

·实验研究·

OPG 及 RANKL 在儿童先天性胫骨假关节
病变骨与骨膜中的表达研究

朱光辉 梅海波 刘 昆 唐 进 伍江雁 刘尧喜 雷 霆

【摘要】 目的 通过免疫组化检测儿童先天性胫骨假关节和胫骨骨折患儿骨与骨膜标本中骨保护素(OPG)、核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)的表达水平,明确OPG及RANKL在儿童先天性胫骨假关节骨与骨膜中的表达差异,并分析其可能的意义。**方法** 选取2016年1月至2018年2月由湖南省儿童医院收治的17例儿童先天性胫骨假关节(CPT组)和10例胫骨骨折患儿(对照组)作为研究对象。采用SABC法检测先天性胫骨假关节患儿和对照组骨及骨膜中OPG、RANKL的表达,并分析其差异性。**结果** 本研究发现OPG在CPT组(0.08 ± 0.03)骨膜中的表达量低于对照组(0.11 ± 0.02),差异有统计学意义($t = 2.805, P < 0.01$);RANKL在CPT组(0.24 ± 0.07)骨膜中的表达量高于对照组(0.15 ± 0.04),差异有统计学意义($t = 3.707, P < 0.01$);CPT组(2.37 ± 0.29)病变胫骨骨膜中RANKL/OPG比值高于对照组(1.09 ± 0.16),差异有统计学意义($t = 12.792, P < 0.01$)。OPG在CPT组(0.17 ± 0.09)胫骨中的表达量低于对照组(0.26 ± 0.05),差异有统计学意义($t = 2.895, P < 0.01$);RANKL在CPT组胫骨中的表达量(0.68 ± 0.13)高于对照组(0.33 ± 0.09),差异有统计学意义($t = 7.494, P < 0.01$);RANKL/OPG比值在CPT组(5.12 ± 0.60)胫骨中的表达量高于对照组(1.12 ± 0.17),差异有统计学意义($t = 25.784, P < 0.05$)。**结论** RANKL/OPG失衡可能是儿童先天性胫骨假关节出现胫骨不愈合和骨吸收的原因之一。

【关键词】 先天性胫骨假关节;骨保护素/化学;核因子 κ B受体活化因子配体/化学;免疫组织化学/方法

【中图分类号】 R726.8 R682.1⁺9 R392.11

Expressions of OPG and RANKL in tibia bone and periosteum of patients with congenital tibial pseudarthrosis of the tibia in children. Zhu Guanghui, Mei Haibo, Liu Kun, Tang Jin, Wu Jiangyan, Liu Yaoxi, Lei Ting. Department of Orthopedics, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China. Corresponding author; Mei Haibo, Email: meihaiibo@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the expressions of osteoprotegerin (OPG) and nuclear factor kappa B receptor activator ligand (RANKL) in tibia bone and periosteum of patients with congenital tibial pseudarthrosis of the tibia (CPT) and tibial fracture in children and analyze its possible significance. **Methods** From January 2016 to February 2018, 17 cases of tibia bone and periosteum of CPT and 10 cases of tibia bone and periosteum of tibial fracture were collected. Strept Avidin-Biotin Complex method was employed for measuring the expressions of OPG and RANKL in bone and periosteum of two groups. **Results** The expression of OPG in tibial periosteum of CPT patients was lower than tibial fracture counterparts [(0.08 ± 0.03) vs. (0.11 ± 0.02) , $t = 2.805, P < 0.01$]. And the expression of RANKL in tibial periosteum of CPT patients was higher than tibial fracture counterparts [(0.24 ± 0.07) vs. (0.15 ± 0.04) , $t = 3.707, P < 0.01$]. RANKL/OPG ratio was higher in tibial periosteum of CPT than that in tibial fracture counterparts [(2.37 ± 0.29) vs. (1.09 ± 0.16) , $t = 12.792, P < 0.01$]. The expression of OPG was lower in tibial bone of CPT patients than that in tibial fracture counterparts [(0.17 ± 0.09) vs. (0.26 ± 0.05) , $t = 2.895, P < 0.01$]. And the expression of RANKL was higher in tibial bone of CPT patients than that in tibial fracture counterparts [(0.68 ± 0.13) vs. (0.33 ± 0.09) , $t =$

DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2019.04.017

基金项目:湖南省卫计委课题(编号:B2016032);湖南省自然科学基金青年基金(编号:2017JJ3140);湖南省儿童医院“青年英才”培养计划

作者单位:湖南省儿童医院骨科(湖南省长沙市,410007)

通讯作者:梅海波, Email: meihaiibo@sina.com

7.494, $P < 0.01$]. RANKL/OPG ratio was higher in tibial bone of CPT patients than that in tibial fracture counterparts [(5.12 ± 0.60) vs. (1.12 ± 0.167, $t = 25.784$, $P < 0.05$]. All differences were statistically significant.

Conclusion RANKL/OPG imbalance may be one of the causes of nonunion and bone resorption in CPT children.

【Key words】 Congenital Pseudarthrosis of The Tibia; Osteoprotegerin/CH; Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B/CH; Immunohistochemistry/MT

骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)主要由成骨细胞分泌,作用分别为抑制骨和促进骨吸收^[1,2]。RANKL主要由成骨细胞分泌,可识别破骨细胞及破骨细胞前体,并与之结合,转导骨吸收信号,调节破骨细胞前体的增殖和破骨细胞的成熟,促进骨吸收。除了生成RANKL外,成骨细胞还生成了与之对应的OPG与核因子 κ B受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)竞争结合RANKL,限制过度骨吸收。OPG/RANKL/RANK轴通过对破骨细胞的调控,在骨形成和骨吸收的过程中起到十分重要的作用^[3]。

先天性胫骨假关节(congenital pseudarthrosis of the tibia, CPT)常表现为胫骨发育不良或难以愈合的病理性胫骨骨折^[4-5]。在X线片上表现为胫骨骨折,断端骨皮质变薄,髓腔变窄,骨密度减低,提示存在胫骨骨形成障碍。本研究通过免疫组化方法,对胫骨粉碎性骨折(对照组)和先天性胫骨假关节(CPT组)患儿的胫骨病变骨及骨膜中的OPG及RANKL进行检测,探讨其在胫骨假关节骨代谢中的临床意义。

材料与方法

一、临床资料

本研究在获得湖南省儿童医院伦理委员会同意和患儿家属知情同意后,收集湖南省儿童医院2016年1月至2018年2月经手术治疗的17例胫骨假关节患儿病变胫骨及骨膜标本(CPT组),其中男童9例,女童8例,年龄1岁6个月至6岁9个月,平均年龄(52.8 ± 23.4)个月;收集同期10例胫骨粉碎性骨折患儿的碎骨片骨组织及骨膜10组,其中男童6例,女童4例,年龄1岁9个月至5岁8个月,平均年龄(47.5 ± 19.9)个月。

二、免疫组化

1. 试剂:①一抗:兔抗人多克隆抗体OPG(产品编号:A2100),兔抗人多克隆抗体RANKL(产品编号A2550),均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。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(Strept Avidin-Biotin Complex)染色试剂盒(SABC)购自北京索莱宝科技有限公司。③显色试剂:二氨基联苯胺显色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

2. 实验步骤:①标本经10%甲醛固定液固定,常规石蜡包埋,切片厚度为5 μ m。②骨组织石蜡切片制作:骨组织浸入15%的盐酸-甲醛脱钙液(10%的中性甲醛850 mL,加入150 mL的浓盐酸)中,每4 h更换脱钙液,以刀片能切开标本为达到脱钙标准。从脱钙液中取出标本,立即放入70%的酒精,每小时换1次,连续3次,然后取出投入脱水机脱水、包埋、切片与染色。③骨膜石蜡切片制作:按照常规石蜡切片制作流程进行。免疫组化SABC法检测OPG和RANKL含量:染色之前先进行抗原修复,按照SABC染色试剂盒上的说明进行染色操作。④抗原修复:在微波炉里加热0.01M枸橼酸钠缓冲溶液(pH 6.0)至沸腾后将组织玻片放入,断电,间隔5~10 min,反复1~2次。

