

OPG 及 RANKL 在小儿单纯性骨囊肿与动脉瘤样骨囊肿中的表达研究



宋得夫¹ 毕 波² 邵景范² 杨小进² 王小林²

【摘要】 目的 检测小儿单纯性骨囊肿和动脉瘤样骨囊肿标本中骨保护素(OPG)、核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)的表达水平,并与正常骨组织作对照,分析两种蛋白在这两种瘤样病变中的表达是否存在差异及意义。**方法** 共收集小儿单纯性骨囊肿标本 31 例,动脉瘤样骨囊肿标本 23 例,正常骨组织标本(对照组)14 例。采用免疫组化 SABC 方法检测单纯性骨囊肿、动脉瘤样骨囊肿和对照组中 OPG、RANKL 的表达,并分析其差异性。应用 Imagepro-Plus 6.0 图像处理软件及数据处理软件 SPSS17.0 对图像及所得数据进行分析。**结果** 在单纯性骨囊肿及动脉瘤样骨囊肿中,OPG 的表达量均低于正常骨组织,RANKL 的表达量均高于正常骨组织,其中动脉瘤样骨囊肿 RANKL 的表达量较单纯性骨囊肿更高,差异有统计学意义($P < 0.05$);单纯性骨囊肿的 OPG 稍高于动脉瘤样骨囊肿,差异无统计学意义($P > 0.05$)。RANKL/OPG 比值动脉瘤样骨囊肿 > 单纯性骨囊肿 > 正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** RANKL/OPG 失衡可能是小儿单纯性骨囊肿和动脉瘤样骨囊肿出现溶骨性破坏的原因之一,动脉瘤样骨囊肿术后相对更高的复发率可能与 RANKL 的相对高表达有关。

【关键词】 骨囊肿,动脉瘤样;骨和骨组织;骨保护素;儿童

The expression of osteoprotegerin(OPG) and receptor activator nuclear factor κ -B ligand(RANKL) in pediatric bone tumor-like lesions (simple bone cysts and aneurysmal bone cysts). SONG De-fu¹, BI Bo², SHAO Jing-fan², et al. 1,Xian Children's Hospital, Xian 710003, China;2, Department of Pediatric Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science Technology. Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To explore the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator nuclear factor κ -B ligand (RANKL) in pediatric bone tumor-like lesions (bone cysts, aneurysmal bone cysts). **Methods** 31 specimens of simple bone cysts, 23 of aneurysmal bone cysts were collected during surgery and were taken as experimental group. Normal bone tissues from 14 patients were collected as normal controls. The expressions of OPG and RANKL were detected by immunohistochemical staining and quantified by computer image analysis software. **Results** Compared with normal controls, the expression of RANKL was significantly higher in simple bone cysts and aneurysmal bone cysts, whereas the expression of OPG was significantly lower ($P < 0.05$). The expression of RANKL of aneurysmal bone cysts was significantly higher than that of simple bone cysts ($P < 0.05$). The expression of OPG of simple bone cysts was slightly higher than that of aneurysmal bone cysts, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The aneurysmal bone cysts had the highest ratio of RANKL to OPG, followed by simple bone cysts, then the normal controls ($P < 0.05$). **Conclusions** Abnormal expression of RANKL and OPG is associated with pediatric bone tumor-like lesions like simple bone cysts and aneurysmal bone cysts.

【Key words】 Bone Cysts, Aneurysmal; Bone and Bones; Osteoprotegerin; Child

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2015.03.009

基金项目:国家临床重点专科建设项目基金资助(国卫医函[2013]544)

作者单位:1,西安市儿童医院骨科(陕西省西安市,710003), E-mail:407419187@163.com;2,华中科技大学同济医学院附属同济医院小儿外科(湖北省武汉市,430030),通讯作者:邵景范, E-mail:shaofj65@126.com

骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator nuclear factor κ -B ligand, RANKL)/核因子- κ B 受体活化因子(receptor activator nuclear factor κ -B, RANK)系统是调控骨代谢的重要信号通路之一^[1-3]。OPG 可结合 RANKL,以削弱破骨细胞的分化成熟能力和功能活性、限制破骨细胞活跃所导致的过度骨吸收;而

