

· 临床研究 ·

正常健康人群外周血液中 OPG 和 sRANKL 浓度测定

朱亮亮,包倪荣,周利武,郭亭,曾晓峰,赵建宁

(南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院骨科,江苏 南京 210002)

【摘要】 目的:对正常健康人群外周血液中骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)、核因子 kappaB 受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)浓度测定,明确其与年龄、性别之间是否存在一定关系。**方法:**收集 220 例正常健康人的清晨外周血液,其中男 108 例,女 112 例;年龄 35~70 岁,平均 52.5 岁。用 ELISA 法测血清中 OPG、sRANKL 浓度。**结果:**在 35~70 岁正常健康人群外周血液中的 OPG、sRANKL 浓度:女性,OPG 21.95~315.47 pg/ml, sRANKL 10.25~370.20 pmol/L;男性,OPG 14.78~192.55 pg/ml, sRANKL 9.25~300.32 pmol/L。46 岁后女性血液中 OPG 浓度与年龄存在正相关;57 岁后女性血液中 sRANKL 浓度明显升高。**结论:**年龄和性别影响外周血液中 OPG、sRANKL 浓度。46 岁后女性血液中 OPG 浓度随年龄增加而升高,女性血液中 sRANKL 浓度 57 岁后明显升高。

【关键词】 骨保护素; 核激活因子受体配体; 浓度测定; 外周血; 健康人

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2010.02.003

Concentration measurement of the OPG and sRANKL of peripheral blood among normal healthy people ZHU Liang-liang, BAO Ni-rong, ZHOU Li-wu, GUO Ting, ZENG Xiao-feng, ZHAO Jian-ning. Department of Orthopaedics, Nanjing School of Clinical Medicine, Nanjing University/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China

ABSTRACT Objective: To measure the concentration of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF- κ B ligand (sRANKL) in peripheral blood among normal healthy people and investigate the relationship of the concentration with age and sex. **Methods:** The peripheral blood samples of 220 normal healthy people (included 108 males and 112 females, aged from 35 to 70) were collected in the morning. The OPG and sRANKL concentration of blood serum were measured by ELISA. **Results:** The concentrations in female peripheral blood were: OPG 21.95 to 315.47 pg/ml, sRANKL 10.25 to 370.20 pmol/L; while in male were: OPG 14.78 to 192.55 pg/ml, sRANKL 9.22 to 300.32 pmol/L. There was positive correlation between the OPG concentration and age in the females older than 46 years. And for female older than 57, the sRANKL concentration of peripheral blood increases obviously. **Conclusion:** Age and sex are the elements that affect the OPG and sRANKL concentration in peripheral blood. For female older than 46, the OPG concentration of peripheral blood increases with age, while the sRANKL concentration of peripheral blood increases for females older than 57.

Key words Osteoprotegerin (OPG); Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL); Concentration measurement; Peripheral blood; Healthy people

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(2): 87-89 www.zggszz.com

骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)、核因子 kappaB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)是调节骨代谢的重要分子; OPG、RANKL 均为 RANK 配体,共同调节破骨细胞活性;RANKL 与破骨细胞表面的 RANK 结合后,促进破骨细胞活化;而 OPG 能与 RANKL 竞争性的与 RANK 结合,抑制破骨细胞的分化成熟。外周循环血

液中 OPG/serum RANKL(sRANKL)浓度受骨代谢、心血管及免疫状态等多种因素的影响。本研究对正常健康人群外周血液中 OPG、sRANKL 浓度的测定,明确其浓度基线水平及与年龄、性别之间的关系。

1 资料与方法

1.1 样本收集 研究对象为 2009 年 3 月 1 日至 5 月 31 日来我院进行健康体检人群,随机抽取的 220 例正常健康志愿者,排除心血管以及免疫系统疾病,年龄 35~70 岁,平均 52.5 岁,汉族;其中,男

基金项目:全军“十一五”重点攻关项目基金(编号:06G043)

