文章编号:1000-5404(2008)03-0251-03

论著

BMP-2 和 bFGF 在强直性脊柱炎活动期骶髂关节滑膜组织中的表达

李建明,初同伟,周 跃 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

摘 要:**目的** 探讨骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis,AS)活动期的病理性表达。**方法** 通过免疫组化技术检测活动期 AS 患者与对照组(骨盆骨折患者)骶髂关节滑膜组织中 BMP-2、bFGF 的表达,用图像分析系统比较二者的表达差异。**结果** 在 AS 活动期患者骶髂关节滑膜组织中 BMP-2 和 bFGF 为阳性表达,而对照组骶髂关节滑膜组织中 BMP-2 和 bFGF 为阴性表达,图像灰度值比较二者差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** BMP-2 和 bFGF 均为 AS 病理性成骨过程中重要的成骨因子,它们与强直性脊柱炎骶髂关节成骨硬化过程有密切关系。

关键词:强直性脊柱炎;骨形态发生蛋白 2;碱性成纤维细胞生长因子
中图法分类号:R322.72;R392.13;R593.230.2 **文献标识码**:A

Expressions of BMP-2 and bFGF in synovial tissues of cacroiliac joint in the patients with active ankylosing spondylitis

LI Jian-ming, CHU Tong-wei, ZHOU Yue (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of BMP-2 and bFGF in ankylosing spondylitis (AS) patients in active stage. Methods Five patients with active AS were admitted from July 2006 to March 2007, including 4 males and 1 female, with average age of 31.4 years. Five patients with pelvic fracture served as control, including 3 males and 2 females, with average age of 34.5 years. Using immunohistochemistry, the expressions of BMP-2 and bFGF were detected in the frozen synovial tissues of cacroiliac joint in active AS patients and in the pelvic fracture patients, and the results were compared by analyzing the gray scale of the pictures. Results The positive expressions of BMP-2 and bFGF in the synovial tissues of cacroiliac joint in the patients with active AS were stronger than those in pelvic fracture patients ($P<0.01$). Conclusion BMP-2 and bFGF are the important factors in the process of pathological bone formation in patients with active AS. They are closely correlated with the process of bone formation in cacroiliac joint in active AS.

Key words: ankylosing spondylitis; bone morphogenetic protein-2; basic fibroblast growth factor

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis,AS)是一种全身性免疫性疾病,其病变的最终结局是脊柱周围韧带和椎间盘骨化,形成"竹节椎",中轴关节出现纤维化及骨性强直,导致关节运动功能丧失[1],可见病理性成骨是 AS 患者致残的主要原因,强直性脊柱炎的治疗最终必须解决正常韧带及滑膜骨化强直问题[2]。本研究以骨盆骨折患者为对照,通过免疫组化技术检测活动期 AS 患者与对照组骶髂关节滑膜组织中骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的表达情况,以探讨 BMP-2、bFGF 在 AS 患者中的表达情况。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取本科从 2006 年 7 月至 2007 年 3 月共收治的 AS 患者 5 例为试验组,男性 4 例,女性 1 例,平均 31.4 岁,均为活动期(有炎性腰背痛,X 骨盆平片提示:骶髂关节有明显骨化线,C-反应蛋白、ESR 水平升高,4 例 HLA-B27 阳性),符合 1984 年修订的纽约标准。选取本科从 2006 年 5 月至 2007 年 3 月收治的 5 例骨盆骨折患者为对照组,男性 3 例,女性 2 例,平均 34.5 岁,其中车祸致骨盆骨折3 例,跌落伤骨盆骨折 2 例。试验组滑膜组织在 CT 引导下活检针穿刺取得,对照组从骨盆骨折切开复位术中取得。对照组的年龄、性别构成比与试验组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

作者简介:李建明,男,重庆市潼南县人,硕士研究生,主治医师,主要从事脊柱外科方面的研究。电话:(023)68755608,E-mail:Ljmshien@163.com
通信作者:初同伟,电话:(023)68774908,E-mail:chtw@sina.com
收稿日期:2007-04-30;修回日期:2007-07-11

