

血清中 Sclerostin、RANKL 及 OPG 在老年股骨转子间骨折早期的含量改变及其临床意义

曹燕明 朱晓峰 胡健辉

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013)03-0199-04

摘要: 目的 观察正常成年男女、老年男女及低外力作用下发生髋部骨折的老年男女血清中 sclerostin、RANKL 及 OPG 的含量变化并分析其临床意义。方法 收集正常成年男女、老年男女及在 2010 年 10 月至 2011 年 10 月我院收治的低外力作用下发生股骨转子间骨折的老年患者血清样本。采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测各血清样本中 sclerostin、RANKL 及 OPG 的水平。数据均以均数 $\pm$ 标准差表示。采用 SPSS13.0 对数据进行统计分析。结果 正常成年组(A组): sclerostin 76.6 ± 10.5 pmol/l、RANKL 0.58 ± 0.18 ng/ml、OPG 17.3 ± 4.6 pmol/l; 正常老年组(B组): sclerostin 102.0 ± 12.3 pmol/l、RANKL 0.25 ± 0.12 ng/ml、OPG 12.1 ± 3.5 pmol/l; 老年骨折组(C组): sclerostin 90.8 ± 11.0 pmol/l、RANKL 0.23 ± 0.13 ng/ml、OPG 11.7 ± 3.5 pmol/l。结论 由以上结果经统计分析后得出, sclerostin、RANKL 及 OPG 在不同年龄层次其表达水平具有明显差异, 与年龄有相关性。在老年骨折的早期阶段(骨折后 3 天内)血清中 sclerostin 的含量已出现显著变化。而 RANKL 及 OPG 的含量在骨折早期阶段并无明显改变。由此我们认为, 骨折早期血清 sclerostin 的水平下降在促进骨折愈合的过程中可能起到一定作用, 通过人为干涉抑制 sclerostin 的水平对预防老年髋部骨折可能存在一定的价值。

关键词: Sclerostin; RANKL; OPG; 老年骨折; 骨质疏松

Changes of serum sclerostin, RANKL, and OPG at the early stage of femoral intertrochanteric fractures in senile patients and their clinical significance CAO Yanming, ZHU Xiaofeng, HU Jianhui.

The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China

Corresponding author: CAO Yanming, Email: caoyanmingyisheng@126.com

Abstract: Objective To observe the changes of serum sclerostin, RANKL, and OPG in normal adults, normal senile people, and senile people who had hip fractures with a low external force, and their clinical significance. **Methods** Serum specimen of normal adults, normal senile patients, and senile people who had femoral intertrochanteric fractures with a low external force from October 2010 to October 2011, were collected. Serum sclerostin, RANKL, and OPG were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** were expressed as mean $\pm$ SE. Statistical analysis was conducted using a SPSS17.0 software. Results Normal adult group (group A): sclerostin (76.6 ± 10.5 pmol/l), RANKL (0.58 ± 0.18 ng/ml), OPG (17.3 ± 4.6 pmol/l); Normal senile group (group B): sclerostin (102.0 ± 12.3 pmol/l), RANKL (0.25 ± 0.12 ng/ml), OPG (12.1 ± 3.5 pmol/l); Senile fracture group (group C): sclerostin (90.8 ± 11.0 pmol/l), RANKL (0.23 ± 0.13 ng/ml), OPG (11.7 ± 3.5 pmol/l). **Conclusion** According to statistical analysis of above results, expression of sclerostin, RANKL, and OPG is distinctly different at different stage of age, and it is correlated with age. The serum expression of sclerostin has already apparently changed at the early stage of the senile fractures (within 3 days after fractures). No significant changes are

基金项目: 2011 年广东省自然科学基金项目(S2011010003333)

作者单位: 510260 广州, 广州医学院第二附属医院

通讯作者: 曹燕明, Email: caoyanmingyisheng@126.com

observed in the expression of OPG and RANKL at the early stage of the fracture. Thus, we believe that the decline of serum sclerostin level at the early stage of the fracture may play a key role in the healing process. It may be of great value to prevent senile hip fractures by intervening of serum sclerostin.