通讯作者:赵建宁 E-mail: zhaojianning.0207@163.com

108 例,年龄 35~70 岁,平均(52.50±10.44)岁;女 112 例,年龄 35~70 岁,平均(52.41±10.25)岁。清晨空腹抽取外周血液,存放于 EDTA 中,离心(4 000 g,5 min),-70 °C 冻存。记录其年龄、性别等相关资料。血浆收集时间为 2009 年 3 月至 5 月底;OPG、sRANKL 测定时间为 2009 年 6 月初,标本保存在-70 °C 深低温冰箱中,期间无解冻过程。本实验研究得到了南京军区总医院伦理委员会的同意及实验参与者的同意。

1.2 样本中 OPG、sRANKL 的浓度测定 本实验对 OPG、sRANKL 浓度测定均使用 ELISA 法:(OPG 试剂盒,奥地利,BENDER 公司,sRANKL 试剂盒,美国,BIOVENDOR 公司)。检测实验开始前,提前配置好所有试剂,试剂或样品稀释时,均混匀,混匀时尽量避免起泡。每次检测都标准曲线。如样品浓度过高时,用样品稀释液进行稀释,以使样品符合试剂盒的检测范围。步骤:①加样:分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μl,余孔分别加标准品或待测样品 100 μl,注意不要有气泡,加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀,酶标板加上盖或覆膜,37 °C 反应 120 min。为保证实验结果有效性,每次实验都用新的标准品溶液。②弃去液体,甩干,不用洗涤。每孔加待测的 OPG 血浆 100 μl,37 °C,60 min。③温育 60 min 后,弃孔内液体,甩干,洗板 3 次,每次浸泡 1~2 min,350 μl/每孔,甩干。④每孔加 OPG 检测液体 100 μl,37 °C,60 min。⑤温育 60 min 后,弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次,每次浸泡 1~2 min,350 μl/每孔,甩干。⑥依序每孔加底物溶液 90 μl,37 °C 避光显色(30 min 内,此时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度兰色,后 3~4 孔梯度不明显,即可终止)。⑦依序每孔加终止溶液 50 μl,终止反应(此时蓝色立转黄色)。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。为保证实验结果的准确性,底物反应时间到后应尽快加入终止液。⑧用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔光密度(OD 值)。在加终止液后 15 min 内进行检测。sRANKL 的检测步骤基本与 OPG 的检测步骤相同。

1.3 统计分析 本实验数据的处理使用 SPSS 13.0 软件,结果以均数±标准差表示。OPG、sRANKL 浓度分别与年龄之间是否存在相关性用 Pearson 分析法进行分析。同一种因子之间的比较用 *t* 检验法。

2 结果

OPG、sRANKL 浓度测量结果:35~70 岁正常健康人群外周血液中 OPG、sRANKL 浓度分布范围:OPG14.78~315.47 pg/ml,sRANKL9.25~370.20 pmol/L;其中女性分布范围:OPG21.95~315.47 pg/ml,sRAN-

KL10.25~370.20 pmol/L;男性分布范围:OPG14.78~192.55 pg/ml,sRANKL9.25~300.32 pmol/L。女性外周血液中 OPG 浓度明显高于男性($t=5.00, P<0.05$);而男女外周血液中 sRANKL 浓度无明显差异($t=1.67, P>0.05$)(见表 1)。

表 1 样本中 OPG、sRANKL 浓度($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Concentration of OPG and sRANKL($\bar{x}\pm s$)

性别	例数	OPG 浓度(pg/ml)	sRANKL 浓度(pmol/L)
男	108	89.54±29.64	110.00±73.43
女	112	121.37±60.21	93.17±75.96
<i>t</i> 值		5.00	1.67
<i>P</i> 值		<0.05	>0.05

