文章编号:1000-5404(2008)15-1459-03

论著

强直性脊柱炎活动期 VEGF 和 TNF-α 在棘间韧带组织中 mRNA 表达水平的检测

钱奕铭,初同伟,李建明,刘玉刚 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和肿瘤坏死因子(tumor nerosis factor, TNF-α)在强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)活动期患者棘间韧带的病理性表达水平。**方法** 通过原位杂交技术检测活动期 AS 患者与对照组棘间韧带组织中 TNF-α mRNA、VEGF mRNA的表达,用图像分析系统比较它们的表达差异,并与疾病的活动指数、CRP 进行相关性分析。**结果** 在活动期 AS 患者棘间韧带组织中 TNF-α mRNA、VEGF mRNA 呈阳性表达,而对照组棘间韧带组织中 TNF-α mRNA、VEGF mRNA 呈阴性表达,阳性细胞计数和图像灰度值比较有统计学差异($P<0.01$)。VEGF mRNA、TNF-α mRNA 的表达与 AS 疾病活动指数(BASDAI)和 CRP 显著相关($r=0.53$, $r=0.42$, $P<0.05$)。**结论** VEGF 可能是强直性脊柱炎发病过程中的重要因子之一,TNF-α 作为 1 个核心的调控因子,在强直性脊柱炎发病机制中也起着重要作用。

关键词:强直性脊柱炎;TNF-α;VEGF;原位杂交技术
中图法分类号:R392.11;R446;R593.23 **文献标识码:**A

Expressions of VEGF and TNF-α in interspinous ligament of patients with ankylosing spondylitis in active stage

QIAN Yi-ming, CHU Tong-wei, LI Jian-ming, LIU Yu-gang (Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To detect the pathological expressions of TNF-α and VEGF in interspinous ligament of patients with ankylosing spondylitis (AS) in active stage. Methods The expressions of TNF-α mRNA and VEGF mRNA in the interspinous ligament of patient with AS group and control group were detected by hybridization *in situ*. Their different results were compared by image analysis system and the correlation between TNF-α mRNA, VEGF mRNA and both AS disease active index (DAI) and C reactive protein (CRP) was analysed respectively. Results The expressions of TNF-α mRNA and VEGF mRNA in the interspinous ligament of patients with active AS were positive, but those of the control group were negtive. Statistical differences existed in the positive cell numbers and in image gray scale value of AS group ($P<0.01$). Significant correlation was observed between the expression of VEGF, TNF-α and CRP, BASDAI ($P<0.05$). Conclusion VEGF are the important factors in the pathological process in patients with active AS. TNF-α, a core regualting factor, also plays an significant role in the pathogenesis of AS.

Key words: ankylosing spondylitis; TNF-α; VEGF; hybridization *in situ*

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)主要侵犯骶髂关节和中轴骨骼,炎症主要累及滑膜、韧带和肌腱附着点部位,致使脊柱周围韧带和椎间盘骨化、病理性新骨形成、全脊柱融合是 AS 患者致残的重要原因,其治疗最终必须解决正常韧带及滑膜骨化强直问题。有研究报道,脊柱关节炎病血清中 VEGF 水平比正常组高[1],本实验以外伤引起的腰椎骨折患者为对照,通过原位杂交技术检测活动期 AS 患者与对照组棘间韧带组织中 TNF-α mRNA 和 VEGF mRNA 的表达水平,探讨 TNF-α 和 VEGF 与 AS 临床指标之间的关系及在 AS 病理性成骨中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

实验组共 21 例,男性 16 例,女性 5 例。研究标本均由本院骨科提供,所有病例符合 1984 年美国风湿病协会修订的纽

作者简介:钱奕铭,男,内蒙古自治区赤峰市人,硕士研究生,主治医师,主要从事强直性脊柱炎发病机制方面的研究。电话:13635480052
通信作者:初同伟,电话:(023)68774050
收稿日期:2007-09-22 修回日期:2007-11-15

