

# RANK、RANKL 与人工关节磨损颗粒诱导骨溶解

陈德胜 张先龙

**摘要** 人工关节磨损颗粒诱导的骨溶解是人工关节置换术后无菌性松动的最主要原因。人工关节各个部件相互摩擦产生的磨损颗粒经体内巨噬细胞反复吞噬、刺激产生多种细胞因子和炎症介质。磨损颗粒与巨噬细胞相互作用产生的促炎症反应使破骨细胞过度生成和激活,人工关节周围正常骨质被吸收破坏,最终形成骨溶解和无菌性松动。研究证实,细胞核因子  $\kappa$ B 活化因子受体(RANK)及其配体(RANKL)在骨溶解中起重要作用。该文就 RANK、RANKL 结构,生物学功能及其与磨损颗粒诱导骨溶解的关系等近期研究进展作一综述。

**关键词** 细胞核因子  $\kappa$ B 活化因子受体;细胞核因子  $\kappa$ B 活化因子受体配体;无菌性松动;磨损颗粒;骨溶解

DOI:10.3969/j.issn.1673-7083.2012.06.016

人工关节置换术作为日趋成熟的外科技术,能达到解除患者关节疼痛、重建关节活动功能并提高生活质量的治疗目的,是晚期骨关节炎、类风湿关节炎及老年股骨颈骨折各种原因引起的股骨头坏死终末期病变等有效的治疗方法之一。随着手术技术和人工关节制作工艺的不断提高,组织生物学和材料学的进一步发展,人工关节置换术后并发症如感染、人工关节断裂下沉等明显减少。但人工关节磨损颗粒引起的人工关节周围骨溶解导致的无菌性松动,仍然是影响人工关节长期使用的重要并发症和人工关节失败、返修的主要原因。磨损颗粒诱导骨溶解是一复杂的病理过程,其中细胞核因子  $\kappa$ B 活化因子受体(RANK)及其配体(RANKL)起着重要的调控作用。深入研究 RANK 和 RANKL 的调控机制及其与磨损颗粒诱导骨溶解的关系,对于研究人工关节磨损颗粒所致无菌性松动的机制并寻找积极有效的预防和治疗手段有着重要意义。

## 1 磨损颗粒与人工关节周围骨溶解

人工关节周围骨溶解是人工关节置换术后无菌性松动最主要原因之一。骨溶解的主要发病机制与人工关节周围磨损颗粒引起的人工关节周围结缔组织界膜慢性炎症反应有关。人工关节植入体内后骨-人工关节或骨-骨水泥界面存在微动,相应的各个部件相互摩擦或(和)与密切接触的骨水泥、骨界面摩擦,从而产生磨损颗粒。磨损颗粒有多种类型,如骨水泥(聚甲基丙烯酸甲酯,PMMA)颗粒、超高模量聚乙烯纤维(UHMPE)颗粒、金属(钴铬钼合金和钛合金)颗粒、陶瓷颗粒等。随着人工关节材料的不断改进,新型磨损颗粒还会出现<sup>[1]</sup>。磨损颗粒可以通过有效的关节间隙随关节液向远离关节部位的周围组织扩散。体内研究<sup>[2,3]</sup>发现,磨损颗粒数量大于  $1 \times 10^{10}$  /g,直径大于  $10 \mu\text{m}$  时明显对人工关节周围组织

产生相应反应;磨损颗粒被人工关节周围界膜组织中的巨噬细胞反复吞噬,形成异物肉芽肿,同时还包含有成纤维细胞、滑膜细胞等炎性细胞浸润。磨损颗粒刺激巨噬细胞等释放多种细胞因子和炎症介质,如肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-1、IL-6、单核细胞趋化蛋白(MCP)-1、前列腺素(PG)E2、基质金属蛋白酶(MMP)、一氧化氮(NO)、转移抑制因子、超氧化物等,从而产生一系列体内持续复杂的炎性反应<sup>[4,5]</sup>。巨噬细胞激活释放 TNF- $\alpha$ ,从而刺激体内成骨细胞释放巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和 RANKL,使破骨细胞前体细胞向破骨细胞成熟、分化<sup>[6,7]</sup>。因此,磨损颗粒与巨噬细胞相互作用产生的促炎症反应,使得破骨细胞过度生成和激活、人工关节周围正常骨质被吸收破坏,最终导致人工关节周围骨溶解和无菌性松动<sup>[8,9]</sup>。