三、结果判定及图像处理分析

在光镜下观察切片。将阳性细胞定义为胞浆或胞膜出现浅黄色、棕黄色或棕褐色颗粒。对免疫组化图片采用Image Plus 6.0图像分析软件进行光密度(OD)检测分析,每个图像随机观察5个高倍镜($\times 20$)视野,以平均OD值代表蛋白颗粒密度。

四、统计学处理

采用SPSS17.0软件进行统计学处理,两组光密度值采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

经免疫组化染色后,两组患儿的OPG及RANKL蛋白阳性反应物质为位于细胞质内的黄色或棕黄色颗粒(图1)。本研究发现OPG在CPT组骨膜中的表达量低于对照组,差异有统计学意义($t = 2.805$, $P < 0.01$);RANKL在CPT组骨膜中的表达量高于对照组,差异有统计学意义($t = 3.707$, $P <$

0.01); CPT 病变胫骨骨膜中 RANKL/OPG 比值高于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 12.792, P < 0.01$), 具体见表 1。OPG 在 CPT 组胫骨中的表达量低于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 2.895, P < 0.01$); RANKL 在 CPT 组胫骨中的表达量高于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 7.494, P < 0.01$) RANKL/OPG 比值在 CPT 组胫骨中的表达量高于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 25.784, P < 0.05$), 见表 2。

表 1 OPG 及 RANKL 在 CPT 组和对照组骨膜中的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expressions of OPG and RANKL in tibial periosteum of CPT and control groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	OPG	RANKL	RANKL/OPG
CPT 组	17	0.08 ± 0.03	0.24 ± 0.07	2.37 ± 0.29
对照组	10	0.11 ± 0.02	0.15 ± 0.04	1.09 ± 0.16
t 值	-	2.805	3.707	12.792
P 值	-	<0.01	<0.01	<0.01

