

松质骨 OPG, RANKL 和 RANK 基因甲基化的相关性研究

杨昕 曹永平* 文立成 孟志超 刘恒 崔云鹏
北京大学第一医院骨科 100034

中图分类号: R 318.17 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 09-1071-04

摘要: **目的** 探求 OPG, RANKL 和 RANK 基因甲基化水平在松质骨组织中的相关性。**方法** 选取 2011 年 11 月至 2012 年 3 月于我科进行人工髋关节置换患者 8 例, 术中留取股骨颈内松质骨标本, 进行标本的骨密度检测, 并采用甲基化免疫共沉淀的方法检测标本 OPG, RANKL 和 RANK 基因的甲基化水平, 进行相关性的统计学分析。**结果** 该组患者股骨颈内松质骨骨密度均值为 0.056 g/cm^3 , OPG 基因甲基化率中值为 0.115%, RANK 和 RANKL 基因甲基化率分别为 0.087% 和 0.079%。OPG 基因和 RANKL 基因甲基化率呈明显正相关($r=0.952, P<0.01$), OPG 基因和 RANK 基因甲基化率也呈明显的相关性, 为正相关($r=0.976, P<0.01$), 但 OPG 基因和 RANKL 基因甲基化率的比值与标本的骨密度值没有明显的相关性($P>0.01$)。**结论** 在松质骨组织中 OPG 基因甲基化水平分别和 RANKL、RANK 基因甲基化水平存在明显的正相关, 但没有发现甲基化率比值与松质骨的骨密度存在明显的相关性。

关键词: 松质骨; 基因; 甲基化

Correlation study of gene methylation of OPG, RANKL, and RANK in the cancellous bone

YANG Xin, CAO Yongping, WEN Licheng, MENG Zhichao, LIU Heng, CUI Yunpeng

Department of Orthopedics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Corresponding author: CAO Yongping, Email: freehorse66@163.com

Abstract: **Objective** To study the relationship among OPG, RANKL, and RANK gene methylation in the cancellous bone. **Methods** A total of 8 patients, who had total hip arthroplasty from November 2011 to March 2012 in our department, were included. During the operations, the cancellous bone of the femoral neck was collected. The bone mineral density (BMD) of the cancellous bone was detected. The methylation level of OPG, RANKL, and RANK gene was detected using methylated DNA immunoprecipitation-quantitative PCR method (MeDIP-qPCR). The correlation analysis was also performed. **Results** The average BMD of the cancellous bone was 0.056 g/cm^3 . The average methylation level of OPG, RANKL, and RANK gene was 0.115%, 0.087%, and 0.079%, respectively. The methylation level of OPG gene was positively correlated with the mythylation level of RANKL and RANK gene ($r=0.952, P<0.01$; $r=0.976, P<0.01$; respectively). But no correlation between the ratio of OPG, RANKL gene and BMD of the cancellous bone was observed ($P>0.01$). **Conclusion** In the cancellous bone, the methylation level OPG gene methylation level is positively correlated with the mehtylation levels of RANKL gene and RANK gene. But there is no apparent relationship between the mehtylation levels of OPG and RANKL gene and BMD of the cancellous bone.

Key words: Cancellous bone; Gene; Methylation

DNA 甲基化是一种表观遗传修饰方式, 是可逆的 DNA 自然化学修饰方式。DNA 甲基化是指以 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 为甲基供体, 在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, DNMTs) 的作用下将甲基转移到胞嘧啶的 C-5 上。DNA 甲基化主要发生在基因

的 5' 端启动子对称 CpG 序列中的 C 碱基上。CpG 岛的甲基化会干扰一些转录因子与基因调控区的结合或直接抑制 RNA 聚合酶活性而抑制基因的表达^[1]。此过程具有可逆性, 且不改变 DNA 的序列和遗传密码。甲基化作为一种调控机制可以关闭某种特定的基因, 异常的甲基化表达则可能是导致肿瘤和其他疾病, 尤其是年龄相关性疾病的重