RANKL 与破骨细胞表面的 RANK 相结合,可促进破骨细胞分化成熟、促进骨吸收增加^[3]。单纯性骨囊肿和动脉瘤样骨囊肿是小儿常见瘤样病变之一,其共同特点是病灶的溶骨样改变。为了解 OPG/RANKL 在这两种疾病中的表达情况及临床意义,本研究利用免疫组化技术,对单纯性骨囊肿及动脉瘤样骨囊肿标本进行相应检测并分析其结果和意义。

材料与方法

一、临床资料

收集本院 2003 年 1 月至 2011 年 4 月经手术刮除的石蜡包埋小儿单纯性骨囊肿和动脉瘤样骨囊肿标本共 54 例,其中单纯性骨囊肿 31 例,男性 21 例,女性 10 例,年龄 9 个月至 14 岁,平均年龄(97 ± 40)个月;动脉瘤样骨囊肿 23 例,男性 19 例,女性 4 例,年龄 1 岁 10 个月至 14 岁,平均年龄(105 ± 37)个月。另取 14 例正常骨组织作为对照组,组织来源为多指(趾)患儿切除后指(趾)骨,年龄为 3 个月至 6 岁,平均年龄为(8 ± 3.5)个月。标本经甲醛固定,常规石蜡包埋,切片厚度为 $5 \mu\text{m}$ 。

二、方法

骨组织石蜡切片制定:骨组织脱钙,脱钙液配制: A 液: EDTA 10g, PBS 缓冲液(pH 7.2) 100 mL,加 NaOH 搅拌溶解后,用 1 mol/L 的 HCl 调 pH 至 7.2,再加入甲醛 15 mL。室温下每 4 h 更换 1 次脱钙液。以大头针能刺进骨密质为完成脱钙标准。组织脱钙后经常规处理切片,即完成骨组织石蜡切片制备。

采用免疫组织化学 SABC 法,染色步骤按 SABC 试剂盒说明操作,一抗工作浓度为 1:100,所有切片

染色前均经抗原修复。

抗原修复:将 0.01 M 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)放入微波炉中加热至沸腾,再放入载玻片,冷却至室温,重复几次。可解决先放入玻片再加热至沸腾时出现的脱片问题。

三、实验试剂

1. 一抗:兔抗人多克隆抗体 OPG(产品编号:BA1475),兔抗人多克隆抗体 RANKL(产品编号:BA1323),均购自武汉博士德生物工程有限公司。

2. 免疫组织化学试剂盒:即用型过氧化物酶标记链霉亲和素(StreptAvidin-Biotin Complex)染色试剂盒(SABC)购自武汉博士德生物工程有限公司。

3. 显色试剂:二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

四、结果判定及图像处理分析

光镜下观察染色切片,以胞浆或胞膜出现浅黄色、棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞。每张切片随机观察 5 个高倍镜($\times 40$)视野,经 Imagepro-Plus6.0 图像分析测量软件对免疫组化结果进行光密度(OD)检测分析,以平均 OD 值代表蛋白颗粒密度。

五、统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计处理,分析数据采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

在光镜下,OPG/RANKL 蛋白阳性物质被染色成黄色至棕褐色颗粒,主要位于细胞质内,见图 1 和图 2。经 Imagepro-Plus6.0 图像分析测量软件对免

