

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.14.003

## 重组人骨保护素对牙周炎大鼠牙槽骨 RANKL、OPG 蛋白表达的影响\*

钟雯怡<sup>1</sup>, 武岐山<sup>1</sup>, 高丽<sup>1</sup>, 刘琪<sup>1△</sup>, 陈芳<sup>1</sup>, 柴松宏<sup>2</sup>

(1. 遵义医学院附属口腔医院儿童牙科, 贵州遵义 563003; 2. 贵州省安顺市人民医院口腔科 561000)

**[摘要]** **目的** 探讨重组人骨保护素(rhOPG)对牙周炎大鼠牙槽骨 RANKL、OPG 蛋白表达的影响,为 rhOPG 应用于牙周炎的治疗提供实验依据。**方法** 选择 22 只 Wistar 大鼠,采用随机数字表法选择 2 只健康大鼠作为健康组;其余 20 只作为实验组,建立牙周炎大鼠模型,再将其分为实验对照组( $n=10$ )和 rhOPG 组( $n=10$ ),rhOPG 组大鼠于上颌第 2 磨牙牙周袋间隙局部注入 10 mg/kg rhOPG 治疗。实验对照组大鼠于相同部位注射等体积灭菌注射用水。采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)检测牙槽骨 RANKL、OPG 蛋白的表达。**结果** 与健康组比较,实验组大鼠牙槽骨 OPG 表达水平较低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 RANKL 表达水平两组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与实验对照组比较,rhOPG 组大鼠牙槽骨组织 OPG 蛋白的表达水平明显上调,而 RANKL 蛋白的表达明显下调( $P<0.05$ )。治疗后 rhOPG 组大鼠牙槽骨中 OPG 表达水平明显高于治疗前,而 RANKL 表达水平明显低于治疗前,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** rhOPG 能调节牙周炎大鼠牙槽骨 RANKL、OPG 的表达。

**[关键词]** 骨保护素;牙周炎;核因子  $\kappa$ B 受体活化因子;大鼠,Wistar**[中图分类号]** R781.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)14-1879-03

## Effect of recombinant human osteoprotegerin on RANKL、OPG protein expression in alveolar bone tissue of rat with periodontitis\*

Zhong Wenyi<sup>1</sup>, Wu Qishan<sup>1</sup>, Gao Li<sup>1</sup>, Liu Qi<sup>1△</sup>, Chen Fang<sup>1</sup>, Cai Songhong<sup>2</sup>

(1. Department of Pediatric Dentistry, Affiliated Stomatologic Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 2. Department of Stomatology, Anshun Municipal People's Hospital, Anshun, Guizhou 561000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of recombinant human osteoprotegerin(rhOPG) on RANKL、OPG protein expression in alveolar bone tissue of rats with periodontitis to provide the experimental evidence for the application of rhOPG in periodontitis treatment. **Methods** Totally 22 Wistar rats were enrolled. The random number table was adopted to select two healthy rats as the healthy group. The rest 20 rats were selected as the experimental group for establishing the rat models of periodontitis, and then subdivided into the experimental control group ( $n=10$ ) and rhOPG group ( $n=10$ ). Rats in the rhOPG group were locally injected by rhOPG 10 mg/kg at periodontal pocket gap of maxillary second molar, while those in the experimental control group were injected by sterile water for injection at the same site and some volume. The streptavidin-peroxidase(SP) method was employed to detect the expression of RANKL、OPG protein in alveolar bone tissue. **Results** Compared with the healthy group, the expression levels of OPG in alveolar bone tissue of rats in the experimental group were lower with statistically significant difference ( $P<0.05$ ), while the difference of RANKL expression levels between the two groups showed no statistical significance( $P>0.05$ ). Compared with the experimental control group, the expression level of OPG protein in alveolar bone tissue of rats in the rhOPG group was significantly up-regulated, while that of RANKL protein was significantly down-regulated( $P<0.05$ ). The OPG expression level after treatment in the rhOPG group was markedly enhanced, while the RANKL expression level was reduced compared with before treatment, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** rhOPG may regulates the expression of RANKL and OPG in alveolar bone tissue of rats with periodontitis.

