

· 临床研究 ·

HLA-B27 阳性强直性脊柱炎患者淋巴细胞含量、DKK1 和 BMP-2 因子表达研究

刘 华,董 青[△]

(江苏省苏州市中医院检验科 215007)

摘要:目的 研究 HLA-B27 阳性强直性脊柱炎(AS)患者淋巴细胞含量、DKK1 和骨形成蛋白-2(BMP-2)因子表达特点及临床意义。**方法** 采用流式细胞术分别检测患者及健康者 CD4⁺T、CD8⁺T、B 及 NK 细胞百分率,并分析 CD4⁺T/CD8⁺T 比值,应用酶联免疫吸附测定(ELISA)分别检测患者及健康者 DKK1 和 BMP-2 因子的表达。**结果** 与对照组相比,HLA-B27 阳性 AS 患者总 T 细胞含量百分比显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$);B 细胞含量百分比显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),DKK1 和 BMP-2 的表达均显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 免疫系统及 DKK1 和 BMP-2 异常可能是 HLA-B27 阳性 AS 发病机制之一,值得进一步深入研究。

关键词: 脊柱炎,强直性;淋巴细胞;HLA-B27 阳性;DKK1;骨形成蛋白-2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.36.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)36-3857-02

Study on the content of lymphocytes, the expression of DKK1 and BMP-2 in patients of ankylosing spondylitis with HLA-B27 positive

Liu Hua, Dong Qing[△]

(Department of Clinical Laboratory, Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou, Jiangsu 215007, China)

Abstract: Objective To study the content of lymphocytes, the expression of DKK1 and BMP-2 in patients with ankylosing spondylitis (AS) and HLA-B27 positive and investigate the clinical significance. **Methods** The percentages of CD4⁺T, CD8⁺T, B and NK were detected in patients and healthy people by Flow cytometry, and the ratio of CD4⁺T/CD8⁺T was analyzed. The expression of DKK1 and BMP-2 of patients and healthy people were detected by ELISA technique. **Results** Compared with the control group, the total percentage of T cells decreased significantly ($P<0.05$), the percentage of B cells increased significantly ($P<0.05$), the expression of DKK1 and BMP-2 increased significantly ($P<0.05$) in patients with AS and HLA-B27 positive. **Conclusion** Dysfunction The immune system, DKK1 and BMP-2 may be involved in pathogenesis of AS with HLA-B27 positive. It is worth further research.

Key words: spondylitis, ankylosing; lymphocytes; HLA-B27 positive; DKK1; BMP-2

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种危害骨骼系统与自身免疫相关的慢性疾病,症状表现为关节部位疼痛,行动不便,严重者甚至丧失活动能力,病理实验显示为关节的纤维化和骨性强直,进一步研究表明该疾病与人类白细胞抗原 MHC-I 类分子 HLA-B27 高度相关,HLA-B27 阳性成为 AS 的诊断指标之一^[1]。Dickkopf(DKK1)是一种含有 2 个富半胱氨酸区域的分泌性糖蛋白,参与抑制 Wnt/ β -catenin 信号^[2],通过多种级联反应抑制成骨细胞,激活破骨细胞,破坏成骨与溶骨失衡。骨形成蛋白-2(bone morphogenetic protein, BMP-2)是一种生长因子,在体内、体外均有较强的骨诱导活性,可以使碱性磷酸酶的活性增高、骨桥蛋白、骨钙蛋白及 I 型胶原蛋白合成增加^[3]。本研究通过流式细胞术检测淋巴细胞亚群在 B27 阳性患者和健康人之间的差别,通过酶联免疫反应检测 DKK1 和 BMP-2 在 AS 患者和健康人中的含量,探讨淋巴细胞亚群的结构与 AS 患病的关系,并进一步深入研究 DKK1 和 BMP-2 与 AS 疾病之间的关系,为研究 AS 疾病提供新的参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机抽取 30 例 HLA-B27 阴性健康受试者(对照组),60 例 HLA-B27 阳性住院患者(AS 组),符合 AS 诊

断标准。所有受试者均于当天抽取外周静脉血 2 mL, EDTA-2K 抗凝,标本在 6 h 之内测定。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪购自美国 BD 公司;酶标仪、洗板机购自芬兰雷勃公司;离心机购自德国艾本德公司;隔水式培养箱购自海门市恒昌仪器厂。CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC(Cat NO: 340499t)、CD3-FITC/CD16 + 56-PE/CD45-PerCP/CD19-APC(Cat NO: 340500+) 购自 BD 公司;人 DKK1 和 BMP-2 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自上海沪尚生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 流式细胞仪标本处理 选 2 支试管,分别加入 CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC、CD3-FITC/CD16 + 56-PE/CD45-PerCP/CD19-APC 20 μ L,将标本充分混匀,分别加入 50 μ L 标本,振荡器上充分混匀,避光放置 15 min;加入溶血素 2 mL,充分振荡,避光放置 10 min。1 500 r/min 离心 5 min 弃上清液,加入生理盐水 2 mL 振荡,1 500 r/min 离心 5 min 弃上清液,加入生理盐水 100 μ L,充分振荡混匀,待测。