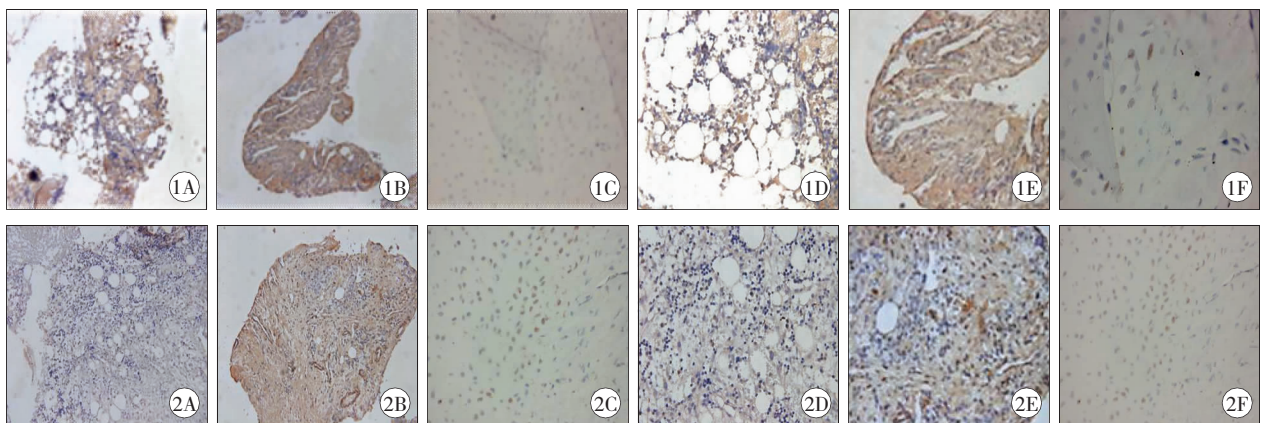


图 1 OPG 在单纯性骨囊肿、动脉瘤样骨囊肿和对照组中的表达(光镜, $\times 200$, $\times 400$),免疫组化染色;1A,单纯性骨囊肿 OPG 200 倍;1B,动脉瘤样骨囊肿 OPG 200 倍;1C,正常骨 OPG 200 倍;1D,单纯性骨囊肿 OPG 400 倍;1E,动脉瘤样骨囊肿 OPG 400 倍;1F,正常骨 OPG 400 倍;图 2 RANKL 在单纯性骨囊肿、动脉瘤样骨囊肿和对照组中的表达(光镜, $\times 200$, $\times 400$),免疫组化染色;2A,单纯性骨囊肿 RANKL 200 倍;2B,动脉瘤样骨囊肿 RANKL 200 倍;2C,正常骨 RANKL 200 倍;2D,单纯性骨囊肿 RANKL 400 倍;2E,动脉瘤样骨囊肿 RANKL 400 倍;2F,正常骨 RANKL 400 倍

疫组化图片结果进行光密度(OD)检测及分析,各组结果见表1。OPG在正常骨组织中的表达量较单纯性骨囊肿、动脉瘤样骨囊肿增高,差异有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$);在两种瘤样病变的比较中,单纯性骨囊肿的OPG表达较动脉瘤样骨囊肿更高,但差异无统计学意义($P>0.05$);RANKL在单纯性骨囊肿和动脉瘤样骨囊肿中的表达较正常组明显增

高,差异有统计学意义($P<0.01$, $P<0.01$),在两种瘤样病变的比较中,动脉瘤样骨囊肿的RANKL表达较单纯性骨囊肿更高,差异有统计学意义($P<0.01$);RANKL/OPG比率动脉瘤样骨囊肿>单纯性骨囊肿>正常骨组织,动脉瘤样骨囊肿、单纯性骨囊肿与正常骨组织比较,差异均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.01$),两种瘤样病变比较,差异也有统计

表1 OPG和RANKL在各组织中的表达($\bar{x}\pm s$)

分组	n	免疫组化染色阳性的光密度 OD 值		RANKL/OPG
		OPG	RANKL	
单纯性骨囊肿	31	0.223 1±0.012 5	0.450 5±0.050 3	2.182 0±0.337 7
		(* $P<0.01$)	(* $P<0.01$)	(* $P<0.01$)
		(* * $P>0.05$)	(* * $P<0.01$)	(* * $P<0.01$)
动脉瘤样骨囊肿	23	0.208 6±0.039 6	0.592 6±0.066 4	2.937 3±0.670 5
		(* $P<0.05$)	(* $P<0.01$)	(* $P<0.01$)
正常对照组	14	0.290 3±0.040 3	0.308 6±0.033 5	1.074 9±0.142 3