1.2 实验方法

标本冰冻切片，以兔抗人 BMP-2 和 bFGF 抗体检测各标本滑膜组织中 BMP-2 和 bFGF 的表达情况，Leica Qwin 高清晰图像分析系统检测灰度值，进行半定量评价。

1.2.1 所需器械及试剂 活检针（济南世康达）、MICROM 冰冻切片机（德国）、Leica Qwin 高清晰图像分析系统（Leica 德国）、BMP-2 和 bFGF 免疫组化试剂盒（武汉博士德）、DAB 染色试剂盒（AR1022）。

1.2.2 标本收集与处理 试验组滑膜组织均在 CT 引导下活检针穿刺取得，对照组滑膜组织在骨盆切开复位内固定术中获得。标本离体后切成 1.5 cm×1.2 cm×0.2 cm 小块，立即投入 4% 多聚甲醛固定，置于 4 ℃ 冰箱 2～4 h。再将组织移入 30% 蔗糖 PBS 溶液内，4 ℃ 冰箱过夜。冰冻切片时将组织块置于 -20 ℃ 恒冷切片机内切成 10 μm 薄片，黏附于涂有黏片剂的载玻片上，将切片放入切片盒，-80 ℃ 超低温冰箱保存备用。

1.2.3 免疫组化检测 30% 双氧水 1 ml + 纯甲醇 50 ml 混合，室温处理 30 min，以灭活内源性过氧化物酶，蒸馏水洗涤 3 次。滴加 5% BSA 封闭液，室温 20 min，甩去多余液体。滴加兔抗人 BMP-2 和 bFGF 抗体，37 ℃ 1 h 左右，PBS（pH 7.2～7.6）洗 2 min×3 次。滴加生物素化山羊抗兔 IgG，37 ℃ 20 min，PBS 洗 2 min×3 次。滴加试剂 SABC，37 ℃ 20 min，PBS 洗 5 min×4 次。DAB 显色：使用 DAB 显色试剂盒，取 1 ml 蒸馏水，加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴，混匀后加至切片，室温显色，镜下控制反应时间，约 10 min，蒸馏水洗涤。苏木精轻度复染约 30 s，充分洗涤。酒精梯度脱水，二甲苯透明，中性树脂封片。显微镜下观察结果。

1.2.4 图像处理 切片于 ×400 倍视野留影备份，Leica Qwin 高清晰图文分析仪进行灰度值检测。

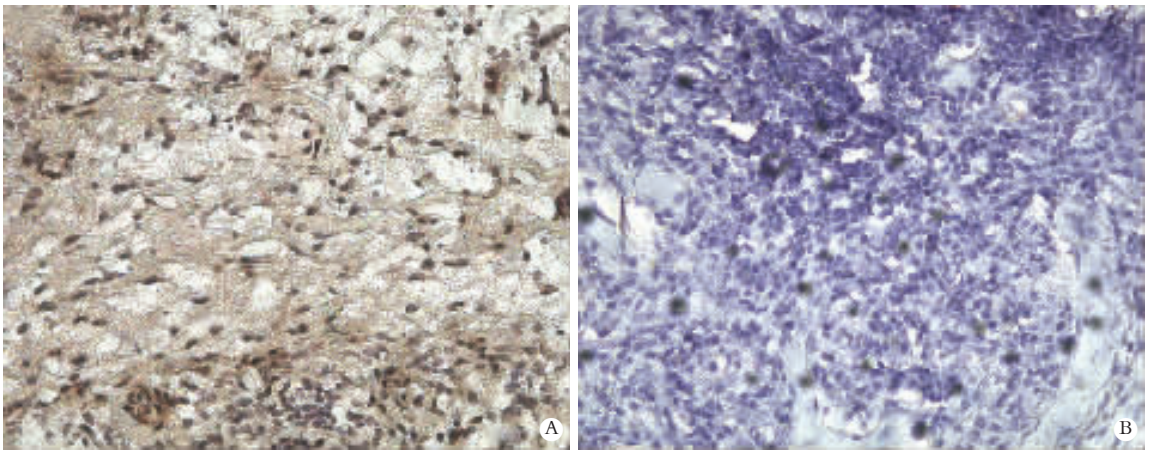
1.3 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件对 BMP-2 及 bFGF 在两组标本中的灰度值进行 t 检验。

