

·基础研究·

# 脊髓损伤继发骨质疏松大鼠骨髓基质细胞 OPG、RANKL 基因表达特点\*

叶超群<sup>1,2</sup> 纪树荣<sup>3,4</sup> 张凡<sup>2</sup> 杨健<sup>3</sup>

**摘要** 目的:了解脊髓损伤继发骨质疏松大鼠骨髓基质细胞成骨能力及其 OPG、RANKL 基因表达的特点,以探索脊髓损伤继发骨质疏松发病机制。**方法**:60 只 SD 大鼠按体重随机分为 6 组,对 20 只采用脊髓横断法在 T10 处横断脊髓制作完全性 SCI 模型,分为 SCI 6 周和 12 周组;20 只同水平处切断棘突、椎板制作假手术对照组(sham),分为 Sham 6 周和 12 周组;另 20 只分为正常 6 周和 12 周对照组。分别在 SCI 后 6 周和 12 周时取材,行骨髓基质细胞培养,并检测其成骨能力及 OPG、RANKL 基因表达。**结果**:脊髓损伤 6 周、12 周时,大鼠骨髓基质细胞成骨能力无明显变化,其 OPG 基因表达无明显改变;脊髓损伤 6 周时,其 RANKL 基因表达和 RANKL/OPG 明显升高。**结论**:骨髓基质细胞 RANKL 基因表达和 RANKL/OPG 升高可能是脊髓损伤后早期大鼠发生骨质疏松的主要原因。

**关键词** 脊髓损伤;骨质疏松;骨髓基质细胞;骨保护蛋白;RANKL;基因表达

中图分类号:R651.2,R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-09-0782-04

**Osteoprotegerin, RANKL gene expression of bone marrow stromal cells in rats with osteoporosis secondary to spinal cord injury/**YE Chaoqun,JI Shurong,ZHANG Fan, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006, 21(9):782—785

**Abstract Objective:** To explore the osteogenesis and OPG,RANKL gene expression of bone marrow stromal cells (BMSCs) in rats with osteoporosis (OP) secondary to spinal cord injury (SCI). **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into control group(40 cases) and experiment group (20 cases). The rats of experiment group were transected at the tenth thoracic vertebra to make model of SCI, and control group included normal control group and sham operation group in which the rats underwent a sham procedure.All rats were sacrificed at 6 weeks or 12 weeks postoperation. BMSCs were cultured to be measured their alkaline phosphatase (ALP) activities by Lowry and mineral nodule formation by Von Kossa stain.The OPG and RANKL gene expression in BMSCs were analyzed by RT-PCR. **Result:** After 6 weeks postoperation, compared to the control group, the RANKL gene expression was elevated and the RANKL/OPG ratio was increased in BMSCs of rats with OP secondary SCI. The other data was not changed significantly. **Conclusion:** The elevation of RANKL gene expression and RANKL/OPG ratio in BMSCs may be the main cause of OP after early SCI in rats.

**Author's address** Dept. of Orthopedics, The Beijing Army General Hospital, 100070

**Key words** spinal cord injury;osteoporosis;bone marrow stromal cells;osteoprotegerin;RANKL;gene expression

骨质疏松(osteoporosis, OP)是脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)常见并发症。系列动物研究证明<sup>[1-2]</sup>:SCI 后骨吸收增强、骨量丢失快速发生、骨微细结构和生物力学性能显著损害、骨折风险增加;与 SCI 继发 OP 患者临床特点相似。但 SCI 继发 OP 发病机制不明,既往认为:神经损伤、内分泌代谢紊乱、损伤平面下应力减少或消失等因素可能共同参与作用,但确切途径不清。

RANKL、RANK、OPG 是近年发现的肿瘤坏死因子受体、配体超家族成员,它们形成一个骨调节轴:RANKL-RANK-OPG 轴,是调节骨吸收和体内钙离子平衡的最终途径,是破骨细胞发生、发育、成熟及功能调节的必需通路,是骨形成和骨吸收偶联的核

