

骨保护蛋白和骨保护蛋白配体在脊柱结核病灶骨中的表达★

何玉泽¹, 王自立², 马 腾², 辛 兵¹, 郭开今¹

Expression of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the focus of spinal tuberculosis

He Yu-ze¹, Wang Zi-li², Ma Teng², Xin Bing¹, Guo Kai-jin¹

Abstract

BACKGROUND: The pathological process of bone tissue hardening in spinal tuberculosis is complex, and the underlying mechanism remains poorly understood.

OBJECTIVE: To investigate the expression of osteoprotegerin (OPG) and OPG ligand (OPGL) in different sections of spinal tubercular infectious focus.

METHODS: The bones resected from patients with spinal tuberculosis were divided into three groups based on their regions: ossified bone, sub-normal bone and normal bone. The average absorbance and positive area percentage of OPG and OPGL in each group samples were detected by PV-6000 two-step immunohistochemical technique.

RESULTS AND CONCLUSION: The average absorbance and positive area percentage of OPG, as well as OPG and OPGL expression in the ossified bone group were significantly greater than in the normal bone group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). These findings suggest that changes in OPG and OPGL expression are related to the formation of ossified bone surrounding the focus of spinal tuberculosis.

He YZ, Wang ZL, Ma T, Xin B, Guo KJ. Expression of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the focus of spinal tuberculosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(28): 5165-5168.

[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 脊柱结核病灶骨组织硬化的病理过程较为复杂, 其发生机制尚不明确。

目的: 探讨脊柱结核病灶骨不同部位的骨保护蛋白和骨保护蛋白配体的表达。

方法: 取脊柱结核患者脊柱结核术中切除的骨质, 按照部位分成硬化骨组, 亚正常骨组和正常骨组。应用 PV-6000 二步法免疫组化检测技术测定各组标本中骨保护蛋白和骨保护蛋白配体的平均吸光度及阳性面积比, 并进行统计学分析。

结果与结论: 脊柱结核硬化骨组骨保护蛋白平均吸光度, 阳性面积比以及骨保护蛋白和骨保护蛋白配体表达的比值均显著高于亚正常骨组和正常骨组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果表明骨保护蛋白和骨保护蛋白配体的表达变化与脊柱结核病灶周围硬化骨的产生有关。

关键词: 脊柱结核; 硬化骨; 骨保护蛋白; 骨保护蛋白配体; 免疫组化

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.28.009

何玉泽, 王自立, 马腾, 辛兵, 郭开今. 骨保护蛋白和骨保护蛋白配体在脊柱结核病灶骨中的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28):5165-5168. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨保护蛋白(osteoprotegerin, OPG)作为骨转换的重要分子生物学指标, 在骨吸收中对破骨细胞有抑制作用, 抑制骨吸收, 增加骨量, 最终使骨组织病理形态向硬化型方向发展^[1]。骨保护蛋白配体(osteoprotegerin ligand, OPGL)是从成骨细胞/基质细胞上克隆得到的另一种骨代谢因子, 对破骨细胞的分化与活化, 抑制破骨细胞凋亡起重要作用^[2-4]。OPGL是目前发现的惟一能直接诱导破骨细胞分化发育并参与破骨细胞功能调节的细胞因子, 可通过增强破骨细胞运动能力并抑制破骨细胞的凋亡来间接促进其骨吸收功能^[5]。大量研究发现, 许多调节骨代谢的细胞因子如甲状旁腺素、白细胞介素、维生素D等, 都是通过影响OPG和OPGL这两个

因子的增加或减少而完成对成骨细胞和破骨细胞的调节作用的^[6]。

脊柱结核病灶中的硬化骨, 在影像学上表现为高密度区域, 这些区域在手术过程中显示为非常坚硬的骨质, 使传统的病灶刮除术不能把结核病灶彻底清除, 硬化骨成为抗痨药物的屏障, 阻碍了抗结核药物的进入, 为结核杆菌的残存提供了场所, 术后复发率较高^[7]。硬化骨产生的机制较为复杂, 目前鲜见报道, 实验通过比较脊柱结核病灶硬化骨、亚正常骨和正常骨中OPG和OPGL的表达情况, 探讨OPG和OPGL在脊柱结核病理过程中的作用, 从分子水平深化对脊柱结核病灶骨硬化的发生机制。

1 对象和方法

设计: 开放性实验。

¹Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China; ²Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

He Yu-ze★, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China
surgeonhyz@sina.com

