



基于 OPG/RANK/RANKL 系统比较研究 前肢畸形 WHBE 兔骨代谢特征

吕建敏, 陈方明, 陈诚

(浙江中医药大学动物实验研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 利用 OPG (osteoprotegerin)/RANK (receptor activator of NF- κ B)/RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) 系统比较研究前肢畸形 WHBE 兔骨代谢特征。方法 取 WHBE 兔、日本大耳白兔、前肢畸形 WHBE 兔各 10 只, 分为 3 组, 标记为 HWR (healthy WHBE rabbit)、HJR (healthy Japanese rabbit) 和 FMWR (forelimb malformation WHBE rabbit) 组。用 X 射线机所拍摄 X-线片观察各组兔前肢尺桡部形状并测定平均灰度值; 通过骨组织石蜡切片 HE 染色对前肢骨组织进行微观形态分析; 采用荧光定量 PCR 法检测 OPG、RANKL 基因在肝脏中表达; 采用酶联免疫法和免疫组化法分别测定 OPG/RANK/RANKL 蛋白在血清和骨组织中的表达。结果 与 HWR 和 HJR 组比较, FMWR 组兔前肢尺桡部呈异常弯曲状, 骨皮质明显变薄, X-线片所示灰度值显著低于 HWR 组 ($P < 0.05$)。FMWR 组兔在肝脏 RANKL 基因表达水平和 RANKL/OPG mRNA 比值 ($P < 0.01$), 血清 RANK、RANKL 蛋白含量及 RANKL/OPG 比值 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 骨组织 RANKL 蛋白表达阳性指数及 RANKL/OPG 比值 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 等指标上均显著高于 HWR 组和 HJR 组。与 HJR 组比较, HWR 组兔肝脏 OPG 和 RANKL 基因表达水平显著提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 前肢畸形 WHBE 兔存在骨质量下降、骨组织受损现象, RANKL/OPG 比值明显升高, 骨代谢紊乱是其骨骼发生畸形的主要原因。与日本大耳白兔在 RANKL 基因表达水平上的品种差异可能是 WHBE 兔对前肢畸形易感的诱因。

【关键词】 WHBE 兔; 日本大耳白兔; 前肢畸形; 骨代谢; OPG/RANK/RANKL 系统

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)05-0503-08

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.05.012

Comparative study on the characteristics of bone metabolism in forelimb malformation WHBE rabbits via the OPG/RANK/RANKL system

LV Jian-min*, CHEN Fang-min, CHEN Cheng

(Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To comparatively investigate the characteristics of bone metabolism in forelimb malformation WHBE rabbits based on the OPG/RANK/RANKL system. **Methods** Healthy male 2-2.5-month old WHBE rabbit (HWR), Healthy Japanese rabbit (HJR) and forelimb malformation WHBE rabbit (FMWR) were used in this study and divided into 3 groups, HWR, HJR and FMWR groups, with 10 rabbits in each group. The shape of forelimb and mean gray value observed from X-ray film were examined, and the bone tissue micro-morphology was analyzed using HE staining. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to determine the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) mRNA. The expressions of OPG, receptor activator of NF- κ B (RANK) and RANKL protein in serum and bone tissue were assayed by enzyme-linked immunoassay (ELISA) and immunohistochemistry, respectively. **Results** Compared with the HWR and HJR groups, rabbits in the FMWR group appeared abnormal in toutuous forelimb

【基金项目】 浙江省科技厅资助项目基金(编号:2014C37008); 浙江中医药大学比较医学创新团队基金(编号:XTD201301)。

【通讯作者】 吕建敏(1971-), 女, 研究员, 博士, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: ljm6666@163.com。

and thinner bone cortex. The mean gray values of X-ray in the FMWR group were lower than that in the HWR group ($P < 0.05$). There were significant differences between the FMWR and healthy rabbits (HWR and HJR) in the following parameters: RANKL mRNA expression and RANKL/OPG mRNA ratio in the liver ($P < 0.05$, $P < 0.01$), serum protein expression of RANK and RANKL and RANKL/OPG ratio ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and positive index of expression of RANKL protein and RANKL/OPG ratio in the bone tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, the gene expression levels of OPG and RANKL of HWR were significantly higher than that of HJR ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** The FMWR show some abnormal symptoms in bone metabolism as well as decrease of bone quality and histological changes of bone micro-structure, due to the significant increase of RANKL/OPG ratio of FMWR. The breed differences between WHBE and Japanese rabbits in RANKL mRNA expression level may be one of factors inducing limb malformation in the WHBE rabbits.