**[Key words]** osteoprotegerin; periodontitis; receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B; rats, Wistar

牙周病是成人牙齿丧失的主要原因,而牙槽骨的吸收破坏是牙周病发生、发展的病理基础,亦是影响该疾病预后的主要因素。因此,再生吸收的牙槽骨已成为牙周组织工程研究的前沿领域和热点课题。骨保护素(OPG)/核因子  $\kappa$ B 受体活化因子及其配体(OPG/RANKL/RANK)轴对破骨细胞的分化和活化起着重要调节作用。抑制 OPG/RANKL/RANK 通路可有效抑制破骨细胞的分化和激活,从而抑制牙槽骨吸收<sup>[1-3]</sup>。目前,通过阻断 OPG/RANKL/RANK 通路来治疗牙周炎的报道尚不多见。本课题基于 OPG/RANKL/RANK 轴的生物学基础,以大鼠牙周炎模型作为研究载体,通过局部注射重组人 OPG(rhOPG),检测牙槽骨组织中 OPG、RANKL 的表达情况,

为牙槽骨的修复重建寻求新的治疗途径。

**1 材料与方法**

**1.1 主要试剂与仪器** 主要试剂包括 rhOPG-Fc、免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)试剂盒、兔抗鼠 RANKL 多克隆抗体、兔抗鼠 OPG 多克隆抗体,均购自武汉博士德生物工程有限公司。主要仪器:BS-110S 电子分析天平(美国 Napco 公司)、KDC-20447 低速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)、Nikon YS100 生物显微镜[尼康仪器(上海)有限公司]。

**1.2 方法**

**1.2.1 动物分组与建模** 22 只 6 周龄一级(普通级)健康雄

性 Wistar 大鼠,平均体质量 197.4 g,由第三军医大学动物实验中心提供[动物合格证号 SCXK(渝)2007-0005]。采用 10 g/L 戊巴比妥(3 mg/kg)腹腔注射麻醉并固定。采用随机数字表法选择 2 只健康大鼠作为健康组;其余 20 只作为实验组,采用 0.2 mm 结扎丝于上颌第 2 磨牙的颈部结扎 1 圈,术后大鼠高糖饮食喂养 8 周,以建立牙周炎大鼠模型。该研究获遵义医学院动物伦理委员会批准。

**1.2.2 rhOPG 局部注射** 实验组大鼠均建模成功,于腹腔注射 10 g/L 戊巴比妥麻醉,取出结扎丝,行龈下刮治术。采用随机数字表法将其分为实验对照组( $n=10$ )和 rhOPG 组( $n=10$ ),予普食喂养 1 周。rhOPG 组大鼠于上颌患侧第 2 磨牙牙周袋间隙局部注入 10 mg/kg rhOPG,4 d 后,再行 rhOPG 注射,剂量同前<sup>[4]</sup>;实验对照组大鼠于相同部位注射等体积灭菌注射用水。3 d 后麻醉处死取材。

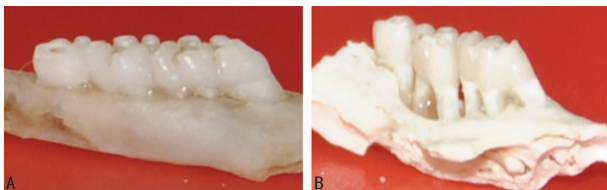
**1.2.3 组织标本的制作** 取大鼠上颌骨组织于 4% 甲醛固定,10% 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙,常规梯度乙醇脱水,石蜡包埋,制备颊舌向切片,切片厚 4~5  $\mu\text{m}$ 。