Key words: Sclerostin; RANKL; OPG, Senile fracture; Osteoporosis

骨质疏松症是一种以骨量较少、骨组织微结构破坏和骨强度下降为特征,导致脆性增加和易于骨折的全身性代谢性骨病。而骨折,特别是股骨及脊椎骨的骨折往往会导致患者残疾或某些功能丧失,从而加大患者死亡的风险,提高社会的医疗成本。随着我国社会的不断老龄化,骨质疏松性骨折的发病率逐年增高。然而治疗骨质疏松性骨折是相当困难的,因为骨量减少,骨密度降低,内固定治疗后往往达不到所预期的固定强度及稳定性,导致骨折移位、内固定松脱等并发症。而且骨质疏松性骨折愈合所需的时间效长,往往导致其并发症增多。有研究报告指出骨质疏松性骨折骨不连的发生率达到 2~10%,手术后骨折移位发生率 4~40%,内固定失败发生率 1~10%,再次手术率在 3~23%^[1]。实验研究表明骨折修复能力随着年龄的增加而逐渐减退,特别是老年人骨质疏松患者其骨折的愈合能力的退化尤为突出^[2]。在一项动物实验中,分别对 6 周、26 周和 52 周龄的骨折大鼠进行放射学研究,其结果显示周龄越大骨折愈合越慢。但在以往的研究中,骨折愈合过程中的关键基因并无年龄相关性^[3,4]。而老年骨质疏松症患者骨折早期的骨折愈合反应及在这一反应过程中短暂的基因表达改变并没有通过细胞和分子水平充分研究。了解这一机制对治疗骨质疏松性骨折是非常重要的,因为通过干预这一机制,可以大大减少骨不连及其它并发症的发生,并能更好地促进骨折愈合。此外,这一生物过程也许是未来药物干预骨质疏松性骨折愈合的关键。骨折的愈合过程中涉及到骨骼的生长、细胞因子和细胞外基质等。受伤后,骨折断端形成血肿,诱导炎症反应从而启动了骨折的愈合过程^[5,6]。根据组织学研究骨折的愈合过程分为三个阶段。本文旨在探讨人类骨质疏松性骨折早期阶段(骨折后 3 天内) sclerostin、RANKL 及 OPG 的表达量是否与年龄相关及其在骨质疏松性骨折愈合过程中最初阶段其表达水平的变化,为骨质疏松性骨折的早期干预寻找新的靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取我院体检中心同期体检的健康体检者成年男女及老年男女各 28 例,同时选取我院骨科 2010 年 10 月至 2011 年 10 月的轻微外力作用下发生股骨转子间骨折的患者 28 例。成年组(A 组):样本 28 例,其中男性 14 例,女性 14 例;年龄:22 岁~55 岁(平均年龄 42 ± 2.7 岁)。老年组(B 组):样本 28 例,其中男性 14 例,女性 14 例,年龄:65~87 岁(平均年龄 75.2 ± 3.3 岁)。老年骨折组(C 组):样本 28 例,其中男性 14 例,女性 14 例,年龄:66~91 岁(平均年龄 76.2 ± 2.8 岁)。各组受试者无心血管病及外周动脉硬化病史,体格检查无阳性体征,心电图、胸片、肝肾功能、生化常规检查正常;冠状动脉造影正常,并排除合并感染、周围血管病变、结缔组织病、骨骼系统疾病、肿瘤患者及适用免疫抑制剂患者。各组间性别无显著性差异($P > 0.05$),B 组与 C 组间年龄无显著差异($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 实验材料与研究方法

入选者入组后采取清晨静脉血离心后得到血清,放入深低温冰箱(-75°C)内保存,分批检测。Sclerostin、OPG、RANKL 的检测采用 ELISA 试剂盒酶联免疫吸附法。Sclerostin 试剂盒购自奥地利 Biomedica Gruppens 公司;OPG、RANKL 试剂盒购自德国 Immundiagnostik 公司。按照试剂使用说明书配制标准品及对照品,绘制标准曲线,酶标板加样后按要求孵育,测量 450nm 处 OD 值,按照标准曲线计算样品中的检测物浓度,检测过程严格按照试剂及仪器使用说明书进行。

1.3 统计学处理

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,两两样本之间均数比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

3 组受试者共 84 份血清样本中的 sclerostin、OPG、RANKL 表达水平均测得,结果如下表所示:

对上述数据进行统计分析,A、B 两组的 sclerostin、RANKL 及 OPG 数据相比较均有统计学意义($P < 0.05$)。B 组与 C 组数据的 sclerostin 表达水平的差异也有统计学意义($P < 0.05$),但 RANKL 及