*通讯作者: 曹永平, Email: freehorse66@163.com

要原因^[2]。DNA 甲基化已经广泛应用于各种肿瘤疾病、糖尿病、骨性关节炎和帕金森等疾病发病机理的研究。目前,在对骨代谢的研究中对 DNA 甲基化的研究还较少。

骨代谢已被证实和多个基因的表达有相关性,包括 VDR,ESR,LRP,OPG, RANK,RANKL, COLIA1 和 SOX6 等。这些基因的翻译,转录等环节都影响相关蛋白的合成,对蛋白靶点的作用产生影响,对骨代谢的调节起到一定的作用。有研究表明部分基因的甲基化能够影响成骨细胞和破骨细胞的分化和细胞活性。Penolazzi^[3] 和 Lv^[4] 发现雌激素受体 α (estrogen receptor α , Er α) 基因外显子 F 的转录起始点存在甲基化,与成骨细胞的生长和分化活性有密切关系。为研究股骨颈内松质骨标本中 OPG、RANK 和 RANKL 基因甲基化程度以及相关性,我们采用 DNA 甲基化免疫共沉淀-实时定量聚合酶链反应 (Methylated DNA immunoprecipitation-Real time quantitative polymerase chain reaction, MeDIP-qPCR) 方法对我院进行人工髋关节置换手术的 8 例患者的股骨颈内松质骨进行 OPG、RANK 和 RANKL 基因甲基化率的检测,并分析以上基因甲基化程度的相关性,为进一步研究骨质疏松症与基因甲基化的相关性打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

5-甲基胞嘧啶抗体,小鼠抗 IgG 磁珠 (BioLabs S1430S), 蛋白酶 K (EPICENTRE), RNA 酶 A (EPICENTRE), DL2000 DNA 标记物 (Takara), PCR 试剂盒 (Superarray), 超声波破碎仪 (Diagenode), 紫外分光光度仪 (Agilent), 电泳仪 (北京天能), 梯度 PCR 仪 (宝生物工程有限公司), PCR 仪 (Applied Biosystems)。

1.2 标本采集和保存

2011 年 11 月至 2012 年 3 月于我科进行人工髋关节置换患者 8 例,年龄为 42 ~ 78 岁,平均年龄 66.7 岁,男 2 例,女 6 例。股骨颈骨折 5 例,髋关节骨性关节炎 2 例,髋臼发育不良 1 例 (见表 1)。术中截除股骨头后,取股骨颈内松质骨约 1 cm³,保持完整。液氮冻存。

1.3 松质骨标本骨密度测定

使用 XR-800 型双能 X 线骨密度仪 (美国 Norland 公司) 附带微小体测量软件检测松质骨标本骨密度。

表 1 病例记录表

Table 1 Case record

病例编号 Case Number	性别 Gender	年龄 Age	所患疾病 Diagnosis
1	女 Female	65	右股骨颈骨折 Femoral neck fracture (R)
2	女 Female	78	左股骨颈骨折 Femoral neck fracture (L)
3	女 Female	78	左髋关节病 Hip arthritis (L)
4	男 Male	53	左股骨颈骨折 Femoral neck fracture (L)
5	女 Female	42	右髋臼发育不良 acetabular dysplasia (R)
6	女 Female	74	左股骨颈骨折 Femoral neck fracture (L)
7	男 Male	70	右股骨头坏死 Avascular necrosis of femoral head (R)
8	女 Female	74	左股骨颈骨折 Femoral neck fracture (L)

1.4 标本处理和甲基化检测

1.4.1 DNA 提取:取组织 25 mg,利用 Biopulverizer 在液氮中破碎,转入 15 ml 的离心管中。加入蛋白酶 K 和 RNase 消化。加入等体积的酚-氯仿溶液,离心取上清。沉淀后加入 200 μ L 纯水溶解后测 DNA 浓度,取 5 μ L 于 2% 琼脂糖凝胶电泳 (图 1)。-70℃ 保存样品。

