

# RANKL、OPG 在初发系统性红斑狼疮患者中的表达及意义

郑一君 胡大伟 陈顺乐 鲍春德 敖文 袁敏

中图分类号: R392.12 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)01-0036-04

**摘要:**目的 研究初发系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者外周血淋巴细胞中细胞核因子- $\kappa$ B受体激活剂配体(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL)护骨素(osteoprotegerin, OPG)基因 mRNA 的表达情况,探讨其表达水平与初发 SLE 患者骨质疏松的关系。方法 选择初发 SLE 患者 45 例及正常对照 42 例,运用实时定量 PCR 方法检测患者外周血淋巴细胞 RANKL、OPG 的 mRNA 表达水平。采用双能 X 线骨密度仪分别检测患者腰椎(L<sub>1-4</sub>)和股骨近端 2 个部位的骨密度,单因素分析 RANKL、OPG 基因 mRNA 表达水平与 SLE 患者骨密度的关系。结果 SLE 患者 RANKL、OPG 基因 mRNA 表达水平较正常对照组明显减低( $P < 0.01$ );SLE 患者 2 个部位的骨密度均低于正常对照组( $P < 0.05$ ),骨量异常发生率为 28.89%,骨量异常降低的 SLE 患者 OPG 基因 mRNA 的表达水平比骨量正常的患者显著降低,两者间的差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而 RANKL 基因 mRNA 表达水平的差异无统计学意义( $P > 0.05$ );OPG 基因 mRNA 表达水平与初发 SLE 患者骨密度间存在正相关( $r = 0.461$ ;  $P = 0.001$ ),即 OPG 表达水平越低,骨量减少越明显,而 RANKL 基因 mRNA 表达降低与初发 SLE 患者骨密度无明显相关性( $r = -0.189$ ,  $P = 0.214$ );初发 SLE 患者疾病活动度与骨量减少、RANKL 及 OPG 基因表达水平间不存在相关性( $r = 0.293$ ,  $P = 0.138$ ;  $r = -0.099$ ,  $P = 0.493$ ;  $r = 0.138$ ,  $P = 0.493$ )。结论 初发 SLE 患者骨量减少的发病率较正常人群增高,并且初发 SLE 患者体内 RANKL 和 OPG 基因表达存在异常,其中 OPG 表达水平的降低可能与初发 SLE 患者的骨量减少有密切关系。

**关键词:** 系统性红斑狼疮; 护骨素; 细胞核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体; 骨密度; 荧光实时定量聚合酶链反应

**The significance of the RANKL and OPG gene expression in the initial systemic lupus erythematosus patients** ZHENG Yijun, HU Dawei, CHEN Shunle, et al. Department of Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China

**Abstract: Objective** To investigate the RANKL and OPG gene expression in peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and its relationship with bone mineral density (BMD).

**Methods** The expressions of RANKL and OPG gene in peripheral blood lymphocytes from 45 SLE patients and 42 normal controls were detected by real-time PCR. BMD measurements in the lumbar spine (L1 ~ L4) and left proximal femur (femoral neck) were performed using dual X-ray absorptiometry before treatment. The relationship between RANKL and OPG gene expression and the bone mass were studied. **Results** The expressions of RANKL and OPG gene significantly decreased in initial SLE compared with normal controls ( $P < 0.01$ ). The initial SLE patients had significantly lower BMD values, and higher frequency of osteopenia (28.89%) at all sites of measurement compared with matched healthy controls ( $P < 0.01$ ). Recent-onset SLE patients were divided into two groups by BMD, abnormal group and normal group. There are differences in OPG gene expression between them ( $P < 0.01$ ). There is positive correlation between OPG gene expression and BMD in recent-onset SLE patients ( $r =$

0.461;  $P = 0.001$ ). In the SLE patients RANKL gene expressions were not correlated with BMD ( $r = -0.189$ ,  $P = 0.214$ ). There is no correlation between SLE disease activity and BMD, RANKL gene expressions, OPG gene expressions respectively ( $r = 0.293$ ,  $P = 0.138$ ;  $r = -0.099$ ,  $P = 0.493$ ;  $r = 0.138$ ,  $P = 0.493$ ). **Conclusions** Recent onset untreated SLE patients may have lower BMD than expected. There are abnormal RANKL and OPG gene expressions in SLE patients. The low expression of OPG gene may be involved with the osteopenia in the initial SLE patients. The level of RANKL gene is not correlated with BMD.