OPG 表达水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组统计数据比较情况

Table 1 Comparison of statistical data among each group

	Sclerostin (pmol/l)	RANKL (ng/ml)	OPG (pmol/l)
A 组	76.6 ± 10.5	0.58 ± 0.18	17.3 ± 4.6
B 组	102.0 ± 12.3	0.25 ± 0.12	12.1 ± 3.5
C 组	90.8 ± 11.0	0.23 ± 0.13	11.7 ± 3.5

3 讨论

Sclerostin 是由骨细胞分泌的一种糖蛋白,是骨形态发生蛋白 (BMP) 的抑制因子,对骨的形成起负性调节作用。Sclerostin 对骨形成的抑制作用可能与经典的 Wnt/ β -catenin 信号通道有关。它被证明能结合于 LRP5 及与之密切相关的辅助受体 LRP6,从而抑制经典 Wnt 信号。OPG 是一种骨吸收负性调节蛋白。RANKL 可由成骨细胞、间质细胞和免疫系统细胞表达。RANKL/OPG 调节骨骼重塑与形成的平衡。RANK 是目前已知的 RANKL 唯一的受体。RANK/RANKL 信号通路参与破骨细胞的生成调节。当成骨细胞表达并释放 RANKL,与破骨前体细胞膜上的 RANK 结合并相互作用,启动破骨细胞生成基因的转录,最终诱导成熟的破骨细胞生成。而 OPG 竞争性的与 RANKL 结合,使其失去结合 RANK 的活性,从而使破骨细胞的生成受到抑制,导致破骨细胞数量减少,骨量增加,并最终影响骨密度和骨强度。

通过对成年组 (A 组) 及老年组 (B 组) 血清 sclerostin、RANKL 及 OPG 表达水平的统计学分析。此两组之间的 sclerostin、RANKL 及 OPG 表达水平均具有显著差异性 ($P < 0.05$)。因此,我们认为 sclerostin、RANKL 及 OPG 相关基因的表达在青壮年人群与老年人群中有所不同,这些基因的表达存在年龄的相关性,并且青壮年组 sclerostin 含量小于老年人群组,而 RANKL 及 OPG 蛋白表达则大于老年人群组,符合 sclerostin 及 RANKL/RANK/OPG 系统的作用机制。说明 sclerostin、RANKL/OPG 的表达变化是老年骨质疏松的一个重要原因。而针对 sclerostin、RANKL/RANK/OPG 系统的基因治疗则有待于进一步研究。那么在老年骨折发生后,以上基因的表达是否会发生变化。

通过对老年组 (B 组) 及老年骨折组 (C 组) 的血清 sclerostin、RANKL 及 OPG 的表达水平进行统计学分析后发现, sclerostin 血清表达水平具有差异性 ($P < 0.05$)。但是同样与年龄相关的 RANKL 及

OPG 在骨折后早期的表达却没有发生显著的变化。这就证明在骨折发生后的早期阶段 (骨折后 3 天内), sclerostin 基因的表达已发生明显变化,可能通过其独特的方式影响着骨折的愈合。而 RANKL 及 OPG 的表达虽然与年龄相关,但在骨质疏松性骨折的早期其表达水平并无明显改变,在骨折愈合的起始阶段其作用可能有限。

虽然有研究已经明确说明骨折愈合的一系列过程,但这些研究主要基于健康个体的组织学检查和动物模型的分子生物学研究。基于这些早先的组织学和分子生物学研究,骨折愈合的早期被分成三个阶段,包括早期炎症和合成代谢阶段 (第一个 24 小时到第 3 天),及紧随其后一个非特定的降解阶段 (第 3 天至第 1 周结束的时候) 和有确定条件的合成代谢阶段 (第 1 星期后)^[7-11]。而在我们的研究中,这些患者血清标本均采集于骨折后 3 天内,通过观察各患者在血肿炎症机化期的最初阶段的基因表达变化。以往的研究发现,在这一过程中有很多与炎症相关的基因高水平表达,直到第 3 天,成骨细胞和破骨细胞活性增加。在骨折后的第 1 天,炎症因子 (TNF, IL1B, IL6) 基因的表达变化非常显著,而其中以 IL-6 的表达下降最为明显^[12]。已有研究证明, IL-6 在骨折愈合的早期阶段具有极其重要的作用,其可能通过刺激破骨细胞的相关基因而促进骨折愈合^[13]。骨质疏松性骨折患者的 IL-6 的表达水平和健康的年轻骨折患者的表达水平相类似^[14],骨折愈合的炎症血肿机化期, IL-6 是骨折愈合的关键所在。但是 IL-6 的表达水平在骨质疏松性骨折患者及年轻患者中并无差别。

