

骨折早期调节 RANKL 表达对骨折愈合影响的实验研究

沈业彤* 张学斌 吴丽红 刘果彤 王琳 陶敏燕 徐凤琳
齐齐哈尔医学院附属第一医院骨外科, 齐齐哈尔 161041

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 03-0362-04

摘要: 目的 通过对大鼠股骨骨折早期局部应用重组人骨保护素 Fc 融合蛋白(OPG-Fc),研究调节骨保护素(OPG)和核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)的表达变化对骨折早期的影响,探讨其表达调节方式及作用机制。方法 48只雌性SD大鼠随机分成实验组和对照组,每组24只。建立大鼠股骨骨折模型,于术后第7天、第14天、第21天、第28天4个时间节点分批处死模型,标本切片后通过HE染色观察骨折愈合情况,免疫组织化学染色研究破骨细胞数量变化。结果 HE染色示单纯骨折组呈典型骨折愈合过程,而骨折局部注射OPG组骨痂形成及改造提前,骨折愈合加速。免疫组织化学染色显示在第7天、第14天、第21天、第28天各个时间节点单纯骨折组破骨细胞计数值均高于骨折应用OPG组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 骨折早期调节RANKL表达,当RANKL/OPG比值减小时,骨折局部破骨细胞减少,骨痂形成增多,骨折愈合加速。

关键词: 骨折愈合; 早期调节; 骨保护素; 核因子- κ B受体活化因子配体

Experimental study on the effect of early fracture reluating rankl expression to fracture healing

SHEN Yetong, ZHANG Xuebin, WU lihong, LIU Guotong, WANG Lin, TAO Minyan, XU Fenglin

The First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161041, China

Corresponding author: SHEN Yetong, Email: shenyetong7@sohu.com

Abstract: Objective To investigate the effect of regulating the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptoractivator of nuclear factor-KB ligand (RANKL) on early fracture by local application of OPG-Fc to rats with femoral fracture in the process of early fracture, and so as to explore its expression regulation mode and related mechanism. **Methods** 48 female SD rats were randomly divided into the experimental group and the control group respectively, and 24 pieces per group. And then open fracture model of rats was established, the animals were sacrificed at 4 time points (7, 14, 21 and 28 day) after operation, after callus specimens were sectioned, the information of fracture healing was observed by HE staining and the change of Osteoclast number was detected by immunohistochemical staining. **Results** HE staining indicated that the process of fracture healing in the pure fracture group was classical, but the callus formation and reforming in the fracture group of local injections of OPG were ahead of schedule, and fracture healing was accelerated. Immunohistochemical staining showed that the osteocyte count values of the pure fracture group were higher than that of the OPG application fracturegroup at all time points of 7, 14, 21 and 28 day, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** when regulating RANKL expression in the early stage of fracture, with the decreasing of RANKL/OPG, the number of local osteoclast declines, callus formation increases, and fracture healing is accelerated.

Key words: Fracture healing; Early regulation; OPG; RANKL

OPG/RANKL/RANK系统自1997年被发现以来,被认为是骨科研究领域中的一项重大突破,许多细胞因子、激素等影响因素均可通过骨保护素(OPG)的竞争机制来调节核因子- κ B受体活化因子

配体(RANKL)的表达,从而调控OPG、RANKL和核因子- κ B受体活化因子(RANK)之间的比值,直接对破骨细胞的分化和功能产生决定性作用,OPG由成骨细胞及骨髓基质细胞分泌,可与RANKL结合,竞争性抑制其表达,来调节破骨细胞的活性及凋亡过程,体内有很多激素及调控因子均可通过影响OPG/RANKL的比值来调节其表达,并影响骨代谢。骨折早期的骨吸收阶段,破骨细胞起着重要的

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541920)

* 通讯作者: 沈业彤, Email: shenyetong7@sohu.com

作用,OPG在软骨内成骨过程中也有着重要的影响,既往研究表明,BMP、雌激素、IL-1、1,25-(OH)₂D₃、TGF和TNF等都能通过调节OPG mRNA的表达^[1-5],通过竞争性抑制来调节RANKL的表达,使破骨细胞的活性降低,减少骨吸收,减轻固定后废用性骨质疏松,对缩短骨折的愈合时间,防治骨缺损、骨坏死、骨折不愈合及再骨折均具有重要的临床意义。本项目通过对鼠的骨折模型进行实验治疗,以探讨应用基因技术治疗骨折模式的可行性及有效性,同时为进一步研究该系统对骨生成及代谢方向的影响机制奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

