

· 论 著 ·

RANK 在大鼠股骨干骺端组织上的表达及其意义

田庆显 陆铁 骆辉 沈月新 李虹 周君琳

中图分类号: R36 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)10-0884-04

摘要: 目的 检测大鼠股骨干骺端 RANK 基因的表达及其意义。方法 取 36 只 Wistar 雌性大鼠,随机分为实验组(OVX)组和对照组(Sham-OVX),实验组无菌条件下腹侧入路行完整双侧卵巢摘除;对照组摘除与卵巢重量相同的卵巢周围脂肪组织各 1 块。术后均常规喂食 3w。多聚甲醛主动脉灌注固定半小时后取出股骨干,多聚甲醛液固定 24h,EDTA 溶液中脱钙 4~6w 后,应用免疫组织化学染色的方法检测不同鼠龄的去势大鼠股骨干骺端中 RANK 的表达。结果 在老年雌性大鼠的股骨干骺端皮质骨外膜中 RANK 的表达较 12w 鼠龄的股骨干骺端中 RANK 的表达减弱,骨内膜中 RANK 的表达在不同的鼠龄中变化不明显。在去势大鼠的小梁骨中 RANK 的表达较假手术组大鼠明显增强。结论 雌激素缺乏可以增加大鼠股骨干骺端小梁骨中 RANK 的表达。

关键词: 去势大鼠; RANK

The expression and significance of RANK in rat femoral metaphysis TIAN Qingxian, LU Tie, LUO Hui, et al. Department of Orthopedic Surgery, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China

Corresponding author: TIAN Qingxian, Email: tqxian@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of RANK in rat femoral metaphysis.

Methods A total of 36 male Wistar rats were randomly divided into ovariectomized group (OVX) and sham-operated group (Sham-OVX). Rats in OVX group were performed bilateral ovariectomy under sterile condition. Fat tissue of the same weight of the ovary in adjacent region was cut from the rats in Sham-OVX group. The rats were fed routinely. After irrigation with paraformaldehyde for half an hour, the femoral shafts were collected. After 24h fixation with paraformaldehyde and 4-6w decalcification with EDTA, the expression of RANK in femoral metaphysis in rats of different age was examined using immunohistochemistry method.

Results The RANK expression in periosteum of the femoral metaphysis in aged rat was less than that in 12w-old rats. The RANK expression in endosteum was constant in rats of different ages. The RANK expression in the trabecular bone increased more significantly in OVX rats than in Sham-OVX rats.

Conclusion Estrogen deficiency results in an increase of RANK expression in the trabecular bone of femoral metaphysis in rats.

Key words: Ovariectomized rat; RANK

OPG/RANK/RANKL 系统的发现是近年来骨代谢领域最重要的进展之一^[1-3]。此系统在骨代谢的过程中有重要的作用,RANKL 与 RANK 结合能诱导破骨细胞的前体细胞形成破骨细胞。并且这种诱导破骨细胞形成的作用能被 OPG 拮抗。一些激素或细胞因子如:糖皮质激素、IL-11、PTH、PGE₂ 能拮抗

OPG 的产生,同时刺激 RANKL 的合成,进而促进破骨细胞的发育,产生破骨效应^[4-5];另一些激素或细胞因子如:雌激素、IL-1、IL-6、TNF 能促进 OPG 的合成,抑制破骨细胞的发育,进而阻滞骨吸收^[6]。这些激素与细胞因子几乎都是通过 OPG/RANK/RANKL 系统参与骨代谢的调控作用。

本课题正是在以上研究的基础上,通过检测 RANK 在去势大鼠股骨干骺端的表达的差异来进一步探讨 RANK 在骨代谢中的作用及可能的作用机理。

作者单位: 100020 北京,首都医科大学附属北京朝阳医院骨科
通讯作者: 田庆显, Email: tqxian@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 去势大鼠实验造模建立