【Key words】 WHBE rabbit; Japanese rabbit; Forelimb malformation; Bone metabolism; OPG/RANK/RANKL system

Corresponding author: LV Jian-min, E-mail: ljm6666@163.com

白毛黑眼兔 (WHBE rabbit) 是浙江省的一种特色实验动物^[1], 在育种过程中, 研究人员发现 WHBE 兔容易发生自发性前肢畸形疾病, 且发生率要高于其他品种兔。已有研究表明, WHBE 兔对骨骼畸形疾病敏感性可能与其血清中 Ca 和 ALP 水平较低有关^[2], 但具体原因尚不明确。另一方面, 骨骼畸形是骨代谢异常的表现, osteoprotegerin (OPG)/receptor activator of NF- κ B (RANK)/receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 系统是近年发现的调节骨代谢的重要通路^[3], 目前已作为主要的标志物广泛用于骨代谢的研究^[4-8]。本研究首先从骨骼形状和骨组织微观形态观察上验证前肢畸形 WHBE 兔与兔的差异性, 再从 OPG/RANK/RANKL 系统入手, 从基因和蛋白表达层面比较研究前肢畸形 WHBE 兔、WHBE 兔和日本大耳白兔三者 OPG、RANK、RANKL 表达特性上差异, 为探讨前肢畸形 WHBE 兔致畸原因, 揭示 WHBE 兔骨代谢特征提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级前肢畸形 WHBE 兔 10 只, 体重 1.9 ~ 2.1 kg; 普通级 WHBE 兔 10 只, 体重 2.5 ~ 2.4 kg; 普通级日本大耳白兔 10 只, 体重 2.5 ~ 2.9 kg, 均购自浙江省新昌县大市聚镇欣健兔场【SCXK (浙) 2010-0042】。以上动物均为雄性, 年龄在 2.0 ~ 2.5 月龄。动物组织取材均在浙江中医药大学动物实验研究中心动物实验设施内进行【SYXK (浙) 2013-0184】进行。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒、cDNA 反转录试剂和 SYBR green 荧光定量 PCR 试剂盒均购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司; OPG、RANKL 及内参 β -actin 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。封口膜和 PCR 板购自美国 Bio-Rad 公司。

兔护骨素 (OPG)、兔核因子 KB 受体活化子 (RANK) 和兔核因子 KB 受体活化子配体因子 (RANKL) ELISA 试剂盒 (杭州诚维生物公司), 批号分别为 E2016050902、E2016050904、2016050903。

RANK 兔多抗 (博奥森公司), 批号为 AD062301; RANKL 鼠单抗和 OPG 兔多抗 (Adcam 公司), 批号分别为 GR58773-1 和 GR81101-1。

1.1.3 主要仪器

PLX700B/B 高频移动式 C 形臂 X 射线机 (南京普爱射线影像设备有限公司), 用于 X 线片拍摄。

组织均质机 (法国 Bertin 公司); iQ5 荧光定量 PCR 仪、水平电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Nanodrop2000 蛋白核酸测定仪、冷冻高速离心机 (美国 Thermo 公司); 9700 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司), 用于荧光定量 PCR 检测。Model 680 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), 用于 ELISA 检测。Microm AP280 组织包埋机、Microm HM 335E 型轮转切片机 (德国 Microm 公司); Leica 染色机操作规程 (瑞士 Leica 公司), NanoZoomer 2.0 RS 数字切片扫描仪 (日本滨松光电) 用于免疫组化检测。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

取 2.0 ~ 2.5 月龄雄性前肢畸形 WHBE 兔、WHBE 兔、日本大耳白兔各 10 只, 分为 3 组: 前肢畸形 WHBE 兔组 (forelimb malformation WHBE rabbit

group, 简称 FMWR 组), WHBE 兔组 (healthy WHBE rabbit group, 简称 HWR 组) 和日本大耳白兔组 (healthy Japanese rabbit group, 简称 HJR 组)。

1.2.2 样本采集

先将各组实验兔固定, 取血, 分离血清, 置 -20°C 冰箱保存, 用于血清 OPG、RANK、RANKL 蛋白含量的检测; 再麻醉处死各组兔, X 射线机下拍片后, 取肝脏于冻存管中, -80°C 冰箱保存, 用于 OPG、RANKL 基因表达检测; 取左侧前肢骨 (尺桡部) 于 4% 中性甲醛中固定, 用于前肢骨组织学及免疫组化分析。

1.2.3 检测指标

(1) 前肢骨形状 X 射线拍片观察及图像分析

分别将各组刚处死的实验兔置于 PLX700B/B 高频移动式 C 形臂 X 射线机下进行前肢骨 (桡骨和尺骨) 形状拍片。利用 Image J 图像分析软件分析前肢桡尺骨 X 线片, 测定平均灰度值, 以间接了解骨密度情况^[9]。

