RANK/RANKL/OPG系统与人工关节无菌性松动

熊绯　戴闽

摘要　人工关节置换术是临床上治疗各种终末期关节疾病最常用的有效方法，但人工关节无菌性松动常影响其远期疗效。目前多数学者认为人工关节周围破骨细胞介导的骨吸收，是导致人工关节松动的主要原因。近年许多研究表明核因子-κB受体活化因子(RANK)/RANK配体(RANKL)/骨保护素(OPG)系统与人工关节无菌性松动有密切关系，在体内受多种促骨激素和细胞因子的直接或间接作用，调控RANKL-OPG比值，介导破骨细胞分化、活化和凋亡，从而影响骨代谢。该文就RANK/RANKL/OPG系统功能、磨损颗粒对其作用及其基因治疗研究进展作一综述。

关键词　RANK；RANKL；OPG；破骨细胞；人工关节无菌性松动

DOI：10.3969/j.issn.1673-7083.2011.01.017

随着人工关节材料与相关手术技术的飞速发展，人工关节置换术已成为临床上治疗各种终末期关节疾病最常用的有效治疗方法。然而，人工关节周围骨质溶解导致的无菌性松动仍未得到很好解决，已成为影响人工关节置换术远期疗效的重要难题。近年研究表明，人工关节无菌性松动的发生与力学因素和生物学因素相关，以生物学因素为主要因素。人工关节置入人体后，随着关节活动，会产生大量磨损颗粒，这些颗粒诱导机体发生生物学反应，促使人工关节与骨之间形成界膜组织，并随着磨损颗粒和骨细胞吸收刺激因子的增加，引起界膜组织中各种骨吸收因子的释放和破骨细胞的分化和活化，最终导致人工关节周围骨溶解[1]。在这一过程中，对破骨细胞分化、活化和凋亡起重要作用的是核因子-κB受体活化因子(RANK)/RANK配体(RANKL)/骨保护素(OPG)信号调节系统。因此，深入研究RANK/RANKL/OPG系统调控破骨细胞分化、成熟和凋亡，以及人工关节周围骨溶解的机制，对于开发人工关节无菌性松动防治新途径有着重要意义。

1　RANK、RANKL、OPG结构与功能

RANK是在人骨髓源性树突状细胞基因序列测评中发现的一种I型跨膜蛋白，人RANK基因定位于18q22.1，属于肿瘤坏死因子(TNF)受体家族[2]。人RANK分子由616个氨基酸残基组成，其N末端胞外域有2个糖基化位点和4个富含半胱氨酸区域。RANK编码的蛋白在体内有跨膜蛋白型和可溶型两种存在方式，前者表达于单核巨噬细胞系、破骨细胞前体细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞、树突状细胞等细胞表面，其中表达于破骨细胞前体细胞表面的RANK会与RANKL结合而发挥促进破骨细胞分化的功能；后者存在于血液循环中，可与RANKL结合，但对破骨细胞分化起抑制作用。RANK与RANKL结合后，通过TNF受体相关因子(TRAF)触发细胞内信号级联反应。RANK含有3个与TRAF结合的区域，分别与TRAF2、TRAF5、TRAF6相结合，作为信使传递RANK刺激信号，并激活核因子-κB(NF-κB)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、Src途径。TRAF6对维持破骨细胞分化[2]、破骨细胞骨架形成和骨吸收作用，均必不可少[3]。