取 36 只 Wistar 大鼠(北京维通利华实验技术有限公司),所有大鼠饲养一周适应环境后开始进行实验。将实验动物分为两个组,所有 12 周龄雌性大鼠分在第一组,老年(大于 2 年)雌性大鼠分在第二组,每组均为 18 只,每组又随机分为实验组(OVX)组和对照组(Sham-OVX)。各组大鼠均以 3% 戊巴比妥钠按 1 mL/kg 腹腔注射麻醉后,严格无菌操作,实验各组雌性大鼠均从腹侧入路行完整双侧卵巢摘除,彻底止血后,分两层依次缝合腹膜、肌肉和皮肤;对照组为假手术组,切口同实验组,进入腹腔后切除卵巢周围脂肪组织各一块,重量基本与两侧卵巢重量相同,止血缝合。术后取切除的卵巢组织进行病理检查。术前及术后均常规喂食 3 周。

1.2 实验组织的取材

大鼠以 3% 戊巴比妥钠按 1 mL/kg 腹腔内注射麻醉,用 100mL 生理盐水冲洗和 150mL 4% 多聚甲醛主动灌注固定。固定半小时后,取出股骨干,放入 4℃ 预冷的 4% 多聚甲醛液中 4℃ 固定 24h。然后在 4℃ 0.5 mol/L EDTA 溶液中脱钙,每两周置换一次 EDTA。4~6w 后,当脱钙结束后,取出股骨干应用石蜡包埋。

1.3 大鼠股骨干骺端 RANK 表达的免疫组织化学染色

石蜡包埋的股骨髁,被切成 5 μ m 的切片。组织贴片后,用甲醛脱蜡,在一系列梯度酒精中浸泡,在 PBS 和 0.2% 的过氧化酶中洗涤。室温下,切片在 0.5mg/mL 的牛睾丸透明质酸酶中预处理 30min 后,在室温下正常的胎牛血清中孵育 30min。在切片上分别加入兔抗鼠 RANK 后,在切片上加入生物素附着的可见的辣根过氧化酶的第二抗体。PBS 洗三次,加链霉卵白素/辣根过氧化物,室温 30 min, PBS 洗两次,加 DAB 室温显色 30 min。苏木素复染,脱水、中性树脂封片。

2 结果

2.1 建立去势大鼠模型过程中切除的大鼠卵巢标本的 HE 染色

从图片中我们在卵巢组织表层的皮质部,散在分布着不同发育阶段的卵泡:较小的原始卵泡,逐渐增大的初级卵泡、次级卵泡及体积很大的成熟卵泡,从中可以看到位于中心的卵丘(图 1)。

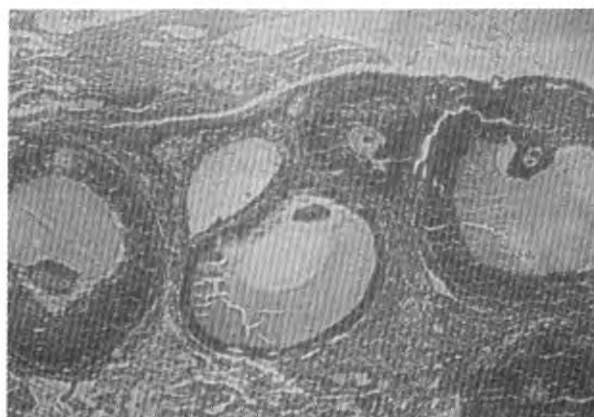


图 1 大鼠卵巢组织的 HE 染色 ($\times 40$)

2.2 不同鼠龄的大鼠股骨干骺端 RANK 的免疫组织化学染色

在 12w 龄雌性大鼠股骨干骺端的皮质骨外膜及骨内膜中,可以检测到 RANK 的高度表达。在老年雌性大鼠干骺端皮质骨外膜中,无论是 RANK 阳性的细胞数还是单个细胞中 RANK 信号的强度均较 12w 龄雌性大鼠中的表达弱,但在骨内膜中, RANK 阳性细胞数没有明显的改变,只是单个细胞中 RANK 信号的强度减弱。在小梁骨中的表达情况与皮质骨相似(图 2,3)。

