文章编号:1000-5404(2008)23-2207-04

论著

强直性脊柱炎滑膜细胞破骨表型及分化因素的研究

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

摘 要:目的 通过检测破骨细胞(osteoclast,OC)在强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)骶髂关节及髋关节滑膜组织中的表达及分化因素的研究,探讨AS骨与软骨破坏机制。**方法** 酶组织化学染色技术(TRAP染色)检测滑膜细胞破骨表型,原位杂交技术检测滑膜组织中TNF-α mRNA、VEGF mRNA、MMP-3 mRNA的表达;培养正常滑膜成纤维细胞,加入TNF-α、VEGF,培养AS滑膜成纤维细胞,加入抗TNF-α、抗VEGF,钙钴法检测碱性磷酸酶(ALP)表达,放射免疫法检测骨钙素(bone gla protein,BGP)含量,分析其在AS滑膜成纤维细胞成骨中的作用。**结果** 经TRAP染色,TNF-α mRNA、VEGF mRNA和MMP-3 mRNA在AS滑膜组织中阳性表达,而对照组阴性表达,两组比较有统计学差异($P<0.01$);AS组滑膜TRAP染色阳性细胞同时表达MMP-3;AS组滑膜成纤维细胞培养ALP染色阳性数、BGP分泌增加值与正常对照组比较有统计学差异($P<0.01$);TNF-α、VEGF单克隆抗体可以抑制滑膜成纤维细胞骨钙素的分泌。**结论** AS滑膜组织中表达TNF-α、VEGF,两种因子可以诱导滑膜成纤维细胞分化为成骨细胞(osteoblast,OB),在这种OB存在的条件下,滑膜组织内破骨细胞前体可以分化为成熟的OC并表达MMP-3。

关键词:强直性脊柱炎;滑膜细胞;破骨细胞;原位杂交技术;细胞因子;TRAP染色
中图法分类号:R329.28;R392.13;R593.23 **文献标识码**:A

Osteoclast phenotypes and differentiation factors of synoviocyte in ankylosing spondylitis

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

Abstract: Objective To investigate whether there exists osteoclasts and differentiation factors in the synovial tissue of patients with ankylosing spondylitis (AS) for the mechanism of destruction of bone and cartilage in AS. Methods Enzymohistochemical staining (TRAP staining) was used to detect the expression of osteoclast phenotype, and hybridization *in situ* to detect the mRNA expressions of TNF-α, VEGF and MMP-3 in synovial membrane samples of 21 AS patients and 21 fracture subjects. Synovial cells isolated from normal group were cultured in presence of TNF-α and VEGF, while those from AS group were cultivated with anti-TNF-α and anti-VEGF antibodies. Gomori method was used to detect alkaline phosphatase (ALP) and radioimmunoassay to detect bone gla protein (BGP) in these cultured cells for the role of differential factors in osteoblast phenotype expression. Results The synovial membrane in AS were positive to mRNA expressions of TNF-α, VEGF, and MMP-3, and to TRAP staining, but that of control group were negative. Significant difference was seen in the positive cell numbers between these 2 groups ($P<0.01$). In cultivated synovioblast from AS group, ALP staining was positive, and BGP content was elevated compared with control group. Anti-VEGF and anti-TNF-α inhibited synovioblast to secrete BGP. Conclusion An obvious increase of TRAP positive cells in synovium may provide a main source of osteoclastogenesis in AS patients. With induction of TNF-α and VEGF, synovioblast may differentiate into osteoblasts, and express ALP and BGP. In this condition, synovial mononuclear macrophage may differentiate into osteoclasts and express MMP-3, which play important role in bone resorption.