(2) 兔肝脏 OPG、RANKL mRNA 荧光定量 PCR 检测: 1) 肝脏总 RNA 提取和检测: 采用 TAKARA 动物组织 RNA 提取试剂盒提取兔肝脏组织总 RNA (具体操作步骤参照试剂盒说明书)。采用 Nanodrop 2000 蛋白核酸测定仪检测总 RNA 的纯度和浓度。所提取 RNA 样品于 -80°C 保存。2) cDNA 合成: 每个样品取 $2\ \mu\text{g}$ 总 RNA, 按 RT 反转录试剂说明书方法合成 cDNA, -20°C 保存备用。3) qRT-PCR: 根据 Genbank 中要检测基因的 mRNA 序列, 用 Oligo 6 软件设计 OPG、RANKL 及内参 β -actin 引物 (引物序列见表 1)。荧光定量 PCR 在伯乐 iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行, 反应体系按照 TAKARA 公司 SYBR Green 试剂盒推荐的方法进行配制, 反应程序如下: 95°C 预变性 10 s, 然后 95°C 变性 5 min, 60°C 复性 30 s, 40 个循环后进入融解曲线程序。每个样品 PCR 反应重复 3 次, 根据溶解曲线判断产物特异性。差异基因表达水平参考文献 [10] 的方法计算 (采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算)。

(3) 兔血清 OPG、RANK、RANKL 蛋白含量

利用酶联免疫法, 参照兔 OPG、RANK、RANKL 蛋白检测的 ELISA 试剂盒说明书, 测定以上 3 种蛋白在血清中的含量。

(4) 兔前肢骨组织 OPG、RANK、RANKL 蛋白表达

兔前肢骨经固定、脱钙、石蜡包埋等程序制作成前肢桡骨组织石蜡包埋块, 利用切片机对组织包埋

块进行切片, 每个标本取 5 张切片, 常规脱蜡后, 分别用于 HE 染色和免疫组织化学染色。免疫组化操作按相关试剂盒说明书进行, 制作好切片后用数字切片扫描仪对每张切片所要分析的部位进行扫描, 利用图像分析软件 (Carl Zeiss Imaging Systems: Carl Zeiss 公司) 进行图像分析, 最终以阳性指数 (总吸光度 IOD/72049.356) 来反映 OPG、RANK 和 RANKL 蛋白的表达强度。

表 1 OPG、RANKL 及内参 (β -actin) 引物序列及相应产物长度

Tab. 1 The primer sequence and length of OPG, /RANKL and β -actin products

名称 Primers	序列 (5' to 3') Sequence	扩增长度 /bp Amplification fragment length
OPG-fl	ACAGACACTTGGCACACCAG	117
OPG-r1	TTCCTCGCATTCACACACAC	
RANKL-f	ACACCTGAGAGCCGAGAAAG	110
RANKL-r	GAACCTGATGGGATGTTGGT	
β -actin-f	CGGGACATCAAGGAGAAGC	173
β -actin-r	AGGAAGGAGGGCTGGAAGA	

1.3 统计学方法

采用 SAS 8.1 统计软件中的 ANOVA 过程进行单因素方差分析, 试验数据用平均数 \pm 标准差表示, $P > 0.05$ 为差异无显著性, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异极显著, 组间样本均数差异采用 Duncan 氏多重比较检验。

2 结果

2.1 各组兔前肢骨 X 射线拍片观察结果

三种实验兔前肢 X 光片见图 1。与 WHBE 兔和日本大耳白兔相比, 前肢畸形 WHBE 兔前肢尺桡部呈明显弯曲状。利用 Image J 图像分析软件测得前肢畸形 WHBE 兔 X-线片平均灰度值为 (52.7 ± 3.1) , 低于 WHBE 兔 (55.9 ± 1.3) 和日本大耳白兔 (55.4 ± 3.5) , 且与 WHBE 兔存在显著性 ($P < 0.05$), 说明前肢畸形 WHBE 兔的骨骼质量发生明显下降。

2.2 各组兔肝脏 OPG、RANKL 基因表达

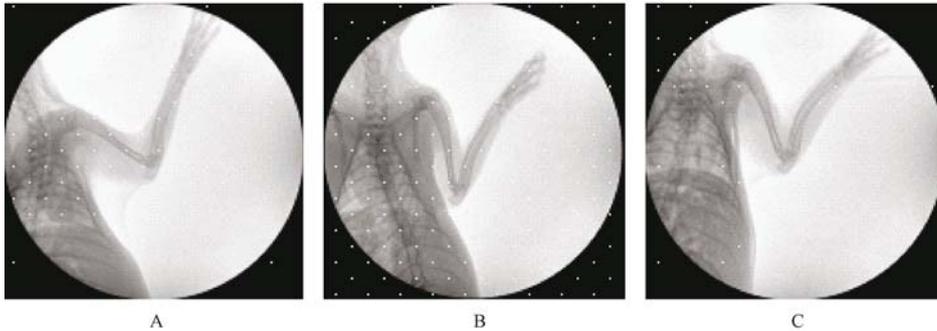
兔肝脏 OPG、RANKL 基因表达情况见表 2 和图 2。WHBE 兔的 OPG 和 RANKL 的基因表达水平均显著高于日本大耳白兔 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明这两种兔在骨代谢特征上存在差异, 但两者在 RANKL/OPG 比值上差异无显著性 ($P > 0.05$)。与 WHBE 兔和日本大耳白兔相比, 前肢畸形 WHBE 兔 RANKL mRNA 表达水平和 RANKL/OPG mRNA 比