2 结果

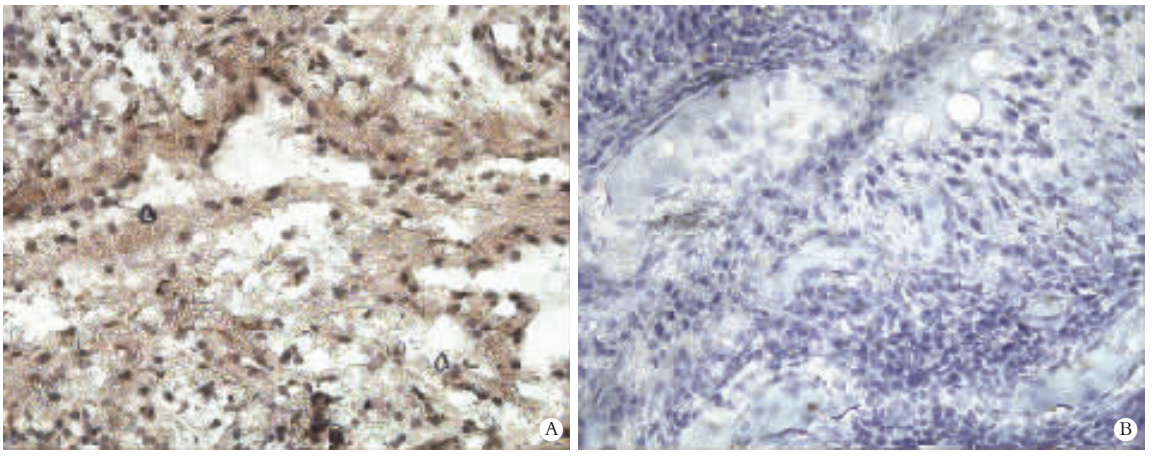
2.1 免疫组化技术检测各标本中 BMP-2 和 bFGF 表达情况

结果显示 5 例 AS 活动期患者（试验组）滑膜组织标本明显见到细胞质和细胞外基质棕黄色颗粒，呈阳性染色；而 5 例对照组滑膜组织标本无明显黄色颗粒着色，仅苏木精背景染色（图 1、2）。



A：试验组；B：对照组

图 1 BMP-2 免疫组化染色结果（SABC×400）



A：试验组；B：对照组

图 2 bFGF 免疫组化染色结果（SABC×400）

2.2　图像分析结果

图像均由 Leika Qwin 高清晰图像分析系统通过检测灰度值进行半定量评价,试验组 BMP-2、bFGF 与对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.01$,表 1)。

表 1　BMP-2 及 bFGF 在两组标本中的灰度值比较($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	BMP-2	bFGF
试验组	180.56 ± 31.08[a]	169.41 ± 27.49[a]
对照组	235.81 ± 16.34	224.61 ± 23.54

a:$P<0.01$,与对照组比较

3　讨论

BMP 主要位于骨髓基质细胞、骨膜细胞和骨细胞内[3]。它具有诱导成骨与促进成骨细胞分化的能力[4],能够诱导血管、肌肉和筋膜周围游离的和未分化的间充质细胞以及纤维细胞,转化为不可逆的骨系细胞,从而促进骨折愈合,也可在骨骼以外产生软骨和骨组织。其中 BMP-2 成骨作用最强,也是唯一能单独诱导成骨的因子,在骨组织修复中最常用到[5]。bFGF 是一种能广泛促进来源于中胚层及神经外胚层细胞增殖的生物活性蛋白[6],主要由成骨细胞合成,储存于骨细胞外基质中,通过自分泌和旁分泌发挥作用[7]。bFGF 可以促进成骨细胞增殖,它与生物材料联合植入动物模型体内能明显促进骨形成,在骨组织工程中被广泛应用[8]。同时它还是一种强大的毛细血管增殖刺激剂,能为骨痂生长提供充足的血供和营养[9]。本实验表明,在活动期 AS 患者骶髂关节滑膜组织中 BMP-2、bFGF 表达明显,免疫组化染色呈阳性反应,而在正常的骶髂关节滑膜组织中 BMP-2 和 bFGF 不表达,证明 BMP-2 和 bFGF 是 AS 患者局部病理性成骨过程中的关键成骨因子,在整个病理性成骨过程中发挥着重要作用。