约标准,活动期标准根据 Bath 强直性脊柱炎活动指数(BASDAI)≥4,均有持续性腰背痛、夜间痛,晨起后腰背部僵痛>30 min,疲乏,医师检查至少有 1 个关节肿胀、局部触痛,C-反应蛋白 > 20 mg/L,ESR > 30 mm/h。棘间韧带组织自 L_5/S_1 通过活检针穿刺获取。对照组共 18 例,男性 10 例,女性 8 例,标本由脊柱外伤致腰椎骨折切开复位内固定术中取得。对照组的年龄、性别构成比与实验组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患者入选后进行详细的病情评估,记录 BASDAI,并进行 C-反应蛋白(CRP)、血沉(ESR)、血常规、尿常规以及肝肾功能等检查。本实验采用程序严格遵循本院人体试验委员会制定的伦理学标准,同时得到该委员会批准,并征得全部患者的知情同意。

1.2 实验方法

标本冰冻切片,以 VEGF、TNF-α 杂交试剂盒检测各标本棘间韧带组织中 mRNA 的表达情况,用 Leika Qwin 高清晰图像分析阳性细胞数和平均灰度值。

1.2.1 实验器械及试剂 活检针(济南世康达)、MICROM 冰冻切片机(德国)、Leika Qwin 高清晰图像分析系统(Leika 德国)、原位杂交试剂盒(武汉博士德)、DAB 染色试剂盒(AR1022)。

1.2.2 标本收集与处理 实验组棘间韧带组织均通过活检针穿刺取得,对照组棘间韧带组织在脊柱骨折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% 蔗糖的 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,黏附于涂有粘片剂的载玻片上,放入切片盒,-80 ℃超低温冰箱保存备用。

1.2.3 原位杂交检测 按 VEGF 原位杂交试剂盒说明书操作。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 3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶室温消化 1 min,暴露 mRNA 核酸片段;1% 多聚甲醛再固定 10 min,蒸馏水洗涤 3 次 每张切片滴加 20 μl 预杂交液,40 ℃恒温箱内孵育 3 h,吸去多余液体 每张切片滴加 20 μl 杂交液,盖上原位杂交专用盖玻片,40 ℃杂交过夜,进行杂交后洗涤 滴加封闭液,37 ℃ 30 min 滴加生物素化鼠化地高辛,37 ℃ 60 min,原位杂交用 PBS 洗 5 min,共 3 次;滴加 SABC 37 ℃ 20 min,原位杂交用 PBS 洗 5 min,共 4 次;DAB 显色,镜下控制反应时间,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,于 10×40 倍视野留影照相。

1.2.4 结果判断 原位杂交以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞反应,阴性对照组除细胞核染成蓝色外,无棕黄色反应物。采用 Leika Qwin 高清图像分析系统对 mRNA 表达进行半定量分析,每张切片随机选取 2 个高倍镜视野(×400),测定每个视野下阳性反应的平均灰度值和阳性细胞数,以每例 5 个视野的平均灰度值、阳性细胞数平均值作为该例的测量值。

1.3 统计学分析

所有数据资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行均数间比较的 t 检验,检测指标与其他指标相关性用相关分析。

2 结果

2.1 原位杂交技术检测 VEGF mRNA、TNF-α mRNA 表达情况

对 21 例 AS 活动期患者和 18 例对照组棘间韧带组织分别通过原位杂交试剂盒检测,DAB 显色,结果显示 VEGF mRNA、TNF-α mRNA 全部呈阳性表达,在细胞质内有棕黄色颗粒沉着,而对照组呈阴性表达,无棕黄色颗粒沉着(图 1~4)。

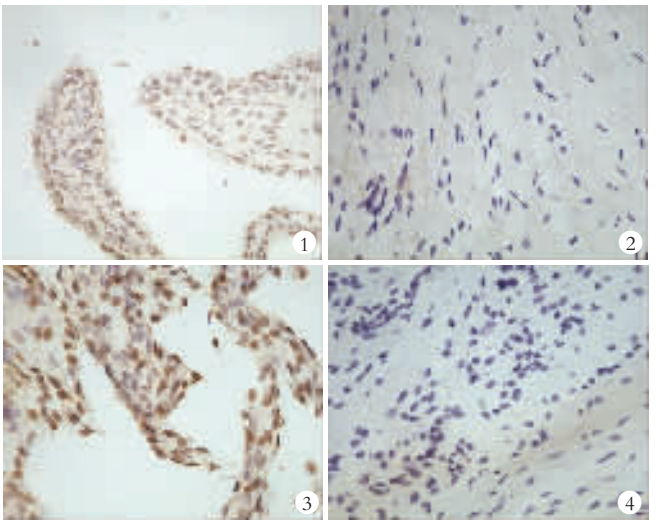


图 1 AS 组 VEGF mRNA 呈阳性表达 (SABC×400)
图 2 对照组 VEGF mRNA 呈阴性表达 (SABC×400)
图 3 AS 组 TNF-α mRNA 呈阳性表达 (SABC×400)
图 4 对照组 TNF-α mRNA 呈阴性表达 (SABC×400)