对女性 OPG 浓度与年龄相关分析后发现:35~45 岁 OPG 浓度与年龄无明显相关性,46 岁后 OPG 浓度与年龄存在正相关($r=0.493, P<0.01$)(见图 1)。男性血液中 OPG 浓度与年龄无相关性(见图 2)。男女血液中 sRANKL 浓度与年龄无相关性,而 57 岁后女性血液中 sRANKL 浓度明显升高($P<0.005$)(见图 3-4)。

3 讨论

OPG、RANKL 均为肿瘤坏死因子超家族成员,参与体内运动系统(主要是骨骼组织)、心血管系统以及免疫系统等多种代谢活动^[1]。RANKL 表达于前体破骨细胞、树突状细胞等多种细胞。OPG 是由骨髓基质细胞、成骨细胞等分泌的可溶性蛋白。成骨细胞表面的 RANKL 配体在与破骨细胞表面的 RANK 受体结合后,能够促进破骨细胞的分化、成熟。OPG 能够与 RANKL 的配体 RANK 结合,从而竞争性抑制 RANKL 与 RANK 结合。RANKL 缺陷患者有严重的骨硬化、生长停滞、牙齿萌出障碍^[2]。在转基因小鼠体内,高水平的 OPG 导致骨硬化症。

OPG、RANKL 在骨代谢中起着重要作用,血清中 OPG 及 sRANKL 的测定对于评估患者的骨代谢状态有一定的临床意义,有望成为诊断多种骨溶解疾病及骨质疏松的辅助方法。然而对正常健康人群外周血液中 OPG、sRANKL 浓度出现差异,可能与下列因素有关:①实验所测人群种族、年龄段不同。②样本采集时间,被测者的月经周期、运动效应等差异^[3]。③OPG、RANKL 为多种组织所分泌,参与骨代谢等多种代谢活动。关节疾病、促进骨质代谢药物、血液系统肿瘤、转移性骨肿瘤以及内分泌系统状态对 OPG、sRANKL 的水平均有一定影响^[4]。④试剂盒差异。⑤所测样本储存方法的差异。样本的储存方法也会影响所测结果。Chan 等^[5]报道:样本储存-70 °C 冰箱中 6 个月其 OPG 浓度明显下降。这些因素影响