Received: 2011-04-27
Accepted: 2011-06-01

¹ 徐州医学院附属医院骨科, 江苏省徐州市 221002
² 宁夏医科大学附属医院骨科, 宁夏回族自治区银川市 750004

何玉泽★, 男, 1971年生, 汉族, 宁夏医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨科方面研究。
surgeonhyz@sina.com

通讯作者: 何玉泽, 硕士, 主治医师。徐州医学院附属医院骨科, 江苏省徐州市 221002
surgeonhyz@sina.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)28-05165-04

收稿日期: 2011-04-27
修回日期: 2011-06-01
(20110427024/ZW S)

时间及地点: 于2007-05/2009-10在宁夏医科大学附属医院骨科、病理科及徐州医学院附属医院骨科完成。

对象: 选择宁夏医科大学附属医院骨科和徐州医学院附属医院骨科手术治疗的脊柱结核患者38例, 其中男性20例, 女性18例, 年龄25~72岁, 平均年龄46岁。胸椎9例, 胸腰段11例, 腰椎18例。研究符合国务院颁布的《医疗机构管理条例》第33条规定^[8], 并将实验方法对患者或家属如实告知, 取得充分合作并签署知情同意书。

纳入标准: ①保守治疗无效。②手术治疗并经病理学检查确诊的脊柱结核患者。

排除标准: 有氟骨症等骨质疏松病史; 近期(6个月内)发生脊柱骨折; 接受过OPG和OPGL产品的治疗; 脊柱结核病灶局部有前后纵韧带骨化。

材料: OPG, OPGL和辣根酶标记抗兔IgG多聚体兔抗人多克隆抗体购于河北博海生物工程开发有限公司。

实验方法:

标本采集与分组: 根据纳入标准, 取脊柱结核患者术中切除的骨质, 按照部位分为3组: 紧挨病灶空洞壁的骨质, 为硬化骨组; 切除少量正常骨质作为正常骨组; 位于硬化骨和正常骨之间的部分组成亚正常骨组。如果术中没有发现硬化骨, 则此病例不取硬化骨。

OPG和OPGL免疫组化染色: 采用PV-6000二步法进行免疫组化染色^[9]。标本于40 g/L多聚甲醛磷酸缓冲液固定, 10%EDTA脱钙液脱钙, 常规石蜡包埋, 切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 蒸馏水洗涤。采用高热高压抗原修复。每张切片加入体积分数3% H_2O_2 去离子水, 以阻断内源性过氧化物酶, 防止标本中的内源性过氧化物酶使DAB发生显色反应, 产生非特异性染色。每张切片分别滴加OPG或OPGL兔抗人多克隆抗体(一抗; 工作浓度均为1:100)。抗体与标本发生特异性结合后, 每张切片分别滴加辣根酶标记抗兔IgG多聚体(二抗), 与一抗发生特异性结合。滴加新鲜配制的DAB显色剂, 此时过氧化物酶催化3, 3'-二氨基联苯胺与双氧水发生反应, 产生棕黄色沉淀物。显色充分后蒸馏水冲洗终止显色反应。复染, 脱水, 透明, 吹干, 封固, 显微镜下观察结果。

根据免疫组化染色判定标准^[10], 以细胞浆、细胞膜以及基质中出现棕黄色颗粒为阳性表达, 以PBS磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。将免疫组化切片正置于OLYMPUS显微镜下观察, 利用OLYMPUS BX40病理图文报告系统在每张切片随机选取5个不相重复的视野采集图像, 并将图像输入Image Pro Plus 6.0图像分析系统, 对染色强度进行半定量分析, 测定OPG和OPGL免疫组化染色平均吸光度和阳性面积比, 取每张切片的均

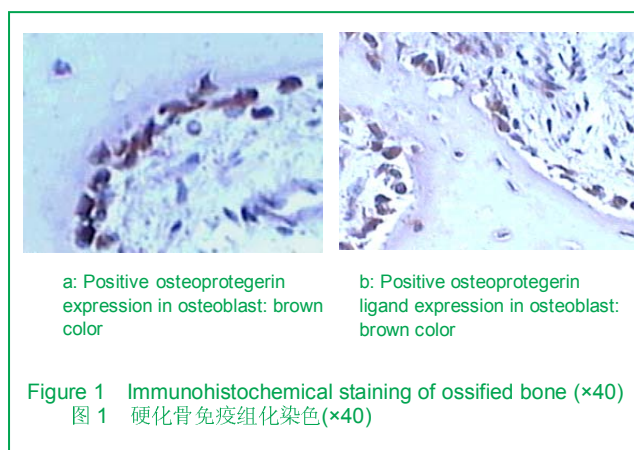
值作为该例的测量值。

主要观察指标: 免疫组化检测技术测定各组标本中OPG和OPGL的平均吸光度及阳性面积比。

统计学分析: 应用SPSS11.5统计软件包对数据结果进行统计学分析, 计量资料数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间OPG和OPGL免疫组化染色阳性指标的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果

