

卵巢切除大鼠在不同时期 RANKL、OPG 蛋白表达的变化及与 BTMs 的相关性

林海鸣 黄云梅 吴银生 黄美雅 陈翔 刘振涛 林燕萍*
福建中医药大学,福建 福州 350122

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 08-0981-05

摘要: 目的 探讨卵巢切除大鼠在不同时期骨保护素(OPG)、核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)的表达及与骨转换标志物(BTMs)的关系。方法 将SD雌性大鼠随机分成假手术组(Sham)和去卵巢骨质疏松模型组(OVX),模型组行双侧卵巢切除术,术后第2、6、10、14周分批取材,采用Western blot检测各时期大鼠骨组织OPG、RANKL蛋白表达,采用Elisa检测各时期大鼠血清骨转换标志物BGP、BALP、CTX-I、TRAP-5b的变化。结果 OVX组在术后第2周($P < 0.01$)和第10、14周($P < 0.05$)骨组织RANKL蛋白表达均较Sham组显著升高,OPG蛋白表达在第2周($P < 0.01$)和第6周($P < 0.05$)均显著降低。②与Sham组相比,OVX组术后第2周血清BGP、BALP、CTX-I($P < 0.05$)和TRAP-5b($P < 0.01$)水平均显著升高;OVX组术后第6周血清BGP、BALP水平显著升高($P < 0.01$),CTX-I($P < 0.05$)和TRAP-5b($P < 0.01$)水平显著下降;OVX组术后第10、14周血清CTX-I($P < 0.05$)、BALP($P < 0.01$)水平显著升高。③骨转换标志物血清CTX-I、TRAP-5b水平与骨OPG表达成负相关($P < 0.01$),与骨RANKL表达成正相关($P < 0.05$)。结论 相关性分析显示骨转换标志物CTX-I、TRAP-5b与骨OPG成负相关,与骨RANKL成正相关。

关键词: 绝经后骨质疏松;骨转换标志物;骨保护素;核因子 κ B受体活化因子配体

Protein expression of RANKL and OPG at different periods in ovariectomized rats and their relationships with bone turnover markers

LIN Haiming, HUANG Yunmei, WU Yinsheng, HUANG Meiya, CHEN Xiang, LIU Zhentao, LIN Yanping*
Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China
Corresponding author: LIN Yanping, Email: lyp66@126.com

Abstract: Objective To explore the relationship between bone turnover markers (BTMs) and protein expression of NF- κ B Ligand (RANKL) and Osteoprotegerin (OPG) at different periods in ovariectomized rats. **Methods** SD rats were randomly divided into two groups: sham operated group (Sham) and ovariectomy group (OVX). OVX group had bilateral ovariectomy. Samples were taken from rats at 2, 6, 10 and 14 weeks after operation. Serum levels of bone alkaline phosphatase (BALP), bone gla protein (BGP), Carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-I), tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP-5b) were detected using ELISA method. Protein expression levels of OPG and RANKL were measured using Western blot method. **Results** 1) Protein expression of RANKL in the OVX group was higher than that in the Sham group at 2 weeks ($P < 0.01$) and at 10 and 14 weeks ($P < 0.05$) after operation, while OPG was lower at 2 weeks ($P < 0.01$) and 6 weeks ($P < 0.05$) after operation. (2) Compared with the Sham group, the serum levels of BGP, BALP, CTX-I ($P < 0.05$) and TRAP-5b ($P < 0.01$) in the OVX group increased significantly at 2 weeks after operation. The serum levels of BGP and BALP ($P < 0.01$) in the OVX group increased significantly, while CTX-I ($P < 0.05$) and TRAP-5b ($P < 0.01$) levels decreased significantly at 6 week after operation. The serum levels of CTX-I ($P < 0.05$) and BALP ($P < 0.01$) in the OVX group increased significantly at 10 and 14 weeks after operation. (3) The serum levels of BTMs CTX-I and TRAP-5b negatively correlated with the protein expression of OPG ($P < 0.01$), and positively correlated with the protein expression of RANKL ($P < 0.05$). **Conclusion** Correlation analysis

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81574003);福建省科技厅引导性项目(2015Y0069);福建省自然科学基金计划资助项目(2014J01355);福建省中医药科技项目(wzgs201309)

* 通讯作者: 林燕萍, Email: lyp66@126.com

showed that the serum level of BTMs CTX-I and TRAP-5b were negatively correlated with the protein expression of OPG, and positively correlated with the protein expression of RANKL.

