

RANKL/RANK/OPG 系统与强直性脊柱炎相关性研究进展

王 玉 徐胜前

由细胞核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)、细胞核因子 κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK) 和护骨素 (osteoprotegerin, OPG) 组成的 RANKL/RANK/OPG 系统是近些年来发现并且研究愈趋热门的一个在骨调节上发挥重要作用的系统。随着研究的深入,人们发现它也在免疫系统中发挥着重要的作用,是联系免疫系统与骨代谢的一个关键信号传导通路,并由此产生了一个新概念“骨免疫学”(osteimmunology)^[1]。近年来有关该系统在强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 中的研究也有报道,现综述如下。

一、RANKL/RANK/OPG 系统

RANKL、RANK、OPG 3 者同属于肿瘤坏死因子超家族,成骨细胞和激活的 T 淋巴细胞表达 RANKL, RANKL 又称作骨保护素配体 (OPGL), 含有 317 个氨基酸,在人体内有两种存在形式:膜结合型 RANKL (membrane-bound RANKL, mRANKL) 和游离型 RANKL (soluble RANKL, sRANKL), sRANKL 是在金属蛋白酶作用下从 mRANKL 的 140 或 145 位氨基酸上割裂下来的膜外区部分^[2]。成骨细胞系的细胞在它的膜表面表达 RANKL 与破骨细胞直接接触启动破骨形成, Hikita A 等^[3]运用 RNA 干扰技术抑制金属蛋白酶 14 (MMP₁₄) 的生成后,发现成骨细胞上 mRANKL 的表达提高了,在同巨噬细胞共同培养的情况下,破骨前体细胞 (osteoclast precursor, OCP) 的破骨分化得到了加强;同时发现来自 MMP₁₄ 基因敲除小鼠的成骨细胞分泌 sRANKL 显著减少,而它的促破骨形成能力却得到了提高。由此指出在体外某种程度上 mRANKL 比 sRANKL 有着更强的破骨分化潜能。RANK 是一种 I 型跨膜受体,含有 616 个氨基

酸,在单核-吞噬系、OCP、成骨细胞和树突状细胞 (dendritic cell, DC) 上有表达, RANKL 与 RANK 结合后,启动一系列信号传导通路,引起破骨细胞激活与破骨分化。OPG 是一种分泌型糖蛋白,含有 404 个氨基酸,具有单体和二聚体两种形式。OPG mRNA 广泛存在于肺、心、肾、胎盘、肝、胃、皮肤、脑、脊髓、甲状腺和骨骼等组织,骨髓基质细胞、成骨细胞,成纤维细胞、主动脉平滑肌细胞、单核细胞、DC 及 B 淋巴细胞均可分泌 OPG。OPG 有两种受体:RANKL 和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand, TRAIL), 作为 RANKL 的诱骗受体, OPG 能竞争性地干扰 RANKL 与 RANKL 结合,抑制破骨细胞的成熟和分化,从而阻止骨的破坏;作为 TRAIL 的诱骗受体, OPG 能抑制 TRAIL 诱导的肿瘤细胞凋亡。

二、RANKL/RANK/OPG 系统与骨代谢

人体内骨的代谢由骨破坏和骨形成两个过程维持着动态的平衡, RANKL/RANK/OPG 系统通过影响破骨细胞的生成和激活进而对骨代谢的平衡产生影响。破骨细胞是由单核细胞分化融合而成的多核骨吸收细胞,从单核细胞、多核骨吸收细胞到成熟破骨细胞都能表达 RANK, RANKL 与 RANK 结合后,在巨核细胞集落刺激因子的辅助下,促进 OCP 融合成多核骨吸收细胞,多核骨吸收细胞分化为成熟的破骨细胞。实验研究表明^[4] RANKL 或 RANK 基因敲除的小鼠出现了严重的骨质硬化,而且在那些小鼠的骨骼组织中只能观察到少量的破骨细胞。最近一次包括 412 名低矿物质密度绝经后妇女的大规模 II 期临床试验表明^[5],皮下注射 RANKL 的单克隆抗体 Denosumab 可显著减少绝经后妇女骨转换标志物水平,增加她们的骨矿密度。OPG 作为一种骨的保护因素可以与 RANKL 结合,影响 RANKL 介导的破骨细胞发育、黏附、激活等过程,实验研究表明 OPG 基因敲除小鼠表现出严重的骨质疏松并发高发生率的骨折^[6]。一项随机、双盲、安慰剂对照包括 52 名健康绝