**Key words:** Systemic lupus erythematosus; Osteoprotegerin (OPG); The receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL); Bone mineral density (BMD); Real-time PCR

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种常见的自身免疫性疾病,临床上以多脏器累及和免疫调节异常为主要特征。随着SLE患者生存率的逐年提高,SLE患者的骨骼代谢异常越来越受到临床医生的重视。已有不少研究发现绝经前SLE患者骨量减少和骨质疏松的发病率较同年龄同性别人明显增高,而且这与糖皮质激素(corticosteroid,CS)的用量及病程长短无关<sup>[1]</sup>。因为OPG/RANKL在调节体内骨骼代谢中发挥着重要作用,所以我们希望通过检测初发SLE患者外周血中淋巴细胞RANKL及OPG基因表达水平,了解它们在初发SLE患者体内的表达情况,并探讨其与初发SLE患者骨密度之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

选择2007年7月~2008年8月在上海交通大学医学院附属仁济医院风湿科就诊的初发SLE患者共45例,其中女性40例,男性5例,年龄11~80岁,平均( $29.93 \pm 13.7$ )岁,其中围绝经期妇女占4.44%,绝经前期SLE患者占84.44%;所有患者SLE诊断符合美国风湿病学会1997年诊断标准。正常对照组42例,其中女性37例,男性5例,年龄13~54岁,平均( $34.60 \pm 11.75$ )岁,其中围绝经期妇女占7.14%,绝经前期SLE患者占80.95%,均为健康体检者。

### 1.2 主要试剂及仪器

淋巴细胞分离液:购自北京鼎国生物技术有限责任公司;RNA抽提试剂:Trizol,购自美国Invitrogen Life Technologies公司;定量检测试剂盒:SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit,购自日本TaKaRa公司;ABI 7900 HTPCR仪:购自美国应用生物系统公司;双能X线骨密度仪:DISCOVERY-M,购自美国HOLOGIC公司。

### 1.3 外周血淋巴细胞RANKL、OPG mRNA表达

采集患者和正常人外周静脉血5 ml,EDTA抗凝。用淋巴细胞分离液从外周血中分离出淋巴细胞,然后Trizol抽提淋巴细胞总RNA,SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit一步法检测RANKL、OPG mRNA的表达量,以GAPDH为内参照,每个样本均设3个复孔,取其平均值进行比较。RQ-PCR后获得其CT值(即循环阈值,表示RQ-PCR过程中,每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数),以与GAPDH的CT差值( $\Delta$ CT)表示RANKL和OPG在淋巴细胞中的相对表达量。VDR及GAPDH引物序列如下:RANKL上游引物5'-ATCGTTGGATCACAGCACATCA-3',下游引物5'-TGAGCAAAAGGCTGAGCTTCA-3';OPG上游引物5'-CGGCACATTGGACATGCTAA-3',下游引物5'-TCCCCGTAAGCTTTCCATCA-3';GAPDH上游引物5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3',下游引物5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'。

### 1.4 骨密度测定

采用双能X线吸收仪,分别测定腰椎1~4和股骨近端骨密度,所有入选SLE患者均在采血前进行检测。骨量异常诊断标准:按照WHO双能X线的诊断标准, $-2.5 \leq T < -1.0$ 时诊断为骨量减少; $T < -2.5$ 时,诊断为骨质疏松。腰椎和股骨颈只要有一个部位存在骨量减少或骨质疏松,就可诊断为骨量减少或骨质疏松。

### 1.5 初发SLE患者疾病活动度

采用SLE disease activity index (SLEDAI)评估SLE病情活动度:0~4分:基本无活动;5~9分:轻度活动;10~14分:中度活动; $\geq 15$ :重度活动。

### 1.6 统计学处理

实验结果用SPSS 11.0软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两独立样本比较采用 $t$ 检验,等级资料采用秩和检验,两组骨量异常的发病率采用连续性校正 $\chi^2$ 检验,Spearman法进行相关性检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料

初发 SLE 患者 45 例,就诊前均未服用过糖皮质激素进行治疗,其中出现骨量减少 12 例,骨质疏松 1 例,初发 SLE 患者疾病活动情况:轻度 12 例,中度 11 例,重度 22 例。正常对照组 42 例,骨量减少 2 例。两组性别、年龄差异均无统计学意义。两组骨量异常发生率的差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 2.2 外周血淋巴细胞 RANKL 和 OPG 基因 mRNA 的表达水平

RQ-PCR 结果显示,与正常组比较,初发 SLE 组的 RANKL 及 OPG 基因表达均较正常对照组显著减少( $t = 4.83, P = 0.00; t = 5.30, P = 0.00$ ),见表 1。