Key words: Postmenopausal osteoporosis; Bone turnover markers; Osteoprotegerin(OPG); NF- κ B Ligand(RANKL)

绝经后骨质疏松(PMOP)发病的主要原因是由于绝经后妇女卵巢功能下降,特别是雌激素的缺乏,导致骨吸收作用增强,造成快速骨丢失所引起。PMOP的发生与骨代谢失衡密切相关,目前研究表明 OPG/RANKL/RANK 轴是影响骨代谢的重要途径,许多研究工作基于该轴从骨代谢入手对 PMOP 的发生机制进行探讨,但目前对 OPG/RANKL/RANK 轴与骨代谢关系的研究尚未完全阐明^[1],有待更深入的研究。课题组在既往工作中已对去卵巢大鼠骨代谢标志物的变化进行了实验研究^[2],并基于 OPG/RANK/RANKL 轴做了对成骨细胞 OPG、RANKLmRNA 表达的探讨^[3]。由于 PMOP 是一进展性疾病,有必要在实验中进行动态观测,目前基于该轴动态检测相关蛋白表达与骨代谢指标关系的研究较少见报道,因此本研究拟对不同时期 RANKL、OPG 蛋白表达的变化及与 BTMs(骨转换标志物)的相关性做一初步的探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:3月龄雌性SD大鼠48只,SPF级,体重(267±21)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(沪)2012-0002,合格证编号:2015000517533。在福建中医药大学动物实验中心鼠类实验室饲养,医学实验动物环境设施为SPF级(合格证号:SYXK(闽)2014-0005)。

1.1.2 主要试剂:兔抗大鼠RANKL一抗(武汉博士德公司),兔抗大鼠OPG一抗(SAB公司)、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠、兔IgG(Earthox LLC公司),一、二抗稀释液(碧云天生物技术研究),ECL发光试剂(Thermo Scientific公司),SDS-PAGE凝胶配置试剂盒(碧云天生物技术研究),RIPA裂解液(南京诺唯赞公司),BGP、CTX-I、BALP和TRAP-5b Elisa试剂盒(上海西唐公司),PVDF膜(Invitrogen公司)。

1.1.3 主要仪器设备:AIR TECH 无菌操作台(苏净集团安泰公司),64R 低温高速离心机(美国 Beckman 公司),MILLI-Q 超纯水装置(美国 Milipore 公司),Du650 紫外分光光度计(美国 Beckman 公司),Trans-Blot Turbo 蛋白转印系统(美国 BIO-RAD

公司),ChemiDocXRS + 化学发光成像系统(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及处理:48只3月龄SD雌性大鼠随机分成Sham组和OVX组,每组各24只。OVX组行双侧卵巢切除术:用2%戊巴比妥钠按40mg/kg进行腹腔注射麻醉,行腹部正中切口,沿子宫双侧探及左、右卵巢,卵巢结扎切除术后腹壁逐层缝合。术后3d连续肌注青霉素预防感染(8万单位/只);Sham组未切除卵巢,其余步骤与OVX组同。

1.2.2 取材:于术后第2、6、10、14周分批进行取材,每批次每组各取6只。大鼠以10%水合氯醛麻醉后,经腹主动脉采血,全血室温静置2h后,经3000r/min离心20min,取血清,1.5mLEP管分装,-80℃冻存,用于血清相关指标检测。取大鼠腰椎,其中L₅、L₆置于1.5mLEP管,-80℃冻存,用于骨组织OPG、RANKL蛋白检测。骨组织取材时,均在取材中及时放入液氮中暂存。