Key words: ankylosing spondylitis; osteoclast; cytokine; hybridization *in situ*; TRAP staining

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis,AS)是一种病因复杂、发病隐匿的血清阴性脊柱关节病,好发于青壮年,高峰年龄20~30岁。破骨细胞(osteoclast,OC)是专职性骨吸收细胞,其来源于骨髓造血组织中的单核巨噬细胞系统,是骨质破坏的重要因素,成骨/基质

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,主要从事脊柱外科的临床与基础方面的研究。E-mail:qym2006119@hotmail.com
通信作者:初同伟,电话:(023)68774050
收稿日期:2008-01-18;修回日期:2008-05-12

细胞是OC分化成熟直接且必须的条件[1]。但AS滑膜组织中聚集的大量的单、多核细胞是否是破骨前体细胞,AS滑膜组织中是否存在破骨前体细胞分化的条件,目前仍不清楚。本研究旨在了解在AS滑膜组织中OC前体分化的因素,探讨AS骨与软骨破坏机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

AS组共21例,其中男性16例,女性5例,研究标本均由本科提供,所有病例符合1984年美国风湿病协会修订的纽约标准。标本通过CT引导下骶髂关节(15例)穿刺及股骨头置换术(6例)获取。对照组共18例,其中男性10例,女性8例,标本于外伤致股骨头骨折和骨盆骨折切开复位内固定术中取得。标本离体后,PBS冲洗后液氮中保存备用。细胞培养所用标本取自2例AS股骨头置换术中滑膜组织。对照组的年龄、性别构成比与AS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Bath AS活动指数(BASDAI),并进行实验室检查,如CRP、ESR、血常规等。本实验采用程序严格遵循我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

1.2.1 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(Leika德国),原位杂交试剂盒、ALP组化试剂盒、DAB染色试剂盒(武汉博士德),骨钙素试剂盒(中国原子能科研所),VEGF、TNF-α(晶美生物科技有限公司),抗VEGF、抗TNF-α(上海麦莎生物科技有限公司)。

1.2.2 滑膜组织病理学检测 标本10 μm冰冻切片,4%多聚甲醛固定,PBS缓冲液冲洗行酶组织化学染色及原位杂交技术检测,显微镜下观察结果,于10×40倍视野留影照相,采用Leica Qwin高清图像分析系统进行分析,每张切片随机选取5个视野,测定每个视野下阳性细胞数,以每例5个视野阳性细胞数平均值作为该例的测量值。

1.2.3 酶组织化学染色(TRAP染色) 在切片上滴加自配TRAP孵育液(0.2 mol/L醋酸缓冲液8 ml;六偶氮副品红1 ml;萘酚AS-BI磷酸钠20 mg,溶于1 ml N,N-二甲基甲酰胺中;酒石酸钾钠50 mmol/L溶解过滤后使用),37 ℃ 50 min,PBS缓冲液冲洗3次,苏木精轻度复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察结果,以细胞质内出现酒红色颗粒为阳性细胞反应。

1.2.4 滑膜组织原位杂交检测 取出切片,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经地高辛标记的寡核酸探针杂交液,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 3次;滴加SABC 37 ℃ 20 min,原位杂交用PBS洗5 min 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。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。显微镜下观察结果,以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞反应。

1.2.5 滑膜组织原位杂交联合酶组织化学染色 原位杂交技术DAB显色后,滴加TRAP染色液,37 ℃ 50 min,PBS缓冲液冲洗3次,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察结果,以细胞质内出现棕红色颗粒为阳性细胞反应。

1.2.6 AS滑膜成纤维细胞培养及其成骨表型检测 标本取回后采用消化培养法培养,培养基用含20 %胎牛血清的DMEM培养液,置于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中静置培养,收集第3代细胞,用相差显微镜观察细胞形态和细胞质内外分泌的颗粒情况,钙钴法碱性磷酸酶(ALP)染色检测细胞质及培养液中是否有黑色阳性颗粒出现,取第3代成纤维细胞计数后,以1×10^5/ml接种至96孔板,每组6个复孔,正常成纤维细胞组分别加入不同浓度VEGF、TNF-α和联合加入两种因子,AS成纤维细胞组分别加入不同浓度VEGF抗体、TNF-α抗体和联合加入,5 d时每孔收集100 μl上清液,采用BGP放免试剂盒检测(按说明书操作),得出各组骨钙素含量。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 10.0统计软件,一般资料用描述性统计分析,mRNA及TRAP表达2组比较用t检验,mRNA及TRAP间的相关性用pearson相关性分析,BGP检测结果比较采用析因设计方差分析。