表 1 初发 SLE 组与对照组基本情况比较

组别	年龄(岁)	RANKL 表达	OPG 表达	骨量异常	
				例数	发生率(%)
初发 SLE 组	29.93 ± 13.7	12.75 ± 2.16	14.71 ± 2.19	13	28.89
正常对照组	34.60 ± 11.75	10.12 ± 2.90	12.36 ± 1.83	2	4.76
<i>t</i> 值	-1.698	4.83	5.30		
<i>P</i> 值	0.093	0.000	0.000		0.004

表 2 初发 SLE 骨量异常组与骨量正常组基本情况比较

组别	患者例数	年龄(岁)	RANKL 表达	OPG 表达
骨量异常组	13	27.69 ± 18.05	13.09 ± 2.84	16.08 ± 1.54
骨量正常组	32	30.84 ± 11.72	12.62 ± 1.85	14.16 ± 2.19
<i>t</i> 值		-0.695	0.66	2.88
<i>P</i> 值		0.49	0.51	0.006

### 2.3 RANKL、OPG 基因表达水平与初发 SLE 患者骨密度的相关性分析

在初发 SLE 患者中,骨量异常及骨量正常者之间 OPG 基因 mRNA 表达水平差异有统计学意义( $P < 0.01$ );RANKL 基因 mRNA 表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 2)。初发 SLE 患者 OPG 基因表达水平与骨量减少间存在正相关( $r = 0.461; P = 0.001$ ),OPG 表达水平越低,骨量减少越明显;而 RANKL 基因 mRNA 表达降低与 SLE 患者骨密度不存在相关性( $r = -0.189, P = 0.214$ )。

### 2.4 系统性红斑狼疮疾病活动度与骨量减少、RANKL 以及 OPG 基因表达水平相关性分析

分别分析初发 SLE 患者疾病活动度与骨量减少、RANKL 及 OPG 基因表达水平的相关性,发现 SLE 患者疾病活动度与骨量减少、RANKL 及 OPG 基因的表达水平不存在相关性,相关系数及  $P$  值分别为: $r = 0.293, P = 0.138; r = -0.099, P = 0.493; r = 0.138, P = 0.493$ 。

## 3 讨论

SLE 是一种较为常见的自身免疫性疾病,其病因和发病机制尚不完全清楚,目前认为可能与遗传、激素与环境等因素综合作用引起的机体免疫调节功能紊乱有关。有研究显示机体内 T、B 细胞的功能紊乱会引起机体 OPG/RANKL 信号传导系统异常<sup>[2]</sup>。免疫调节功能紊乱,T、B 细胞功能异常是 SLE 患者的突出特征之一。初发 SLE 患者外周血淋巴细胞是否存在 OPG、RANKL 基因的表达异常,这些基因的异常表达与初发 SLE 患者的骨量异常有无关系等目前还不清楚,也未发现相关报道。

本研究显示,初发 SLE 患者外周血淋巴细胞 OPG、RANKL 的基因表达存在异常。与正常人比较,初发 SLE 患者外周血 OPG、RANKL 的 mRNA 表达显著降低。探讨其原因可能与患者体内存在 B、T 细胞功能紊乱有关。骨髓中的 OPG 和 RANKL 主要由骨髓基质细胞分泌,而血清中的 OPG 和 RANKL 主要来源于外周血淋巴细胞<sup>[3]</sup>。外周血淋巴细胞 OPG、RANKL 的 mRNA 表达降低反映了外周淋巴细胞存在着 OPG 和 RANKL 的转录减少,当然有些 SLE 患者本身存在着白细胞总数的减少及淋巴细胞数目的减少,这也可能是造成外周血淋巴细胞 OPG、RANKL 的 mRNA 表达减少的一个重要原因。

众所周知,OPG/RANKL 系统在维持骨骼内环境稳定方面有着重要作用<sup>[4]</sup>。护骨素(OPG)是一种分泌型蛋白,属于肿瘤坏死因子受体超家族,它可以限制破骨细胞对骨组织的过度吸收,对骨组织有保护作用<sup>[5]</sup>。RANKL 有两种存在形式,膜蛋白和分泌型蛋白<sup>[6]</sup>,它在淋巴结、胸腺和肺组织中高表达,在其他如脾脏和骨髓低表达<sup>[7]</sup>。很多能刺激破骨细胞形成和活化的因素都可以促进成骨细胞/基质细胞表达 RANKL。生理情况下,OPG 与分泌型 RANKL 通过竞争性巨噬/单核细胞来源的细胞表面的 RANK 结合,对破骨细胞和成骨细胞的活动进行精确调解,保持骨量的动态平衡。初发 SLE 患者外周血淋巴细胞 OPG、RANKL 的表达降低会对患者的骨密度产生什么影响,目前未见相应研究。我们希望通过分