2.1 OPG和OPGL在脊柱结核硬化骨中的表达 硬化骨组OPG和OPGL阳性表达的细胞主要是一些成骨细胞, 在增生、增粗的骨小梁表面可见带状排列紧密的成骨细胞数目增多, 胞体肥大, 增生活跃, 胞浆胞膜阳性棕色着色, 胞核阴性蓝染, 见图1。



2.2 免疫组化染色检测脊柱结核硬化骨OPG表达强度 高于亚正常和正常骨质 硬化骨组OPG免疫组化染色平均吸光度明显高于其他两组, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 亚正常骨组较正常骨组略有升高, 但差异无显著性意义($P > 0.05$); 硬化骨组阳性面积比明显高于其他两组, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 亚正常骨组较正常骨组略有升高, 但差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 免疫组化染色检测各组骨质骨保护蛋白表达强度
Table 1 Detection of expression of osteoprotegerin in each group by immunohistochemical staining ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Average absorbance	Positive area percentage (%)
Ossified bone	29	0.588±0.101	4.96±0.84
Sub-normal bone	38	0.306±0.079 ^a	2.01±0.65 ^a
Normal bone	38	0.295±0.090 ^a	1.93±0.46 ^a

^a $P < 0.01$, vs. ossified bone group

2.3 免疫组化染色检测脊柱结核硬化骨OPGL表达强度 高于亚正常和正常骨质 硬化骨组OPGL免疫组化染

色平均吸光度高于其他两组, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 亚正常骨组较正常骨组略有升高, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。硬化骨组阳性面积比高于其他两组, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 亚正常骨组较正常骨组略有升高, 但差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表2。

表2 免疫组化染色检测各组骨质保护蛋白配体表达强度
Table 2 Detection of osteoprotegerin ligand expression in each group by immunohistochemical staining

(x±s)			
Group	n	Average absorbance	Positive area percentage (%)
Ossified bone	29	0.443±0.103	3.51±0.92
Sub-normal bone	38	0.303±0.089 ^a	1.99±0.59 ^a
Normal bone	38	0.292±0.097 ^a	1.91±0.52 ^a

^a $P < 0.01$, vs. ossified bone group

2.4 脊柱结核硬化骨OPG和OPGL表达比值高于亚正常和正常骨质 硬化骨组OPG和OPGL平均吸光度的比值, 明显高于其他两组, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 而亚正常骨组较正常骨组略有升高, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。硬化骨组OPG阳性面积比和OPGL阳性面积比的比值, 明显高于其他两组, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 而亚正常骨组较正常骨组略有升高, 但差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表3。

表3 各组中骨保护蛋白和骨保护蛋白配体表达的比值
Table 3 The ratio of osteoprotegerin (OPG) to osteoprotegerin ligand (OPGL) expression in each group

(x±s)			
Group	n	OPG/OPGL average absorbance	OPG/OPGL positive area percentage
Ossified bone	29	1.413±0.034	1.469±0.195
Sub-normal bone	38	1.006±0.046 ^a	1.990±0.590 ^a
Normal bone	38	1.001±0.211 ^a	0.998±0.229 ^a

^a $P < 0.01$, vs. ossified bone group

3 讨论

骨的正常代谢是维持骨质吸收和骨质形成的平衡过程, 破骨细胞活性和分化的调节对于维持这一平衡起决定作用^[11-13], OPG/OPGL/RANK环路是调节骨代谢的核心因子, OPG是OPGL的可溶性受体, 竞争性地结合RANK, 抑制OPGL与RANK之间的信号传递, 从而抑制破骨细胞成熟与激活, 达到骨吸收和骨形成的动态平衡。多种激素和细胞因子调节OPG和OPGL的表达, 如细菌, 机械刺激、张应力、压应力、激素、甲状旁腺激素、1,25(OH)₂D₃、细胞因子、白细胞介素、肿瘤坏死因子α、干扰素γ、免疫应答等等^[14]。骨质的破坏, 启动

