

· 临床论著 ·

慢性乙型肝炎患者血清骨保护素和核因子κB受体活化因子配体变化的研究

张强 成军 赵昌松 袁征 蔡娟 万钢 李鑫

【摘要】目的 观察慢性乙型肝炎患者血清骨保护素(OPG)和核因子κB受体活化因子配体(RANKL)水平的变化,探讨慢性肝病致骨质疏松的发病机制。**方法** 随机选取300例慢性乙型肝炎患者作为试验组,其中95例不伴有肝硬化,205例伴肝硬化,根据Child-Pugh分级:A级69例,B级62例,C级74例,选取年龄、性别、身高、体重相匹配的100例健康志愿者作为对照组。血清OPG、RANKL应用ELISA方法检测,应用跟骨超声骨密度测定仪测定跟骨硬度指数(SI),对相关数据进行相应的统计学分析。**结果** 各组患者OPG水平差异均具有统计学意义,对照组、不伴肝硬化组、肝硬化A组、肝硬化B组和肝硬化C组患者的血清OPG水平逐渐降低,RANKL值则逐渐升高($P < 0.05$)。对照组、不伴肝硬化组、肝硬化A组、肝硬化B组和肝硬化C组患者血清OPG/RANKL比值逐渐降低,对照组OPG/RANKL值较其余4组均显著升高($P < 0.05$)。慢性乙型肝炎组患者的跟骨SI与对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。肝硬化A组、B组、C组患者SI值显著低于对照组SI($P < 0.05$)。**结论** OPG、RANKL和OPG/RANKL系统可能参与慢性肝病相关性骨质疏松症的发病过程,慢性乙型肝炎患者可引起OPG、RANKL以及OPG/RANKL的变化,上调破骨细胞,使得骨吸收大于骨形成,从而引发骨质疏松。

【关键词】慢性肝病;肝炎,乙型;骨质疏松;骨保护素(OPG)、核因子κB受体活化因子配体(RANKL)

Study on the changes of serum osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor-κB ligand in patients with chronic hepatitis B ZHANG Qiang, CHENG Jun, ZHAO Chang-song, YUAN Zheng, CAI Juan, WAN Gang, LI Xin. Department of Orthopedics, Beijing Ditan hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: CHENG Jun, Email: jun.cheng.ditan@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes of serum osteoprotegerin (OPG) and receptor activator for nuclear factor-κB ligand (RANKL) in patients with chronic hepatitis B (CHB) and to discuss the possible pathogenesis of osteoporosis caused by chronic liver diseases. **Methods** Total of 300 consecutive hepatitis B patients were selected randomly as CHB group, among which, there were 95 cases without cirrhosis and 205 cases with cirrhosis; according to Child-Pugh classification: 69 patients were class A, 62 were class B, and 74 were class C. One hundred normal healthy people were selected as control group. The serum OPG and RANKL were measured by ELISA. The value of stiffness index (SI) of calcaneus was measured by ultrasound apparatus. All data were statistically analyzed. **Results** The serum OPG had significant difference among the groups ($P < 0.01$). The OPG of the control group, CHB without cirrhosis group, chronic hepatitis A, B and C group showed a decreasing trend. While the RANKL of those groups showed an increasing trend. OPG/RANKL decreased gradually from control group to non-cirrhosis group, to cirrhosis group A, B and C ($P < 0.05$). OPG/RANKL in control group were significantly higher than

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.06.013

基金项目:首都医科大学基础-临床科研合作课题(No. 11JL-L09);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划资助课题(领军人才)(No. 2009-1-09)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院骨科(张强、赵昌松、袁征 蔡娟、李鑫),传染病研究所(成军),病案室(万钢);新发突发传染病研究北京市重点实验室(成军)

通讯作者:成军, Email: jun.cheng.ditan@gmail.com

other 4 groups. The SI of CHB and control group was significantly different. The SI of calcaneus in cirrhosis group A, group B, group C were significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$). **Conclusions** The OPG, RANKL and OPG/RANKL system might relate to the pathogenesis of hepatitis B chronic liver disease associated osteoporosis. In patients with chronic liver diseases, OPG, RANKL and OPG/RANKL changed, osteoclast formation was up-regulated more than the normal bone tissue, bone resorption was faster than bone formation, and these might cause osteoporosis.