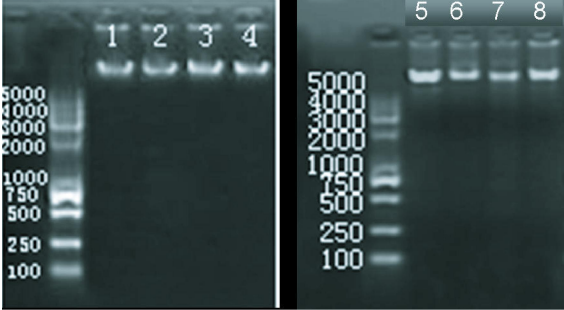


图 1 股骨颈内松质骨组织 DNA 提取电泳图
Fig. 1 Electrophoretogram of DNA isolated from the cancellous bone of the femoral neck

1.4.2 超声处理:将超声仪器 Bioruptor 调到中档。于 1.5 ml Ep 管中,将样品 DNA 浓度均稀释到 30 ng/ μ L,体积均为 300 μ L。超声 4 min,取 5 μ L 于 2% 琼脂糖凝胶电泳 (图 2)。

1.4.3 DNA 沉淀 (MeDIP):取 250 μ L DNA 样本加入 60 μ L IgG 磁珠悬液,4℃垂直混匀器上混匀 1 h,转移上清。在转移后的上清中加入 8 μ g 5-甲基胞嘧啶抗体,4℃垂直混匀器上孵育过夜。加入小鼠抗

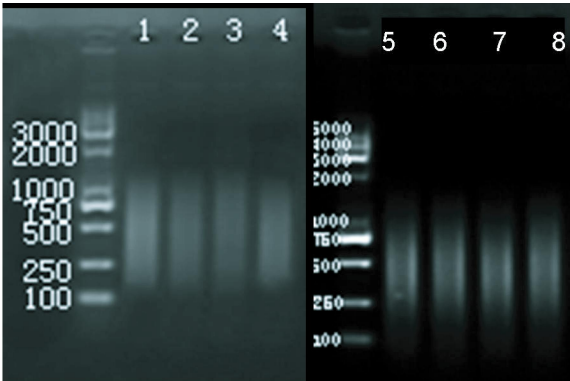


图2 股骨颈内松质骨组织 DNA 超声处理后电泳图
Fig. 2 Electrophoretogram of DNA from the cancellous bone of the femoral neck sheared by ultrasound.

IgG 磁珠,4℃垂直混匀器上孵育;用预冷的 EDTA + Tris + Triton X-100 洗涤 IgG-抗体-DNA 复合物,洗完 后放到磁力架上,放置 10 min 直至磁珠全部被吸附 到管壁上,弃上清。

1.4.4 DNA 纯化:向洗脱的 MeDIP DNA 中加入等 体积的酚-氯仿溶液,剧烈震荡 15 s,离心 10 min,转 移上清。加入 5M 的 NaCl 和无水乙醇,离心后弃上 清。乙醇清洗沉淀,风干和 20 μL 纯水溶解沉淀,用 Nanodrop 测 DNA 浓度。

1.4.5 引物:采用软件 Primer 5.0 设计 RT-PCR 扩增 引物。扩增 OPG 的正向和反向引物序列分别为 F: 5' GAGTCCGATCCAGCCAAGA3' 和 R: 5' GTACG GCGGAAACTCACAG3'。扩增 RANKL 的正向和反向 引物序列分别为 F:5' TCGCTGGGAAACAACACTG3' 和 R:5' GGGAAGGGAAAGGTAGATGC3。扩增 RANK 的正向和反向引物序列分别为: F: 5' CCGTT CCCGATACGATTCT3' 和 R:5' GGCAAGCCCGCAGT TCA3'。

1.4.6 Realtime PCR 反应:将 45 μL 超声处理后 DNA 样本和 20 μL MeDIP DNA 样本分别配置 Realtime PCR 反应体系。轻弹管底将溶液混合, 5000 rpm 短暂离心。将 9 μL 混合液加到 384-PCR 板对应的每个孔中。再加入对应的 1 μL DNA。将 上述 384-PCR 板置于 Realtime PCR 仪上进行 PCR 反应。分别记录 Ct 值,分别用 CtInput 和 CtMeDIP 表示。