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目 (KJ2007B137)。

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院风湿免疫科

通讯作者:徐胜前,电子邮箱:xsqian-1112@163.com

经后妇女的 I 期临床试验表明^[7],皮下注射 OPG 能显著减少骨吸收标志物的表达。深入的研究表明 RANKL/OPG 比率决定骨质变化的方向,比率增大,骨质流失增多;比率减少,则骨丢失减少。大量细胞因子和炎症介质通过影响 RANKL 或 OPG 的表达,进而影响 RANKL/OPG 比率参与骨的调节^[8,9]。如:IL-1、IL-6、IL-11、IL-17、TNF- α 、降钙素、PTH、1,25-(OH)₂D₃ 等可以刺激破骨细胞膜上的 RANKL 分子表达上调,提高 RANKL/OPG 比率进而促进破骨,而 IL-8、IL-12、TNF- γ 、骨形成蛋白-2(BMP-2)、转化生长因子(TGF)- β 、雌激素可以刺激 OPG 表达上调,减低 RANKL/OPG 比率进而抑制破骨。

三、RANKL/RANK/OPG 系统与骨免疫学

RANKL 作为一个调节破骨细胞的细胞因子已经得到广泛认同,与此同时也有研究发现^[10],激活的 T 细胞能产生并分泌 RANKL、IFN- γ 等细胞因子, Takayanagi H 等^[11]发现 IFN- γ 通过诱导 TRAF6 的降解抑制 RANKL 介导的细胞内信号传导,是 RANKL 的一个潜在的抑制因子。Kwak HB 等发现 RANKL 可以诱导鼠关节炎模型炎症局部的破骨细胞表达 IFN- γ 诱导蛋白 10,该蛋白又可以诱导 CD4⁺ T 细胞表达 RANKL 及 TNF- α ,促进 OCP 向破骨细胞分化^[12]。RANKL 也能调节 T 细胞和 DC 的生长和功能,是淋巴结形成、淋巴细胞发育的重要调节因子;这些均提示 RANKL 是联系骨骼系统和免疫系统的重要分子,Choi. Y 提出用骨免疫学来描述这个新的跨越骨生物学和免疫学的学科领域^[13]。激活的 T 细胞还能刺激巨核细胞分泌 TNF- α 等细胞因子, TNF- α 能诱导骨髓内 OCP 数量的增加^[14];还能促使 OCP 从骨髓进入外周血循环使炎症局部的 OCP 数量增加^[15]。在炎症局部作为对 RANKL 和 TNF- α 作用的回复,OCP 增加了对 TNF- α 的分泌,由此产生了增加破骨细胞数量的恶性循环,而从另一个侧面增强了 RANKL/RANK/OPG 系统的在骨破坏中的作用。在各种骨疾病中,破骨细胞和 OCP 分泌大量的细胞因子同免疫系统相互作用进而影响骨容量和骨转化,见图 1^[16]。

在诸如类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)等免疫系统功能紊乱诱发的关节疾病的骨损伤中,T 细胞分泌功能的不平衡变化可能是破骨细胞异常激活的基础,而 RANKL/RANK/OPG 系统正是联系免疫系统紊乱与骨破坏的一个重要通路。Maria Z 等发现抗 TNF- α 治疗后,RA 患者血清内高水平的

