实验中实验组中每名 AIS 患儿骨密度与对照

组平均骨密度差值均低于 1.0s ,换言之本组 30 例 AIS 患儿均存在骨量减低的现象。结果显示 ,AIS 患儿 MSCs 中 RANKL 的核酸表达强度显著高于同年龄对照组。我们推测 AIS 患儿骨骼生长发育时 ,MSCs 聚集区相对高表达的 RANKL 可优势启动破骨前体细胞的信号转导过程 ,最终导致 OC 分化的增强 ,这是一种上调作用。Shiotani 等^[25]在体外培养小鼠成骨细胞和骨髓细胞时发现 ,RANKL 可诱导破骨前体细胞分化为有功能的 OC ,这说明 RANKL 与 OC 的分化和成熟直接相关 ,它能刺激 OC 活化并抑制其凋亡。此外 ,RANKL 与 RANK 结合促使 OC 中许多基因表达 ,如血小板衍生生长因子- α 、胰岛素样生长因子-1 等 ,而这些因子都有促进 OB 增殖分化的作用^[26] ,而增殖的 OB 又可通过分泌 RANKL 发挥其正反馈作用。由此我们得知 AIS 患儿 MSCs 中高表达的 RANKL 可增强其活化 OC 的能力 ,加速诱导破骨前体细胞分化为成熟的 OC ,从而使得 AIS 患儿骨吸收程度较同年龄正常儿童有显著增强。这与 AIS 患儿临床中骨密度降低的现象一致。

Boyle 等^[27]研究发现 ,过度表达 OPG 的转基因小鼠骨质坚硬 ,骨髓腔变小 ,呈明显的大理石样骨病表现 ,相反 ,敲除 OPG 的小鼠会发生严重的骨质疏松。据此他认为体内 OPG 含量的多少与骨量变化密切相关。近年研究表明 ,采用 OPG 抑制 RANKL 活性可以阻断其对于 OC 的激活作用^[28]。本实验结果显示 ,AIS 患儿 MSCs 中 OPG 的核酸表达强度显著低于同年龄对照组。我们推测 AIS 患儿 MSCs 聚集区相对低表达的 OPG ,可使其作为一个诱受体拮抗 RANKL ,从而对 OC 分化和成熟的阻断效应较同年龄正常对照组明显下降 ,导致 OC 分化成熟的能力相对增强。Cheng 等^[29]在对 AIS 骨组织形态学研究也证实 ,AIS 患者骨小梁连续细长 ,骨小梁厚度降低 ,骨细胞数量减少 ,骨形成不活跃 ,少见成骨细胞。

徐琳及曾天舒等^[12,30]认为 ,骨微环境中 RANKL 和 OPG 表达量的相对比值决定着骨代谢的方向 ,对于骨质疏松的患者 RANKL/OPG 比率显著增加。本实验结果显示 ,AIS 患儿 MSCs 中 RANKL 的核酸表达强度显著高于对照组 ,OPG 的核酸表达强度显著低于对照组 ,这说明在转录水平 RANKL 表达强于同年龄青少年而 OPG 表达弱于同年龄青少年。同时 AIS 组患儿 MSCs 中显著高表达的 RANKL 以及相对低表达的 OPG 使得 RANKL/OPG 的比值显著增加。一方面 RANKL 表达增加 ,由它启动的 OC 分化、成熟和激活的信号加强 ;另一方面 ,OPG 表达下降 ,对

RANKL 的抑制作用减弱,可以强化 RANKL 与 RANK 的结合及随后的信号传递过程,二者对 OC 强势调控的最终结果导致 AIS 患儿 OC 活性显著加强,骨吸收程度强于骨形成,导致骨密度降低。此外,由于骨的生长存在吸收和重建的动态平衡,因此本研究中骨吸收的增强可能也意味着骨重建同时有所增强,这与临床所见的 AIS 患者身材瘦高及四肢修长等软骨内成骨增强的现象符合,同时也验证了 Cheng^[15] 的研究结果,AIS 组 BMD 值明显低于对照组的同时 AIS 患儿肢体长度超过正常组的儿童。这说明 AIS 患儿的骨吸收与骨重建可能均有加强,只是骨吸收的程度强于骨重建,造成 AIS 患者在软骨内成骨增强的同时出现骨矿化不足,骨强度不够,骨密度降低。二者可能都是 AIS 患儿生长发育不平衡的一部分。

过去学者们对 AIS 骨量减低的研究多见于大体测量学方面。至今尚未见有从分子生物学水平研究 AIS 骨量异常的文献报道。本实验从 OC 分化的分子机制入手,推测细胞因子 RANKL 及 OPG 的表达与 AIS 骨量减低的分子机制间可能存在相关性。但骨骼的吸收和重建是一极其复杂的过程,存在众多相互影响的调控通路,细胞因子 RANKL 及 OPG 对 OC 分化和活化的调控只是其中的一个环节,导致 AIS 患者低骨量也肯定存在着其他的机制。因此本实验所揭示的分子生物学证据在 AIS 骨量减低的致病机理中所起的作用可能微不足道,但这项开拓性的基础研究无疑会给 AIS 患者骨量降低的病因学更深层次的研究带来新的思路和启发。