**1.2.4 SP 检测** 严格按 SP 试剂盒说明检测牙槽骨 RANKL、OPG 蛋白的表达,用 PBS 代替第一抗体作阴性对照。利用 IPWIN60 型全自动彩色图像分析系统对染色标本进行图像分析。每个标本采用随机数字表法随机选取 2 张切片,每张切片在第 2 磨牙近、远、中牙槽骨区域随机取 4 个视野( $\times 400$ )分析,在每个视野内截取牙槽骨区域检测阳性信号的强度,并计算平均光密度值,计算公式如下:平均光密度=积分光密度/测量面积。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,以  $\alpha=0.05$  为检验水准,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 健康组与实验组大鼠的牙周炎表现** 健康组大鼠牙槽骨无吸收表现。实验组大鼠术后 8 周均于术区牙龈出现不同程度的炎性反应,牙龈红肿,探诊出血,可探及较深牙周袋,上颌第 2 磨牙可探及根分叉,牙槽骨吸收超过根 1/2,牙齿松动大于 II 度,呈中、重度牙周炎的临床表现,见图 1。

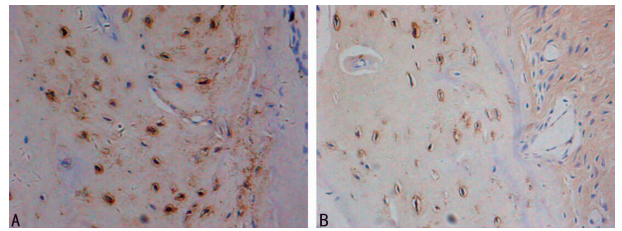


A:健康组;B:实验组。

图 1 两组大鼠上颌第 2 磨牙的比较

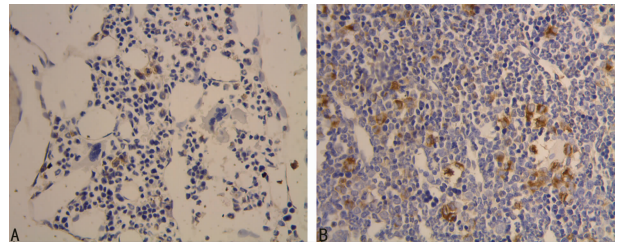
**2.2 健康组与实验组大鼠牙槽骨中 OPG、RANKL 蛋白的表达** 健康组大鼠 OPG 阳性表达集中在大鼠牙槽骨骨细胞中,胞膜、胞质及核膜都被染色,呈棕黄色颗粒状。RANKL 的阳性表达集中在大鼠牙槽骨骨髓基质细胞中,胞膜、胞质及核膜都被染色,呈棕黄色颗粒状。与健康组比较,实验组大鼠牙槽骨 OPG 表达水平较低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );RANKL 表达水平较高,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 2、3。

**2.3 实验对照组与 rhOPG 组大鼠牙槽骨中 OPG、RANKL 蛋白的表达** 与实验对照组比较,rhOPG 组大鼠牙槽骨组织 OPG 蛋白的表达水平明显上调,而 RANKL 蛋白的表达明显下调,见图 4、5,表 1。



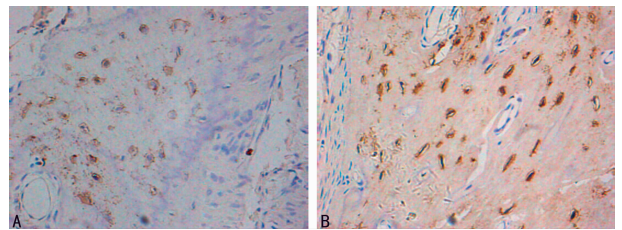
A:健康组;B:实验组。

图 2 大鼠牙槽骨中 OPG 蛋白的表达(SP $\times 400$ )



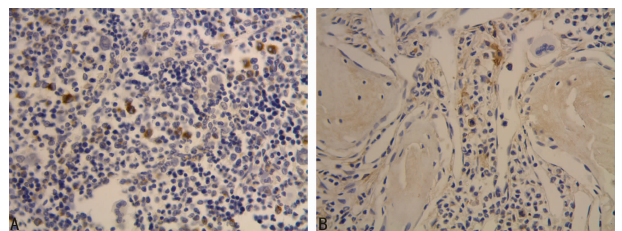
A:健康组;B:实验组。

图 3 大鼠牙槽骨中 RANKL 蛋白的表达(SP $\times 400$ )