1.2.3 指标检测:Western blot检测各时期大鼠骨组织的OPG、RANKL蛋白表达:取大鼠L₅、L₆提取骨组织蛋白,BCA法检测蛋白浓度,进行SDS-PAGE电泳后切胶,然后将胶上蛋白转印至PVDF膜,经封闭后一抗孵育过夜。次日孵二抗后,加ECL化学发光试剂,在化学发光成像系统上显影。Image Lab 图象分析软件分析目的条带,读取并记录每条带的光密度值。Elisa检测各时期大鼠血清骨转换标志物BGP、BALP、CTX-I、TRAP-5b的变化。分别按相应Elisa试剂盒说明进行检测,最后酶标仪读取OD值,并计算各标志物水平。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据用SPSS17.0软件进行处理,Sham组及OVX组的组间数据比较,对数据符合正态分布的采用独立样本 T 检验,不符合正态分布的用非参数检验(Mann-Whitney检验);指标间的相关性分析,对数据符合正态分布的采用Pearson相关性分析,对不符合正态分布的采用Spearman检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 OPG、RANKL 蛋白表达

Western blot 检测不同时期大鼠 L₅、L₆ 骨组织的 OPG、RANKL 蛋白表达,与 Sham 组比较,OVX 组在术后各时期骨组织 RANKL 蛋白表达均升高,第 2 周 ($P < 0.01$) 和第 10、14 周 ($P < 0.05$) 有统计学意义,OPG 蛋白表达在第 2 周 ($P < 0.01$) 和第 6 周 ($P < 0.05$) 显著降低。见图 1、2。

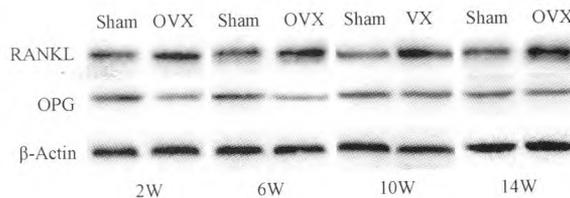


图 1 大鼠骨组织 RANKL、OPG 的 Western Blot 结果
Fig. 1 Western Blot results of RANKL and OPG in rat bone tissue

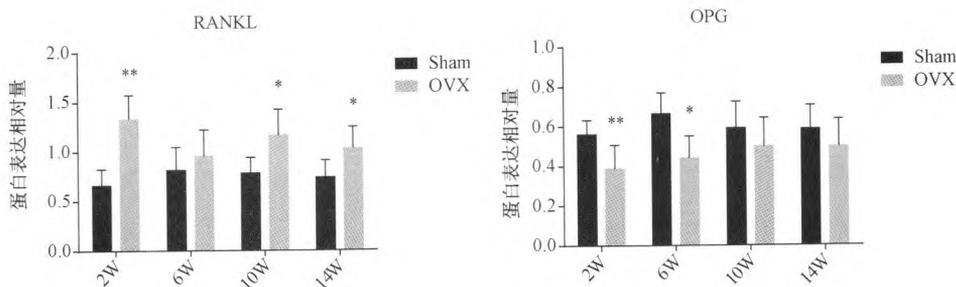


图 2 大鼠骨组织 RANKL、OPG 蛋白表达相对量结果比较
注:与 Sham 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Fig. 2 Comparison of the relative expression of RANKL and OPG in rat bone tissue
Note: Compared with Sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 血清骨转换标志物 BGP、BALP、CTX-I、TRAP-5b 水平

Elisa 检测不同时期大鼠血清骨转换标志物 BGP、BALP、CTX-I、TRAP-5b 水平,与 Sham 组比较,术后第 2 周 OVX 组 TRAP-5b 水平显著升高 ($P < 0.01$), BGP、BALP、CTX-I 水平显著升高 ($P < 0.05$);术后第 6 周 OVX 组 BGP、BALP 水平显著升高 ($P < 0.01$), CTX-I 水平显著下降 ($P < 0.05$)、TRAP-5b 水平显著下降 ($P < 0.01$);术后第 10 周及第 14 周 OVX 组 CTX-I 水平显著升高 ($P < 0.05$), BALP 水平显著升高 ($P < 0.01$)。见图 3。