值均极显著升高($P < 0.01$)。

2.3 各组兔血清 OPG、RANK、RANKL 表达

兔血清 OPG、RANK、RANKL 蛋白含量见表 3 和图 3。由表和图可见,3 组兔在血清 OPG 蛋白含量上差异无显著性($P > 0.05$),且 WHBE 兔和日本大耳白兔之间在血清 RANK 和 RANKL 蛋白含量及

RANKL/OPG 比值上差异也无显著性($P > 0.05$)。与 WHBE 兔和日本大耳白兔比较,前肢畸形 WHBE 兔血清 RANK 和 RANKL 蛋白含量分别极显著($P < 0.01$)和显著升高($P < 0.05$);RANKL/OPG 比值显著高于日本大耳白兔($P < 0.01$)和 WHBE 兔($P < 0.05$)。



注:A. WHBE 兔;B. 日本大耳白兔;C. 前肢畸形 WHBE 兔。

图 1 兔前肢 X 线片

Note: A. A healthy WHBE rabbit; B. A healthy Japanese rabbit; C. A forelimb malformation WHBE rabbit.

Fig. 1 X-ray film of forelimb in the rabbits

表 2 各组兔肝脏 OPG/RANKL mRNA 表达及 RANKL/OPG 比值($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The OPG /RANKL mRNA expression and RANKL/OPG ratio in the rabbit livers of the three groups

组别 Groups	OPG	RANKL	RANKL/OPG
WHBE 兔组(HWR), Healthy WHBE rabbit group	2.03 ± 0.65 ^a	1.17 ± 0.25 ^B	0.64 ± 0.25 ^B
日本大耳白兔组(HJR) Healthy Japanese rabbit group	1.32 ± 0.66 ^b	0.45 ± 0.11 ^C	0.41 ± 0.11 ^B
前肢畸形 WHBE 兔组(FMWR) Forelimb malformation WHBE rabbit group	1.45 ± 0.09 ^{ab}	2.04 ± 0.21 ^A	1.42 ± 0.20 ^A

注:同列无字母或数据肩标存在相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。下表同。

Note. In the same line, values with no letter or the same letter superscripts mean $P > 0.05$, while values with different small letter superscripts mean $P < 0.05$, and with different capital letter superscripts mean $P < 0.01$. The same as in tab. 3 and 4.

表 3 各组兔血清 OPG、RANK、RANKL 蛋白含量及 RANKL/ORG 比值($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The OPG /RANK/RANKL contents and RANK/OPG ratio in rabbit serum of the three groups($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	OPG/pg/L	RANK/pg/L	RANKL/pg/L	RANKL/OPG
WHBE 兔组(HWR), Healthy WHBE rabbit group	268.17 ± 12.54	8.39 ± 0.72 ^B	108.60 ± 4.57 ^b	0.41 ± 0.03 ^{ABb}
日本大耳白兔组(HJR) Healthy Japanese rabbit group	275.58 ± 18.43	8.60 ± 0.81 ^B	107.92 ± 7.45 ^b	0.39 ± 0.02 ^{Bb}
前肢畸形 WHBE 兔组(FMWR) Forelimb malformation WHBE rabbit group	262.41 ± 18.72	10.09 ± 0.97 ^A	115.65 ± 4.39 ^a	0.44 ± 0.04 ^{Aa}

2.4 各组兔骨组织形态观察及骨组织 OPG、RANK、RANKL 蛋白表达

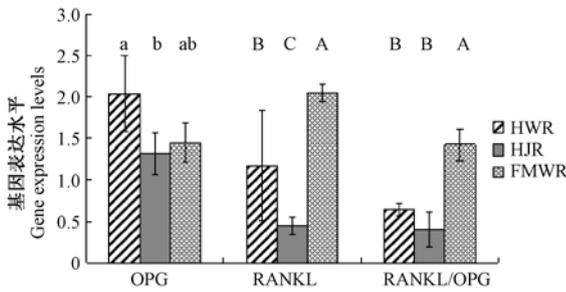
2.4.1 兔骨组织形态学观察

各组兔桡骨组织石蜡切片 HE 染色观察结果见图 4, WHBE 兔(A)和日本大耳白兔(B)的骨皮质

部位均匀紧密;前肢畸形 WHBE 兔(C)骨皮质明显变薄,并存有大量编织骨,提示前肢畸形 WHBE 兔的骨组织发育不良,骨形态受损。

2.4.2 兔骨组织 OPG、RANK、RANKL 蛋白表达

各组兔桡骨组织 OPG/RANK/RANKL 蛋白免



注:同一指标柱形图上方无字母或数据肩标存在相同字母表示差异无显著性($P > 0.05$),不同小写字母表示差异有显著性($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。图 3,6 同。