1.3.2 流式细胞仪设置及数据分析 采用 FACS Comp 调整仪器 FSC、SSC、FL1、FL2、FL3、FL4 的电压及补偿。采用 CELL Quest 软件获取 20 000 个淋巴细胞,分析 CD3、CD4、CD8、

[△] 通讯作者, Tel:13013793490; E-mail: qingdong64@126.com。

表 1 对照组与 AS 患者的淋巴细胞亚群百分比($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T	B	NK
对照组	30	61.47±5.23	31.50±5.20	23±6.06	1.44±0.42	10.86±2.37	19.50±7.37
AS 组	60	54.91±8.66*	29.00±8.58	20±7.20	1.65±0.92	13.05±4.17 [#]	20.00±9.99

*: $P < 0.05$, #: $P < 0.05$, 与对照组比较。

CD19、CD16⁺56 细胞占淋巴细胞的百分比。分别将他们与淋巴细胞绝对数相乘,得到各种表型细胞的绝对值。

1.3.3 ELISA 分析 按照试剂盒说明操作,标准品的稀释与加样;标准品稀释好 5 个梯度,每孔加样量均为 50 μL ;加样:分别设空白孔、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL ,然后再加待测样品 10 μL ;温育:封板膜封板 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min;洗涤:弃去液体,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,重复 5 次;加酶:每孔加入酶标试剂 50 μL ;温育:步骤同上;洗涤:步骤同上;显色:每孔先加入显色剂 A 50 μL ,再加入显色剂 B 50 μL ,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min;终止:每孔加终止液 50 μL ,终止反应;测定:450 nm 波长依序测量各孔 A 值。

1.4 统计学处理 采用 Stata7.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组样本间采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与对照组相比,HLA-B27 阳性 AS 疾病患者总 T 细胞含量百分比显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞百分比明显下降,而差异无统计学意义($P > 0.05$);T4/T8 比值有所上升,但差异无统计学意义($P > 0.05$);B 细胞含量百分比显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);NK 细胞百分比含量略有上升,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。ELISA 试剂盒标准曲线的绘制,通过标准品的梯度加样测定并绘制标准曲线,DKK1 和 BMP-2 的标准曲线 r^2 分别为 0.998 5、0.997 9,HLA-B27 阳性中 DKK1 和 BMP-2 的表达与对照组相比均显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 对照组与 AS 患者的 DKK1 和 BMP-2($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

分组	n	DKK1	BMP-2
对照组	30	15.21±2.60	56.14±9.30
AS 组	60	20.03±3.59 [▲]	72.79±13.30 [△]

▲: $P < 0.05$, △: $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

AS 是与免疫学密切相关的疾病,有流行病学发病因素,也有遗传学易感因素^[4]。早在 1973 年 Brewerton 等^[5] 和 Schlosstein 等^[6] 就分别证实 HLA-B27 抗原与 AS 有强关联性,并且 HLA-B27 阳性个体一生中患 AS 的可能性为 HLA-B27 阴性者的 300 倍,这提示 HLA-B27 基因或者是 AS 的疾病相关的基因,或者是与致病基因紧密连锁。有越来越多的证据表明,HLA-B27 基因或与 AS 疾病相关,HLA-B27 转基因大鼠骨量的变化,发现有疾病倾向的 HLA-B27 大鼠骨量减少,该实验表明 HLA-B27 基因缺陷与疾病中骨量丢失有关^[7]。HLA-B27 基因多态性影响机体相关的免疫应答反应,本研究通过流式细胞术检测 AS 患者淋巴细胞亚群的含量百分比,探讨淋巴细胞的变化与疾病的关系,总 T 细胞百分含量

有显著下降,B 细胞百分含量显著上升,表明在本检测的患者体内,T 细胞和 B 细胞较对照组异常,可能与 AS 有关,而 T4、T8、T4/T8 及 NK 细胞的百分比含量均有所变化,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