心;各种骨代谢因子均通过其发挥骨调节作用。研究表明:其信号紊乱在多种类型 OP 的发病中起重要作用,对此的研究已经使骨质疏松的治疗进入了一个崭新的时代<sup>[3-4]</sup>,但 SCI 继发 OP 是否与此相关? 尚未见报道。我们对此进行了研究。

## 1 材料与方法

\* 基金项目:中国康复研究中心资助(2003-15)

1 北京军区总医院全军骨科中心, 100070

2 首都体育学院保健康复教研室

3 中国康复研究中心

4 通讯作者:纪树荣(中国康复研究中心康复部, 100068)

作者简介:叶超群,女, 博士后,副教授

收稿日期:2005-11-07

## 1.1 主要试剂

DMEM(低葡萄糖, Gibco), 胎牛血清(杭州四季青)、trypsin(Sigma)、兔抗鼠 OPG 单克隆抗体(北京望尔生物技术有限公司)、SP 免疫组化试剂盒(北京中杉生物技术有限公司)、Lowry 蛋白测定试剂盒(北京帮定生物医学公司)、Trizol (Gibco)、AMV 逆转录酶、RNAsin、dNTPs (Promega)、Taq 脱氧核糖核酸聚合酶(Promega)、引物(奥科公司)。

## 1.2 实验动物及分组

雌性 10 周龄 SD 大鼠 60 只(解放军军事医学科学院动物中心提供), 体重 200—230g, 按体重随机分为 6 组, 每组 10 只。脊髓损伤 6 周组:  $220 \pm 8.94\text{g}$ ; 假手术组 6 周组:  $218.33 \pm 7.52\text{g}$ ; 正常组 6 周组:  $219.16 \pm 4.91\text{g}$ ; 脊髓损伤 12 周组:  $211.42 \pm 8.99\text{g}$ ; 假手术组 12 周组:  $211.66 \pm 11.69\text{g}$ ; 正常 12 周对照组  $216.48 \pm 8.72\text{g}$ 。分组后, 进行单因素方差分析, 各组体重无显著性差异( $P > 0.05$ )。

## 1.3 动物模型制作

采用脊髓横断全切术式在 T10 段横断脊髓制作完全性 SCI 模型, 假手术组在相同水平切断棘突和椎板, 手术方法及判别模型确立的标准同文献<sup>[1]</sup>。

## 1.4 细胞爬片的制作

盖玻片用玻璃刀裁成  $(0.8 \times 0.8)\text{cm}^2$  大小, 自来水清洗干净, 泡酸 24h, 自来水冲洗 10 次以上, 三蒸水冲洗 3 遍, 高压灭菌, 铺于 24 孔板底部备用。

## 1.5 骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)的体外培养

颈椎脱臼处死大鼠后立即浸泡于 75% 酒精中 10min, 无菌条件下, 取股骨、胫骨, 仔细除去骨表面的软组织, 咬骨钳咬除股骨两端, 用预先吸入 2ml 基本培养液的 5ml 注射器冲洗骨髓腔, 置冲洗液于刻度离心管中, 1000r/min, 离心 6min。小心弃上清, 每管重新加入完全培养液(含 15% 胎牛血清)2ml, 轻轻吹打成单细胞悬液, 计数并调整细胞浓度为  $5 \times 10^5/\text{ml}$ , 分别以 1ml、100 $\mu\text{l}$  的量接种于 25 $\text{cm}^2$  培养瓶、24 孔板及预先铺好盖玻片的 24 孔板, 补足完全培养液。放入 5% $\text{CO}_2$ 、37 $^\circ\text{C}$  恒温培养箱内培养, 隔天倒置显微镜下观察, 第 5d 轻轻吸出悬浮细胞, 半量换液, 以后每 2—3d 更换一次培养液。

## 1.6 BMSCs 成骨特性鉴定

①碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)比活性测定: 原代细胞生长至 80% 融合时用胰酶消化, 制成单细胞悬液, 以  $5 \times 10^4/\text{孔}$  的密度接种于 24 孔板, 细胞长满时吸出培养液, 0.01M PBS 漂洗 2 次后按 Lowry 法测定, ALP 比活性以酶活性单位与蛋白