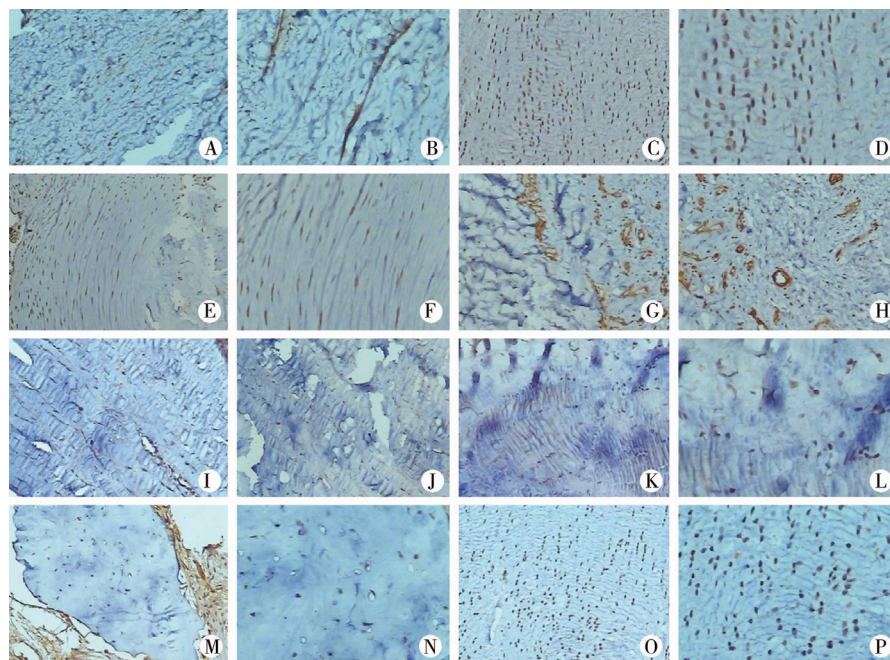


图 1 通过免疫组化染色测定 OPG 和 RANKL 在 CPT 组和对照组在骨膜及胫骨中的表达 A: CPT 骨膜 OPG, $\times 100$; B: CPT 骨膜 OPG, $\times 200$; C: 对照组骨膜 OPG, $\times 100$; D: 对照组骨膜 OPG, $\times 200$; E: CPT 骨膜 RANKL, $\times 100$; F: CPT 骨膜 RANKL, $\times 200$; G: 对照组骨膜 RANKL, $\times 100$; H: 对照组骨膜 RANKL, $\times 200$; I: CPT 骨 OPG, $\times 100$; J: CPT 骨 OPG, $\times 200$; K: 对照组骨 OPG, $\times 100$; L: 对照组骨 OPG, $\times 200$; M: CPT 骨 RANKL, $\times 100$; N: CPT 骨 RANKL, $\times 200$; O: 对照组骨 RANKL, $\times 100$; P: 对照组骨 RANKL, $\times 200$

Fig. 1 Expressions of OPG and RANKL in tibial periosteum and bone in CPT patients and tibial fracture patients (light microscope, $\times 100, \times 200$), immunohistochemical staining.

表 2 OPG 及 RANKL 在 CPT 组和对照组骨组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expressions of OPG and RANKL in tibial bone of CPT and control groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	OPG	RANKL	RANKL/OPG
CPT 组	17	0.17 ± 0.09	0.68 ± 0.13	5.12 ± 0.60
对照组	10	0.26 ± 0.05	0.33 ± 0.09	1.12 ± 0.17
t 值	-	2.895	7.494	25.784
P 值	-	<0.01	<0.01	<0.05

讨论

OPG 又叫破骨细胞抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor), 属于肿瘤坏死因子受体家族。

OPG 是 RANKL 的诱导受体, 通过与 RANKL 的结合减少破骨细胞的产生。核因子 κB 受体活化因子属于 I 型跨膜蛋白, 也是 TNF 家族成员之一, 通过激活转录因子 NF- κB , 促进破骨细胞的增殖、分化、成熟以及增强骨吸收活性。核因子 κB 受体活化因子配体主要由成骨细胞分泌, 可识别破骨细胞及破骨细胞前体, 并与其结合, 促进破骨细胞的分化, 增强成熟破骨细胞的活力, 阻止破骨细胞凋亡, 是破骨细胞分化成熟和维持功能所需的重要因子^[1,2,6]。OPG/RANKL/RANK 信号系统是骨代谢中一个重要的信号通路, RANKL 与破骨细胞前体细胞或破骨细胞表面上的 RANK 结合, 促进破骨细胞的分化和激活, 并抑制其凋亡; 骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)

可以阻止 RANKL 与 RANK 的结合,起负调节作用^[6,7]。

先天性胫骨假关节(CPT)是一种罕见病,其特征为胫骨节段性发育异常、骨萎缩,伴随成角畸形、病理性骨折和骨不愈合,最终形成局部的假关节^[8]。我们在手术切除胫骨假关节病变骨膜和骨组织时观察到,胫骨假关节病变表现为胫骨假关节周围骨膜异常增厚,而胫骨断端萎缩。推测可能是胫骨假关节局部骨转换异常所致^[9,10]。本研究发现,OPG 在 CPT 组胫骨中的表达量低于对照组,RANKL 在骨组织中的表达量高于对照组。OPG 在 CPT 组骨膜中的表达量低于对照组,RANKL 在 CPT 组骨膜中的表达量高于对照组。这说明病变胫骨骨与骨膜中 OPG 表达较正常减低,而 RANKL 表达增加。其生物学效应是 OPG 抑制和拮抗破骨细胞活性能力的降低,而 RANKL 和 RANK 结合,促进破骨细胞成熟和活性增加,最终导致胫骨假关节处胫骨骨吸收增加,成骨减少,导致局部骨萎缩。因此,本研究认为 RANKL/OPG 失衡可能是先天性胫骨假关节出现骨不愈合和断端吸收的原因之一,但其具体致病机制仍需要进一步研究。