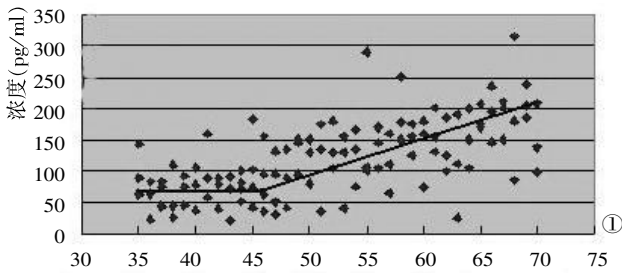


图 1 女性血液中 OPG 浓度

Fig.1 OPG concentration of woman

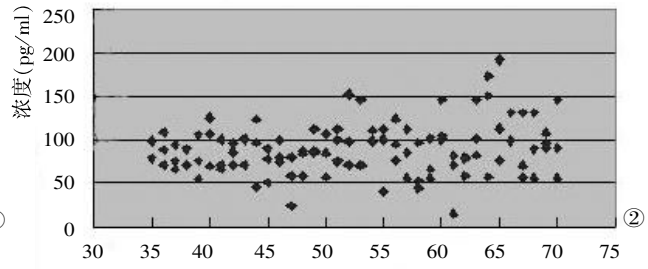


图 2 男性血液中 OPG 浓度

Fig.2 OPG concentration of man

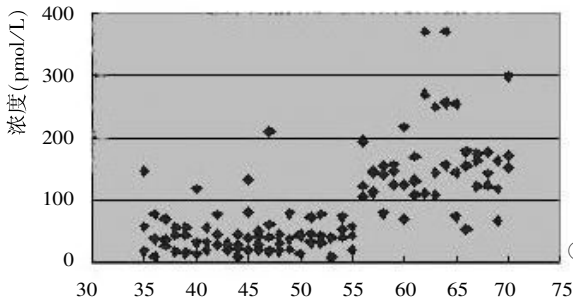


图 3 女性血液中 sRANKL 浓度

Fig.3 sRANKL concentration of woman

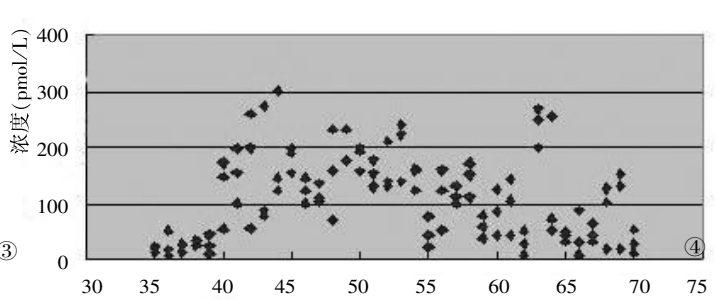


图 4 男性血液中 sRANKL 浓度

Fig.4 sRANKL concentration of woman

可能导致所测结果不一致。

本研究发现 46 岁以下女性及所有男性志愿者血清中 OPG 含量与年龄未呈明显线性关系,而 46 岁以上的女性 OPG 血清水平出现升高,并与年龄呈正相关。57 岁以下女性及所有男性志愿者血清中 OPG 含量与年龄亦未见明显线性关系,而 57 岁以上女性 RANKL 的血清水平出现了明显升高,且与年龄成正性的线性相关。sRANKL 的水平升高将引起破骨细胞的分化成熟,可以解释老年女性出现的骨质疏松,sRANKL 与雌激素之间的关系有待于进一步明确。而 OPG 升高可能是机体钙质流失加快的代偿反应。Rogers 等^[6]的研究中未发现 sRANKL 与年龄与性别之间的线性关系,而 Svetlana 等^[7]的研究发现女性 42 岁后,OPG 的血清水平明显升高,这与本研究结果不完全一致,可能与种族、试剂盒以及样本量差异有关。

本研究的不足之处在于不能明确 sRANKL 的水平是否能反映骨组织内的 RANKL 水平,因为 RANKL 的水平还受到如免疫系统状态、心血管事件等除了年龄和激素之外的因素影响,另外局部 RANKL 的游离程度也受到其他因素的影响^[8],故 sRANKL 临床意义的确定尚有待于明确 sRANKL 与局部 RANKL 水平的相关性。

参考文献

- [1] 王扬天,王坚,马驰原.核因子- κ B 与糖尿病的关系.医学研究生学报,2007,20:310-314.
- [2] Sobacchi C, Frattini A, Guerrini MM, et al. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. Nat Genet, 2007, 39:960-962.
- [3] Hannon R, Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. Osteoporos Int, 2000, 11(Suppl 6):30-44.
- [4] 陈柏龄,谢登辉,王宗伟,等.淫羊藿总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 OPG、OPGL mRNA 表达的影响.中国骨伤,2009,22(4):271-273.
- [5] Chan BY, Buckley KA, Durham BH, et al. Effect of anticoagulants and storage temperature on the stability of receptor activator for nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in plasma and serum. Clin Chem, 2003, 49(12):2083-2085.
- [6] Rogers A, Saleh G, Hannon RA, et al. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. J Clin Endocrinology Metabolism, 2002, 87(10):4470-4475.
- [7] Trofimov S, Pantsulaia Ia, Eugene Kobylansky, et al. Circulating levels of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegerin/macrophage-colony stimulating factor in a presumably healthy human population. Eur J Endocrinol, 2004, 150:305-311.
- [8] Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor- κ B ligand:clinical utility in metabolic bone disease assessment. J Clin Endocrinol Metabol, 2005, 90(11):6323-6331.

(收稿日期:2009-11-25 本文编辑:王玉蔓)