1.5 数据收集和處理

1.5.1 数据校正:数据采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法进行分析。实 时定量 PCR 时各样品加样量均为 1 μL。甲基化率 校正公式:甲基化率 = $2^{(CtInput - CtMeDIP)} \times Fd \times 100\%$ 。 Fd 为用于 PCR 和 MeDIP 的 DNA 样本体积比。

1.5.2 统计学分析

采用 SPSS 软件(13.0 版)进行统计分析,均值 以 $\bar{x} \pm s$ 表示,相关性分析采用 Spearman 分析(双侧 检验), $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 该组患者股骨颈内松质骨骨密度为 0.042 ~ 0.066 g/cm³,均值为 0.056 g/cm³。

2.2 该组患者标本 OPG 基因甲基化率中值为 0.115% (0.044 ~ 0.545%),RANK 和 RANKL 基因 甲基化率分别为 0.087% (0.041 ~ 0.351%) 和 0.079% (0.038 ~ 1.657%) (表 2)。

表 2 甲基化 DNA 免疫沉淀(MeDIP)的效率结果(%)

Table 2 The result of MeDIP (%)			
病例编号 Case Number	OPG	RANK	RANKL
1	0.441	0.351	1.657
2	0.138	0.098	0.079
3	0.545	0.191	0.374
4	0.073	0.047	0.075
5	0.058	0.065	0.068
6	0.197	0.156	0.250
7	0.044	0.041	0.038
8	0.092	0.075	0.078

2.3 OPG 基因和 RANK 基因甲基化率呈明显正相 关($r = 0.952, P < 0.01$),OPG 基因和 RANKL 基因 甲基化呈明显正相关($r = 0.976, P < 0.01$),RANK 和 RANKL 基因甲基化呈明显正相关($r = 0.976, P < 0.01$)。OPG 和 RANKL 基因甲基化率的比值为 1.053 ± 0.201 ,与骨密度没有明显的相关性($P > 0.01$)。

3 讨论

OPG,RANK 和 RANKL 蛋白是与骨代谢密切相 关的蛋白。OPG 可与 RANKL 特异性结合,抑制破 骨细胞前体细胞的分化和成熟破骨细胞的骨吸收, 并诱导破骨细胞凋亡,从而抑制破骨细胞介导的骨 吸收^[5]。RANK 是 RANKL 的受体,二者特异性结 合可刺激破骨细胞前体细胞分化,活化成熟破骨细 胞,阻止破骨细胞凋亡并延长其寿命,促进骨吸 收^[6-8]。因此,研究 OPG、RANK 和 RANKL 基因表 达调控因素对骨代谢的研究十分重要。

本研究采用 MeDIP-qPCR 的方法在股骨颈内松 质骨中检测到 OPG,RANK 和 RANKL 基因的甲基 化。MeDIP 是采用 5-甲基胞嘧啶抗体进行 DNA 甲

基化片段富集,可以更加有效提取甲基化的 DNA 片段,对于 CpG 密度较低的甲基化区域和 DNA 浓度较低的标本的检测更加有效^[9,10]。本研究检测到股骨颈松质骨内 OPG 和 RANKL 基因甲基化水平较 Delgado^[11]报道的股骨头骨组织的甲基化水平低,考虑可能存在人群年龄和人种不同等因素,将进一步对大样本病例标本进行检测。

本研究发现股骨颈内松质骨 OPG 和 RANK、RANKL 基因甲基化水平存在明显的相关性,具有统计学意义($P < 0.01$)。此结果表明在松质骨内 RANK 和 RANKL 基因甲基化水平越高,OPG 基因甲基化水平也会相应升高。Delgado^[11]在人的骨组织上发现了存在 RANKL 和 OPG 基因甲基化的现象,并证实 5-aza-dC 可以抑制细胞 DNA 的甲基化,降低 RANKL 和 OPG 基因甲基化,使 RANKL 和 OPG 表达增加。所以,OPG、RANK 和 RANKL 基因的甲基化水平能够在一定程度上反映蛋白合成水平,对骨代谢平衡的调节起到重要作用。因此,我们推测在骨质疏松症患者中 OPG、RANK 和 RANKL 蛋白水平的变化可能和相关基因的甲基化水平有关,对进一步深入研究骨质疏松症的表观遗传学发病机理有一定的指导意义。