浓度的比值表示。②钙化结节: 24 孔板内第一代细胞长满时, 取出盖玻片, 90% 乙醇固定 30min 后行 von Kossa 染色<sup>[5]</sup>。

## 1.7 BMSCs 骨保护蛋白(osteoprotegerin, OPG)的免疫组化染色

24 孔板内第一代细胞长满爬片后取出, 行细胞免疫化学染色, 按试剂说明书进行。利用图像分析系统(北京麦克奥迪技术图像有限公司)对阳性细胞进行计数及读取其灰度值和光密度值。

## 1.8 BMSCs OPG、RANKL 基因表达

①RT-PCR 总 RNA 的提取: 原代细胞培养至 18—19d, 培养瓶内细胞长满时提取细胞总 RNA, 按 Trizol 说明书进行; 所提 RNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳确定其完整性, 并经紫外分光光度仪检测 RNA 含量和纯度。

②RT-PCR 扩增: 分别取 3 $\mu\text{g}$  总 RNA 为模板, 在加入 Oligo(dT)和 AMV 逆转录酶后以 25 $\mu\text{l}$  反应体系在 42 $^\circ\text{C}$  条件下作用 1h 合成 cDNA 第一链, 然后在 94 $^\circ\text{C}$  加热 2min 以灭活逆转录酶。

在 25 $\mu\text{l}$  反应体系中加入上述产物 2 $\mu\text{l}$ , PCR Mix 12.5ml, 并分别加入 OPG、RANKL、 $\beta$ -actin 引物各 2 $\mu\text{l}$ , 其反应条件为: OPG 94 $^\circ\text{C}$  预变性 5min; 94 $^\circ\text{C}$  变性 45s; 57 $^\circ\text{C}$  退火 45s; 72 $^\circ\text{C}$  延伸 60s, 扩增 29 个循环。RANKL 94 $^\circ\text{C}$  预变性 5min; 94 $^\circ\text{C}$  变性 45s; 52 $^\circ\text{C}$  退火 45s; 72 $^\circ\text{C}$  延伸 60s, 扩增 30 个循环。 $\beta$ -actin 94 $^\circ\text{C}$  预变性 5min; 92 $^\circ\text{C}$  变性 45s; 52 $^\circ\text{C}$  退火 45s; 72 $^\circ\text{C}$  延伸 60s, 扩增 20 个循环。最后一个循环于 72 $^\circ\text{C}$  继续反应 8min。

引物序列为:

OPG 上游 5'CTG TGA AAG CAG TGT GCA ACG 3' 下游 5' GGT GAA GCT GTG CAA GAA CCT3' 301bp

RANKL 上游 5'TTA GCG TCC AGG TGT CCA AC 3' 下游 5' CCA TTG TGT GAT CAC CAT GAG3' 290bp

$\beta$ -actin 上游 5'GGG AAA TCG TGC GTG ACA T 3' 下游 5' TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG3' 385bp

③PCR 产物的半定量分析: PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 采用凝胶成像系统(Amp Pharmacia 公司)进行图像扫描, 分析同一样品 cDNA 扩增的 OPG、RANKL、 $\beta$ -actin 电泳条带的积分光密度; 分别计算其 mRNA 表达量的相对值: 各因子的积分光密度/ $\beta$ -actin 积分光密度。

## 1.9 统计学分析

采用 SPSS11.5 软件, 各时间点实验组与对照组间差异进行单因素方差分析; 不同时间点实验组间的差异进行独立样本间的 *t* 检验; 实验数据以均数  $\pm$  标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 倒置相差显微镜下观察细胞形态

细胞刚接种时呈圆形, 大小不一, 2d后可见极少数细胞开始贴壁, 变成圆形, 体积增大, 5d后可见贴壁细胞呈梭形, 散在分布于悬浮的血细胞中, 随着换液, 大部分悬浮血细胞被除去, 7—8d时细胞成集落生长, 少部分成梭形, 大部分为扁平形、椭圆形及多角形, 10—14d后细胞集落增多、长大逐渐融合成片, 18—20d, 细胞呈片状融合, 长满平皿。振动的细胞在形态上与静止培养细胞无明显差别。SCI 6周、12周与各同时间对照组 BMSCs 形态、生长状况无明显差异。