了机体的修复机制, 各种影响骨转换的因子分泌增加, 功能增强, 使骨转换速度加快, 一方面促进了成骨过程, 对破坏的骨质进行修复; 另一方面也促进了破骨过程, 对修复的骨质进行塑形和重建^[15]。

脊柱结核起病缓慢, 病史较长, 上述因子都有可能对脊柱结核病灶修复过程中发挥作用, 影响OPG-RANKL的表达, 骨质修复也是在很长的时间内完成的, 而且经常反反复复, 破坏、修复、骨化, 然后再破坏、修复、骨化, 由于坏死灶周围骨质硬化过程不一定是同时进行的, 有的地方已经骨质硬化, 有的地方没有硬化, 当机体局部抵抗力降低或化疗不规律、结核杆菌产生耐药时, 结核菌又开始繁殖增长, 坏死灶就会向相对比较薄弱的未硬化的部分扩散, 甚至到达硬化部位的两侧和外面, 从而形成结核病灶的不规则形状^[7]。本组骨质破坏的显示率为100%, 有时同一病例不同的病灶处表现为多种骨破坏改变, 也提示脊柱结核慢性、反复的发病过程。

OPG和OPGL表达的比例决定骨吸收的程度。实验结果显示, 脊柱结核硬化骨组织中OPG, OPGL的表达水平及OPG/OPGL均较亚正常骨组和正常骨组显著升高, 同时, OPG表达较其他两组的升高水平比OPGL明显, 结果说明硬化骨组OPG表达的强度超过了OPGL表达的强度。结果提示, 在脊柱结核免疫炎症反应刺激下, 在影响OPG-RANKL表达的因素如细菌, 机械刺激及免疫应答等参与下, 可通过提高OPG/OPGL表达而抑制破骨细胞前体细胞的发育、活化和生存, 抑制破骨活动, 增加骨量, 骨密度增高, 使骨组织形态向硬化型方向发展^[12]。文献报道显示OPG和OPGL是作用于骨吸收和钙代谢的最后体液介质, OPG和OPGL表达的比例决定骨吸收的程度^[5]。在脊柱结核的骨转换加速过程中OPG和OPGL等细胞因子可能联合发挥重要作用, 既有成骨活动增强, 也有破骨活动增强, 只是由于成骨活动增强的程度强于破骨活动的增强程度。

在脊柱结核骨组织微环境中, 免疫反应及炎症递质可能通过刺激成骨细胞分泌OPG增加超过了OPGL的增加, 从而通过一系列的级联反应, 最终导致破骨细胞功能受到抑制, 骨吸收活动减弱, 而造成了脊柱结核骨质呈硬化型的病理表现。由于硬化骨非常致密, 它不但影响抗结核药物的渗透, 而且为结核菌的残留提供了场所, 是脊柱结核复发的最主要原因之一^[16]。因此, 手术必须用骨刀彻底清除病灶及其周围硬化骨, 直到正常骨, 局部的OPG和OPGL表达比例又会恢复动态平衡, 有利于病灶的愈合。病灶的愈合消除了细菌、炎症递质、免疫应答等促使OPG和OPGL表达比例失调的因素, 从而使骨吸收与骨形成维持正常的动态平衡^[14], 本实验中脊柱结核硬化骨组织中OPG, OPGL的表达水平及OPG/OPGL均发生了明显

变化正是说明了脊柱结核的各种病理表现都是骨吸收与骨形成正常动态平衡的破坏, 即病理情况下产生的多种因子调控OPG和OPGL表达的动态不平衡导致了脊柱结核病灶周围硬化骨的产生。

综上所述, 实验结果显示硬化骨组骨保护蛋白平均吸光度, 阳性面积比以及骨保护蛋白和骨保护蛋白配体表达的比值均显著高于亚正常骨组和正常骨组。结果表明骨保护蛋白和骨保护蛋白配体表达的变化与脊柱结核病灶周围硬化骨的产生有关。