图 2 肝脏 OPG/RANKL 基因表达及 RANKL/OPG 比值

Note. On the column figure of the same parameter, values with no letter or the same letter superscripts mean $P > 0.05$, while values with different small letter superscripts mean $P < 0.05$, and with different capital letter superscripts mean $P < 0.01$. The same as in the Fig. 3 and Fig. 6.

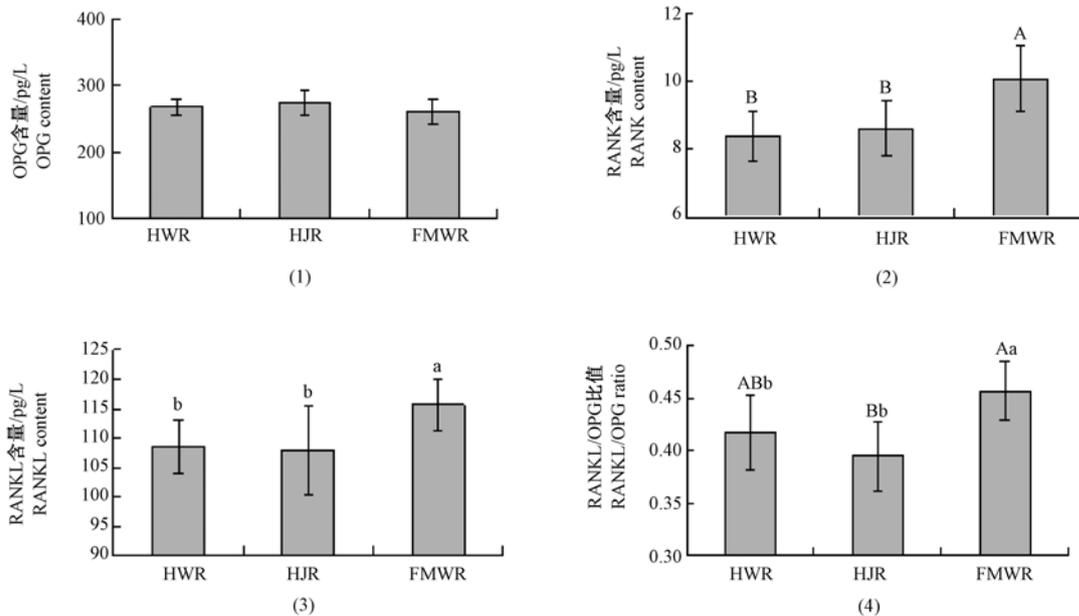
Fig. 2 OPG/RANKL gene expression and RANKL/OPG ratio in the rabbit livers

疫组化染色图片见图 5,蛋白表达的阳性指数见表 4 和图 6。OPG/RANK/RANKL 蛋白在骨细胞胞质和胞核中均有表达(图 5)。且由表 4 和图 6 可知,各组兔在骨组织 OPG 和 RANK 蛋白表达阳性指数上

差异无显著性($P > 0.05$)。而前肢畸形 WHBE 兔的 RANKL 蛋白表达阳性指数和 RANKL/OPG 比值均高于其他两组兔,分别与日本大耳白兔和 WHBE 兔具有极显著性($P < 0.01$)和差异有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

OPG、RANK 和 RANKL 是肿瘤坏死因子超家族的新成员,OPG 属于分泌性糖蛋白,RANK 和 RANKL 主要为跨膜蛋白^[3]。OPG、RANK、RANKL 基因可在多种组织中表达(如肝脏和骨组织)^[3],其基因表达产物不仅存在于骨组织,而且也可在血清中测出,目前已有将血清 OPG、RANK、RANKL 蛋白检测结果用于骨代谢评估的报道^[11-12]。OPG/RANK/RANKL 对骨代谢的作用主要体现在对破骨细胞形成和活化的调控上^[13],其具体机制为:在骨组织中,RANKL 和 OPG 主要在成骨细胞(OB)中表达,RANK 主要在破骨细胞(OC)表达,RANKL 与 RANK 结合形成 RANK-RANKL 信号,可激活下游信号分子,促进破骨细胞分化、成熟和骨的吸收^[14];而 OPG 作为受体拮抗剂,主要功能是与 RANKL 竞争性结合,抑制骨的吸收^[13],在正常情况下,RANKL/OPG 比值处于相对恒定状态,一旦异常升高或降