重组人骨保护素Fc融合蛋白(Recombinant Human OPG-Fc)剂型(50 μg/支)、二甲苯溶液、蜂蜡、酒精溶液、苏木精染液、石蜡溶液、1%盐酸乙醇、1%伊红酒精溶液、树胶等。TRAP免疫组化染色试剂盒。健康雌性3个月龄SD大鼠48只,体重270 g~320 g,由齐齐哈尔医学院动物实验研究室提供。

1.2 动物分组和模型

48只大鼠随机分为骨折+OPG组和单纯骨折对照组,每组各24只并标记组别。备皮后以10%水合氯醛行腹腔注射麻醉。取右大腿外侧切口,钝性分离至股骨干,经股骨中段(大转子下1.5 cm处)以直径1.0 mm牙科钻钻过,纵向形成规整的3 mm×1 mm不完全骨折及骨缺损槽,保持骨缺损两侧骨折完好,并有足够强度不形成完全骨折,缝合后单纯骨折组局部注射1 ml生理盐水,OPG组将重组人骨保护素Fc融合蛋白50 μg溶于10 ml注射用水中,即浓度为5 μg/ml,亦以1 ml局部注射^[6],术前及术后两组大鼠均肌注庆大霉素一次预防感染,淘汰失败模型,并补充,保持数目不变。

1.3 标本采集和处理

两组动物于术后第7、14、21、28d 4个时间节点分批处死,每组每个节点各6只,在无菌操作下将骨折处骨痂组织截取,用4%的多聚甲醛在4℃下固定24 h,用20%的乙二胺四乙酸以脱钙,脱水,透明,包埋。将标本均沿纵轴中线切片,连续3张,厚度5 μm,将一张行HE染色,而另两张行免疫组化染色。

1.4 观察指标

1.4.1 HE染色:制好的切片经脱蜡、水化、苏木素染核、盐酸及酒精分化、伊红染浆、再脱水透明,最后

以中性树胶封片,在光镜下观察其骨痂生长情况及其组织形态。

1.4.2 免疫组化染色:将切片脱蜡复水,首先孵育液A液:0.2 mol/L醋酸缓冲液8 ml;再孵育液B液:取六偶氮副品红1 ml;再孵育液C液:在1 ml N,N-二甲基甲酰胺中溶解20 mg 萘酚AS-BI磷酸酯。然后将A、B液按比例混和,并将pH值调到5.0,加入C液,最后将141 mg 酒石酸钾钠加入。破骨细胞固定后,切片浸入孵育液内,封片。镜下观察破骨细胞数量。

1.5 数据收集与处理

将染色后的切片在光学显微镜400倍镜头下观察,并计数TRAP阳性染色的破骨细胞。在显微镜下,染色阳性的破骨细胞胞浆呈酒红色,将这两张切片中的破骨细胞数量分别计数。选择染色明、分布均的部位进行破骨细胞计数,计数10个高倍视野下的破骨细胞总数为值,即该张切片的破骨细胞数。样本的数值为两张切片的破骨细胞总数的平均数。然后采用SPSS11.0软件分析,对各时间点两组数值行t检验,最后比较,如P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 骨痂组织形态观察

HE染色切片低倍镜下观察发现每时间点骨折+OPG组,骨痂直径平均值均大于单纯骨折组,骨痂生成速度快及生成量增多。具体情形如下:7d时,骨折+OPG组骨折处可见大量的软骨细胞在形成的纤维肉芽组织中,并有明显的成骨出现,软骨基质形成,软骨明显膜内化骨及软骨内化骨现象,骨折间隙的纤维肉芽组织中有大片软骨细胞骨膜增生变厚,其下出现新生骨组织,有大量成骨细胞聚集;单纯骨折组骨痂中纤维组织成分多,出现散在少量软骨细胞及成骨细胞,骨膜有增厚,但新生骨组织明显较少。第14天时,骨折+OPG组纤维性骨痂减少,软骨性骨痂增多并向编织骨转化;单纯骨折组软骨性骨痂少。21天时,骨折+OPG组骨折间隙编织骨逐渐聚集,呈连续性骨痂,骨小梁逐渐形成并增多;单纯骨折组骨折有大量软骨细胞,骨小梁形成少。28天时,骨折+OPG组骨折处进一步融合、连接,出现板层骨,骨量增多;单纯骨折组仍有软骨组织,骨组织成熟慢、量较少,见图1、图2。