注: * 表示与正常骨组织比较, * * 表示与动脉瘤样骨囊肿比较学意义($P<0.01$)。

讨 论

OPG/RANKL/RANK系统是近年来被发现与骨代谢密切相关的信号传导系统^[4]。RANKL以两种形式存在于体内,一种以跨膜形式表达于成骨细胞、软骨细胞、T细胞等细胞膜表面,即膜结合型RANKL;另一种以游离形式存在于淋巴组织、骨与软骨组织和关节滑液中,即游离型RANKL^[2,5]。

RANK属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员,以跨膜蛋白形式表达于破骨细胞前体细胞、成熟破骨细胞、软骨细胞、滑膜细胞等细胞膜表面,是RANKL唯一功能性受体^[5]。膜结合型RANKL和游离型RANKL能与破骨细胞表面的RANK结合,RANKL与RANK结合后可激活RANK,胞内通过与TNFR相关因子结合,激活下游信号通路如核因子-kB、c-Jun N末端激酶、Src、c-Myc、p38、钙调素蛋白磷酸酶、胞外信号调节激酶等介导相关功能,刺激破骨细胞分化成熟和活性,阻止破骨细胞凋亡^[2,6]。

OPG又称骨保护素,也属于TNFR超家族成员,缺乏穿膜区和细胞质结构域,为可溶性分泌蛋白,在多种组织中均有表达,骨骼肌肉系统中的骨髓基质细胞、成骨细胞、软骨细胞、成纤维型及巨噬型滑膜细胞均能表达并分泌OPG^[7]。OPG可从多方面抑制破骨细胞的活性,如抑制破骨细胞自骨膜释放并削弱破骨细胞黏附骨的能力;OPG可与RANKL竞

争性结合,拮抗RANKL与RANK的结合和激活、抑制RANK的生物活性及阻止破骨细胞产生,从而抑制骨的重吸收;OPG还可使RANKL保持在细胞内,减少RANKL释放至胞外及胞膜^[8]。

目前关于OPG/RANKL的临床研究主要局限在成人骨病如老年性骨质疏松、绝经后骨质疏松、转移性骨肿瘤和骨关节炎等领域^[2,5,9]。我们的研究发现小儿骨囊肿和动脉瘤样骨囊肿中OPG降低、RANKL升高,其生物学效应必然表现为OPG抑制和拮抗破骨细胞活性能力的降低;高水平的RANKL与RANK结合后又刺激破骨细胞的成熟和活性增加,同时减少破骨细胞凋亡。上述两方面因素的综合效应就是骨吸收和骨溶解增加,这与小儿单纯性骨囊肿和动脉瘤样骨囊肿的临床病理特点相符,证实在小儿单纯性骨囊肿、动脉瘤样骨囊肿组织中均存在OPG/RANKL系统失衡现象。

临床对小儿单纯性骨囊肿、动脉瘤样骨囊肿的治疗有多种方法,包括传统的病灶刮除植骨、囊内减压引流、激素或骨髓注射、大块切除等,但仍面临复发率较高的困惑^[10-11]。对小儿单纯性骨囊肿采用传统的病灶刮除植骨后复发率可达33%~45%,动脉瘤样骨囊肿术后复发率更高,达64%^[11]。虽然复发率还与病灶大小、部位及与骨骺板的距离、患者年龄与性别和治疗方法等有关,但根据我们对OPG/RANKL在这两种疾病的表达的测定结果来看,动脉瘤样骨囊肿相对较高的复发率可能与RANKL/OPG比值高有一定关系。骨骼的完整性及

骨修复重建需要破骨细胞的骨吸收和成骨细胞的骨形成维持动态平衡以及许多细胞因子、生长因子对骨吸收和形成过程的调控。由于 RANKL 与 OPG 有相反的生物学作用,RANKL/OPG 比值的变化决定了成骨或溶骨,增高有利于骨吸收,而降低有利于骨形成。在临床实践中,如果有条件测定该类患儿手术标本的 OPG 和 RANKL 水平及其比值,对判断患儿预后及复发风险可能有一定帮助。

参考文献

1 Silva I, Branco JC. RANK/RANKL/OPG: literature review [J]. Acta Reumatol Port,2011, 36(3):209-218.

2 封志云,贺振年,陈中. OPG/RANKL/RANK 系统与软骨及软骨下骨[J]. 国际骨科学杂志,2013,34(2):112-118.