对于 RANK-RANKL-OPG 系统,有研究证明在骨折后第 3 天至第 7 天,OPG 的表达有所下降,释放抑制信号抑制破骨细胞分化。相应的, RANKL 的表达有所升高刺激破骨细胞的分化。因此, RANKL / OPG 比值的升高,不仅是因为 RANKL 表达的增加,同时还有 OPG 表达的减少。但在我们的研究结果中, RANKL、OPG 在骨折愈合的早期阶段并没有出现迅速而显著的变化。其后来出现的表达水平变化可能是炎症因子或其它一些细胞因子的表达水平变化所引起。因此 RANKL、OPG 作为干预骨折愈合的靶点的价值效小。

骨细胞所合成的 Sclerostin 蛋白,通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,而阻断成骨细胞增殖和分化。这一信号通路对骨折愈合的作用取决于 β -catenin 在骨折修复的不同阶段对成骨细胞的调节作用^[15]。研究

证明,在成年老鼠的骨折愈合过程中,sclerostin 的表达水平受到抑制^[16]。而我们的研究结果也表明,在骨质疏松性骨折后,sclerostin 的表达明显下降,这一变化可以导致 sclerostin 对成骨细胞增殖和分化的抑制被解除,新的骨细胞不断形成,促进骨折的愈合。Sclerostin 的表达水平在骨质疏松性骨折愈合的最初阶段即发生了显著的变化。我们知道以往的研究证明,在骨折愈合的早期过程以 IL-6 为代表的炎症因子的表达谱的变化起着关键作用。而我们的研究发现,sclerostin 的表达在骨折后迅速减少。这一变化使成骨细胞摆脱了 sclerostin 的抑制作用,促进了骨形成基因的表达。因此,sclerostin 将会是人们对骨质疏松性骨折进行药物干预的新的理想靶点。

目前,临床用于治疗骨质疏松性骨折的药物除了经典的钙剂和维生素 D 以外,主要有抑制骨吸收的治疗和促进骨形成的治疗。抑制骨吸收的药物主要是双膦酸盐类和降钙素类。这些药物能增加骨密度,降低骨折的风险。但是由于骨折愈合的过程主要是成骨细胞形成新骨组织的过程。因此,此二类药物对促进骨质疏松性骨折的愈合效果并不理想。促进骨形成的药物主要有甲状旁腺素(PTH),如特立帕肽,其能增加骨密度,降低骨折的危险。并对骨折的愈合有一定的促进作用。但有相关文献报道,接受高剂量的特立帕肽的大鼠出现骨肉瘤的几率增加,它的使用时间不能超过 24 个月,这些也限制了它的推广。

用于治疗骨质疏松症的 sclerostin 单克隆抗体目前已处于临床试验阶段。因为 sclerostin 单克隆抗体能降低血清 sclerostin 的表达水平,接触 sclerostin 对成骨细胞的抑制作用,促进新骨组织的形成。因此,其相对于双膦酸盐类和降钙素类对骨质疏松性骨折的治疗有着无可比拟的优势。此外,与特立帕肽相比 sclerostin 单克隆抗体能更迅速的促进骨的形成、作用时间更持久。并且有实验证明 PTH 促进骨形成的作用,可能是通过一系列的机制调节血清 sclerostin 的表达水平从而影响成骨细胞的活性来完成。因此,如与特立帕肽等 PTH 类药物相比较,sclerostin 单克隆体的作用更直接、有效、安全可靠。因此,除治疗骨质疏松症外,sclerostin 单克隆抗体在促进骨质疏松性骨折的愈合、治疗骨不连等并发症方面也有广阔的前景。