sRANKL 恢复了正常^[17]。因此骨免疫学在理解骨破坏的病理机制和探索自身免疫性骨疾病的治疗策略方面正变得越来越重要。

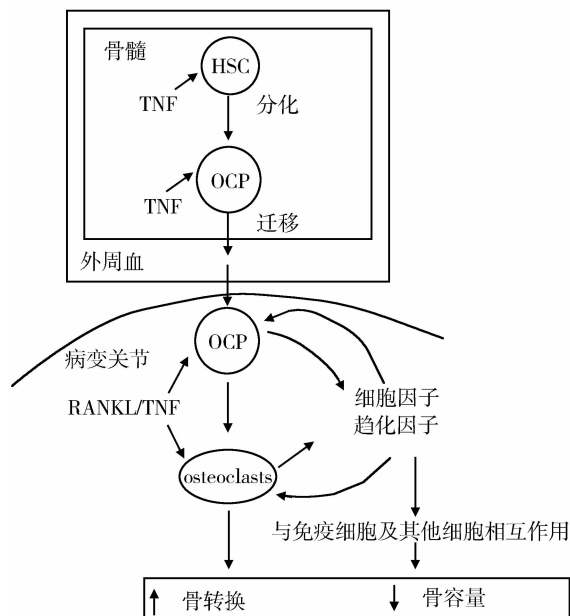


图 1 OCP 及破骨细胞和免疫系统间的相互作用

HSC(hemopoietic stem cell):造血干细胞;TNF(tumor necrosis factor):肿瘤坏死因子 OCP(osteoclast precursor):破骨前体细胞;osteoclast:破骨细胞

四、RANKL/RANK/OPG 系统与 AS

AS 是一种慢性炎症性疾病,主要侵犯中轴骨骼,以骶髂关节炎为标志,同时也可累及外周关节,AS 患者可同时出现骨破坏和由于成骨过度导致的韧带钙化。随着研究的深入,发现 RANKL/RANK/OPG 系统在 AS 骨代谢和骨损伤的机制中起着重要作用。

1. RANKL/RANK/OPG 系统在 AS 外周血中的表达: Szulc P 等研究了 252 名正常人外周血中 OPG 与年龄的关系,发现正常人随着年龄的增加,OPG 水平有着显著提高,推测此 OPG 水平的增高可能是由于骨代谢随着年龄的增长表现出以破骨为主的趋势下出现的代偿性增高^[18]。Franck H 等研究了 264 名 AS 患者和 240 名健康对照外周血中 OPG 的表达,发现 AS 患者外周血中 OPG 水平明显低于健康对照,并且同年龄没有相关性,同时将 OPG 与 AS 病人的腰椎、全髋、股骨颈骨密度水平进行了相关性研究,结果发现 AS 患者的骨质疏松同低 OPG 水平有着显著相关性^[19]。OPG 水平与年龄的无相关性也可能提示了 AS 患者中 OPG 水平代偿性增高功能的丧失而这恰恰是 AS 病人发生骨质疏松乃至骨破坏的重要原因。

但国内耿丽等的研究数据与以上有所不同,她通过对120例AS患者与120例健康者的研究发现:AS患者外周血中OPG水平要明显高于对照组,认为AS患者体内高水平的OPG与AS病人的成骨过度(如脊柱旁骨赘形成现象)有关^[20]。Kim HD等对60例AS患者血清sRANKL、OPG、骨密度水平、ESR、CRP、BASDA、BASFI等进行研究,发现同对照组相比,AS患者的血清OPG水平无显著差异,但sRANKL水平显著升高,sRANKL/OPG比率显著提高,分别有19%、33%的患者出现腰椎、股骨颈骨质疏松,尽管sRANKL/OPG比率同AS患者的AS疾病活动性、ESR、CRP水平无相关性,但同无骨质疏松的患者相比,有骨质疏松的AS患者倾向于有更高的sRANKL/OPG比率。认为RANKL和OPG间的不平衡可能参与了AS病人骨质疏松的发病及临床进展。AS患者外周血中RANKL、OPG水平与其骨质疏松的发生情况及成骨过度存在何种关系尚未见文献报道,有待进一步阐明。