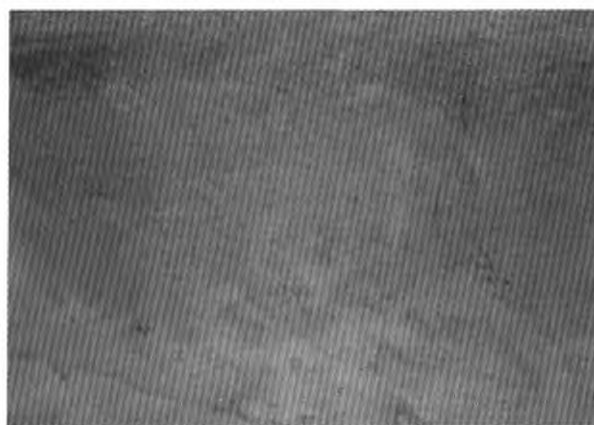


图 2 大鼠股骨干骺端皮质骨外膜及内膜中 RANK 表达 ($\times 100$) 12 w

在假手术组和去势组中,股骨干骺端皮质的骨外膜及骨内膜中 RANK 的表达没有明显的差别,但是在小梁骨中,去势组中 RANK 的表达较假手术组中表达明显增强(图 4,5)。

3 讨论

骨组织始终处于动态的重塑过程中,先通过破骨细胞吸收陈旧的骨组织然后再由成骨细胞生成新的骨组织^[7]。成骨细胞与破骨细胞之间的平衡对

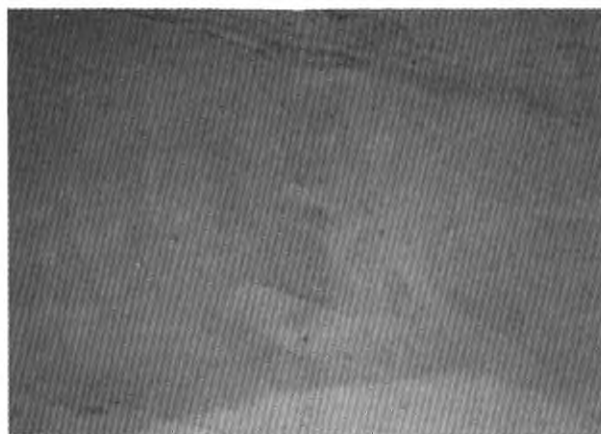


图 3 大鼠股骨干骺端皮质骨外膜及内膜中 RANK 表达 ($\times 100$) 24 m

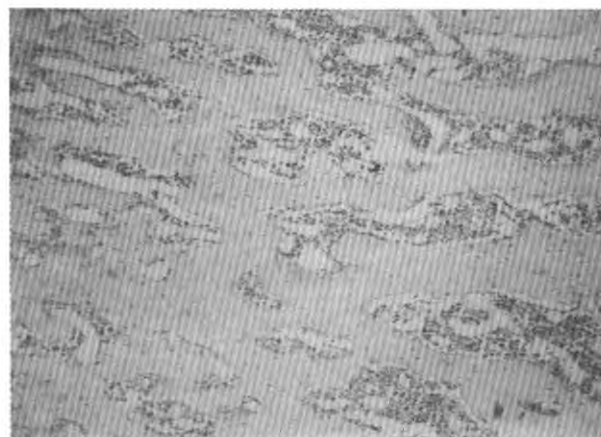


图 4 大鼠股骨干骺端小梁骨中 RANK 表达 ($\times 100$) 假手术组

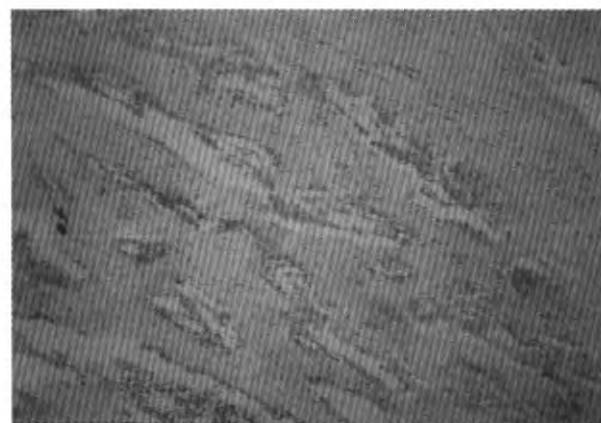


图 5 大鼠股骨干骺端小梁骨中 RANK 表达 ($\times 100$) 去势组

骨骼的发育以及矿物质的代谢具有重要意义。破骨细胞起源于单核/巨噬细胞系造血干细胞,在破骨细胞的发育过程中,RANK/RANKL 信号转导系统以及巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)处于决定性的地位^[8]。RANK 表达于破骨细胞的前提细胞及成熟的破骨细胞表面,可以将 RANKL 及 OPG 的信号转导