注:(1): OPG 蛋白表达;(2): RANK 蛋白表达;(3): RANKL 蛋白表达;(4): RANKL/OPG 比值。

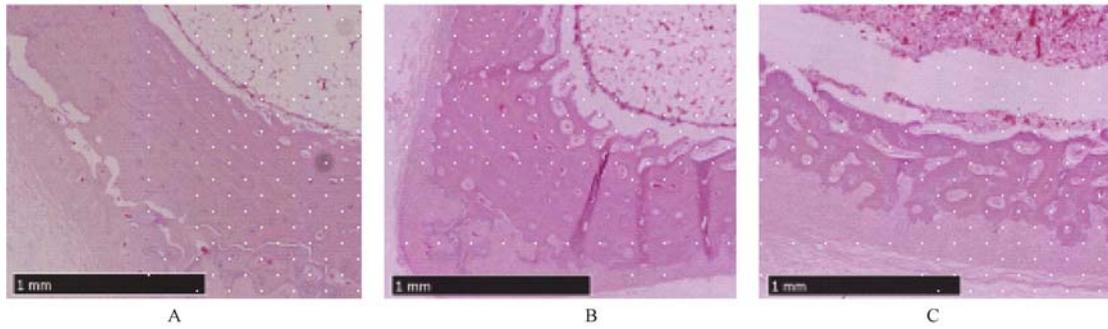
图 3 血清 OPG/RANK/RANKL 蛋白表达及 RANKL/OPG 比值

Note. (1) OPG protein expression, (2) OPG protein expression, (3) OPG protein expression, (4) RANKL/OPG ratio.

Fig. 3 OPG/RANK/RANKL protein expression and of RANKL/OPG ratio in the rabbit serum

低,将会使破骨细胞分化功能异常增强或减弱,导致骨代谢紊乱和相关疾病的发生。因此,RANKL/OPG

比值被认为是调节破骨细胞分化的关键因子^[15],可利用该比值判断骨破坏程度^[16]。

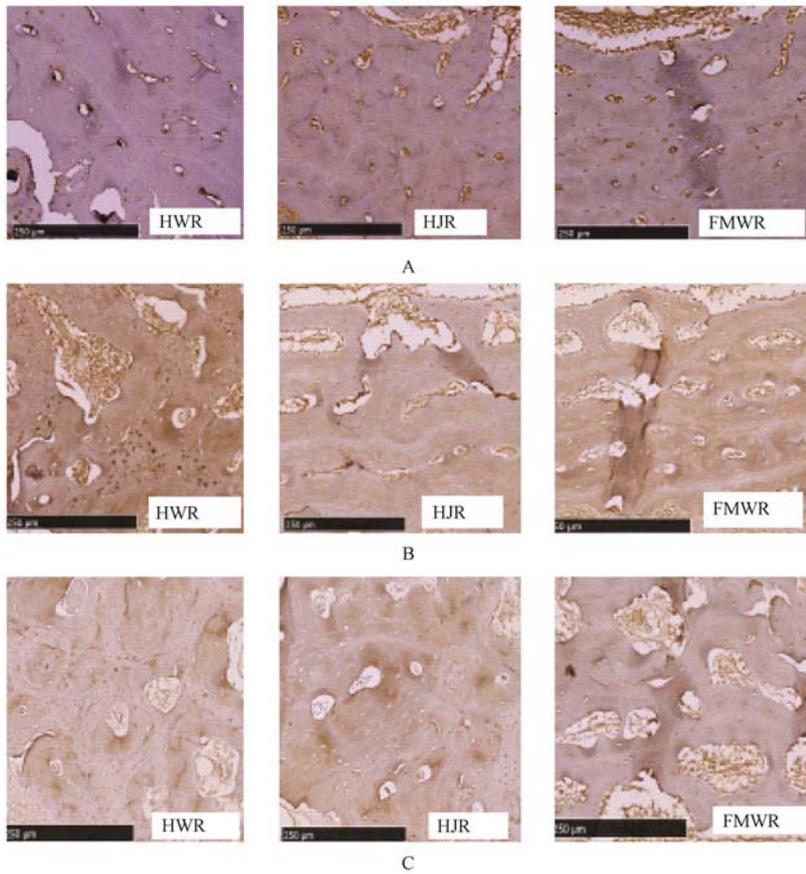


注:A. WHBE 兔;B. 日本大耳白兔;C. 前肢畸形 WHBE 兔。

图 4 兔桡骨石蜡切片 HE 染色结果(×25)

Note. A. A healthy WHBE rabbit, B. A healthy Japanese rabbit, C. A forelimb malformation WHBE rabbit. HE staining

Fig.4 Comparison of the histology of the radius.