RANKL是TNF-α超家族成员，破骨细胞基因表达时必须有其存在[4]。作为一种Ⅱ型跨膜蛋白，目前发现RANK在体内有3种存在方式，即跨膜结合蛋白、跨膜结合蛋白在140或145位置经酶切后由外部区域重组形成的游离型多肽，以及膜结合蛋白胞外C端脱落形成的具有生物活性的可溶性分子。人和大鼠RANKL分子分别包含317、316个氨基酸残基，具有87%同源性。人RANKL基因位于13q14，其启动子区含有成骨细胞分化的关键转录因子核心结合因子-α1(Cbf-α1)的结合位点，RANKL表达依赖于Cbf-α1的活性，这可能是RANKL偶联成骨细胞和破骨细胞的关键所在，但具体机制尚不清楚。RANKL mRNA可在多种组织表达，以在骨骼和淋巴组织中表达最高。骨骼中RANKL主要表达于骨小梁和骨髓，骨髓基质细胞和成骨细胞中也可检测到RANKL mRNA。RANKL在体内分布广泛，但动物试验显示注射RANKL后仅在骨组织中发现破骨细胞，其他组织内则未发现，这提示骨组织微环境中含有破骨细胞分化所必需的其他因子。RANKL是目前发现的唯一具有诱导破骨细胞分化、发育、发挥功能的因子。小鼠RANKL基因敲除后体内出现广泛骨硬化、生长停滞、牙齿萌出障碍[5]及缺乏成熟的破骨细胞，给予RANKL后症状改善，而应用重组RANKL后则出现严重的骨质疏松和高钙血症。在体外巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)存在条件下，单纯给予RANKL即可使破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞。RANKL不仅促进破骨细胞分化，而且呈剂量依赖性地激活成熟的破骨细胞，延长其存活时间，提高其运动和形成骨吸收陷窝的能力。可见，RANKL是调节骨吸收的关键因子。

OPG是在对胎鼠小肠cDNA测序分析时发现的一

基金项目：国家自然科学基金(30760255)

作者单位：330006，南昌大学第一附属医院骨二科

万方数据

个新的序列蛋白，编码含401个氨基酸残基，也是TNF-α受体超家族成员，可调节RANKL的生物活性[6]。作为一种分泌型糖蛋白，OPG以单体形式在胞内合成，以双体形式分泌到胞外，两种形式在加工过程中均切除21个氨基酸信号肽，形成含380个氨基酸残基的成肽。人OPG是单拷贝基因，位于8q23-24上，含有5个外显子，1个主要转录位点和2个次要转录位点。OPG分子包含7个主要结构域，其N'端包含4个富含半胱氨酸区域(D1～D4)，为其主要功能域；C'端含2个死亡对应域(D5、D6)，可转导破骨细胞凋亡信号。人体骨组织OPG主要由成骨细胞产生，淋巴细胞和乳腺也可产生，其表达量与细胞分化程度呈正相关。OPG具有抑制骨吸收的功能，通过与RANK竞争性结合RANKL抑制破骨细胞分化及成熟破骨细胞活性，并诱导成熟破骨细胞调亡[7]。体内实验显示，OPG转基因小鼠表现出骨硬化症，OPG基因敲除小鼠表现为严重的骨质疏松症。体外研究显示，10 ng/ml重组OPG可完全抑制动物破骨细胞生成，成骨细胞与破骨细胞共同培养中加入RANKL可形成功能完整的破骨细胞，加入OPG则完全抑制破骨细胞功能。此外，OPG表达水平还受雌激素的影响，雌激素减少将引起OPG表达下降，从而导致其与RANKL的竞争性抑制作用减弱。预防小鼠卵巢切除后骨质疏松的实验[8]结果表明，给予小鼠注射OPG能有效预防骨质疏松的发生。以上研究进一步提示，OPG在破骨细胞调控过程中起重要作用。

2 磨损颗粒对RANK/RANKL/OPG系统的作用

导致人工关节无菌性松动的主要原因，如力学因素，包括人工关节界面微动、液压、应力遮挡、磨损等；生物学因素，包括人工关节生物相容性、内毒素、磨损颗粒诱导的骨溶解等。目前大部分学者认为，磨损颗粒诱导的骨溶解为关键因素。大量临床和基础研究表明，人工关节磨损可产生大量异物颗粒，而这些颗粒引发的生物学反应是人工关节周围出现骨溶解的主要原因。界膜的出现是骨溶解病理过程的显著特征之一，界膜中含有大量单核-巨噬细胞、成纤维细胞、异物巨细胞及淋巴细胞等。界膜细胞在磨损颗粒作用下产生各种骨吸收刺激因子，最终导致破骨细胞分化和活化。这种骨吸收活动增强、骨形成活动降低的情况，可破坏骨吸收与骨形成之间的动态平衡，最终导致骨溶解和人工关节松动。