【Key words】 Chronic liver diseases; Hepatitis B; Osteoporosis; Osteoprotegerin (OPG); Receptor activator for nuclear factor- κ B ligand (RANKL)

我国约有1.25亿人携带HBV, 其中需要治疗的患者约3000万, 慢性乙型肝炎引起的慢性肝病非常常见, 慢性肝病可引起多器官系统疾病, 骨科门诊常可以见到由于慢性肝病骨质疏松引起的各种骨关节疾病, 慢性肝病患者发生代谢性骨营养不良的发生率约为12%~55%^[1-3], 临床上常见的是由于骨质疏松出现各部位的骨折, 对患者的生存质量造成了严重影响, 尽管目前已有许多病因的报道, 但是, 有关慢性肝病骨质疏松的发病机理还不完全明确^[4-5]。本研究通过测定慢性乙型肝炎患者血清中骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)、核因子 κ B受体活化因子配体 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 水平, 观察慢性乙型肝炎OPG、RANKL指标变化与骨质疏松发生率的相关性, 初步探讨慢性肝病骨质疏松的发病机理。

资料与方法

一、一般资料

随机选取本院门诊收治的慢性乙型肝炎患者共300例作为受试组, 其中男性180例, 女性120例, 年龄30~60岁, 平均年龄48岁。不伴有肝硬化者95例, 慢性乙型肝炎合并肝硬化患者205例, 应用Child-Pugh分级: A级69例, B级62例, C级74例; 分别记录为肝硬化A组、肝硬化B组、肝硬化C组; 患者按照《慢性乙型肝炎防治指南2010年最新版》^[6]进行确诊, 病程2~15年, 平均3年。对照组: 随机选取健康志愿者100例, 其中男性60例, 女性40例, 年龄30~60岁, 平均年龄45岁。受试者均未针对骨质疏松进行治疗。排除可能影响骨质疏松的其他一些疾病, 如肾脏疾病、糖尿病、甲状腺功能减退以及原发性胃肠道疾病等。

二、仪器与方法

1. 骨密度测量方法: 应用GE公司Achilles Express跟骨超声骨密度测定仪, 骨密度根据跟骨硬度指数 (stiffness index, SI) 确定。同时测量宽

波段超声衰减 (broadband ultrasound attenuation, BUA)、超声速度 (speed of sound, SOS), SI通过以下公式计算: $SI = 0.67 \times BUA + 0.28 \times SOS - 420$ 。测量工作由专人负责, 统一测定受试者右足跟骨。

2. 超声跟骨硬度指数计算方法及骨质疏松诊断标准: 硬度指数以T值表示, $T = (\text{所测骨密度值} - \text{正常年轻人群平均骨密度}) / \text{正常年轻人群骨密度的标准差}$ 。跟骨骨密度较同性别人峰值骨量均值下降2.5个标准差或以上为骨质疏松, 下降1个标准差以上但未达到2.5个标准差者为骨量减少, 以此来判断跟骨密度情况^[2]。

3. OPG、RANKL指标检测方法: 所有患者空腹10 h, 于次日8:00抽空腹血, 离心取血清, 置于-70℃冰箱内备用, 血清OPG和RANKL应用ELISA方法检测, 分别采用美国Raybiotech公司和美国Kappa试剂盒, 以全自动多功能酶标仪 (Multiskan MK3, Thermo, USA) 检测。OPG试剂盒批内变异数 $< 10\%$, RANKL试剂盒批内变异数为3%~5%。

三、统计学处理

应用SPSS 11.0软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 多重比较采用SNK检验, 定性资料采用频率和率进行统计学描述, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、各组患者跟骨SI值和骨质疏松发生率

慢性乙型肝炎患者跟骨SI较对照组跟骨SI差异具有显著统计学意义 ($P < 0.001$)。不伴肝硬化组、肝硬化A组、肝硬化B组和肝硬化C组患者跟骨SI值逐渐变小, 显著低于对照组跟骨SI, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。本研究中共有58例 (19.33%) 慢性乙型肝炎患者诊断为骨质疏松。正