## 2 RANK、RANKL 结构及表达特征

RANK 是一种从小鼠类巨噬细胞的破骨细胞前体细胞中复制出的 TNF- $\alpha$  超家族破骨细胞分化因子受体,具有调节树突状细胞功能<sup>[10]</sup>。人类 RANK 属于 TNF 受体家族I型跨膜蛋白,基因定位于染色体 18q22.1,含有 28 个氨基酸构成的信号肽、21 个氨基酸短跨膜区、2 个 N2 糖基化位点的胞外区和 616 个氨基酸,其中氨基酸残基的 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。在人破骨细胞前体细胞、成熟破骨细胞、软骨细胞等细胞内,均发现有 RANK 表达。体内 RANK 编码的蛋白以 2 种方式存在:①跨膜蛋白型:表达于 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、破骨细胞前体细胞、单核巨噬细胞系、树突状细胞等细胞表面,尤其是存在于破骨细胞前体细胞表面的 RANK 可与 RANKL 结合,从而具有促进破骨细胞分化的功能;②可溶型:存在于血液循环中,可与 RANKL 结合,但是对破骨细胞分化起着抑制作用。RANK 与 RANKL 结合后,通过 TNF 受体相关因子(TRAF)激发细胞内信号级联反应。RANK 的三个区域分别与 TRAF2、TRAF5、TRAF6 相结合,从而刺激、激活核因子

(NF)- $\kappa$ B、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、非受体型蛋白酪氨酸激酶(PTK)Src 亚族信号通路。其中, TRAF6 在调节破骨细胞分化中起着非常重要的作用<sup>[11]</sup>。

RANKL 属于 TNF- $\alpha$  超家族成员 II 型跨膜蛋白, 基因定位于染色体 13q14, 含有 317 个氨基酸肽, 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(CBF)- $\alpha$ 1 的结合位点, RANKL 表达依赖于 CBF- $\alpha$ 1 活性, 使成骨细胞和破骨细胞的偶联成为可能。体内 RANKL 以 3 种方式存在: ①跨膜结合蛋白: RANKL 存在的主要形式; ②游离型多肽: 在 140 或 145 位置经酶切后由外部区域重组形成; ③可溶性分子: 膜结合蛋白胞外 C 端脱落形成的具有生物活性的蛋白。RANKL 基因在骨骼和淋巴组织中具有高表达, 在骨小梁和骨髓可以检测到, 在骨髓基质细胞和成骨细胞中也可以检测到。RANKL 对诱导破骨细胞分化、发育、发挥功能具有重要作用, 是调节骨吸收骨溶解的关键因子<sup>[12]</sup>。

除了 RANK 和 RANKL 外, 骨保护素(OPG)在破骨细胞活化增殖引起溶骨性改变中亦具有重要作用<sup>[13]</sup>。OPG 也是 TNF- $\alpha$  超家族成员, 是一种分泌型糖蛋白, 主要以单体形式由成骨细胞和骨髓基质细胞分泌产生。人 OPG 是单拷贝基因, 位于 8q23-24 上, 含有 1 个主要转录位点、2 个次要转录位点和 5 个外显子; 分子结构上有 7 个主要结构域, 主要功能域在于其 N' 端, 包含 4 个富含半胱氨酸区域(D1~134), 而 C' 端含有 2 个死亡对应域(135、136), 具有转导破骨细胞凋亡信号的功能。OPG 是 RANKL 竞争性抑制因子, 与破骨细胞前体细胞和成熟破骨细胞表面的 RANK 竞争性结合, 以阻断 RANKL 与 RANK 结合, 从而拮抗 RANKL 的促破骨细胞分化活性, 诱导破骨细胞凋亡, 抑制骨吸收<sup>[14,15]</sup>。