2.2 光学显微镜下对破骨细胞观察并计数

将骨折+OPG组、生理盐水组所计数的破骨细

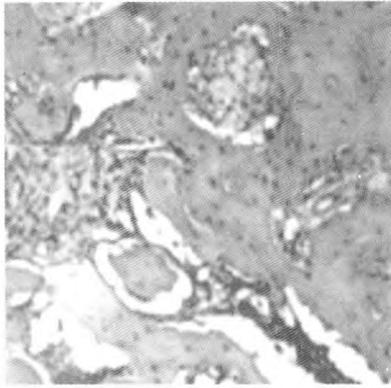


图1 单纯骨折组 28 天时低倍镜下见软骨组织多,骨组织少

Fig.1 The simple fracture group was lower than that in the 28 days of the fracture group, and there were more cartilage tissues and less bone tissue

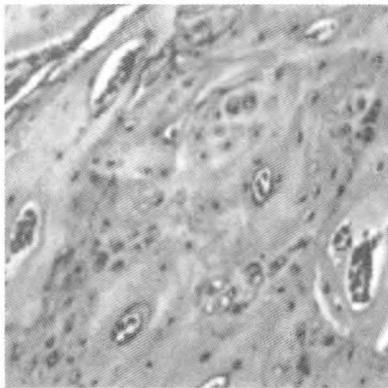


图2 骨折 + OPG 组 28 天时低倍镜下见骨量多,多为板层骨,骨成熟度高

Fig.2 The fracture + OPG group was lower than that in 28 days, and the number of bone was much more than that of lamellar bone, and the height of bone was high

胞个数取平均值,得出 7d、14d、21d、28d 的两组中每个样本的破骨细胞个数的平均数,OPG 组分别为 3.153 ± 0.057 , 2.964 ± 0.162 , 1.831 ± 0.068 , 5.462 ± 0.073 , 对照组分别为 5.536 ± 0.035 , 8.859 ± 0.041 , 5.464 ± 0.027 , 7.427 ± 0.052 再对两组破骨细胞数进行统计学分析。见图 3。

3 讨论

在实验研究及临床治疗中观察发现,骨折早期即有破骨细胞参与骨吸收及骨生成的动态平衡,并为其重要调节因素之一。RANKL 为破骨细胞生长及分化所必需的细胞因子^[7],它通过与 RANK 结合使破骨细胞活性增强,达到骨吸收加强的效果,OPG

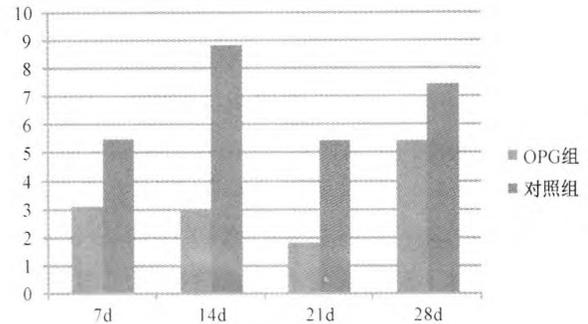


图3 OPG 组与对照组在不同时间节点破骨细胞数量对比图

Fig.3 OPG group and control group at different time of the number of broken bone cells

是 RANKL 的诱骗受体,通过竞争性抑制作用,可以减少 RANKL 与 RANK 结合,从而抑制破骨细胞分化、成熟,并且成熟破骨细胞活性也受到抑制^[8-9]。OPG 还可以激发成骨活性,通过促进成骨细胞样细胞分化成熟为成骨细胞来完成,进而促进新骨组织形成^[10]。AyaShiotani 等^[11] 也通过研究证实了 OPG/RANKL/RANK 系统对破骨细胞的分化和重吸收的作用。体内诸多激素、细胞因子也是通过 RANKL/RANK/OPG 环路来实现调控破骨细胞的活化和功能的^[12]。破骨细胞表面的 RANK 是 RANKL 的唯一受体,成骨细胞分泌 OPG,竞争性地抑制了 RANKL 与 RANK 结合,从而抑制了破骨细胞的生物活性及其成熟^[13]。骨形态发生蛋白 BMPs、PGE2、甲状旁腺激素 PTH、转化生长因子 TGF β 、雌激素、糖皮质激素等对破骨细胞的抑制作用均是通过调节该通路,改变成骨细胞系的 OPG 和 RANKL 的表达而完成的。本实验应用 OPG-Fc 可排除其他因素,达到直接下调 RANKL 表达的目的,与应用腺病毒改变基因表达效果相同,使 OPG/RANKL 比值增大,为基因治疗奠定实验基础,以往实验显示该蛋白药效为局部作用,半衰期约 6-7 天,药物性能持续约 30 天,可完全满足本实验要求,也是 28 天后 OPG 组破骨细胞数量开始回升的原因之一。