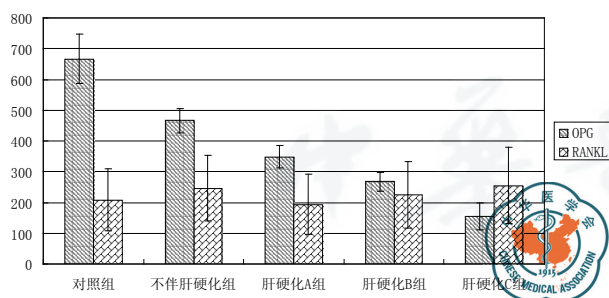
常对照组仅6例(6%)诊断为骨质疏松,慢性乙型肝炎患者骨质疏松发生率较对照组差异具有统计学意义($\chi^2=9.9206$, $P=0.0016$),见表1。

二、各组患者OPG和RANKL的比较

各组患者间OPG水平均具有显著性差异,对照组、不伴肝硬化组、肝硬化A组、肝硬化B组和肝硬化C组患者血清OPG逐渐降低,分别为(666.2 ± 80.19) ng/ml、(465.9 ± 40.42) ng/ml、(348.5 ± 36.48) ng/ml、(267.4 ± 30.39) ng/ml和(154.1 ± 44.09) ng/ml,各组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$);对照组RANKL水平(pg/ml)与不伴肝硬化组、B组、C组比较差异也具有统计学意义($P < 0.05$),但与肝硬化A组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见图1。

三、各组患者OPG/RANKL的比较

对照组、不伴肝硬化组、肝硬化A组、肝硬化B组和肝硬化C组患者血清OPG/RANKL逐渐降低,分别为(4.9 ± 5.68)、(2.38 ± 1.53)、(2.61 ± 1.93)、(1.43 ± 1.47)和(0.81 ± 0.68),对照组OPG/RANKL值较其余4组均显著升高($P < 0.05$),肝硬化A组患者与不伴肝硬化组OPG/RANKL比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),肝硬化B组和肝硬化C组无显著差异($P > 0.05$),但较肝硬化A组患者与不伴肝硬化组低,差异显著具有统计学意义($P < 0.05$),见图2。



注: OPG和RANKL数值单位分别为ng/ml和pg/ml

图1 各组患者OPG和RANKL的比较

讨 论

骨保护素(OPG)属于肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族成员,是一种可溶的分泌性糖蛋白,无疏水跨膜区,有单体和同源二聚体两种形式。OPG基因敲除小鼠表现为破骨细胞数量增多和严重的骨质疏松^[7-8]。NK- κ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor κ B, RANK)也是肿瘤坏死因子受体超家族成员,为I型跨膜蛋白。RANKL是一种缺乏信号肽的II型跨膜蛋白。研究表明,RANKL的作用是促进破骨细胞分化,激活已经发育成熟的破骨细胞,减缓破骨细胞的凋亡和死亡^[9]。OPG、RANKL和RANK是偶联成骨细胞、基质细胞和破骨细胞分化、活化与生物活性的3种主要细胞因子,在骨的生长发育、骨改建、塑型中起到十分重要的作用。骨髓基质细胞和成骨细胞表达RANKL,与破骨细胞或破骨细胞前体细胞表面上的RANK结合后,促进破骨细胞的激活与分化,减缓破骨细胞的凋亡和死亡。RANKL还可以与成骨细胞分泌的OPG结合,竞争性抑制RANK和RANKL之间的结合,抑制成熟破骨细胞的生成。研究还表明,许多细胞因子、激素都可通过直接或间接调节RANK、OPG/RANKL的表达。影响破骨细胞的分化和功能,对抗骨质疏松的发生或抑制骨质疏松的形成^[9-10]。