【参 考 文 献】

- [1] Heidari B, Fitzpatrick D, Synnott K, et al. Modelling of annulus fibrosus imbalance as an aetiological factor in adolescent idiopathic scoliosis. *Clinical Biomechanics*, 2004, 19 : 217-224.
- [2] 邱勇,朱丽华,宋知非,等. 脊柱侧凸的临床病因学分类研究. *中华骨科杂志*, 2000, 20 : 265-268.
- [3] Cheng JC, Guo X, Sher AH. Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: A longitudinal follow up study. *Spine*, 1999, 24 : 1218-1222.
- [4] Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234 : 137-142.
- [5] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89 : 309-319.
- [6] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory

factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 : 3597-3602.

- [7] Pittenger MF, Mackay AM, Jaiswal SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 : 143-147.
- [8] Forriol F, Shapiro F. Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. *Clin Orthop*, 2005, 432 : 14-33.
- [9] Lenke LG, Betz RR, Hams J, et al. Adolescent idiopathic scoliosis: a new classification to determine extent of spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg (Am)*, 2001, 83 : 1169-1181.
- [10] 邱贵兴, 仇建国, 王以朋, 等. 特发性脊柱侧凸的 PUMC (协和) 分型系统. *中华骨科杂志*, 2003, 23 : 1-9.
- [11] DiMegio A, Bonnel F. In: Raimondi AJ (ed). *The Pediatric Spine: Principles of Pediatric Neurosurgery*. New York: Springer-Verlag, Growth of the Spine, 1989, 39-47.
- [12] 曾天舒, 潘世秀, 陈璐璐, 等. 雌激素调节大鼠去卵巢后骨髓细胞 OPG、RANKL、RANK 基因表达. *中国骨质疏松杂志*, 2006, 12 : 138-141.
- [13] Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (second edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] Burner WL, Badger VM, Sherman FC. Osteoporosis and acquired back deformities. *J Pediatr Orthop*, 1982, 2 : 383-385.
- [15] Cheng JC, Qin L, Cheung CS, et al. Generalized low areal and volumetric bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Miner Res*, 2000, 15 : 1587-1595.
- [16] 吴洁, 邱勇, 孙燕芳, 等. 青少年特发性脊柱侧凸患者骨密度变化的分析. *中国脊柱脊髓杂志*, 2004, 14 : 598-600.
- [17] Ylikoski M. Height of girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*, 2003, 12 : 288-291.
- [18] Guo X, Chau WW, Chan YL, et al. Relative anterior spinal overgrowth in adolescent idiopathic scoliosis. Results of disproportionate endochondral-membranous bone growth. *J Bone Joint Surg Br*, 2003, 85 : 1026-1031.
- [19] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93 : 165-176.
- [20] Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, 1999, 20 : 345-357.
- [21] Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol*, 1999, 141 : 195-210.
- [22] Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 2001, 142 : 5050-5055.
- [23] Liljenqvist UR, Link TM, Halm HF. Morphometric analysis of thoracic and lumbar vertebrae in idiopathic scoliosis. *Spine*, 2000, 25 : 1247-1253.
- [24] Ganey TM, Ogden JA. Development and maturation of the axial skeleton. In: Weinstein Sled. *The pediatric spine: principles and practice*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001 : 3-54.

(上接第 479 页)

- [25] Shiotani A , Shibasaki Y , Sasaki T. Localization of receptor activator of NFkappaB ligand , RANKL , in periodontal tissues during experimental movement of rat molars. J Electron Microsc , 2001 , 50 : 365-369.
- [26] Capellen D , Nguyen NHL , Bongiovanni S , et al. Transcriptional program of mouse osteoclast differentiation governed by the macrophage colony-stimulating factor and the ligand for the receptor activator of NFkB. J Biol Chem , 2002 , 277 : 21971-21982.
- [27] Hofbauer LC , Khosla S , Dunstan CR , et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation

of bone resorption. J Bone Miner Res , 2000 , 15 : 2-12.

- [28] Otte A , Mueller-Brand J , Dellas S , et al. Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment. Lancet , 1998 , 351 : 417-418.
- [29] Cheng JC , Tang SP , Guo X , et al. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis : a histomorphometric study. Spine , 2001 , 26 : E19-E23.
- [30] 徐琳 , 谭颖徽 , 何海涛. 降钙素基因相关肽对兔成骨细胞 OPG/RANKL mRNA 表达的影响. 实用口腔医学杂志 , 2005 , 21 : 396-399.

(收稿日期 : 2007-01-08)