### 3 RANK、RANKL 与人工关节磨损颗粒诱导骨溶解

人工关节磨损颗粒产生并被周围界膜组织中巨噬细胞反复吞噬、刺激产生炎症介质和细胞因子, 促进一系列炎症反应, 从而诱导破骨细胞过度生成和激活, 导致溶骨性改变<sup>[16,17]</sup>。在溶骨性改变过程中, RANK 和 RANKL 起着重要的调控作用。在正常生理状态下, 成骨细胞及骨髓基质细胞产生的 RANKL 与破骨细胞前体细胞或破骨细胞表面的 RANK 结合, 使得破骨细胞的分化和激活作用增强, 出现骨质吸收<sup>[18,19]</sup>; 与此同时, 成骨细胞及骨髓基质细胞亦分泌表达 OPG, 并通过与 RANKL 竞争性结合, 抑制 RANKL 与 RANK 结合, 防止骨的过度吸收<sup>[20]</sup>。因此, RANK 与 OPG、RANKL 与 OPG 比例平衡是维持局部骨代谢平衡的关键。Xu 等<sup>[21]</sup>选用 MG-63 成骨样细胞加入聚乙烯颗粒作体外培养, 并经逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及 Western 免疫印迹分析检测 RANK、RANKL 及 OPG 基因表达, 结果显示在聚乙烯颗粒刺激下, RANKL 表达明显增高; 加入神经介质  $\alpha$ -钙钙素基因相关肽(CGRP)抑制阻断后, OPG 表达明显增高。这表明 RANKL 与 OPG 竞争性结合 RANK 以调控破骨

细胞的成熟分化, 从而影响溶骨性骨质变化。Itonaga 等<sup>[22]</sup>研究发现, 全髋关节置换返修手术取出的松动人工关节周围界膜组织中分离培养出巨噬细胞, 在没有成骨细胞参与下仅加入外源性 RANKL 培养, 结果巨噬细胞被诱导转变成多核破骨细胞样细胞; 同样在没有成骨细胞参与下单独加入外源性 OPG 培养, 则出现上述诱导抑制过程。Haynes 等<sup>[23]</sup>研究发现, 人工关节周围界膜组织中有 RANK、RANKL 及 OPG 基因表达, 其中含有磨损颗粒的细胞 RANK 阳性表达明显; 此外, 界膜组织内 RANKL、RANK 含量与正常滑膜组织相比明显增高, 而 OPG 含量与正常滑膜相比变化不显著。

### 4 展望

RANK 和 RANKL 在破骨细胞增殖分化、活化成熟及凋亡中起着非常重要的调控作用。OPG 与 RANKL 在竞争性结合 RANK 中的协调稳定性影响着骨吸收和骨生成的动态平衡。破骨细胞的成熟与凋亡是磨损颗粒诱导的骨溶解导致人工关节无菌性松动的重要因素, 而介导破骨细胞成熟的各种细胞因子则通过复杂的信号转导通路直接或间接地调控关键细胞核基因的表达, 从而促进其成熟分化<sup>[24]</sup>。RANK、RANKL 与 OPG 可以共同调控这一动态变化过程<sup>[25-27]</sup>。选择这一调控系统作为治疗靶点, 则为预防和治疗人工关节周围磨损颗粒诱导的骨溶解寻找出一种可能性。

RANKL 在破骨细胞生成中的核心作用, 使之成为治疗骨溶解的靶点。治疗骨溶解最具潜力的药物是 RANKL 拮抗剂 OPG-Fc、RANK-Fc 和抗 RANKL 类药物。动物模型研究显示, OPG-Fc 和 RANK-Fc 可降低 RANKL 水平, 并成功预防骨溶解。动物实验研究表明, OPG 类多肽促进 OPG 基因表达, 可拮抗 RANKL 信号, 阻止骨丢失<sup>[28,29]</sup>。Childs 等<sup>[30]</sup>报道应用 RANK-Fc 可以阻止钛合金颗粒诱导的小鼠颅骨骨溶解模型的骨吸收。Canon 等<sup>[31]</sup>报道采用抗表皮生长因子受体抗体帕尼单抗(panitumumab)及 OPG-Fc 作用于小鼠骨溶解模型, 结果显示 RANKL 表达均降低, 并抑制骨质吸收。Borsje 等<sup>[32]</sup>分别采用低强度脉冲超声和脉冲电磁场作用于体外培养的人成骨细胞, 结果 OPG 与 RANKL 表达均降低, 而脉冲电磁场作用 8 h 后 OPG 表达反而增高。Enjuanes 等<sup>[33]</sup>研究显示, 阿仑膦酸钠通过直接作用于成骨细胞和成骨前体细胞抑制骨吸收, 达到治疗骨质疏松的目的; 阿仑膦酸钠通过维生素 D 作用于成骨细胞前体细胞, 使得 RANKL mRNA 表达增高, 而 OPG 在成骨细胞前体细胞分化中未发生改变。Peng 等<sup>[34]</sup>研究发现, 镉在骨代谢过程中的破骨细胞和成骨细胞交叉串扰(cross-talk)效应中起重要作用, 通过采用抗 OPG 抗体调控 OPG 表达影响镉的功能, 使得 OPG 作为一种交叉串扰效应分子参与和调控破骨细胞和成骨细胞增殖分化。