### 2.2 BMSCs ALP 比活性

SCI 6周和12周时, BMSCs 的 ALP 活性比较同时间对照组无明显差异 ( $P>0.05$ ), 两组间无明显变化 ( $P>0.05$ ) (表 1)。

### 2.3 Von Koss 染色

SCI 各组 BMSCs 均可形成可形成钙结节。Von Kos 染色显微镜下均可见细胞聚集部位出现黑色结节。除 SCI 12 周组大鼠钙化结节较小外, 其他各组间无明显区别 (图 1, 见前置彩色插页 7)。

### 2.4 BMSCs 的 OPG 免疫组化

BMSCs 的 OPG 阳性染色细胞为胞核蓝染, 胞浆和胞核中布满棕褐色颗粒或胞浆和胞核均为棕褐色, 细胞体积较小; 阴性细胞核无蓝色复染, 胞浆呈淡棕或棕蓝色, 胞核呈淡蓝色。单因素方差分析显示: SCI 6周和12周时, OPG 阳性染色细胞百分比、阳性细胞平均灰度值和平均光密度值在各组间无明显差异 ( $P>0.05$ ) (表 2、图 2, 见前置彩色插页 7)。

### 2.5 RT-PCR 检测 BMSCs OPGmRNA、RANKLmRNA 水平

SCI 6周时, RANKLmRNA 表达和 RANKL/OPG 较对照组明显升高 ( $P<0.05$ ), OPGmRNA 无明显变化。SCI 12周时, 上述各指标均无明显改变 ( $P>0.05$ ) (表 3、图 3, 见前置彩色插页 7)。

## 3 讨论

SCI 继发 OP 表现出骨吸收增强、骨转换增高的特征, 发病机制不明。有研究<sup>[9]</sup>发现 SCI 患者来源于骨髓细胞培养的破骨细胞增加; 我们前面的研究也显示<sup>[2]</sup>: SCI 6周时, 大鼠单位面积骨小梁的破骨细胞数增加。可见, 破骨细胞的数量、功能改变在 SCI 继发 OP 发病中可能起重要作用。

破骨细胞来源于造血单核/巨核前体细胞, 在

表 1 SCI 组和对照组细胞 ALP 比活性 ( $\bar{x}\pm s$ , U/g/L)

组别	动物数	ALP 比活性
Normal 6	6	8.08±2.52
Sham 6	5	7.97±1.96
SCI 6	6	7.66±4.47
<i>F</i> (2,16)		0.027
<i>P</i>		0.974
Normal 12	8	6.81±2.64
Sham 12	6	7.954±3.43
SCI 12	6	7.66±4.04
<i>F</i> (2,19)		0.224
<i>P</i>		0.802

表 2 SCI 组和对照组 BMSCs OPG 免疫化学 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数	阳性细胞 (%)	灰度值	光密度值
Normal 6	5	19.29±3.45	173.48±33.93	0.1739±0.085
Sham 6	4	23.75±18.17	177.90±33.93	0.1630±0.087
SCI 6	5	8.32±9.19	189.74±12.44	0.1291±0.028
<i>F</i>		2.13=2.330	2.13=0.537	2.13=0.670
<i>P</i>		0.143	0.670	0.599
Normal 12	5	12.44±5.87	163.68±11.77	0.1934±0.03
Sham 12	5	12.59±6.03	154.07±19.28	0.2215±0.05
SCI 12	5	8.59±8.26	168.94±25.51	0.1831±0.07
<i>F</i>		2.12=0.469	2.14=0.735	2.14=0.655
<i>P</i>		0.500	0.639	0.537