2. RANKL/RANK/OPG系统在AS滑膜中的表达:AS和RA同属炎性多关节病,但其关节外骨组织损伤的形式却有很大不同,在RA中增生的滑膜组织导致局部的骨侵蚀,但没有反应性的新骨形成,AS外周关节重塑的特点是相对局限的关节骨降解伴有广泛的新骨形成。赵伟等通过免疫组织化学方法检测13例AS、16例RA、17例骨关节炎(osteoarthritis, OA)患者及6名健康对照组关节滑膜组织中RANKL及OPG的表达及分布状况,结果发现AS和RA患者组滑膜组织RANKL表达水平均明显升高,主要见于滑膜组织衬里层和滑膜软骨交界区,OA患者组和健康对照组滑膜组织中则未见阳性表达信号^[22,23]。AS和RA患者滑膜组织中RANKL表达水平与关节X线分期呈正相关(相关系数 r 分别为0.41、0.73, P 值分别为0.021、0.003),而OPG在所有13例AS滑膜组织中均有阳性表达,阳性细胞主要分布于滑膜衬里层、衬里下层区域,滑膜软骨交界区OPG表达明显低于滑膜衬里层和衬里下层,外周关节滑膜组织衬里层和滑膜软骨交界区高表达的RANKL与低表达的OPG水平凸显了RANKL/RANK/OPG系统在AS患者骨质破坏与保护的重大意义。Haynes D等的研究结果与其一致,他们同样运用免疫组化法研究了16例RA和12例脊柱关节病患者的膝关节滑膜,在除了活动期RA外的滑膜都能探测到OPG的存在^[24]。由此推测在AS病人体内高表达的OPG发挥着骨保护作用,并且正是由于它的高表达,引起AS病人的

成骨过度,进而出现AS病人典型的韧带钙化。在脊柱关节病的外周关节中,RANKL/OPG的比率或许是决定外周关节骨质疏松与成骨过度的关键因素。但Vandooren B等有不同的发现,他们采用免疫组织化学法研究了35名脊柱关节病和19名RA患者的炎性外周关节滑膜标本,发现RANKL、OPG和RANK在所有组中都有大量染色,OCF和破骨细胞生成调节因子在脊柱关节病和RA的滑膜中的表达基本相同,RANKL集中表达于脊柱关节病滑膜组织内膜衬里层和衬里下层;RANK⁺单核细胞主要表达在血管周围和内膜衬里层中;OPG则大量表达于脊柱关节病滑膜组织内膜衬里层和血管内皮上,并且没有显著差别^[25]。由此推断RANKL/RANK/OPG系统并不能解释脊柱关节病与RA在骨损伤方面的差别。但RANKL、RANK和OPG在脊柱关节病滑膜中的大量表达,也给我们提示RANKL/RANK/OPG系统在脊柱关节病发病和骨损伤中发挥了重要作用。

3. AS患者体内炎症与RANKL/RANK/OPG系统表达的分离:TNF- α 拮抗剂作为一种有效的AS治疗药物已广泛应用于临床。Woo J等研究了15名接受重组人肿瘤坏死因子 α 受体抗体融合蛋白治疗的AS患者,发现经12周的治疗后,AS患者的疾病活动积分和功能积分有了明显改善,但治疗前后RANKL与OPG浓度及其比率没有明显变化,提示AS患者外周血中RANKL/RANK/OPG系统的表达同炎症的分离^[26]。Vandooren B等的研究同其一致,他们评价了脊柱关节病患者全身(关节肿胀计数、血C反应蛋白水平、血沉)和局部(总体滑膜浸润、血管浸润等)炎症对RANKL/RANK/OPG系统表达的影响,结果发现滑膜中RANKL、OPG和RANK的表达与全身炎症水平及局部疾病活动参数间无显著相关性^[25];以上结果提示AS患者体内炎症与RANKL/RANK/OPG系统表达的分离。但Gengenbacher M等研究指出经24周的人鼠嵌合的肿瘤坏死因子 α 抗体治疗后,同临床症状的缓解相一致,AS患者体内OCF的骨吸收活性有了显著下降,尽管同RA对照组比较,下降的速度要缓慢得多^[27]。

上述研究结果不完全相同的原因可能是多方面的,尽管TNF- α 对RANKL/RANK/OPG系统的调节发挥着重要作用,但也正如前文提到的,体内诸多生化因子如IL-1、IL-6、IL-11、IL-17、前列腺素E₂等也能参与RANKL/RANK/OPG系统的调节,在AS关节炎患者体内,可能TNF- α 对RANKL/

RANK/OPG 系统的调节并不发挥主要作用, TNF- α 拮抗剂对破骨细胞分化、活化的主要影响可能不是通过调节 RANKL/OPG 平衡, 而是直接对破骨细胞及其前体产生作用, 这也可能 TNF- α 拮抗剂对 AS 患者的骨质疏松和韧带钙化的形成疗效并不确切的原因。这些都有待于进一步深入地研究。