2 结果

2.1 滑膜组织TRAP染色结果

AS组滑膜组织内有大量的炎性细胞浸润,部份滑膜细胞细胞质内TRAP染色呈酒红色颗粒,以滑膜衬里层及滑膜软骨交界部明显(图1)。

2.2 滑膜组织原位杂交检测结果

AS组滑膜组织TNF-α mRNA、VEGF mRNA、MMP-3 mRNA全部阳性表达,滑膜细胞细胞质有棕黄色颗粒沉着,呈阳性染色反应,而对照组标本呈阴性染色反应(图2~4)。

2.3 滑膜组织原位杂交联合酶组织化学染色结果

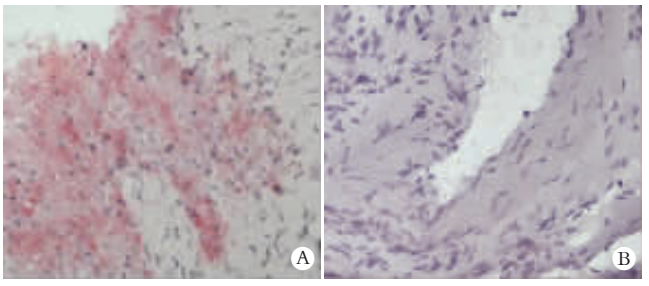
原位杂交检测滑膜组织内MMP-3 mRNA,可见细胞质被染成棕黄色,再经TRAP孵育液染色后,可见棕黄色细胞被染成棕红色(图5)。

2.4 图像分析系统检测阳性细胞计数结果

2组图像均由Leica Qwin高清晰图像分析系统测定阳性细胞数,差异具有统计学意义($P<0.01$,表1)。TRAP与TNF-α mRNA阳性细胞计数具有显著相关性($r=0.546$,$P=0.031$);TRAP与VEGF mRNA阳性细胞计数具有显著相关性($r=0.473$,$P=0.034$);TRAP与MMP-3 mRNA阳性细胞计数具有显著相关性($r=0.679$,$P=0.001$)。

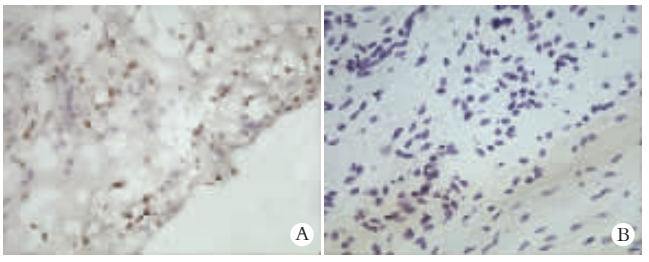
2.5 AS滑膜成纤维细胞成骨表型检测结果

AS组传代培养第5天,相差显微镜细胞内可观察到黑色颗粒和透亮小泡,对照组成纤维细胞的形态、大小及生长状况与AS组相似,只有少量黑色颗粒;钙钴法ALP染色可见细胞质有黑色颗粒,而对照组细胞内无黑色颗粒(图6)。