3 Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease [J]. Endocr Rev, 2008,29(2):155-192.

4 Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system

[J]. Endocrinology,2001,142(12):5050-5055.

5 Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(1):17-25.

6 Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, et al. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis[J]. J Biol Chem,2001,276(23):20659-20672.

7 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997,89(2):309-319.

8 Ostrowski MC. A new role for OPG: putting RANKL in its place[J]. J Bone Miner Res,2010,25(9):1905-1906.

9 张雄良,郝永强. OPG/RANKL/RANK 系统与转移性骨肿瘤[J]. 国际骨科学杂志,2007,28(6):390-392.

10 龙海兵,李明. 弹性钢针加混合植骨治疗儿童骨囊肿 28 例[J]. 临床小儿外科杂志,2008,7(5):44-45.

11 王来喜,张德文. 单纯性骨囊肿病因及治疗现状[J]. 临床小儿外科杂志,2003,2(1):47-52.

(上接第 185 页)

输尿管抗反流术,术后膀胱容量和逼尿肌压的改变均较小肠膀胱扩大术差,但其优点是仍保留自己的膀胱黏膜,避免了黏液尿、电解质紊乱、结石和癌变等并发症。

下尿路评价对神经性膀胱有非常重要的意义,尿动力学检查、泌尿系超声和排泄性膀胱尿道造影是神经性膀胱的重要评价手段,对神经性膀胱患儿要根据其评价结果采取相应的、个性化的治疗方案,如膀胱容量较大、逼尿肌压较低的患儿,清洁间歇导尿即可获得较好的疗效,膀胱容量小、逼尿肌压较高的患儿可在膀胱扩大的基础上行清洁间歇导尿,合并逼尿肌过度活动者可应用索立那新等抗胆碱能药物,合并输尿管反流者可在膀胱扩大的同时行输尿管再植抗反流术,小肠膀胱扩大术膀胱容量改善好于膀胱自扩大。

参考文献

1 陈维秀,孙小兵,李金良,等. 可控性回肠膀胱扩大术治疗儿童神经性膀胱[J]. 中华泌尿外科杂志,2008,29(2):93-95.

2 Eva LH, Gitte MH, Yazan FHR, et al. Promising long-term outcome of bladder autoaugmentation in children with neurogenic bladder dysfunction [J]. J Urol, 2013, 190(11):1869-2865.

3 孙小兵,李殿国,张丽,等. 托特罗定在小儿神经性膀胱中的应用评价[J]. 中华小儿外科杂志,2011,32(3):199-201.

4 Genervie N, Annette S, Katherine M, et al. Long-term use of solifenacin in pediatric patients with overactive bladder: Extension of a prospective open-label study[J]. Can Urol Assoc J, 2014, 8(3-4):118-123.

5 孙小兵,王若义,张丽,等. 清洁间歇导尿在小儿神经性膀胱治疗中的价值[J]. 中华小儿外科杂志,2008,29(7):388-390.

6 Léon P, Jolly L, Binet A, et al. Botulinum toxin injections in the management of non-neurogenic overactive bladders in children[J]. J Pediatric Surg, 2014,49(9):1424-1428.

7 Arien AM, Merriman LS, Elmore JM, et al. construction of sigmoid bladder augmentation using absorbable staples: Long-term results and comparison to standard colocolostomy in children with neurogenic bladder[J]. J Pediatric Urol, 2014, 10(3):284-288.

8 Ai-Azzawi Y, Galloway N, Keillin S. Management of bleeding-associated severe gastritis of the gastric mucosa in a patient with a gastrectomy [J]. J Clin Gastroenterol, 2014, 48(4):360-361.

9 Landa JS, Fernández AM, Castro NR, et al. Laparoscopic ureterocystoplasty with Mitrofanoff system[J]. J Laparosc Adv Surg Tech A, 2014,24(6):422-427.

10 Zhang F, Liao L. Tissue engineered cystoplasty augmentation for treatment of neurogenic bladder using small intestinal submucosa: an exploratory study[J]. J Urol, 2014,192(2):544-550.