目前胫骨假关节外科治疗为局部病灶切除、植骨(或骨膜移植)、髓内固定加外固定器固定的联合手术,其一期愈合率可达到 90%^[4,9,11]。我们推测 CPT 患儿愈合率高的原因可能是联合手术切除了病变的骨膜及骨组织,髓内固定和外固定提供了良好的力学稳定,而最关键的是通过局部植骨或骨膜移植为成骨提供良好的微环境和有利的条件。

总之,本研究发现 RANKL/OPG 失衡可能是儿童先天性胫骨假关节出现胫骨不愈合和骨吸收的原因之一。在临床实践中,对于胫骨假关节 Crawford I、II、III 型等未骨折的病例,可能通过使用抑制骨吸收的药物,如双膦酸盐、降钙素等,来改善局部的骨代谢情况,促进成骨,推迟或避免手术。术后病例使用此类药物,可能改善骨密度,预防再骨折,但其有效性仍需要进一步的实验来证实。

参考文献

- Wagner D, Fahrleitner-Pammer A. Levels of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator for nuclear factor kappa B ligand (RANKL) in serum: are they of any help? [J]. Wien Med Wochenschr, 2010, 160(17-18): 452-457. DOI: 10.1007/s10354-010-0818-x.
- An J, Yang H, Zhang Q, et al. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation [J]. Life Sci, 2016, 147: 46-58. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.01.024.
- Yasuda H. RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases [J]. World J Orthop, 2013, 4(4): 207-217. DOI: 10.5312/wjo.v4.i4.207.
- Kesireddy N, Kheireldin RK, Lu A, et al. Current treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: a systematic review and meta-analysis [J]. J Pediatr Orthop B, 2018, 27(6): 541-550. DOI: 10.1097/BPB.0000000000000524.
- Horn J, Steen H, Terjesen T. Epidemiology and treatment outcome of congenital pseudarthrosis of the tibia [J]. J Child Orthop, 2013, 7(2): 157-166. DOI: 10.1007/s11832-012-0477-0.
- Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone and beyond [J]. Front Immunol, 2014, 5: 511. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00511.
- Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review) [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5): 3212-3218. DOI: 10.3892/mmr.2015.3152.
- O'Donnell C, Foster J, Mooney R, et al. Congenital pseudarthrosis of the tibia [J]. JBJS Rev, 2017, 5(4): e3. DOI: 10.2106/JBJS.RVW.16.00068.
- Zhu GH, Mei HB, He RG, et al. Combination of intramedullary rod, wrapping bone grafting and Ilizarov's fixator for the treatment of Crawford type IV congenital pseudarthrosis of the tibia: mid-term follow up of 56 cases [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2016, 17(1): 443. DOI: 10.1186/s12891-016-1295-1.
- Yan A, Mei HB, Liu K, et al. Wrapping grafting for congenital pseudarthrosis of the tibia: a preliminary report [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(48): e8835. DOI: 10.1097/MD.00000000000008835.
- Shabtai L, Ezra E, Wientroub S, et al. Congenital tibial pseudarthrosis, changes in treatment protocol [J]. J Pediatr Orthop B, 2015, 24(5): 444-449. DOI: 10.1097/BPB.0000000000000191.

(收稿日期: 2018-10-20)

本文引用格式: 朱光辉, 梅海波, 刘昆, 等. OPG 及 RANKL 在儿童先天性胫骨假关节病变骨与骨膜中的表达研究 [J]. 临床小儿外科杂志, 2019, 18(4): 331-334. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.04.017.

Citing this article as: Zhu GH, Mei HB, Liu K, et al. Expressions of OPG and RANKL in tibia bone and periosteum of patients with congenital tibial pseudarthrosis of the tibia in children [J]. J Clin Ped Sur, 2019, 18(4): 331-334. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.04.017.