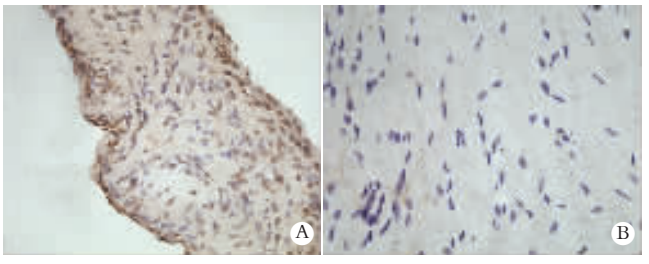
A：AS 组；B：对照组

图 1　滑膜组织酶组织化学染色结果　（TRAP 染色 ×400）



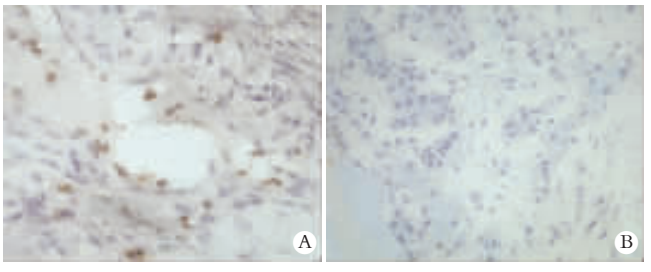
A：AS 组；B：对照组

图 2　原位杂交检测滑膜组织 TNF-α mRNA 表达　（SABC ×400）



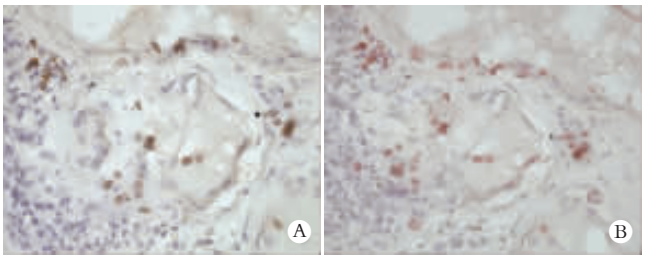
A：AS 组；B：对照组

图 3　原位杂交检测滑膜组织 VEGF mRNA 表达　（SABC ×400）



A：AS 组；B：对照组

图 4　原位杂交检测滑膜组织 MMP-3 mRNA 表达　（SABC ×400）



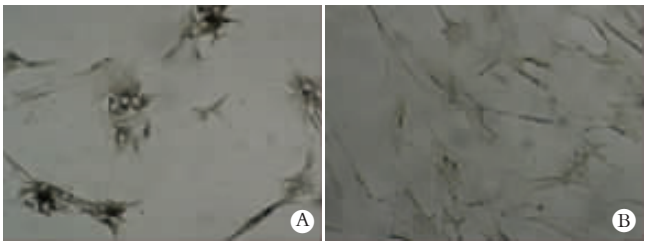
A：原位杂交（SABC）；B：原位杂交加 TRAP 染色

图 5　酶组织化学联合原位杂交检测滑膜组织 MMP-3 mRNA 表达　（×400）

表 1　两组细胞因子 mRNA 表达及 TRAP 染色阳性细胞计数结果（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	VEGF mRNA	TNF-α mRNA	MMP-3 mRNA	TRAP$^+$
对照组	18	7.5 ± 2.4	6.9 ± 3.2	3.4 ± 1.4	4.7 ± 1.8
AS 组	21	51.7 ± 7.4[a]	72.8 ± 6.4[a]	88.5 ± 7.9[a]	90.8 ± 4.7[a]

a：$P < 0.01$，与对照组比较



A：AS 组；B：对照组

图 6　滑膜成纤维细胞培养结果　（钙钴法 ALP 染色 ×400）

2.6　TNF-α 和 VEGF 对滑膜成纤维细胞分泌骨钙素影响

在正常滑膜成纤维细胞组随着 VEGF 及 TNF-α 的增加，BGP 的分泌量逐渐增加，与加入前相比具有统计学差异（$P < 0.01$）。两者共同加入后，BGP 的分泌量显著增加，具有交互作用（$P < 0.01$）。在 AS 滑膜成纤维细胞组分别和同时加入两种抗体后，随着加入浓度的增加，BGP 的分泌量减少，与加入前相比，具有统计学差异（$P < 0.01$），同时加入后，BGP 的分泌量显著减少，两者具有交互作用（$P < 0.01$）（表 2、3）。

表 2　加入不同浓度的 VEGF、TNF-α 后对照组成纤维细胞分泌的 BGP 值检测结果（$\bar{x} \pm s$）

VEGF 浓度	TNF-α 浓度（U/ml）			
（ng/ml）	0	10	100	500
0	0.50 ± 0.31	1.07 ± 0.17[a]	1.26 ± 0.42[a]	1.53 ± 0.34[a]
5	0.98 ± 0.21[b]	1.57 ± 0.37[c]	2.07 ± 0.25[c]	2.06 ± 0.23[c]
10	1.21 ± 0.19[b]	1.58 ± 0.16[c]	2.23 ± 0.48[c]	2.45 ± 0.16[c]
20	1.98 ± 0.55[b]	2.03 ± 0.38[c]	2.10 ± 0.39[c]	2.60 ± 0.41[c]

a：$P < 0.01$，与 0 ng/ml VEGF 比较；b：$P < 0.01$，与 0 U/ml TNF-α 比较；c：$P < 0.01$，与单独加入 TNF-α 或 VEGF 比较