慢性关节炎的治疗应是抗炎治疗与关节结构的保护并重, 而抑制破骨细胞可能成为关节结构保护的一种重要手段, 因此进一步阐明 AS 患者体内生化因子对 RANKL/RANK/OPG 系统的调节机制及 RANKL/RANK/OPG 系统在 AS 患者骨损伤中的作用机制将有助于我们探明更为有效的 AS 治疗策略, 以期对关节结构起到长期的保护作用。

参考文献

- Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev*, 2008, 29(4): 403-440
- Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, *et al.* RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*, 2006, 12(1): 17-25
- Hikita A, Yana I, Wakeyama H, *et al.* Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF- κ B ligand. *J Biol Chem*, 2006, 281(48): 36846-36855
- Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1143(1): 123-150
- Miller PD. Denosumab: anti-RANKL antibody. *Curr Osteoporosis Rep*, 2009, 7(1): 18-22
- Lloyd SA, Yuan YY, Kostenuik PJ, *et al.* Soluble RANKL induces high bone turnover and decreases bone volume, density, and strength in mice. *Calcif Tissue Int*. 2008, 82(5): 361-372
- Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, *et al.* The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(2): 348-360
- Miranda-Carús ME, Benito-Miguel M, Balsa A, *et al.* Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(4): 1151-1164
- Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*, 2008, 29(2): 155-192
- Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, *et al.* RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskeletal Med*, 2009, 2(1): 56-64
- Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med*, 2005, 83(3): 170-179
- Yao Z, Li P, Zhang Q, *et al.* Tumor necrosis factor- α increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fos expression. *J Biol Chem*, 2006, 281(8): 11846-11855
- Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, *et al.* T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature*, 2000, 408(6812): 600-605
- Kwak HB, Ha H, Kim HN, *et al.* Reciprocal cross-talk between RANKL and interferon- γ -inducible protein 10 is responsible for bone-erosive experimental arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5): 1332-4215
- Qian Zhang, Ruolin Guo, Edward M Schwarz, *et al.* TNF inhibits production of stromal cell-derived factor 1 by bone stromal cells and increases osteoclast precursor mobilization from bone marrow to peripheral blood. *Arthritis Research & Therapy*, 2008, 10(2): R37
- Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9 Suppl 1: S1
- Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A, *et al.* High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor α treatment. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(7): 1744-1753
- Szule P, Hofbauer LC, Heufelder AE, *et al.* Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(7): 3162-3165
- Franck H, Meurer T, Hofbauer LC. Evaluation of Bone Mineral Density, Hormones, Biochemical Markers of Bone Metabolism, and Osteoprotegerin Serum Levels in Patients with Ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 2004, 31(11): 2236-2241
- 耿丽, 刘秀梅. 强直性脊柱炎骨代谢的研究. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14(5): 328-331
- Kim HR, Lee SH, Kim HY, *et al.* Elevated serum levels of soluble receptor activator of nuclear factors- κ B ligand (sRANKL) and reduced bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis (AS). *Rheumatology (Oxford)*. 2006, 45(10): 1197-1200
- 赵伟, 黄烽. 细胞核因子 κ B 受体活化因子配基在强直性脊柱炎的表达及意义. *解放军医学杂志*, 2004, 29(6): 482-485
- 赵伟, 黄烽. 护骨素在强直性脊柱炎外周关节骨质破坏病理机制中的作用. *中华风湿病学杂志*, 2005, 9(6): 329-332
- D. R. Haynes, E. Barg, T. N. Crotti, *et al.* Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology*, 2003, 42(1): 123-134
- Vandooren B, Cantaert T, Noordenbos T, *et al.* The abundant synovial expression of the RANK/RANKL/Osteoprotegerin system in peripheral spondylarthritis is partially disconnected from inflammation. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(3): 718-729
- Woo JH, Lee HJ, Sung IH, *et al.* Changes of Clinical Response and Bone Biochemical Markers in Patients with Ankylosing Spondylitis Taking Etanercept. *J Rheumatol*, 2007, 34(8): 1753-1759
- Gengenbacher M, Sebald HJ, Villiger PM, *et al.* Infliximab inhibits bone resorption by circulating osteoclast precursor cells in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(5): 620-624

(收稿: 2010-01-26)

(修回: 2010-03-25)