2.3 骨组织 OPG、RANKL 蛋白表达与骨转换标志物的相关性

BTMs 数据不符合正态分布,采用 Spearman 检验,相关性分析显示骨组织 RANKL 与血清 CTX-I、TRAP-5b 水平成正相关 ($P < 0.05$),骨组织 OPG 与血清 CTX-I、TRAP-5b 水平成负相关 ($P < 0.01$)。见表 1。

3 讨论

骨代谢标志物可分为一般生化标志物、骨代谢调控激素和骨转换标志物 3 类,PMOP 是高转型骨质疏松症,本实验选择骨转换标志物 (BTMs) 为检

测指标,包括骨形成标志物 BGP、BALP,骨吸收标志物 CTX-I、TRAP-5b。

表 1 骨组织 RANKL、OPG 与血清骨转换标志物的相关性分析

Table 1 Correlation analysis between serum BTMs and RANKL and OPG of bone tissue

Item	BGP	BALP	CTX-I	TRAP-5b
骨 RANKL	-0.168	0.007	0.352 *	0.290 *
骨 OPG	1.96	-0.001	-0.481 **	-0.459 **

注:* 在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关,** 在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关。

Note: * Significant correlation at 0.05 level (bilateral), ** Significant correlation at 0.01 level (bilateral).

TRAP-5b 是由破骨细胞产生的非胶原蛋白,是早期反映破骨细胞活性的标志物^[4],血清 TRAP-5b 与骨吸收水平呈正相关;CTX-I 是 I 型胶原的降解产物,是反映骨吸收的特异性指标。本实验显示 OVX 组术后 2 周 TRAP-5b 显著升高,提示卵巢切除后骨吸收增强,但该指标在后期 (10、14 周) 无显著性差异,而 CTX-I 在第 2、10、14 周 OVX 组均较 Sham 组显著升高,持续时间较长,可能与骨组织的构成有关,骨有机成分主要是由 I 型胶原组成,当骨吸收增强时 I 型胶原降解较正常增多,降解产物增加,CTX-I 升

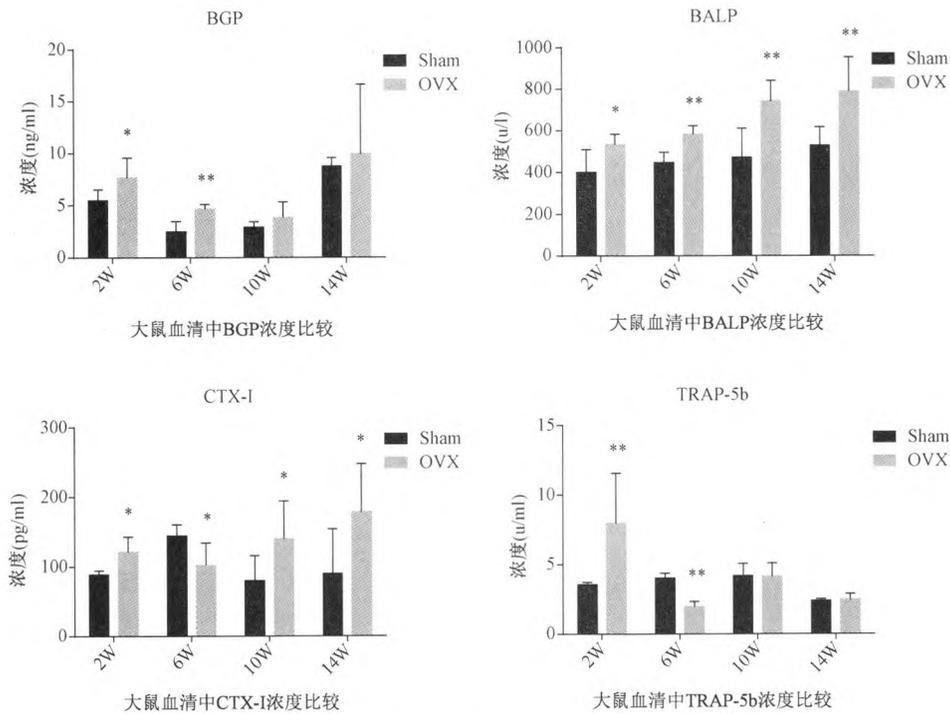


图3 不同时期大鼠血清骨转换标志物(BGP、BALP、CTX-I、TRAP-5b)变化的比较

注:与Sham组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Fig. 3 Comparison of BTMs (BGP, BALP, CTX-I and TRAP-5b) in serum of rats at different periods