表 3　加入不同浓度的抗 VEGF、抗 TNF-α 后 AS 组成纤维细胞分泌的 BGP 值检测结果（$\bar{x} \pm s$）

抗 VEGF 浓度	抗 TNF-α 浓度（U/ml）			
（ng/ml）	0	10	100	500
0	2.10 ± 0.41	1.67 ± 0.45[a]	1.56 ± 0.37[a]	1.48 ± 0.55[a]
0.1	2.02 ± 0.14[b]	1.65 ± 0.42[c]	1.09 ± 0.16[c]	0.72 ± 0.19[c]
1	1.56 ± 0.23[b]	1.56 ± 0.25[c]	1.07 ± 0.37[c]	0.47 ± 0.20[c]
10	1.03 ± 0.33[b]	0.73 ± 0.39[c]	0.57 ± 0.17[c]	0.35 ± 0.13[c]

a：$P < 0.01$，与 0 ng/ml 抗 VEGF 比较；b：$P < 0.01$，与 0 U/ml 抗 TNF-α 比较；c：$P < 0.01$，与单独加入抗 TNF-α 或抗 VEGF 比较

3　讨论

OC 是专职性骨吸收细胞，来源于骨髓造血组织中的单核巨噬细胞系统，在体内多种分化因子的作用下分化、成熟，是骨重塑中必不可少的细胞，TRAP 染色阳性是 OC 分化成熟的阶段性标志。研究证明，RA 滑膜成纤维细胞和外周血单核细胞共培养可以诱导

$TRAP^+$的单核细胞生成,进而分化为具有骨吸收能力的成熟 OC[2]。本研究中,在 AS 增生的滑膜组织聚集了大量的单、多核细胞,这些聚集的细胞中 TRAP 染色阳性,以滑膜衬里层及滑膜软骨交界部表达明显,而对照组阴性表达,提示滑膜组织内的单、多核巨噬细胞是 OC 的前体细胞,并且聚集的大量 $TRAP^+$细胞为 OC 的分化提供了充足的数量基础。

MMP-3 是一种重要的锌离子依赖性内肽酶,不仅能降解大量的细胞外基质成分,而且还具有激活多种其他 MMPs 前体(pro-MMPs)的作用,如 MMP-3 能激活 pro-MMP-1、pro-MMP-9 和 pro-MMP-13[3]。Chen 等[4]通过不同方法检测 AS 患者滑液中 MMP-3 的表达程度增高,而外周血中的 MMP-3 水平并不一定增高。本实验采用原位杂交技术检测 AS 滑膜组织中 MMP-3 表达阳性,阳性细胞计数与对照组比较有统计学差异($P<0.01$),且 MMP-3 的表达与 TRAP 阳性细胞计数间具有显著相关性($r=0.679$, $P=0.01$);原位杂交技术联合酶组织化学染色技术证明了 $TRAP^+$的细胞表达 MMP-3,明确了 MMP-3 来源于滑膜组织中 TRAP 阳性的单核或多核细胞,MMP-3 随循环进入关节液或血液中,使得滑液或血液中的 MMP-3 水平增高,而滑液中的 MMP-3 可以作用于关节软骨基质,使之降解,从而造成骨与软骨破坏。

已有研究证明,OC 的分化成熟必须依赖成骨/基质细胞的存在,但在正常滑膜组织内并无 OB,设想在 AS 滑膜组织内本身可能存在具有 OB。为此在本实验中检测了 AS 滑膜组织中 OB 的特异性标志 ALP、骨钙素,结果显示,在培养的 AS 滑膜成纤维细胞内 ALP 钙钴法染色阳性,骨钙素分泌量与对照组有统计学差异。由此证实了上述设想,AS 滑膜组织中存在 OB,是 OC 分化成熟的一个重要条件。