综上所述,在骨质疏松性骨折愈合的早期阶段 sclerostin 表达水平的下降在骨质疏松性骨折的愈合过程中起到一定作用。因此,对于骨质疏松性骨折

的患者,通过干预这些变化,尤其是 sclerostin 表达水平的变化,可能会进一步促进骨折愈合从而大大降低其并发症的发生。

【参 考 文 献】

- [1] Giannoudis P, Tzioupis C, Almkali T, et al. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective. *Injury*, 2007, 38 Suppl 1: S90-99.
- [2] Kon T, Cho TJ, Aizawa T, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1004-1014.
- [3] Desai BJ, Meyer MH, Porter S, et al. The effect of age on gene expression in adult and juvenile rats following femoral fracture. *J Orthop Trauma*, 2003, 17: 689-698.
- [4] Lu C, Miclau T, Hu D, et al. Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res*, 2005, 23: 1300-1307.
- [5] Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, et al. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 1272-1281.
- [6] Nikolaou VS, Efstathiopoulos N, Kontakis G, et al. The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. *Injury*, 2009, 40: 663-668.
- [7] Rundle CH, Wang H, Yu H, et al. Microarray analysis of gene expression during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair. *Bone*, 2006, 38: 521-529.
- [8] Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, et al. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19: 459-466.
- [9] Ivaska KK, Gerdhem P, Akesson K, et al. Effect of fracture on bone turnover markers: a longitudinal study comparing marker levels before and after injury in 113 elderly women. *J Bone Miner Res*, 2007, 22: 1155-1164.
- [10] Street J, Bao M, deGuzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 9656-9661.
- [11] Khan SN, Solaris J, Ramsey KE, et al. Identification of novel gene expression in healing fracture callus tissue by DNA microarray. *HSS J*, 2008, 4: 149-160.
- [12] Dean DB, Watson JT, Jin W, et al. Distinct functionalities of bone morphogenetic protein antagonists during fracture healing in mice. *J Anat*: In press. 2010.
- [13] Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res*, 2003, 18: 1584-1592.
- [14] Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*, 2007, 38 Suppl 4: S3-6.
- [15] Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*, 2007, 32: 103-110.
- [16] Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, et al. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med*, 2007, 4: e249.
- [17] Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, et al. Action of IL-1beta during fracture healing. *J Orthop Res*, 2010, 28: 778-784.

(收稿日期:2012-08-03)

及其临床意义

作者: 曹燕明, 朱晓峰, 胡健辉, CAO Yanming, ZHU Xiaofeng, HU Jianhui
作者单位: 广州医学院第二附属医院, 广州, 510260
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: Chinese Journal of Osteoporosis
年, 卷(期): 2013, 19(3)

参考文献(17条)

1. Giannoudis P;Tzioupis C;Almalki T Fracture healing in osteoporotic fractures:is it really different.? A basic science perspective 2007(Suppl 1)
2. Kon T;Cho TJ;Aizawa T Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing 2001
3. Desai BJ;Meyer MH;Porter S The effect of age on gene expression in adult and juvenile rats following femoral fracture 2003
4. Lu C;Miclau T;Hu D Cellular basis for age-related changes in fracture repair 2005
5. Einhorn TA;Majeska RJ;Rush EB The expression of cytokine activity by fracture callus 1995
6. Nikolaou VS;Efsthathopoulos N;Kontakis G The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time 2009
7. Rundle CH;Wang H;Yu H Microarray analysis of gene expression during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair 2006
8. Schindeler A;McDonald MM;Bokko P Bone remodeling during fracture repair:The cellular picture 2008
9. Ivaska KK;Gerdhem P;Akesson K Effect of fracture on bone turnover markers:a longitudinal study comparing marker levels before and after injury in 113 elderly women 2007
10. Street J;Bao M;deGuzman L Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover 2002
11. Khan SN;Solaris J;Ramsey KE Identification of novel gene expression in healing fracture callus tissue by DNA microarray 2008
12. Dean DB;Watson JT;Jin W Distinct functionalities of bone morphogenetic protein antagonists during fracture healing in mice 2010
13. Gerstenfeld LC;Cho TJ;Kon T Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling:the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption 2003
14. Giannoudis PV;Einhorn TA;Marsh D Fracture healing:the diamond concept 2007(Suppl 4)
15. Caetano-Lopes J;Canh(a)o H;Fonseca JE Osteoblasts and bone formation 2007
16. Chen Y;Whetstone HC;Lin AC Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair:implications for therapy to improve bone healing 2007
17. Lange J;Sapozhnikova A;Lu C Action of IL-1 beta during fracture healing 2010

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201303001.aspx