入细胞以促进破骨细胞的分化成熟以及细胞功能的各种改变,进而影响骨吸收过程。

在 12w 龄的大鼠中 RANK 在股骨干骺端的骨外膜中的表达较老年大鼠的表达强,在骨骼的发育过程中干骺端的皮质骨是骨重建活跃的地方。因此,高水平的 RANK 表达被认为是骨发育过程中活跃的骨重建引起。另外,在老年大鼠的股骨干骺端 RANK 的表达弱可以认为是骨代谢较 12w 龄大鼠不活跃导致的。除了在对骨发育的过程中骨代谢活跃的部位,其他部位 RANK 的表达变化较小。这与在老年大鼠的骨中 BMP 表达弱相一致^[9],在老年的大鼠骨中骨吸收的减弱较骨形成的减弱相对较轻。这可以解释在老年男性中低转换率骨质疏松的发病机理。

在去势手术后 2 个月,去势大鼠组大鼠股骨远端的总体 BMD 降低 15%,小梁骨 BMD 降低 16%,给去势大鼠组的大鼠应用 17β -雌二醇后能明显逆去势引起的骨丢失^[10]。有研究显示在去势大鼠的骨中 BMP 表达的增加与破骨细胞的数目和活性相一致^[9]。这些数据表明在骨质疏松的大鼠中骨量的降低是由在骨的高转换情况下的骨形成和骨吸收的不平衡引起。在本实验中去势的大鼠的小梁骨中,RANK 的表达较 12 周龄的大鼠中的表达增加,但是在去势的大鼠和假手术的大鼠的皮质骨中 RANK 的表达变化不明显。在去势的大鼠中小梁骨较皮质骨中骨量减少变得明显至少发生在手术后 6 个月。因此,在小梁骨中 RANK 表达较皮质骨中 RANK 表达的增加,可以解释在去势大鼠中由于雌激素缺失引起的骨吸收增加在小梁骨中较皮质骨中严重^[9]。但是目前对骨的不同部位 RANK 表达不同的调节机制还不清楚,但是由于去势引起的全身性的激素改变,小梁骨和皮质骨中骨细胞对雌激素缺乏的反应不同引起了小梁骨中和皮质骨中骨细胞的数量差异。

总之,老年雌性大鼠股骨干骺端皮质骨外膜中 RANK 的表达较 12w 龄的大鼠相应部位 RANK 的表达弱;在去势大鼠股骨干骺端小梁骨中 RANK 的表达较假手术组增强。

【参考文献】

- [1] 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.
- [2] Mizuno A, Amizuka N, Irie K, et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247(3): 610-615.

(下转第 924 页)

变异型与骨密度之间也没有发现显著地统计学关联。鲑鱼降钙素注射剂的浓缩物含量在携带 3673 GA 和 GG 基因型的患者体内是较高的 ($P=0.07$)。他们观察到这两种基因变异与骨折是无相关性的。在他们看来,在维生素 K 环氧化物还原酶复合物亚基 1 (VKORC1) 基因的 3' 局部 (9041 AG 和 GG) 是和低骨密度显著相关的。以上发现支持维生素 K 环氧化物还原酶复合物亚基 1 (VKORC1) 可能在骨质疏松中发挥作用的观点。他们的初步研究结果将证实他们的发现可能对于临床治疗的选择是重要的。