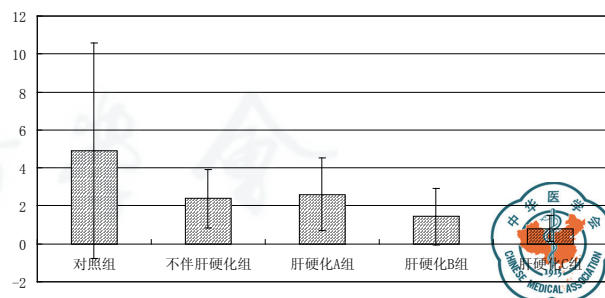


图2 各组患者OPG/RANKL的比较

表1 各组患者跟骨SI值和骨质疏松发生率的检测结果

组别	例数	SI值 ($\bar{x} \pm s$)	骨量减少 [例, (%)]	骨质疏松 [例, (%)]
不伴肝硬化组	95	92.09 ± 13.45^a	15 (15.79)	7 (7.37)
肝硬化A组	69	93.78 ± 12.60^b	15 (21.74)	12 (17.39)
肝硬化B组	62	80.26 ± 11.38^c	34 (54.84)	18 (29.03)
肝硬化C组	74	69.84 ± 10.01^d	28 (37.84)	21 (28.38)
对照组	100	98.73 ± 13.19	10 (10.00)	6 (6.00)

注: 与对照组比较, ^a $q=3.48$, ^a $P=0.005$; ^b $q=2.44$, ^b $P=0.033$; ^c $q=8.85$, ^c $P < 0.001$; ^d $q=15.77$, ^d $P < 0.001$

目前,慢性肝病患者骨质疏松的发生机制尚未明确,研究表明,慢性肝病患者存在骨代谢相关的激素及细胞因子代谢紊乱,如钙和维生素D代谢、胰岛素样生长因子1、瘦素、骨钙素和OPG/RANKL比值等。此外,在肝硬化治疗过程中糖皮质激素等药物的应用、酒精的慢性摄入以及一些不当的日常生活习惯都会参与到肝硬化性骨质疏松症的形成过程中^[3-4]。有关乙型病毒性肝炎所致骨质疏松发病机制以往的研究认为与维生素D和钙代谢紊乱、营养不良和胆汁淤积等有关。肝性骨质疏松的发生机理往往是由综合因素引起的,骨形成减少和骨破坏过多是骨质疏松两种主要因素,骨形成减少的过程中1, 25-(OH)₂D₃起着主要作用,在骨吸收增强的过程中IL-1 α 、IL-6、TNF- β 起着重要的作用^[11]。胰岛素样生长因子1(IGF-1)是骨形成的调节因子,具有促进有丝分裂、促进成骨等作用,Raslan等^[12]研究发现与正常对照组及未合并肝硬化的丙型肝炎患者相比,丙型肝炎肝硬化患者的血清IGF-1水平及BMD显著降低。

成骨细胞和破骨细胞是骨重建过程中维持骨量的两种主要细胞,成骨细胞主要负责骨基质的合成、分泌和矿化,破骨细胞直接参与骨吸收。若此动态平衡发生紊乱,加之慢性肝病导致内分泌异常变化,骨吸收作用超过骨形成作用,则导致骨质疏松。研究表明,成骨细胞调控破骨细胞的分化活动主要是通过RANK、RANKL和OPG基因表达来完成,OPG/RANKL是反映成骨细胞和破骨细胞接到能力的关键,比值越大,成骨介导能力越强。目前,多数学者认为骨质疏松症患者OPG/RANKL的比值远低于正常组织,提示破骨细胞形成远多于正常骨组织,这可能是骨质疏松症的重要病理机制^[12]。

本研究表明,慢性乙型肝炎患者血清OPG/RANKL水平可发生一定的变化,OPG/RANKL水平变化可能调节了慢性肝病患者骨量的丢失^[14]。研究表明,酒精可上调IL-6继而激活RANKL来诱导骨丢失。Monegal等^[15]研究22例肝硬化等待肝移植的患者,同样发现患者血清OPG水平低于对照组,尤其那些低骨量的患者更为明显。慢性肝病患者体内激活的炎性细胞分泌大量的炎性因子如TNF、IL-1、IL-13、IL-6、IL-7、IL-11、IL-15和IL-17,也可通过激活破骨细胞前体或通过诱导成骨细胞产生RANKL而造成骨丢失。