Ramage等[9]对人工关节周围组织进行免疫组化分析，发现人工关节周围界膜中存在能够调节骨吸收的RANK/RANKL/OPG系统。Veigl等[10]进一步研究发现，RANKL只在含有大量磨损颗粒的人工关节周围组织中高表达。相关研究还表明，不仅从人工关节周围组织分离的巨噬细胞和成纤维细胞能够表达RANKL，而且界膜分泌的滑液中也有RANKL存在；在没有成骨细胞参与的情况下，在分离的巨噬细胞中单纯加入外源性RANKL，即被诱导成多核破骨细胞样细胞，加入外源性OPG后这一诱导过程被抑制；将分离的成纤维细胞、滑液分别与人单核细胞共培养，发现有能引起骨基质吸收的多核细胞产生。有研究[11]将聚乙烯颗粒分别植入RANK敲除小鼠和野生型C57BL/6小鼠颅骨中，结果发现前者出现强烈的炎症反应，但颅骨周围未见破骨细胞，且无骨吸收发生，而后者则产生大量破骨细胞并出现骨吸收。Masui等[12]研究发现，人工关节置换术后人工关节周围磨损颗粒可引起RANKL-OPG的比值增加，从而导致人工关节无菌性松动。这说明RANKL-OPG比例的失衡与人工关节置换术后骨溶解存在密切相关性[13]。

以上研究结果说明，人工关节周围界膜组织中的细胞在多种因素联合作用下，通过影响周围组织内RANK、RANKL、OPG的表达，破坏RANKL和OPG平衡状态，引起RANKL-OPG比例失衡，介导破骨细胞进一步分化、活化，最终导致人工关节周围局部骨代谢不平衡及骨溶解。

3 针对RANK/RANKL/OPG系统的基因治疗进展

在人工关节无菌性松动机制中，RANK/RANKL/OPG系统是各种骨吸收刺激因子作用的直接或间接靶点。磨损颗粒诱导产生的各种骨吸收因子，最终均通过影响RANK/RANKL/OPG系统来激活破骨细胞并促进人工关节周围骨溶解。因此，通过基因治疗途径来阻断该系统过度活跃，成为防治人工关节无菌性松动研究的新方向。

3.1 以RANK为靶点

RANK/RANKL/OPG系统在其触发的级联反应中起到连接细胞内外的桥梁作用。无菌性松动的人工关节周围组织中RANKL和RANK的表达明显增多，增多的RANK与RANKL相互结合后，激活的RANK将信号转入细胞内，从而促进破骨细胞的分化、活化，最终导致骨溶解。Ren等[11]利用RANK基因敲除小鼠建立植骨气囊模型，研究RANK在人工关节无菌性松动中的作用，14 d后发现RANK基因敲除小鼠气囊产生明显炎症，白细胞介素(IL)-β、TNF-α及RANKL表达明显升高，但气囊壁耐酒石酸盐酸性磷酸酶染色未见破骨细胞，植入骨也未见骨吸收；这表明RANK基因敲除虽不能抑制磨损颗粒诱导的炎症反应，但可有效阻断破骨细胞成熟的关键信号通路，即RANKL与RANK的结合，从而抑制磨损颗粒诱导的骨溶解。

3.2 以RANKL为靶点

RANKL与破骨细胞前体细胞膜上的RANK结合后，可启动细胞内信号转导，引起级联瀑布反应，最终促进破骨细胞分化、活化，阻止破骨细胞凋亡[14]。RANKL是破骨细胞前体细胞分化为成熟破骨细胞的必需因子。人工关节无菌性松动中的磨损颗粒可诱导周围组织高表达RANKL[12]，使RANKL/RANK信号通路增强。高延征等[15]研究发现，体外RNA干扰技术抑制大鼠成骨细胞RANKL表达，并不会影响OPG、I型胶原表达及细胞