TNF-α 是炎症过程中最早产生的细胞因子之一,具有多种炎性和免疫反应活性[5]。VEGF 是功能最强大的血管生成调节因子,研究证明 VEGF 具有明显的成骨作用,可以加速骨折的愈合[6]。这两种因子是否可以诱导成纤维细胞分化为 OB? 为进一步检测 AS 滑膜成纤维细胞分化为 OB 的条件,本研究首先采用原位杂交技术检测了 AS 患者滑膜组织中 TNF-α mRNA、VEGF mRNA 有阳性表达,阳性细胞数与对照组有统计学差异($P<0.01$),提示 2 种因子在 AS 发病机制中发挥着重要的作用。培养 AS 滑膜成纤维细胞检测 ALP,可见细胞质内及细胞外有黑色颗粒,呈阳性染色,BGP 含量与对照组有统计学差异($P<0.01$);在对正常滑膜成纤维细胞培养过程中分别加入 TNF-α、VEGF 和联合加入两种因子,BGP 含量显著增加,与未加因子组相比具有统计学意义;在 AS 组滑膜成纤维细胞分别及联合加入肿瘤坏死因子抗体及 VEGF 抗体,BGP 的分泌量均随着抗体剂量的增加而减少($P<0.01$),两种因子联合加入,BGP 的分泌量显著减少,二者具有协同作用。可见 AS 滑膜组织内 TNF-α、VEGF 是诱导滑膜成纤维细胞分化为 OB 的重要诱导因子,进一步促进 OC 的分化成熟,这与 TNF-α、VEGF 与 TRAP 阳性细胞数具有相关性的结果相一致。而 TNF-α 和 VEGF 单克隆抗体可以明显抑制成纤维细胞向 OB 的分化,进而抑制 OC 的分化成熟,抑制骨的吸收,这也是可溶性 TNF-α 受体和 TNF-α 单克隆抗体对 AS 治疗效果明显[7]重要机制之一。当然滑膜成纤维细胞的分化是多种细胞因子共同作用的结果,李建明等[8]在 AS 滑膜组织中检测到转化生长因子(TGF-β)及骨形态发生蛋白-2(BMP-2)阳性表达,并认为是 AS 骨化的重要诱导因子,这些因子共同作用于成纤维细胞促使其分化为 OB,一方面为 OC 的分化成熟提供条件,另一方面又是 AS 脊柱周围滑膜韧带骨化强直的重要因素。当然 TNF-α 及 VEGF 促进 AS 滑膜成纤维细胞分化为 OB 只是 OC 分化的途径之一,还可以通过其他途径促进 OC 分化成熟。

总之,本研究提示 AS 滑膜组织中存在 TNF-α、VEGF 的表达,滑膜成纤维细胞在 TNF-α、VEGF 两种因子诱导下可以分化为 OB,在这种 OB 存在的条件下,破骨细胞前体可以分化为 OC,并表达 MMP-3,从而降解软骨基质,破坏骨与软骨。

参考文献:

[1] Hofbauer L C, Khosla S, Dunslan C R, *et al*. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(1):2-12.

[2] Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, *et al*. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage[J]. Ann Rheum Dis, 2003, 62(3): 196-203.

[3] Lijnen H R. Elements of the fibrinolytic system[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 936:226-236.

[4] Chen C H, Lin K C, Yu D T, *et al*. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ankylosing spondylitis: MMP-3 is a reproducibly sensitive and specific biomarker of disease activity[J]. Rheumatology (Oxford), 2006, 45(4): 414-420.

[5] 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. 上海:华夏出版社,2004: 771-824.

[6] 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.

[7] 黄 烽. TNFα 抑制剂治疗强直性脊柱炎研究进展[J]. 中国新药杂志,2006, 15(11): 853-857.

[8] 李建明, 初同伟, 周 跃. 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[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(3):251-253.

(编辑 张 维)