Note: Compared with Sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

高,且 CTX-I 有骨 I 型胶原分子间交联物的重要区段和近似交联物的残基,其紧密结构可以保护不受肝、肾的进一步降解,具有较好的稳定性^[5],因此在术后第 10、14 周组间仍有显著性差异。实验中 TRAP-5b 的早期升高及 CTX-I 术后第 2、10、14 周的升高均提示,卵巢切除后由于雌激素水平下降,导致骨吸收增加,但在第 6 周 TRAP-5b、CTX-I 有阶段性的下降,结合骨形成标志物 BALP 及 BGP 的结果(第 6 周 BALP、BGP 水平 OVX 组较 Sham 组高),提示可能是快速骨丢失后的暂时的某种机制的骨吸收抑制。

BALP 由成骨细胞分泌,在骨矿化过程中,将单磷酸酯水解成无机磷,增加局部无机磷的浓度,水解焦磷酸盐,解除其对骨盐形成的抑制作用,是成骨细胞成熟和具有活性的标志,是骨形成的特异及敏感标志物^[5];BGP 是成骨细胞功能和骨质矿化的特殊标志物,由成骨细胞合成类骨质时释放到细胞外基质,其中一小部分进入血液循环,因此血清中 BGP 水平变化,是直接反映骨形成的一种特异性指标,当骨基质降解时其中的 BGP 也进入血液循环中,因此 BGP 除了能反映成骨细胞的活性,在更大程度上反映的是骨转换^[6]。本实验 BALP 检测结果稳定,各

时期水平总体呈升高趋势,各时期 OVX 组均较 Sham 组显著升高,提示卵巢切除大鼠继发的骨形成增强。BGP 水平在各时期 OVX 组均较 Sham 组升高,在第 2、6 周有显著性差异,同样提示卵巢切除大鼠的骨代谢活跃,骨转换性提高。

以上显示,卵巢切除大鼠骨转换标志物随时间推移呈动态变化,骨吸收标志物 TRAP-5b 在卵巢切除早期即有显著的升高,而 CTX-I 总体升高、有阶段性下降,升高持续时间更长,总体表现为以骨吸收增强为主的高转换性骨代谢的特点。变化有显著性差异的骨转换标志物随术后时间的延长呈下降趋势,在第 2、6 周各标志物均有显著性差异,到第 14 周仅 BALP、CTX-I 差异有统计学意义,可能是机体对早期快速骨吸收的一定程度的代偿机制的作用。

OPG/RANKL/RANK 系统是雌激素调节破骨细胞生成和抗骨吸收作用的重要途径之一^[7],雌激素可抑制破骨细胞的分化、成熟及活性,从而抑制骨吸收,雌激素缺乏可促进 OC 形成、分化及增强其活性,这一过程与 OPG、RANKL 关系密切,实验中 OVX 组骨组织 RANKL 表达较 Sham 组在第 2、6 周均升高,第 2 周有显著性差异,而 OPG 表达显著下降,导致同时期 OVX 组的 RANKL/OPG 比值显著升