此外, 通过基因治疗途径阻断 RANK 和 RANKL 调控体系, 也是目前预防和治疗磨损颗粒诱导骨溶解的途

径。Zhang 等<sup>[35]</sup>利用腺病毒载 OPG 逆转录基因并局部注射于钛颗粒诱导的小鼠骨溶解模型,结果显示 RANKL 表达明显下调,局部骨溶解受到明显抑制。Ren 等<sup>[36]</sup>报道将聚乙烯磨损颗粒分别注入 RANK 敲除小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠模型的颅骨植入气囊内,14 d 后显示 RANK 敲除小鼠颅骨植入气囊内有明显的炎性反应, TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 及 RANKL 表达明显升高,而气囊内颅骨周围破骨细胞少见,没有骨质吸收改变,而野生型 C57BL/6 小鼠气囊内颅骨周围则产生大量破骨细胞并出现颅骨溶骨性破坏,说明 RANK 与磨损颗粒诱导骨溶解密切相关,但与磨损颗粒引起的炎性反应无重要关联;研究结果提示,通过基因敲除方法敲除 RANK 基因,可阻断 RANK 与 RANKL 结合,从而有效抑制破骨细胞分化增殖,磨损颗粒诱导的炎性反应受到抑制。

尽管 RANK、RANKL 调控体系与人工关节磨损颗粒诱导骨溶解相关性研究已取得一定进展,但 RANK、RANKL 调控体系与其他信号转导通路之间的关系是协调还是阻抑,或存在交叉串扰通路,还需要进一步研究。随着 RANK、RANKL 调控人工关节磨损颗粒诱导骨溶解研究的不断深入,有望为预防和治疗人工关节无菌性松动寻找出新手段和新途径。

#### 参 考 文 献

- 1 Sonntag R, Reinders J, Kretzer JP. What's next? Alternative materials for articulation in total joint replacement. *Acta Biomater*, 2012, 8(7):2434-2441
- 2 Mao X, Pan X, Zhao S, et al. Protection against titanium particle-induced inflammatory osteolysis by the proteasome inhibitor bortezomib in vivo. *Inflammation*, 2012, 35(4):1378-1391
- 3 Ellison P, Tipper JL, Jennings LM, et al. Biological activity of polyethylene wear debris produced in the patellofemoral joint. *Proc Inst Mech Eng H*, 2012, 226(5):377-383
- 4 Lynch CC. Matrix metalloproteinases as master regulators of the vicious cycle of bone metastasis. *Bone*, 2011, 48(1):44-53
- 5 Haleem-Smith H, Argintar E, Bush C, et al. Biological responses of human mesenchymal stem cells to titanium wear debris particles. *J Orthop Res*, 2012, 30(6):853-863
- 6 Valles G, Garcia-Cimbrello E, Vilaboa N. Involvement of extracellular Hsp72 in wear particle-mediated osteolysis. *Acta Biomater*, 2012, 8(3):1146-1155
- 7 Lochner K, Fritsche A, Jonitz A, et al. The potential role of human osteoblasts for periprosthetic osteolysis following exposure to wear particles. *Int J Mol Med*, 2011, 28(6):1055-1063
- 8 Rao AJ, Gibon E, Ma T, et al. Revision joint replacement, wear particles, and macrophage polarization. *Acta Biomater*, 2012, 8(7):2815-2823
- 9 Liu F, Zhu Z, Mao Y, et al. Inhibition of titanium particle-induced osteoclastogenesis through inactivation of NFATc1 by VIVIT peptide. *Biomaterials*, 2009, 30(9):1756-1762
- 10 Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253(2):395-400
- 11 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
- 12 Tripathi A, Pandey S, Singh SV, et al. Bisphosphonate therapy for skeletal malignancies and metastases: impact on jaw bones and prosthodontic concerns. *J Prosthodont*, 2011, 20(7):601-603
- 13 Crockett JC, Mellis DJ, Scott DJ, et al. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int*, 2011, 22(1):1-20