Kon 等^[14] 发现 OPG 表达高峰在骨折后 24 小时内和骨折后第 7 天;而 RANKL 表达高峰在骨折后第 3 天和第 14 天。在我们实验研究中,术后即应用 OPG-Fc,观察到第 7 天、第 14 天、第 21 天时间点明显下调了 RANKL 的表达,破骨细胞数量递减,28 天时破骨细胞数量回升,考虑为随着药物代谢,性能下降导致,也可能与骨折后期骨改造增强,破骨细胞活性增强有关,对照组破骨细胞数量也回升,也说明了

这个问题。对照组显示破骨细胞活性最活跃是在第14天和第28天以后,与RANKL表达高峰相符,对比其临床意义,考虑第一个高峰可促进骨折断端及坏死骨的吸收,第二个高峰有利于骨痂的塑形改造,结合低倍镜下观察骨痂愈合情况,充分说明骨折早期下调RANKL表达,能明显抑制破骨细胞活性,抑制早期骨折端骨质的吸收,打破骨生成与骨吸收的动态平衡,使骨痂明显增多,并可促进骨成熟加速,减少骨吸收,提高骨密度,28天后随着药效的减低,对骨折后期骨痂的塑形改造并不会产生严重影响,本实验通过研究骨折愈合不同阶段骨痂 OPG/RANKL 的表达变化,提示 OPG/RANKL 比值决定骨代谢方向和骨折愈合进程。骨组织中 OPG/RANKL 的相对比值升高则骨形成作用大于骨吸收作用,骨折愈合加速;反之则骨折愈合减慢,但本实验并未对成骨细胞表达进行观察比较,有待于进一步研究探讨。

过度抑制 RANKL 的表达,将使破骨细胞的活性极度下降,严重影响骨吸收及改造,当敲除小鼠 OPG 基因后会患严重的骨质疏松症;而小鼠 OPG 基因过度表达时,将出现严重的石骨症。所以,在骨折早期适度下调 RANKL 表达对骨折愈合具有积极的促进作用,但过度抑制其表达将会过犹不及。

【参 考 文 献】

[1] Hofbauer L C, Dunstan C R, Spelsberg TC, et al. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cell is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2 and cytokines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250: 776-781.

[2] Kannan T, Revecca R M, David L H, et al. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor (TGF) [J]. *J Biol Chem*, 2001, 267: 36241-36250.

[3] Olle NAV, Klara S, Bengt IE, et al. Osteoprotegerin mRNA increased by interleukin-1 α in human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cells[J]. *Biochem Biophys Res*

Commun, 1998, 248: 696-700.

- [4] Helena B, Kenweth B J, Olle V, et al. Tumour necrosis factor- α and B up-regulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cell[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 248: 454-457.
- [5] Sakata M, Shiba H, Komatsu S, et al. Osteoprotegerin levels increased by interleukin-1 β in human periodontal ligament cells are suppressed through prostaglandin E (2) synthesized de novo [J]. *Cytokine*, 2002, 18: 133-139.
- [6] Femiano F, Cozzolino F, Gaeta GM, et al. Recent advances on the pathogenesis of oral lichen planus[J]. *Minerva Stomatol*, 1999, 48(4): 151-159.
- [7] Nakamura H, Tsuji T, Hirata A, et al. Localization of osteoprotegerin (OPG) on bone surfaces and cement lines in rat tibia. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50(7): 945-953.
- [8] Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*, 2004, 292(4): 490-495.
- [9] Masi L, Simonini G, Giani T, et al. Osteoprotegerin (OPG)/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potential modulating role for OPG/RANK-L in bone injury? *J Rheumatol*, 2004, 31(5): 986-991.
- [10] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93(2): 165-176.
- [11] Aya Shiotani, Masamichi Takami, Kanani Itoh, et al. Regulation of Osteoclast Differentiation and Function by Receptor Activator of NF κ B Ligand and Osteoprotegerin [J]. *The Anatomical Record*, 2002, 268: 137-146.
- [12] SahTlon P. Loss of chaotic trabecular structure in OPG-deficient mouse—e Paget's disease patients indicates a chaotic role for OPG in nonlinear pattern formation of trabecular bone [J]. *J Bone—Minerals*, 2004, 19(5): 695-702.
- [13] 贾少杰, 贾晓静. 绝经后女性骨质疏松与 OPG、RANKL 和 ApoE 的相关性研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2007, 32(3): 1001-1441.
- [14] Kon T, Cho TJ, Aizawa T, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(6): 1004-1014.

(收稿日期: 2015-08-27)