A:实验对照组;B:rhOPG 组。

图 4 大鼠牙槽骨中 OPG 的表达(SP $\times 400$ )



A:实验对照组;B:rhOPG 组。

图 5 大鼠牙槽骨中 RANKL 的表达(SP $\times 400$ )

表 1 实验对照组与 rhOPG 组大鼠牙槽骨中 OPG、RANKL 平均光密度的比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	$n$	OPG	RANKL
实验对照组	10	17.32 $\pm$ 0.47	55.41 $\pm$ 7.44
rhOPG 组	10	20.94 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	33.14 $\pm$ 4.85 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与实验对照组比较。

**2.4 rhOPG 组大鼠治疗前、后牙槽骨中 OPG、RANKL 的表达** 与治疗前比较,治疗后大鼠牙槽骨中 OPG 表达水平明显升高,RANKL 表达水平明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 rhOPG 组大鼠治疗前、后牙槽骨中 OPG、RANKL 平均光密度的比较( $\bar{x}\pm s$ )

rhOPG 组	$n$	OPG	RANKL
治疗前	10	17.17 $\pm$ 2.24	112.70 $\pm$ 11.13
治疗后	10	20.94 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	33.14 $\pm$ 4.85 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与治疗前比较。

### 3 讨 论

最近的研究揭示牙周疾病不仅是积聚细菌的作用结果,还更强调了炎症的作用。宿主的免疫应答是一把双刃剑,可以消除炎症侵袭,但过表达也会导致组织丧失和骨丢失<sup>[5]</sup>。上世纪中叶发现炎症宿主反应导致的牙槽骨的丧失可以通过 OPG/RANKL/RANK 通路刺激破骨细胞生成及炎症干扰导致的骨形成解耦联和骨吸收。所以除了传统的消除细菌的治疗方式外,另一个治疗途径就是干扰 OPG/RANKL/RANK 轴以防止骨丢失<sup>[6-9]</sup>。

OPG/RANKL/RANK 轴是重要的骨代谢调节系统,阻断 RANKL/RANK 通路可以有效抑制骨的吸收。因此抑制 RANKL/RANK 通路为骨吸收治疗研究提供新思路<sup>[10-11]</sup>。OPG 是肿瘤坏死因子受体超家族成员,由成骨细胞系的基质细胞产生,RANKL 属于 TNF 配体超家族成员,它可以由成骨细胞系和活化的 T 细胞产生,OPG 作为一个诱骗受体与 RANKL 结合,竞争性地抑制 RANK 与 RANKL 作用,从而抑制了破骨细胞活性和骨的吸收<sup>[12]</sup>。骨再建是一个极其复杂的过程,包含了很多细胞、细胞因子及信号通路的相互调节、相互影响,尤其是 OPG/RANK/RANKL 信号通路对维护成骨细胞与破骨细胞的活性平衡起了至关重要的作用。