- 14 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
- 15 Luan X, Lu Q, Jiang Y, et al. Crystal structure of human RANKL complexed with its decoy receptor osteoprotegerin. *J Immunol*, 2012, 189(1):245-252
- 16 Broadhead ML, Clark JC, Dass CR, et al. Therapeutic targeting of osteoclast function and pathways. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(2):169-181
- 17 Landgraaber S, Quint U, Classen T, et al. Senescence in cells in aseptic loosening after total hip replacement. *Acta Biomater*, 2011, 7(3):1364-1368
- 18 Baron R, Ferrari S, Russell RG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone*, 2011, 48(4):677-692
- 19 Geng D, Xu Y, Yang H, et al. Protection against titanium particle induced osteolysis by cannabinoid receptor 2 selective antagonist. *Biomaterials*, 2010, 31(8):1996-2000
- 20 Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port*, 2011, 36(3):209-218
- 21 Xu J, Kauther MD, Hartl J, et al. Effects of alpha-calcitonin gene-related peptide on osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kB ligand expression in MG-63 osteoblast-like cells exposed to polyethylene particles. *J Orthop Surg Res*, 2010, 5:83
- 22 Itonaga I, Sabokbar A, Murray DW, et al. Effect of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand on osteoclast formation by arthroplasty membrane derived macrophages. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59(1):26-31
- 23 Haynes DR, Crotti TN, Potter AE, et al. The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Br*, 2001, 83(6):902-911
- 24 陈德胜 张先龙. MAPK 信号转导通路与人关节磨损颗粒诱导骨溶解. *国际骨科学杂志*, 2012, 33(4):245-247
- 25 Granholm S, Henning P, Lindholm C, et al. Osteoclast progenitor cells present in significant amounts in mouse calvarial osteoblast isolations and osteoclastogenesis increased by BMP-2. *Bone*, 2012, 52(1):83-92
- 26 Singh PP, van der Kraan AG, Xu J, et al. Membrane-bound receptor activator of NF-kB ligand (RANKL) activity displayed by osteoblasts is differentially regulated by osteolytic factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 422(1):48-53
- 27 Koivu H, Mackiewicz Z, Takakubo Y, et al. RANKL in the osteolysis of AES total ankle replacement implants. *Bone*, 2012, 51(3):546-552
- 28 Kuhn MC, Willenberg HS, Schott M, et al. Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 349(2):180-188
- 29 Tanaka H, Mine T, Ogasa H, et al. Expression of RANKL/OPG during bone remodeling in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(4):690-694
- 30 Childs LM, Paschalis EP, Xing L, et al. In vivo RANK signaling blockade using the receptor activator of NF-kappaB; Fc effectively prevents and ameliorates wear debris-induced osteolysis via osteoclast depletion without inhibiting osteogenesis. *J Bone Min Res*, 2002, 17(2):192-199
- 31 Canon J, Bryant R, Roudier M, et al. Inhibition of RANKL increases the anti-tumor effect of the EGFR inhibitor panitumumab in a murine model of bone metastasis. *Bone*, 2010, 46(6):1613-1619
- 32 Borsje MA, Ren Y, de Haan-Visser HW, et al. Comparison of low-intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic field treatments on OPG and RANKL expression in human osteoblast-like cells. *Angle Orthod*, 2010, 80(3):498-503
- 33 Enjuanes A, Ruiz-Gaspa S, Peris P, et al. The effect of the alendronate on OPG/RANKL system in differentiated primary human osteoblasts. *Endocrine*, 2010, 37(1):180-186
- 34 Peng S, Liu XS, Huang S, et al. The cross-talk between osteoclasts and osteoblasts in response to strontium treatment: involvement of osteoprotegerin. *Bone*, 2011, 49(6):1290-1298
- 35 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
- 36 Ren W, Wu B, Peng X, et al. Implant wear induces inflammation, but not osteoclastic bone resorption, in RANKL<sup>-/-</sup> mice. *J Orthop Res*, 2006, 24(8):1575-1586

(收稿:2012-09-17;修回:2012-11-06)

(本文编辑:边佶)