注:A. OPG 蛋白表达;B. RANK 蛋白表达;C. RANKL 蛋白表达。

图 5 兔桡骨 OPG、RANK、RANKL 蛋白免疫组织化学染色(×100)

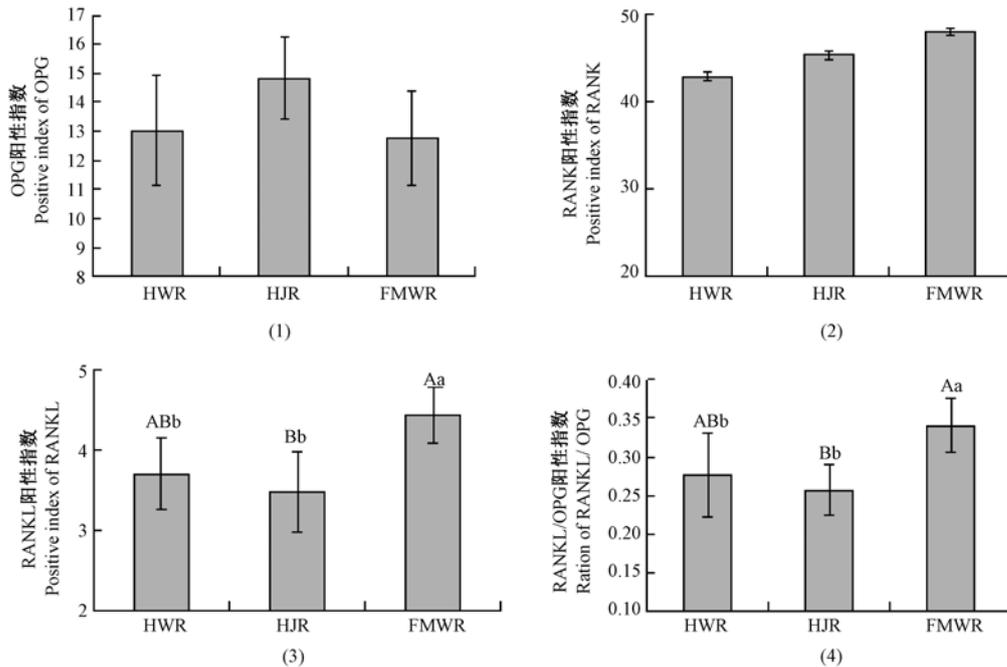
Note. A. Expression of OPG, B. Expression of RANK, C. Expression of RANKL.

Fig.5 Expression of OPG, RANK and RANKL in the rabbit radius tissues. Immunohistochemical staining.

表 4 各组兔骨组织 OPG/RANK/RANKL 蛋白表达阳性指数及 RANKL/ORG 比值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Positive index of OPG /RANK/RANKL protein expression and RANKL/ORG ratio in the rabbit bone tissues of the three groups

组别 Groups	阳性指数 Positive index ($\times 10^3$)			RANKL/OPG
	OPG	RANK	RANKL	
WHBE 兔组 (HWR) Healthy WHBE rabbit group	13.68 \pm 1.89	42.83 \pm 2.95	3.71 \pm 0.44 ^{ABb}	0.28 \pm 0.05 ^{ABb}
日本大耳白兔组 (HJR) Healthy Japanese rabbit group	13.60 \pm 1.41	45.29 \pm 10.89	3.49 \pm 0.50 ^{Bb}	0.27 \pm 0.03 ^{Bb}
前肢畸形 WHBE 兔组 (FMWR) Forelimb malformation WHBE grabbit group	13.12 \pm 1.62	47.91 \pm 2.23	4.44 \pm 0.33 ^{Aa}	0.34 \pm 0.03 ^{Aa}



注: (1) OPG 蛋白; (2) RANK 蛋白; (3) RANKL 蛋白; (4) RANKL/OPG 比值。

图 6 骨组织 OPG/RANK/RANKL 蛋白表达阳性指数及 RANKL/ORG 比值

Note. (1) OPG protein, (2) RANK protein, (3) RANKL protein, (4) RANKL/OPG ratio.