3 总结

总之,基因在骨质疏松症病因中起决定性作用,这是毋庸置疑的。目前已知的参与调控的基因很多,但哪些基因起主要作用以及基因之间相互作用的机制尚不清楚。同时骨质疏松症是一个受遗传、吸烟、酒精摄入、饮食和运动等因素影响的疾病,这决定了研究遗传基因和环境因素之间相互作用会更加重要。如不能很好考虑、控制环境因素的作用,就不能正确评价候选基因与骨量变异等之间的关系。因此,必须考虑基因与环境因素之间的协同作用。

目前对于骨质疏松症相关基因的研究方法基本上是通过临床病例人群和正常人群作对照研究,来探究和证实某一基因与骨质疏松症之间是具有相关性的。但是我们知道某一基因变异它可能和多种影响因素有关系,该基因的这种变异可能是不具有特异性的。这就表明我们研究结果中与骨质疏松症相

关的基因可能与骨质疏松症之间并不具有一一对应的特异性关系,这种基因可能在与骨质疏松症表现出相关性的同时还与多种疾病及影响因素相关,而该基因与这些疾病及影响因素之间的相关性是我们所未知的。这样就会使我们对该基因与骨质疏松症之间的相关性产生怀疑,这就表明该基因表现出的与骨质疏松症的相关性可能只是一种假象,这种“相关性”可能是由那些与该基因相关的我们未知的疾病及影响因素造成的。所以这个问题在骨质疏松症与相关基因关系的研究中有待解决。

【参 考 文 献】

- [1] 何斌,李东风,吴文,等. 护骨素基因启动子区 T950C 多态性与中国广东地区汉族女性骨密度的关系. 南方医科大学学报, 2009, 29 :741-744.
- [2] 赵毅鹏,葛继荣. 绝经后骨质疏松症相关基因多态性的研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2010, 10 :781-785.
- [3] 谭丽君,刘荣,邓红文,等. 全基因组关联分析显示 SOX6 为影响腕部骨密度的候选基因. 中国科学, 2010, 40, (8) :685-693.
- [4] Gunhild Melhus, Brorson SH, Baekkevold ES, et al. Gene Expression and Distribution of Key Bone Turnover Markers in the Callus of Estrogen-Deficient, Vitamin D-Depleted Rats. Calcif Tissue Int, 2010, 87:77-89.
- [5] Vijay K, Yadav PD. Lrp5 and bone formation a serotonin-dependent pathway. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1192:103-109.
- [6] Gerold Holzer, Anna Verena Grasse, Sonja Zehetmayer, et al. Vitamin K epoxide reductase (VKORC1) gene mutations in osteoporosis: A pilot study. Translational Research, 2010, 156: 37-44.

(收稿日期:2011-04-27)

(上接第 886 页)

- [3] 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(7) :3597-3602.
- [4] Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Laroche N, et al. Mice lacking bone sialoprotein (BSP) lose bone after ovariectomy and display skeletal site-specific response to intermittent PTH treatment. Endocrinology, 2010, 151(11) :5103-5113.
- [5] Jimi E, Furuta H, Matsuo K, et al. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. Oral Dis, 2011, 17(5) :462-468.
- [6] Sanchez C, Gabay O, Salvat C, et al. Mechanical loading highly increases IL-6 production and decreases OPG expression by osteoblasts. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(4) :473-481.

- [7] Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. Arthritis Res Ther, 2011, 13(4) :234.
- [8] Yamaguchi M, Weitzmann MN. Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- κ B activation. Cell Biochem, 2011, 355(1-2) : 179-186.
- [9] Ikeda T, Yamaguchi A, Yokose S, et al. Change in biological activity of bone cells in ovariectomized rats revealed by in situ hybridization. J Bone Miner Res, 1996, 11:780-788.
- [10] Mok SK, Chen WF, Lai WP, et al. Icarin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR 106 cells. Br J Pharmacol, 2010, 159(4) :939-949.

(收稿日期:2011-09-01)

RANK在大鼠股骨干骺端组织上的表达及其意义

作者: [田庆显](#), [陆铁](#), [骆辉](#), [沈月新](#), [李虹](#), [周君琳](#)
作者单位: [首都医科大学附属北京朝阳医院骨科, 北京, 100020](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2011, 17(10)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201110010.aspx