表 3 SCI 组和对照组 BMSCs OPGmRNA、RANKLmRNA 表达 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数	OPG	RANKL	RANKL/OPG
Normal 6	3	0.9037±0.1087	1.4852±0.097	2.1331±0.2466
Sham 6	4	0.8479±0.2622	1.6624±0.1567	2.733±0.9456
SCI 6	5	0.8409±0.1115	2.29984±0.1648 <sup>①</sup>	3.9110±0.3392 <sup>①</sup>
<i>F</i>		2.8=0.142	2.11=6.703	2.8=6.426
<i>P</i>		0.870	0.017	0.032
Normal 12	5	1.6319±0.7930	1.3287±0.3191	1.1467±0.9012
Sham 12	5	2.1675±0.9324	1.3090±0.2664	0.7155±0.2468
SCI 12	5	1.4548±0.8256	1.4628±0.4154	1.4527±1.1439
<i>F</i>		2.8=0.566	2.11=0.243	2.8=0.568
<i>P</i>		0.595	0.789	0.594

①与同时间对照组比较  $P<0.05$

其发生、分化、发育、功能发挥过程中, BMSCs 起重要调节作用。一方面, BMSCs 表达、分泌 RANKL, RANKL 是破骨细胞生成、发育、发挥功能唯一的、必需的因子, 通过与表达于破骨前体细胞的 RANK 结合发挥作用; 另外, BMSCs 表达、分泌 OPG, OPG 则竞争性与 RANK 结合, 抑制破骨细胞形成、活化及功能发挥, 因此, RANKL/OPG 浓度比决定着破骨细胞的发生、分化、活化并影响其功能。

### 3.1 SCI 后 BMSCs 的成骨能力

BMSCs 可以成骨, 是体内主要含有定向性骨祖细胞和诱导性骨祖细胞的组织; ALP 和钙化结节是 BMSCs 体外成骨的主要标志之一。

本研究结果显示: SCI 后大鼠 BMSCs 分泌的 ALP 比活性与对照组无明显差异, 可形成矿化结节, 说明 SCI 并不影响 BMSCs 向成骨细胞的分化。免

疫组化和 RT-PCR 结果示 BMSCs 中 OPG 阳性细胞数及 OPGmRNA 表达与对照组无明显差异; 进一步证明: SCI 后, BMSCs 成骨能力没有受到影响。这与我们以前的系列研究<sup>[1-3]</sup>结果一致, 骨代谢生化指标和骨形态计量学结果均显示: SCI 6、12 周时, 大鼠骨形成与对照组无明显区别。

但 SCI 12 周组钙化结节小于其他各组, 而且数量稍多, 据现有证据, 我们还无法推测其原因。

### 3.2 BMSCs OPGmRNA、RANKLmRNA 的表达

RT-PCR 结果显示: SCI 6 周时, SCI 大鼠 BMSCs RANKL mRNA 表达和 RANKL/OPG 比值较对照组明显增高 ( $P < 0.05$ ), OPGmRNA 表达与对照组无明显区别 ( $P > 0.05$ ); 说明: SCI 后, BMSCs RANKL 基因表达上调、RANKL/OPG 增高可能与 SCI 继发 OP 的发生密切相关。

RANKL 是破骨细胞发生的必需因子。在巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 存在条件下, 只需加入 RANKL 即可使单核细胞前体变为破骨细胞, 此作用呈剂量依赖性。在培养的破骨细胞中加入 RANKL, 可促进降钙素受体、 $\alpha\text{v}\beta3$  整合素、抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP)、组织蛋白酶 C 及 c-src 表达, 这些物质是促进破骨细胞成熟和发挥骨吸收作用所必须的。此外, RANKL 还通过提高破骨细胞运动能力、抑制破骨细胞凋亡来促进骨吸收。可见, RANKL 与破骨细胞的分化、发育、成熟、功能发挥的每一步均密切相关。动物实验证实: 重组 RANKL 可引起广泛的 OP, 并伴有恶性高钙血症<sup>[7]</sup>。人体研究发现: 在 OP 患者, 反应骨吸收的形态计量学参数—破骨细胞表面和侵蚀表面骨与成骨细胞 RANKLmRNA 表达成正相关<sup>[8]</sup>。对 SCI 继发 OP 的研究表明: SCI 后骨吸收明显增强; 我们的系列研究则分别发现<sup>[1-3]</sup>: SCI 6 周时, 骨吸收代谢指标增高, 单位骨小梁面积破骨细胞数也增多; 本结果进一步显示: BMSCs RANKLmRNA 表达、RANKL/OPG 比值明显增高; 可见, SCI → ? → BMSCs RANKLmRNA 表达增强、RANKL/OPG 比值增高 → 破骨细胞数目增多、功能增强 → 骨吸收增强, 可能正是 SCI 早期继发 OP 的根本原因。