Fig. 6 Positive indexes of OPG /RANK/RANKL protein expression and RANK/OPG ratio in the rabbit bone tissues

本研究首先通过 X 摄片和骨组织石蜡切片 HE 染色观察验证了前肢畸形 WHBE 兔在骨形状、骨密度及骨组织微观形态上与兔的差异性, 确认了前肢畸形 WHBE 兔存在骨质量下降和骨组织形态受损的病症。继而从基因和蛋白表达层面探讨前肢畸形 WHBE 兔的致病原因, 发现前肢畸形 WHBE 兔无论在基因还是蛋白表达水平上, 其 RANKL/OPG 比值均显著高于 WHEB 兔及日本大耳白兔。而 RANKL/OPG 比值是判断骨破坏程度的重要因子^[15], RANKL/OPG 比值升高可使破骨细胞分化作用增强, 骨的吸收和破坏程度加剧, 导致骨代谢异常, 这可能是导致前肢畸形 WHBE 兔发病的主要原因。此结果与前人报道较一致^[16-19], 他们在研究骨质疏松和类风湿关节炎等骨代谢疾病发病机制时,

均发现上述疾病发生与 RANKL/OPG 比值升高相关。此外, 本研究还发现 WHBE 兔 RANKL 基因表达水平显著高于日本大耳白兔, 说明两者在 RANKL 基因表达上存在品种差异, 这可能是 WHBE 兔易发生前肢畸形的诱因, 但具体机制还有待进一步研究。

基于基因、血清蛋白、骨组织蛋白表达层面分析, 可推测 RANKL/OPG 比值升高是造成前肢畸形 WHBE 兔骨骼发育异常的主要原因, 而 WHBE 兔和日本大耳白兔在 RANKL 基因表达上的品种差异, 可能是 WHBE 兔容易发生骨骼畸形的诱发因素之一。本研究发现不仅揭示了前肢畸形 WHBE 兔的发病原因, 而且为自发性骨代谢疾病动物模型的开发提供了思路。

参 考 文 献

- [1] 蔡月琴, 屠珏, 余佳, 等. RAPD 标记技术用于 WHBE 兔近交系培育中的遗传分析 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(5): 326-329.
- [2] 陈方明, 徐剑钦, 朱科燕, 等. 前肢畸形 WHBE 兔血清钙、磷、碱性磷酸酶含量检测及骨密度分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(1): 19-23.
- [3] Walsh MXC, Choi YW. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond [J]. Front Immunol, 2014; 5: 511-521.
- [4] 吕建敏. OPG/RANK/RANKL 系统在实验动物骨骼发育营养需要评估中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(11): 76-79.
- [5] Song HM, Wei YC, Li N, et al. Effects of Wenyangbushen formula on the expression of VEGF, OPG, RANK and RANKL in rabbits with steroid-induced femoral head avascular necrosis [J]. Mol Med Reports, 2015, 12(6): 8155-8161.
- [6] Bu SY, Kim MH, Choi MK. Effect of silicon supplementation on bone status in ovariectomized rats under calcium-replete condition [J]. Biol Trace Elemnt Res, 2016, 171(1): 138-144.
- [7] Johnson DC, Weinhold N, Mitchell J. Genetic factors influencing the risk of multiple myeloma bone disease [J]. Leukemia, 2016, 30(4): 883-888.
- [8] 刘康, 吴风晴, 吴连国, 等. 强骨胶囊对骨质疏松大鼠 OPG/RANKL/RANK 系统的影响 [J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报), 2016, 31(3): 1071-1073.
- [9] 吕红斌, 杨颖, 曾驰, 等. 低强度脉冲超声对新生骨成熟过程的影响 [J]. 中南大学学报(医学版), 2009, 34(10): 984-986.
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] Kanellakis S, Moschonis G, Tenta R, et al. Changes in parameters of bone metabolism in postmenopausal women following a 12-month intervention period using dairy products enriched with calcium, vitamin D, and phylloquinone (vitamin K1) or menaquinone-7 (vitamin K2): The Postmenopausal Health Study II [J]. Calcif Tissue Int, 2012, 90: 251-262.
- [12] Wagner D, Fahrleitner-Pammer A. Levels of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator for nuclear factor kappa B ligand (RANKL) in serum: Are they of any help? [J]. Wiener Medizinische Wochenschrift, 2010, 160(17): 452-457.
- [13] Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. The role of receptor activator of nuclear factor-B (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(12): 4514-4521.
- [14] Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions [J]. J Dent Res, 2013, 92(10): 860-867.
- [15] Hofbauer LC, Sundeep Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption [J]. J Bone Mineral Res, 2000, 15(1): 2-12.
- [16] 朱再胜, 戴爽, 吴玲, 等. 高脂饮食诱导肥胖小鼠模型中氧化应激、炎症递质对骨代谢的影响及其可能机制 [J]. 温州医科大学学报, 2014, 44(9): 631-636.
- [17] 冯建书, 付强, 闫世杰, 等. 仙灵骨葆对骨质疏松大鼠 OPG/RANK/RANKL 表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(23): 4438-4441.
- [18] Skoumal M, Kolarz G, Haberhauer G, et al. Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and synovial fluid. A comparison of patients with long tending rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. Rheumatol Int, 2005, 26: 63-69.
- [19] Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption of in early postmenopausal women [J]. Clin Invest, 2003, 111(8): 1120-1122.

[收稿日期] 2016-05-30