高,显示由于雌激素水平下降导致成骨细胞过度表达 RANKL 而降低 OPG 的表达,使 RANKL 与 RANK 结合,启动 OC 的分化和功能活性,骨吸收过度活跃,切除卵巢早期过度表达 RANKL 而降低 OPG 表达的结果与之前一些学者的研究结果一致^[8]。相应的骨转换标志物 TRAP-5b、CTX-I 在第 2 周升高,进入骨量快速丢失阶段,文献资料也显示大鼠在去卵巢后 3 周和 6 周,骨量下降较显著,12 周之后骨量持续平稳下降^[9]。但在第 6 周 OVX 组 TRAP-5b、CTX-I 出现阶段性下降,可能是机体的某种负反馈机制抑制骨吸收。有研究发现 RANKL 诱导表达的 LGR4 可作为负反馈信号抑制破骨细胞的分化与功能^[10],实验中 OVX 组 RANKL 早期的显著高表达可能通过类似的机制暂时抑制 OC 活性,以应对机体由于雌激素缺乏引起的快速骨量丢失。在第 10、14 周 OVX 组 RANKL 仍高表达,同期 CTX-I 均显著升高,提示骨吸收持续增强,而 BALP 水平的显著上调,提示伴随成骨细胞活性增强,骨形成增加,但由于骨吸收强于骨形成,而导致骨质疏松症的发生。相关性分析显示骨转换标志物 CTX-I、TRAP-5b 与骨 OPG 成负相关,与骨 RANKL 成正相关。

本实验取材受到实验动物的限制,无法连续多次大量采血和提取骨组织标本,使动态观察的连续性受到限制,有待加大样本、改进实验进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] 李应福,李宁,谢兴文. OPG/RANK/RANKL 信号轴与原发骨骨质疏松关系的研究进展. 中国骨质疏松杂志,2016,22(1): 115-119.
Li YF, Li N, Xie XW. Research progress of the relationship between OPG/RANK/RANKL signal axis and primary osteoporosis. Chin J Osteoporos, 2016, 22(1): 115-119. (in Chinese)
- [2] 林燕萍,李咏高,马建华,等. 健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型鼠骨代谢的影响. 福建中医学院学报,2001,11(4):17-19.
Lin YP, Li YG, Ma JH, et al. Effects of JIANGU granule on bone metabolism of ovariectomized osteoporosis rats. Journal of Fujian College of TCM, 2001, 11(4): 17-19. (in Chinese)
- [3] 林海鸣,林燕萍,吴银生. 健骨颗粒含药血清对成骨样细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响. 福建中医药大学学报, 2012,22(1):19-21.
Lin HM, Lin YP, Wu YS. Effects of serum containing jianggu granules on expression of OPG and RANKL mRNA in osteoblast-like cells. Journal of Fujian University of TCM, 2012, 22(1): 19-21. (in Chinese)
- [4] Fahmy SR, Soliman AM, Sayed AA, et al. Possible antiosteoporotic mechanism of Cicer arietinum extract in ovariectomized rats. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(4): 3477-3490.
- [5] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 骨代谢生化标志物临床应用指南. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2015, 8(4): 283-292.
The Chinese Medical Association of Osteoporosis and Bone Mineral Disease. Guidelines for the clinical application of biochemical markers of bone metabolism. Chin J Osteoporosis & Bone Miner Res, 2015, 8(4): 283-292. (in Chinese)
- [6] 刘勇,樊继援. 骨钙素和 I 型胶原交联氨基端肽测定在绝经后骨质疏松症中的意义[J]. 天津医科大学学报, 2007, 13(4): 511-513.
Liu Y, Fan JY. Measurements of osteocalcin and cross-linked N-telopeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. Journal of Tianjin Medical University, 2007, 13(4): 511-513. (in Chinese)
- [7] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinology, 1999, 140(9): 4367-4370.
- [8] 葛月宾,王丽君. 小鼠去卵巢骨质疏松模型的建立及 OPG/RANKL 的表达[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2008, 16(12): 33-35.
Ge YB, Wang LJ. Evaluation of ovariectomized mice osteoporosis model and expression of OPG/RANKL. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics, 2008, 16(12): 33-35. (in Chinese)
- [9] 杨涵,卜淑敏,文思敏,等. 动态观察去卵巢骨质疏松大鼠股骨微结构的变化. 现代生物医学进展, 2014, 14(30): 5862-5866.
Yang H, Bu SM, Wen SM, et al. Dynamic change of trabecular bone microarchitecture in the ovariectomized osteoporosis rats. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(30): 5862-5866. (in Chinese)
- [10] Jin YY, Yang YZ. LGR4: A new receptor for a stronger bone. Sci China Life Sci, 2016, 59(7): 735-736.
(收稿日期: 2017-01-08; 修回日期: 2017-02-09)