4 参考文献

- [1] Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;234(1):137-142.
- [2] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin(OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-176.
- [3] Kostenuik PJ, Shalhoub V. Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr Pharm Des*. 2001;7(8):613-635.
- [4] Kong YY, Yoshida, Sarosi T, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-323.
- [5] Fan P, Zhou J, Tang LL, et al. *Yixue Zongshu*. 2007;13(8):605-607.
范蓬, 周健, 唐丽丽, 等. 骨保护素及其配体在牙正畸中作用的研究进展[J]. *医学综述*, 2007, 13(8):605-607.
- [6] Palmqvist P, Persson W, Conaway HH, et al. IL-6, leukemia inhibitory factor, and Oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol*. 2006;169(6):3353-3362.
- [7] Ge ZH, Wang ZL, Wei MJ, et al. *Jiangsu Yiyao*. 2009;35(6):669-671.
戈朝晖, 王自立, 魏敏吉, 等. 异烟肼在脊柱结核患者不同组织中的分布[J]. *江苏医药*, 2009, 35(6):669-671.
- [8] State Council of the People's Republic of China Administrative Regulations on Medical institution. 1994-09-01.
中华人民共和国国务院令149号. 医疗机构管理条例. 1994-09-01.
- [9] Xu XW, Dai SZ, Ma D, et al. *Shandong Yiyao*. 2008;48(35):30.
徐小雯, 戴淑真, 马玓, 等. Maspin在宫颈癌组织中的表达及意义[J]. *山东医药*, 2008, 48(35):30.

- [10] Cheng JG, Fan P, Tang LL, et al. *Linchuang Kouqiang Yixue Zazhi*. 2007;23(9):529.
程继光, 范蓬, 唐丽丽, 等. 增龄因素对鼠正畸牙周组织骨保护素及其配体表达的影响[J]. *临床口腔医学杂志*, 2007, 23(9):529.
- [11] Uebelhart B, Rizzoli R. *Osteoporosis. Rev Med Suisse*. 2009;5(186):124-129.
- [12] Jakob F, Seefried L, Ebert R. *Pathophysiology of onemetabolism. Internist(Berl)*. 2008;49(10):1159-1160.
- [13] Gaddy D. Inhibin and the regulation of bone mass. *Curr Osteoporosis Rep*. 2008;6(2):51-56.
- [14] Zhou Y, Fu Y, Yati Yasui Yazhouing Xue Zazhi. 2007;17(3):172-175.
周燕, 付云. 牙周组织OPG-RANK表达调控研究的新进展[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2007, 17(3):172-175.
- [15] Wu YG, Wang ZL. *Ningxia Yixue Zazhi*. 2005;27(1):9-11.
武永刚, 王自立. 脊柱结核病灶骨中BMP-2/4的表达与CT值的关系[J]. *宁夏医学杂志*, 2005, 27(1):9-11.
- [16] Zhang GB, Wu QQ, Guan H, et al. Beijing: People's Medical Publishing House. 2007:422-423.
张光铂, 吴启秋, 关骅, 等. 脊柱结核病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 422-423.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 由第二作者指导审核, 第一作者进行实验设计、资料收集、实施、评估及撰写论文, 并对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验获得徐州医学院附属医院和宁夏医科大学附属医院伦理委员会批准。

致谢: 感谢宁夏医科大学附属医院马腾、江海峰对我课题实验的大力支持, 感谢武警北京市总队第二医院武永刚、李书菊的帮助, 感谢徐州医学院附属医院辛兵、郭开今教授的帮助。

本文创新性: 以“脊柱结核, 硬化骨, 骨保护蛋白, 骨保护蛋白配体”为检索词, 检索中国期刊全文数据库、中国博硕士学位论文全文数据库, 最终检索认定实验具有先进性。

SCI 收录的组织构建类期刊介绍: 本刊发展部

英文刊名: *Journal of Spinal Disorders & Techniques*

中文刊名: 《脊柱病症与治疗技术》

ISSN: 1536-0652

影响因子: 1.206

出版周期: 双月刊

出版数据: 14 篇

创刊年份: 2002 年

出版单位(或出版地): LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS

期刊网址: <http://journals.lww.com/jspinaldisorders/pages/default.aspx>

主编: Thomas A. Zdeblick, MD

投稿平台: <http://www.editorialmanager.com/jstd/>

收录数据库: SCI, PubMed

栏目: 研究原著, 专题论丛, 经典回顾, 报告等

英文简介: *Journal of Spinal Disorders & Techniques* features peer-reviewed original articles on diagnosis, management, and surgery for spinal problems. Topics include degenerative disorders, spinal trauma, diagnostic anesthetic blocks, metastatic tumor spinal replacements, management of pain syndromes, and the use of imaging techniques in evaluating lumbar spine disorder. The journal also presents thoroughly documented case reports.

中文简介: 《脊柱病症与治疗技术》杂志发表同行评议的诊断、管理和脊柱手术问题等原创文章。主题包括退行性疾病, 脊柱创伤, 诊断麻醉块, 脊柱转移性肿瘤的更换, 疼痛综合征的管理, 以及成像技术在评估腰椎疾病的使用。该杂志还发表了病例报告类的文章。