牙周基础治疗之后,大鼠的牙周情况较之前中重度牙周炎明显改善,OPG 的表达上调,与牙周炎治疗前比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),RANKL 表达降低差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。说明炎症减轻后,炎性细胞和淋巴细胞大大减少,在牙周病中,淋巴细胞是 RANKL 一个特别重要的来源,但要使 OPG 的表达明显上调还得辅助 rhOPG,随基因工程的进步体外已可以合成 rhOPG,它具有与生物体内 OPG 相同的生物功能<sup>[13]</sup>。牙周基础治疗辅助局部注射 rhOPG 后,RANKL 表达水平降低,OPG 表达水平升高,差异均有统计学意义,说明 OPG/RANKL 比值的变化对破骨细胞的分化与功能起了关键作用,OPG/RANKL 的比值上升时,破骨细胞的数量和活性将下降,OPG/RANKL 的比值下降时,破骨细胞的数量和活性将上升。Kadri 等<sup>[14]</sup>在小鼠骨关节炎模型腹腔注射 OPG,与对照组相比,骨的体积/组织比明显增加,骨小梁的分离明显减少,并认为 OPG 能够防止软骨的退化。但经静脉和皮下注射 rhOPG 会伴有 OPG 蛋白质的部分降解,给药不便,易产生耐药性及免疫原性等不良反应<sup>[15]</sup>。因此本实验采用牙周局部注射给予 rhOPG。很多组织产生 OPG,包括成骨细胞、内皮细胞、血管平滑肌等。经基础治疗后虽然炎症有所减轻,但相比牙周健康者,骨组织和结缔组织均较少,因此能够表达和分泌 OPG 的细胞也少,所以健康组大鼠牙槽骨中 OPG 表达水平仍然高于局部注射 rhOPG 组,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

期望恢复健康牙周组织,牙槽骨的重建是关键,而骨重建和骨量的稳定依赖于 OPG 和 RANKL 的平衡,OPG/RANKL/RANK 轴对维护成骨细胞与破骨细胞的活性平衡是最重要的一条通路。本实验采用了一周 2 次局部注射 10 mg/kg rhOPG 的方式证明了各组牙槽骨中 OPG、RANKL 免疫组织化学染色变化的对比差异,而对后期支持组织的形成情况尚未探究。rhOPG 蛋白的使用量和注射次数,单独使用还是和别的药物联合使用效果更佳等将是该领域仍需不断探索的问题。

### 参考文献

[1] Jin QM, Cirelli JA, Park CH, et al. RANKL inhibition

through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis[J]. J Periodontol, 2007, 78(7): 1300-1308.

- [2] Xiong J, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(3): 499-505.
- [3] O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis[J]. Bone, 2013, 54(2): 258-263.
- [4] Li XD, Ominsky MS, Stolina M, et al. Increased RANK ligand in bone marrow of orchietomized rats and prevention of their bone loss by the RANK ligand inhibitor osteoprotegerin[J]. Bone, 2009, 45(4): 669-676.
- [5] Trouvin AP, Goeb V. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss[J]. Clin Interv Aging, 2010, 5: 345-354.
- [6] Weitzmann MN. The role of inflammatory cytokines, the RANKL/OPG axis, and the immunoskeletal interface in physiological bone turnover and osteoporosis[J]. Scientifica (Cairo), 2013, 2013: 125705.
- [7] Peng XB, Guo W, Ren TT, et al. Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58361.
- [8] Dougall WC. Molecular pathways: Osteoclast-dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(2): 326-335.
- [9] Cheng ML, Fong L. Effects of RANKL-targeted therapy in immunity and cancer[J]. Front Oncol, 2014, 3: 329.
- [10] Lacey DL, Boyle WJ, Simonet W, et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(5): 401-419.
- [11] Liu C, Zhang Y, Kong X, et al. Triptolide prevents bone destruction in the Collagen-Induced arthritis model of rheumatoid arthritis by targeting RANKL/RANK/OPG signal pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 626038.
- [12] Liu CZ, Walter TS, Huang P, et al. Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling[J]. J Immunol, 2010, 184(12): 6910-6919.
- [13] 熊琦, 张里程, 张立海, 等. 重组人骨保护素与重组核因子  $\kappa$ B 活化因子受体蛋白对破骨前体细胞分化的影响[J]. 中国骨伤, 2013, 4(4): 324-327.
- [14] Kadri A, Ea HK, Bazille C, et al. Osteoprotegerin inhibits cartilage degradation through an effect on trabecular bone in murine experimental osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(8): 2379-2386.
- [15] 刘俊丽, 张建中, 施生根. 重组骨保护素 (rhOPG) 药物的研究现状及应用展望[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(1): 65-67.

(收稿日期: 2015-01-10 修回日期: 2015-03-17)