2.2 图像结果分析

两组图像均由 Leika Qwin 高清晰图像分析系统测定阳性细胞数和平均灰度值,对照组和 AS 组 VEGF mRNA 的阳性细胞数为(7.5±2.4)、(51.7±7.4),灰度值分别为(181.6±7.3)、(140.6±9.8),TNF-α mRNA 的阳性细胞数分别为(6.9±3.2)、(72.8±6.4),灰度值分别为(186.3±6.3)、(149.6±7.5),与对照组比较,阳性细胞数和灰度值差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 VEGF mRNA、TNF-α mRNA 的表达与临床指标的相关性

VEGF mRNA 与 CRP、BASDAI 具有相关性($r=0.53$,$P=0.021$),TNF-α mRNA 的表达与 CRP 和 BASDAI 具有相关性($r=0.42$,$P=0.04$),VEGF mRNA 的表达与 TNF-α mRNA 的表达具有相关性($r=0.68$,$P=0.017$)。

3 讨论

VEGF 是功能最强大的血管生成调节因子,通过与血管内皮细胞膜上的受体结合,特异性地促血管内皮细胞增生和血管生成,并已有研究证明 VEGF 具有明显的成骨作用,可以加速骨折的愈合[2]。骨化必伴

血管生成，骨化初期的血管增生标志着骨化的开始，此过程有 VEGF 的参与[3]。AS 是一种自身免疫性疾病，滑膜翳的形成、血管通透性增高和滑膜细胞增生等病理特点都与病理性的血管过度发生有关。有研究表明，AS 外周血中 VEGF 水平与对照组有显著性差异，并与疾病的活动性相关[3]，而 VEGF 基因的多态性可能与疾病的严重程度相关[4]。

本实验在 AS 患者棘间韧带巨噬细胞内 VEGF mRNA 呈阳性表达并与对照组有统计学意义，而 AS 患者棘间韧带成纤维细胞培养具有明显的成骨作用[3]，推测 VEGF 在 AS 的成骨过程中发生重要的作用，但具体作用机制仍不清楚，可能与下列机制有关：促血管内皮细胞增生和血管生成；诱导成纤维细胞向成骨细胞的分化；VEGF 高表达可能促进局部内皮细胞分泌骨形态发生蛋白（BMP），通过 BMP 介导成骨作用[5]；作用于单核细胞使其向成骨细胞迁移，进而发挥病理性成骨作用[6]。在与疾病的活动性指标相关性研究中，VEGF mRNA 的表达与 CRP 和 BASDAI 显著相关（$r = 0.53$，$P < 0.05$），可以推测在体内炎症作用下多种因子的调节状态。局部穿刺活检检测 VEGF 可以作为 AS 活动性的标志物之一。

TNF-α 是炎症过程中最早产生的细胞因子之一，是激活细胞因子网络的启动因子，具有多种炎性和免疫反应活性[7]，另外抗肿瘤坏死因子药物在 AS 治疗中的应用，使其在 AS 炎症过程中的重要作用已逐渐得到认识。Maksymowych 等[8,9] 分别用抗肿瘤坏死因子拮抗剂治疗 AS 患者，临床症状和骶髂关节 X 线表现都得到明显改善，外周血中 CRP、MMP-3、VEGF 等可作为疾病活动性标志的因子水平都有所恢复，认为 TNF-α 可能作用于 2 种因子的上游而发挥作用。