本研究显示,OPG随着肝损害的加重逐渐降低,与Child-Pugh分级具有显著的相关性。RANKL上升的趋势随着肝损害的加重而逐渐升高,与

Child-Pugh分级也有显著的相关性。OPG/RANKL与Child-Pugh分级呈现显著的负相关,随着肝损害的加重OPG/RANKL逐渐变小。本研究表明,OPG、RANKL、OPG/RANKL和RANK系统可能参与了慢性乙型肝炎肝硬化骨质疏松骨代谢的发病过程,慢性肝病肝硬化患者可以引起OPG、RANKL和OPG/RANKL水平变化,从而介导破骨细胞活性增加,骨吸收大于骨形成,进而引起骨质疏松的发生。

总之,随着医疗水平的提高,慢性肝病患者生存期逐渐延长,慢性肝病骨质疏松症的发病率随之逐渐升高,骨质疏松已成为困扰慢性肝病患者生存质量的一大疾病^[16]。如何预防治疗慢性肝病患者骨质疏松已成为广大医疗工作者需要研究的问题。本研究揭示了OPG/RANKL水平的变化是慢性肝病患者致骨质疏松的重要机制之一,或许通过针对此环节的预防和治疗,防止慢性肝病患者骨质疏松的发生,提高患者的生活质量。

参 考 文 献

- 1 Yadav A, Carey EJ. Osteoporosis in chronic liver disease. *Nutr Clin Pract*,2013,28(1):52-64.
- 2 赵昌松,张强,成军,等.慢性肝病骨质疏松流行病学研究. *中华临床医师杂志:电子版*,2013,7(9):81-84.
- 3 Collier J. Bone disorders in chronic liver disease. *Hepatology*,2007,46(4):1271-1278.
- 4 Mansueto P, Carroccio A, Seidita A, et al. Osteodystrophy in chronic liver diseases. *Intern Emerg Med*,2013,8(5):377-388.
- 5 Guanabens N, Pares A. Management of osteoporosis in liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*,2011,35(6-7):438-445.
- 6 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南2010年更新版. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2011,5(1):50-60.
- 7 Ruiz-Gaspà S, Martínez-Ferrer A, Guañabens N, et al. Effects of bilirubin and sera from jaundiced patients on osteoblasts: contribution to the development of osteoporosis in liver diseases. *Hepatology*,2011,54(6):2104-2113.
- 8 Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*,1998,12(9):1260-1268.
- 9 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*,1998,93(2):165-176.
- 10 Moschen AR, Kaser A, Stadlmann S, et al. The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chronic liver disease. *J Hepatol*,2005,43(6):973-983.
- 11 段志军,郑森磊,李钰伶,等.慢性肝病致骨质疏松症的机制及防治. *临床肝胆病杂志*,2012,28(8):633-640.
- 12 Raslan HM, Elhosary Y, Ezzat WM, et al. The potential role of insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3 and bone mineral density in patients with

chronic hepatitis C virus in Cairo, Egypt. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2010, 104(6):429-432.

- 13 高延征, 高坤, 钟楚楠, 等. RANKL OPG在去卵巢大鼠骨组织中蛋白表达动态变化. 医药论坛杂志, 2009, 30(5):4-6.
- 14 Moschen AR, Kaser A, Stadlmann S, et al. The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chronic liver disease. J Hepatol, 2005, 43(6):973-983.
- 15 Monegal A, Navasa M, Peris P, et al. Serum osteoprotegerin and its ligand in cirrhotic patients referred for orthotopic liver

transplantation: relationship with metabolic bone disease. Liver Int, 2007, 27(4):492-497.

- 16 Oliveira PP, Marinheiro LP, Wender MC, et al. Quantitative ultrasound and risk of fractures in elderly women. Rev Assoc Med Bras, 2011, 57(6):651-656.

(收稿日期: 2013-10-08)

(本文编辑: 孙荣华)

张强, 成军, 赵昌松, 等. 慢性乙型肝炎患者血清骨保护素和核因子 κ B受体活化因子配体变化的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(6): 850-854.