析它们与患者骨密度的关系,探究导致 SLE 患者骨量减少、骨质疏松的可能因素。

因为糖皮质激素能够抑制 OPG 的生成,促进成骨细胞表面 RANKL 的表达<sup>[8]</sup>,导致 OPG/RANKL 的比值减低,增加成骨细胞前体促进破骨细胞发育的能力,打破了骨质生成与骨质吸收之间的平衡,导致服药期间骨量的迅速减少,所以我们将未使用糖皮质激素治疗的初发 SLE 患者做为研究对象,了解初发 SLE 患者骨密度的情况。结果发现,初发 SLE 患者骨量减少的发病率(28.89%)明显高于同年龄同性别的正常对照组,这与文献的报道相一致(25%~46%)<sup>[9]</sup>,这提示 SLE 患者本身可能存在着某些与疾病相关的影响骨骼代谢的因素。为了进一步了解 OPG/RANKL 在 SLE 患者骨骼代谢中的可能作用,我们比较了初发 SLE 骨量正常与骨量异常患者外周血淋巴细胞 OPG、RANKL 基因表达的情况,实验数据显示骨量异常及骨量正常 SLE 患者之间 OPG 基因 mRNA 表达水平差异有统计学意义,而且 OPG 基因表达水平与骨量减少之间存在正相关。在骨量减少的 SLE 患者组中,OPG 基因 mRNA 表达水平更低。同样比较两组 RANKL 基因的 mRNA 表达水平,骨量减少组和骨量正常组间差异无统计学意义,并且 RANKL 基因 mRNA 的表达与 SLE 患者骨密度不存在相关性。因为 RANKL 和 OPG 在表达量上存在着竞争机制,所以一般 RANKL 表达增高时,OPG 表达常出现减低,而当 RANKL 表达下降时,OPG 表达会有所增高,两者的比值调节着破骨细胞的生成,因此不少研究者认为,RANKL/OPG 的比值是决定骨量的重要因子<sup>[10]</sup>。本研究的结果与该理论一致,虽然在初发 SLE 患者中 OPG 和 RANKL 的表达都有显著的降低,但它们的降低程度存在差异。与 RANKL 的表达相比,初发 SLE 患者 OPG 表达的降低更为显著,这可以解释为什么初发 SLE 患者骨量减少的发病率有明显增高。同时,在存在骨量异常的初发 SLE 患者中,OPG 的基因表达也更低。这也提示 OPG/RANKL/RANK 系统可能是导致 SLE 初发患者骨量减少的一个重要原因。

本实验进一步分析了系统性红斑狼疮疾病活动度与骨量减少、RANKL 及 OPG 基因表达水平的相关性,发现疾病活动度与骨量减少、RANKL 及 OPG 基因表达水平不存在相关性,这可能与样本量较少有

关,还待进一步研究。

总之,SLE 患者的骨量减少是多种因素共同作用的结果,它包括与疾病相关因素和非疾病相关因素<sup>[11]</sup>,其中因为 T、B 细胞功能紊乱导致的 OPG 和 RANKL 基因的表达异常可能是其中之一,但要进一步了解 OPG/RANKL/RANK 系统与 SLE 的关系,探究它在 SLE 患者骨量减少中的具体作用机制,还需要我们继续研究。

#### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Borba VZ, Vieira JG, Kasamatsu T, et al. Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int*, 2008, 18( Epub ).
- [ 2 ] Li Y, Toraldo G, Li A, et al. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass *in vivo*. *Blood*, 2007, 109( 9 ) 3839-3848.
- [ 3 ] Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 2001, 142( 12 ) 5050-5055.
- [ 4 ] Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9( Suppl 1 ) S1-S7.
- [ 5 ] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89( 2 ) 309-319.
- [ 6 ] Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, et al. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*, 2001, 142( 10 ) :1419-1426.
- [ 7 ] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 2006, 12( 1 ) : 17-25.
- [ 8 ] Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*, 1999, 140( 10 ) : 4382-4389.
- [ 9 ] Li EK, Tam LS, Young RP, et al. Loss of bone mineral density in Chinese pre-menopausal women with systemic lupus erythematosus treated with corticosteroids. *Br J Rheumatol*, 1998, 37( 4 ) 405-410.
- [ 10 ] Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*, 2004, 292( 4 ) 490-495.
- [ 11 ] Lee C, Almagor O, Dunlop DD, et al. Disease damage and low bone mineral density: an analysis of women with systemic lupus erythematosus ever and never receiving corticosteroids. *Rheumatology*, 2006, 45( 1 ) 53-60.

( 收稿日期 2008-10-26 )