万方数据

增殖。高坤等[16]将成功接受过 RNA 干扰技术且 RANKL 基因沉默的成骨细胞与骨髓细胞共培养后发现，对成骨细胞进行 RANKL 基因沉默可显著抑制破骨细胞生成；这表明破骨细胞的生成很大程度上依赖于成骨细胞表达的 RANKL，降低 RANKL 表达可有效阻断骨髓间充质细胞向破骨细胞分化。因此，可尝试通过基因治疗途径抑制人工关节周围组织 RANKL 基因的表达，阻断 RANKL/RANK 信号通路的激活，从而防治人工关节无菌性松动。

3.3 以 OPG 为靶点

OPG 是 RANKL 的饵受体，通过与 RANKL 竞争性结合，阻断 RANK/RANKL 信号通路，最终阻断破骨细胞的分化、活化，抑制成熟破骨细胞的骨吸收活性并诱导其凋亡。因此，增强 OPG 基因的表达，是抑制人工关节周围骨溶解的重要途径。

Ulrich-Vinther 等[17]研究发现，表达 OPG 的重组腺病毒相关病毒载体能成功转染胚肾细胞 293，并表达一定量的 OPG；将表达 OPG 的重组腺病毒相关病毒载体转染的成纤维细胞与 RANK 和 M-CSF 诱导的脾细胞共培养，结果显示表达 OPG 的成纤维细胞显著抑制脾细胞的破骨细胞生成率；用表达 OPG 的重组腺病毒相关病毒转染小鼠颅盖骨肌细胞，结果示血浆 OPG 浓度于第 2 天开始升高，第 6 天达峰值，并明显抑制钛颗粒诱导的骨重吸收和破骨细胞生成。Goater 等[18]将稳定表达 OPG 基因的滑膜细胞和钛颗粒一起植入小鼠颅盖，发现表达少量 OPG 的滑膜细胞却能有效抑制磨损颗粒诱导的破骨细胞生成和骨溶解，表明 OPG 在抑制磨损颗粒诱导的骨溶解中具有高效性。Yang 等[4]用编码人 OPG 基因的腺病毒相关病毒载体转染动物气囊模型，7 d 后发现 OPG 表达明显上升，而调控破骨细胞分化、成熟及激活的关键因子 RANK 表达下降，骨钙释放减少 30%，骨胶原丢失减少；表明 OPG 不仅可与 RANKL 竞争性结合，还可下调组织中 RANKL 基因的表达，即 OPG 可通过两种不同途径抑制磨损颗粒诱导的骨溶解。Zhang 等[19]在一项腺病毒相关病毒介导的 OPG 基因局部疗法防治膝人工关节松动有效性研究中发现，OPG 基因在人工关节周围表达良好，在其他器官中表达未受影响；局部表达的 OPG 不仅能明显减少破骨细胞数量，抑制骨胶原丢失，还能降低周围组织 TNF、IL、肌酸磷酸激酶(CPK)和 RANKL 表达。以上研究表明，增强人工关节周围 OPG 基因表达，不仅能高效阻断 RANK/ RANKL 信号通路，减少破骨细胞活化，还可降低周围组织 TNF、IL、CPK 和 RANKL 表达，抑制骨溶解。以 OPG 为靶点的基因治疗，是防治人工关节周围骨溶解的有效途径。

4 结语

作为调控破骨细胞分化、活化和凋亡的重要分子机制，RANK/RANKL/OPG 系统失衡将打破人工关节周围骨吸收与骨形成的动态平衡，导致骨溶解并抑制成骨，最终造成人工关节松动。近年研究表明，RANK/RANKL/OPG 系统可能是治疗人工关节无菌性松动的关键靶点，采用 RNA 干扰对靶基因进行基因沉默，以阻断其信号通路的治疗策略，有望开辟新的防治途径。尽管基因治疗人工关节无菌性松动研究已取得一定进展，但目前大多数实验所示基因载体靶向性不强，且仅针对单一基因靶点，其效果往往不尽人意。因此，如何提高载体的靶向性和转染效率，如何实现合理、有效的联合基因治疗，还有待深入研究。