OPG 与 RANKL 竞争性结合位于破骨细胞/破骨前体细胞的 RANK, 抑制破骨细胞的分化、发育、成熟, 促进骨形成; SCI 6 周和 12 周时, BMSCs OPGmRNA 表达均与对照组无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), BMSCs 的免疫化学结果也显示: SCI 后, BMSCs OPG 阳性细胞数与对照组无明显区别, 说明 SCI 对 BMSCs 成骨能力没有影响, 这从根本上解释了我们以前的系列研究结果: SCI 6 周后, 骨形成与对照组无

区别。

### 3.3 BMSCs RANKL 基因表达异常的可能原因

本研究结果显示: SCI 后, BMSCs RANKLmRNA 表达增强、RANKL/OPG 比值增高可能是 SCI 继发 OP 的根本原因。

SCI 后什么因素导致 RANKL 信号紊乱? 虽然我们未能对此进行研究, 但相关研究结果为我们提供了依据。研究表明<sup>[10]</sup>: SCI 后局部组织肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素 6 (IL-6) 等细胞因子改变可能是导致 RANKL 信号紊乱的因素之一。研究<sup>[8]</sup>发现: 在 OP 患者, TNF- $\alpha$  不仅与骨侵蚀表面而且与成骨细胞 RANKLmRNA 表达呈正相关, 是促进 RANKLmRNA 表达和骨吸收的重要因素, 其促进骨吸收作用正通过 RANKLmRNA 表达上调实现。动物实验发现: 在 SCI 后 1 周时股骨近端骨组织中 TNF- $\alpha$  阳性表达显著高于对照组<sup>[9]</sup>。可见, SCI 可通过局部组织 TNF- $\alpha$  表达、分泌增加引起 RANKL 信号紊乱。同时, 该研究<sup>[9]</sup>还发现 SCI 6 周时, IL-6、BMP 表达显著升高, 认为在 SCI 继发 OP 的发生过程中, 不同的细胞因子分别在早期和晚期发挥作用。Demulder 等<sup>[6]</sup>也通过对 SCI 患者的骨髓细胞培养后发现, 6 周时所有来自截瘫患者髂骨骨髓细胞培养液中的 IL-6 含量较胸骨骨髓细胞培养液中含量增高, 同时其形成的破骨细胞数目显著高于胸骨。从截瘫患者髂骨所取得的条件介质 (conditioned media, CM) 加入正常人骨髓培养液中能增加破骨样细胞的形成, 加入 IL-6 单克隆抗体则显著减少破骨样细胞的形成, 结果显示: IL-6 与 SCI 继发 OP 的发生密切相关。TNF- $\alpha$ 、IL-6 是分别由 T 细胞、单核巨噬细胞等分泌的细胞因子, 对 RANKL 信号起正性调节作用, 在多型 OP 的发病中扮演重要角色。综合上述研究和我们的结果, 提示: SCI → 局部 TNF- $\alpha$ 、IL-6 ↑ → RANKLmRNA 表达 ↑、OPGmRNA 表达 ↓ → 骨吸收增强、骨形成下降, 是引起脊髓损伤继发骨质疏松的发病途径之一。

然而, SCI 后骨形成并不明显降低, 我们的结果也显示: SCI 后, BMSCs OPGmRNA 的表达与对照组无明显差异, 说明可能存在相关因素抵消了 IL-6、TNF- $\alpha$  对 BMSCs OPGmRNA 表达的副性调节作用。相关研究结果为我们提供了依据。有学者发现: SCI 6 周时局部骨组织中 BMP 含量增高<sup>[9]</sup>。BMP 是一种重要的骨形成因子, 不仅可直接促进 BMSCs 向成骨细胞的分化, 而且可上调 BMSCs/成骨细胞 OPGmRNA 的表达; 可见, SCI 后, 局部骨形成因子

(下转 803 页)