在骨代谢平衡中,OPG、RANK 和 RANKL 之间存在一定的平衡关系。特别是 OPG/RANKL 比值对破骨细胞的活化有明显的作用,比值越大,破骨细胞活化越少,介导的骨吸收作用越小;比值越小,破骨细胞前体细胞分化越多,破骨细胞骨吸收作用越强^[12,13]。因此,OPG 在 RANKL 信号通路上唯一的负性调节因子。在骨质疏松症中,OPG/RANKL 比值明显下降,OPG 表达下降,RANKL 表达明显增加,使得破骨细胞骨吸收作用明显增强,而骨吸收抑制作用明显减弱^[14,15]。本研究对 OPG 和 RANKL 基因甲基化率的比值进行了分析,与患者标本的骨密度没有明显的相关性($P > 0.01$),提示该比值可能对骨密度值的提示作用不佳。因为基因在表达过程中受到多种因素的调控,所以 OPG 和 RANKL 基因甲基化率的比值不一定与相应蛋白水平的比值对应,需要进一步检测 OPG/RANKL 蛋白的比值,才能真实反映骨代谢的情况。

本研究采用表观遗传学的方法对人体骨组织 OPG、RANK 和 RANKL 基因进行了初步的研究,为进一步探讨 DNA 甲基化在骨代谢中的作用打下基础。由于基因的表达受到翻译、转录和蛋白合成过程中多种因素的影响和调控,所以 DNA 甲基化在骨

代谢中的作用还需要进行深入研究和大量实验研究的验证。

【 参 考 文 献 】

[1] De Carvalho DD, You JS, Jones PA. DNA methylation and cellular reprogramming [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20: 609-17.

[2] Roach HI, Aigner T. DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2007, 15(2):128-137.

[3] Penolazzi L, Lambertini E, Giordano S, et al. Methylation analysis of the promoter F of estrogen receptor alpha gene: effects on the level of transcription on human osteoblastic cells [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 91(1-2):1-9.

[4] Lv H, Ma X, Che T, et al. Methylation of the promoter A of estrogen receptor alpha gene in hBMSC and osteoblasts and its correlation with homocysteine [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 355(1-2):35-45.

[5] Nagai M, Sato N. Reciprocal gene expression of osteoclastogenesis inhibitory factor and osteoclast differentiation factor regulates osteoclast formation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 25(7):719-723.

[6] Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, et al. Determination of the three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus [J]. Endocrinology, 2001, 142(4):1419-1426.

[7] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation [J]. Cell, 1998, 93(2):165-176.

[8] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph node organogenesis [J]. Nature, 1999, 397(6717):315-323.

[9] Nair SS, Coolen MW, Stirzaker C, et al. Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias [J]. Epigenetics, 2011, 6(1):33-44.

[10] Taiwo O, Wilson GA, Morris T, et al. Methylome analysis using MeDIP-seq with low DNA concentrations [J]. Nat Protoc, 2012, 7(4):617-636.

[11] Delgado-Calle J, Sañudo C, Fernández AF, et al. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone [J]. Epigenetics, 2012, 7(1):83-91.

[12] Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2004, 4(3):268-275.

[13] Hofbauer LC, Schoppert M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases [J]. JAMA, 2004, 292(4):490-495.

[14] Jabbar S, Drury J, Fordham JN, et al. Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis [J]. J Clin Pathol, 2011, 64(4):354-357.

[15] Xu S, Wang Y, Lu J, et al. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-induced osteoporosis [J]. Rheumatol Int, 2012, 32(11):3397-403.

松质骨 OPG, RANKL 和 RANK 基因甲基化的相关性研究

作者:

[杨昕](#), [曹永平](#), [立成](#), [孟志超](#), [刘恒](#), [崔云鹏](#), [YANG Xin](#), [CAO Yongping](#), [WEN Licheng](#), [MENG Zhichao](#), [LIU Heng](#), [CUI Yunpeng](#)

作者单位:

[北京大学第一医院骨科 100034](#)

刊名:

[中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名:

[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期):

2014(9)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201409009.aspx