强直性脊柱炎患者均存在骶髂关节炎,且骶髂关节为本病最早受累部位,最终均出现骶髂关节硬化[10,11]。因此本实验选择研究 AS 患者骶髂关节滑膜组织 BMP-2 和 bFGF 的表达情况,有助于阐明强直性脊柱炎的病理成骨机制。有研究者体外培养 AS 患者棘上韧带成纤维细胞,发现其有明显的成骨细胞特征,能够向成骨细胞转化,证实了 AS 患者骨关节周围韧带、滑膜组织向骨组织转化是其病理性成骨的基本病理过程[12]。本实验结果显示,活动期 AS 患者骶髂关节滑膜组织中 BMP-2 和 bFGF 表达明显,说明 BMP-2 和 bFGF 在 AS 患者骶髂关节硬化过程中起着重要作用。其机制可能为:AS 活动期患者某些因子刺激邻近的骨细胞、骨膜细胞等分泌 BMP-2、bFGF,而成纤维细胞是高级的成骨细胞[13],局部高浓度 BMP-2、bFGF 促进成纤维细胞向成骨细胞转化,生成病理性骨组织,导致关节骨性强直。然而,何种因素促进了 BMP-2、bFGF 的局部分泌?其他成骨因子在 AS 病理性成骨过程中的作用如何?这些问题都有待于进一步研究。

总之,本研究表明:BMP-2、bFGF 在 AS 患者病理性成骨过程中扮演重要角色,抑制局部 BMP-2、bFGF 的表达可能会缓解 AS 患者病理成骨过程,降低患者致残率,为治疗 AS 提供一条新的途径。

参考文献:

[1] Van-der-linden S J, van-der-Heijde D. Spondylarthopathies: ankylosing spondylitis[M]// Ruddy S, Harris J R, Sledge C B. Kelley 's textbook of rheumatology. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000: 1039 – 1053.

[2] 黄　蜂. 应重视强直性脊柱炎患者强直性病变的研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2001, 5(4): 211 – 212.

[3] Wozney J M. The bone morphogenetic protein family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and adult[J]. Eur J Oral Sci, 1998, 106(Suppl 1): 160 – 166.

[4] 郭书权,许建中. BMP-2 诱导成骨及传送的研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(16): 1707 – 1710.

[5] Saito Y, Yoshizawa T, Takizawa F, *et al*. A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2[J]. J Cell Sci, 2002, 115 (Pt 21): 4191 – 4200.

[6] 丁焕文,何锡煌. 碱性成纤维细胞生长因子的生物学功能[J]. 中华创伤杂志, 1995, 11(3): 189 – 191.

[7] Spector J A, Greenwald J A, Warren S M, *et al*. Dura mater biology: autocrine and paracrine effects of fibroblast growth factor 2[J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 109(2): 645 – 654.

[8] 陈　庆,顾洁夫,蔡　林. 重组复合异体冻干骨修复节段性骨缺损的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17(1): 5 – 8.

[9] Yeung H Y, Lee S K, Fung K P, *et al*. Expression of basic fibroblast growth factor during distraction osteogenesis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2001, (385): 219 – 229.

[10] 候树勋. 脊柱外科学[M]. 北京:人民军医出版社, 2005: 1036 – 1037.

[11] 蒋百川,王静成,王晓铃,等. 应用流式芯片技术检测强直性脊柱炎患者 HLA-B27 亚型[J]. 郑州大学学报·医学版, 2006, 10(6): 62 – 63.

[12] 高根德,刘耀升. 强直性脊柱炎棘上棘间韧带成纤维细胞在体外培养中的成骨作用[J]. 中华风湿病学杂志, 1998, 2(4): 196 – 199.

[13] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance[J]. Science, 2000, 289(5484): 1501 – 1504.

（编辑　王小寒）