本实验在 AS 活动期患者棘间韧带检测到 TNF-α mRNA 有阳性表达，与对照组比较有统计学意义（$P < 0.01$），与临床常用的反映疾病活动性指标及 BASDAI 有显著相关性（$r = 0.42$，$P < 0.05$），提示 TNF-α 作为炎症过程中启动因子，可能也在强直性脊柱炎的发病过程中起着重要作用。TNF-α mRNA 的表达与 VEGF mRNA 的表达具有显著相关性（$r = 0.68$，$P < 0.05$），并有研究表明在 RA 中 TNF-α 可以诱导 VEGF 的表达[10]，推测在 AS 中，TNF-α 也可以诱导 VEGF 的表达，但有待进一步研究。对于 TNF-α 的具体作用机制仍不清楚，可能与下列因素有关：诱导 VEGF 产生，发挥 VEGF 的成骨作用[10]；诱导成纤维细胞增殖，与 BMP-2 共同使成纤维细胞分化为成骨细胞[11]，进而发生成骨作用；TNF-α 能够直接诱导外周血单核细胞分化为具有骨吸收功能的破骨细胞[12,13]；诱导炎性介质、趋化因子及 MMP 的合成，引起骨和软骨的破坏等。总之，AS 是一种病因复杂，机制不清，诸多因子共同参与调控的一种慢性炎性疾病，TNF-α 可能处于重要的调控位置，才使得其单克隆抗体能够发挥有效的治疗作用。

本研究结果提示了 AS 患者棘间韧带 VEGF mRNA及 TNF-α mRNA 的表达情况，与正常对照组相比表达增强，提示其在 AS 的发病机制中起着十分重要的作用，为阐明 AS 的发病机制提供了部分实验室依据。

参考文献：

[1] Drouart M, Saas P, Billot M, *et al*. High serum vascular endothelial growth factor correlates with disease activity of spondylarthropathies [J]. Clin Exp Immunol, 2003, 132(1): 158 – 162.

[2] 初同伟，王正国，朱佩芳，等. 血管内皮生长因子在骨折愈合中的作用[J]. 中国修复重建外科杂志，2002，16(2)：75 – 78.

[3] 王　哲，王全平，张俊华，等. 骨形成蛋白在黄韧带骨化中的表达定位[J]. 第四军医大学学报，2002，23(4)：341 – 343.

[4] Seo J S, Lee S S, Kim S I, *et al*. Influence of VEGF gene polymorphisms on the severity of ankylosing spondylitis [J]. Rheumatology (Oxford), 2005, 44(10): 1299 – 1302.

[5] Bouletreau P J, Warren S M, Spector J A, *et al*. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing [J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 109(7): 2384 – 2397.

[6] Duyndam M C, Hilhorst M C, Schluper H M, *et al*. Vascular endothelial growth factor-165 overexpression stimulates angiogenesis and induces cyst formation and macrophage infiltration in human ovarian cancer xenografts[J]. Am J Pathol, 2002, 160(2): 537 – 548.

[7] 张海俊，张思争，林　星，等. 类风湿关节炎的治疗[M]//蒋明，DAVID YU，林孝义，等. 中华风湿病学. 北京：华夏出版社，2004：771 – 824.

[8] Maksymowych W P, Jhangri G S, Lambert R G, *et al*. Infliximab in ankylosing spondylitis: a prospective observational inception cohort analysis of efficacy and safety[J]. J Rheumatol, 2002, 29(5): 959 – 965.

[9] Yang C, Gu J, Rihl M, *et al*. Serum levels of matrix metalloproteinase 3 and macrophage colony-stimulating factor 1 correlate with disease activity in ankylosing spondylitis [J]. Arthritis Rheum, 2004, 51(5): 691 – 699.

[10] Cha H S, Bae E K, Koh J H, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha induces vascular endothelial growth factor-C expression in rheumatoid synoviocytes[J]. J Rheumatol, 2007, 34(1): 16 – 19.

[11] 邓廉夫，汤雪明，柴本甫，等. 肿瘤坏死因子-α 和骨形成发生蛋白 2 诱导成纤维细胞成骨表型表达的体外研究[J]. 中国修复重建外科杂志，1998，12(4)：236 – 240.

[12] 孙嗣国，马保安，周　勇，等，肿瘤坏死因子-α 诱导外周血单核细胞分化为破骨细胞[J]. 第四军医大学学报，2005，26(5)：1988 – 1991.

[13] 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]. 实用临床医药杂志，2006，10(6)：62 – 63.

（编辑　薛国文）