参考文献

1 Greenfield EM, Bechtold J, Implant Wear Symposium 2007 Biologic Work Group. What other biologic and mechanical factors might contribute to osteolysis? J Am Acad Orthop Surg, 2008; 16(Suppl 1):S56-S62
2 Hofbauer LC, Heufelder AE. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: new concepts of the pathogenesis and therapy of metabolic bone diseases. Dtsch Med Wochenschr, 2001; 126(6):145-150
3 Dehm SM, Bonham K. SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. Biochem Cell Biol, 2004; 82(2):263-274
4 Yang S, Chen W, Stashenko P, et al. Specificity of RGS10A as a key component in the RANKL signaling mechanism for osteoclast differentiation. J Cell Sci, 2007; 120(Pt 19):3362-3371
5 Sobacchi C, Frattini A, Guerrini MM, et al. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. Nat Genet, 2007; 39(8):960-962
6 Nakamichi Y, Udagawa N, Kobayashi Y, et al. Osteoprotegerin reduces the serum level of receptor activator of NF-kappaB ligand derived from osteoblasts. J Immunol, 2007; 178(1):192-200
7 Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. N Engl J Med, 2002; 347(3):175-184
8 Ren W, Wu B, Peng X, et al. Erythromycin inhibits wear debris-induced inflammatory osteolysis in a murine model. J Orthop Res, 2006; 24(2):280-290
9 Ramage SC, Urban NH, Jiranek WA. Expression of RANKL in osteolytic membranes association with fibroblastic cell markers. J Bone Joint Surg Am, 2007; 89(4):841-848
10 Veigl D, Niedeflova J, Krysulfkova O. Periprosthetic osteolysis and its association with RANKL expression. Physiol Res, 2007; 56(4):455-462
11 Ren W, Wu B, Peng X, et al. Implant wear induces inflammation, but not esteoclastic bone resorption, in RANK$^{-/-}$ mice. J Orthop Res, 2006; 24(8):1575-1586
12 Masui T, Sakano S, Hasegawa Y, et al. Expression of inflammatory cytokines, RANKL and OPG induced by titanium, cobaltchromium and polyethylene particles. Biomaterials, 2005; 26(14):1695-1702
13 Wakita T, Mogi M, Kurita K, et al. Increase in RANKL: OPG ratio in synovia of patients with temporomandibular joint disorder. J Dent Res, 2006; 85(7):627-632
14 Haynes DR, Crotti TN, Zreiqat H. Regulation of osteoclast activity in peri-implant tissues. Biomaterials, 2004; 25(20):4877-4885
15 高延征，高坤，于正红，等. 体外 RNA 干扰抑制 RANKL 表达对成骨细胞功能的影响. 河南医学研究，2009; 18(1):1-5
16 高坤，镐英杰，张晖，等. 靶向 RANKL 基因的 siRNA 对成骨细胞促破骨细胞生成作用的影响. 四川医学，2007; 28(6):575-577
17 Ulrich-Vinther M, Carmody EE, Goater JJ, et al. Recombinant adeno-associated virus-mediated osteoprotegerin gene therapy inhibits wear debris-induced osteolysis. J Bone Joint Surg Am, 2002; 84(8):1405-1412
18 Goater JJ, O'Keefe RJ, Rosier RN, et al. Efficacy of ex vivo OPG gene therapy in preventing wear debris induced osteolysis. J Orthop Res, 2002; 20(2):169-173
19 Zhang T, Yu H, Gong W, et al. The effect of osteoprotegerin gene modification on wear debris-induced osteolysis in a murine model of knee prosthesis failure. Biomaterials, 2009; 30(30):6102-6108

（收稿：2010-08-23）
（本文编辑：林磊）

万方数据