虽然 HLA-B27 阳性与 AS 有强相关性,但是至今 AS 的发病机制仍然不清楚,提示 AS 发病机制的复杂性。AS 是危害骨骼系统的疾病,临床主要表现为骶髂关节及中轴关节病变为特征的脊柱关节炎疾病。DKK1 蛋白属于 Dickkopf 家族,可通过诱导 beta-catenin 磷酸化及降解来抑制 Wnt 信号通路,从而阻断早期成骨细胞形成并诱导未成熟成骨细胞的凋亡^[8]。DKK1 是一种可溶性外泌型的糖蛋白,通过对 Wnt 信号的作用调节骨质重塑。有研究表明,过度表达 DKK1 或 DKK1 缺失表达分别可导致严重骨质丢失及大量骨质形成^[9]。另有研究表明,多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)细胞分泌的 DKK1 通过与基质细胞表面的 LRP5 和(或)LRP6 相互作用抑制 β -catenin 组装,从而抑制成骨细胞发挥骨质重塑功能^[10]。以上证据表明,DKK1 与骨质的丢失和形成有关,本实验测得 AS 患者 DKK1 表达显著上升,这提示 DKK1 与 AS 疾病的发病相关,其具体机制尚待进一步深入研究。

BMP-2 作为 TGF- β 超家族成员,是一种重要的成骨调节因子,有很强的促进成骨细胞分化的功能,并表达特异性的成骨细胞产物^[11]。BMP-2 可以促进骨髓基质间充质细胞体外增值和诱导其分化为成骨前体细胞^[12]。重组人 BMP-2(rhBMP-2)可诱导再生软骨和再生骨的形成^[13]。本研究检测 HLA-B27 阳性 AS 患者中 BMP-2 的表达与对照组相比显著升高,AS 与骨组织的逐步病变密切相关,有学者也提出 BMPs 类蛋白可能在 AS 发生过程中其重要作用,BMP-2 的表达异常是否与患者骨组织病变有关,值得深入研究^[14]。

虽然 AS 的研究广泛而深入,但尚不能揭示其发病的根本原因,也表明 AS 发病的复杂性及影响因素的复杂性,有免疫因素、遗传因素以及环境的互作,大多相关试验都在研究这些因素与 AS 的关系,而 AS 患者病理实验显示为关节的纤维化和骨性强直,提示调节骨质或者骨细胞生长发育的基因也很有可能直接或间接参与 AS 的发病,而这些研究比较少见。本研究利用传统的流式细胞术发现,MHC-I 类分子 HLA-B27 阳性 AS 患者 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞异常,进一步说明了 AS 的发病与 HLA-B27 遗传基因及免疫因素相关。采用 ELISA 分析发现,调节骨质和骨细胞生长发育的两个因子 DKK1 和 BMP-2 表达显著升高,该两种因子可能与 AS 发病有关,有待进一步探讨,这为深入研究 AS 发病机制及临床的诊断和治疗提供新的思路和方法。

参考文献:

- [1] Díaz-Peoa R, López-Vázquez A, López-Larrea C. Old and new HLA associations with ankylosing spondylitis [J]. Tissue Antigens, 2012, 80(3): 205-213. (下转第 3861 页)

查才能做出正确诊断。

3.5 治疗及预后 肝脏 CS 转移率很高,以血行转移为主,对放、化疗均不敏感,预后很差^[11]。其恶性程度高,病情发展快,出现临床症状时多为晚期,本组病例 1、2 和 4 在就诊时均因肿块巨大,且有肝内播散或邻近器官组织的转移,行姑息性手术切除后辅以化疗,分别于确诊后两个半月、3 个月和 4 个月死亡;病例 3 因肿块包膜完整,术中得以完整摘除且未发现周围浸润及转移灶,术后未化疗,随访 8 个月存活,后失访。大部分患者因肿块体积较大,侵袭性强,比同部位的普通癌预后差^[12]。因为预后差,符合米兰标准的患者,移植学家也不主张行肝移植治疗肝脏 CS。目前,首选的治疗方式为早期根治性手术切除,只有无法手术切除或无法切净的病例采用放、化疗。因病例数少,该肿瘤的诊断、治疗和预后等方面的特点,有待更多病例数的积累和研究予以明确。

参考文献:

- [1] Hamihor SR, Aaltonen LA. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the digestive system[M]. Lyon: IARC Press, 2000: 177-198.
- [2] Ishak KG, Goodman ZD, Stocher JT. Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts[M]. Washington DC: AFIP, 2001: 271-280.
- [3] 姚建国, 刘波, 包蕾. 肝脏癌肉瘤[J]. 临床与实验病理学杂志, 2008, 24(6): 738-739.
- [4] Nomura K, Aizawa S, Ushigome S. Carcinosarcoma of the liver [J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(6): 888-890.

- [5] Lao XM, Chen DY, Zhang YQ, et al. Primary carcinosarcoma of the liver: clinicopathologic features of 5 cases and review of the literature[J]. Am J Surg Pathol, 2007, 31(6): 817-826.
- [6] 杨炼, 陈立波, 韩萍, 等. 肝脏癌肉瘤的临床表现与 CT 诊断: 2 例报告并文献复习[J]. 中华肝胆外科杂志, 2009, 15(10): 781-784.
- [7] 方铤华, 林雪平. 肉瘤样癌及癌肉瘤的新认识[J]. 肿瘤研究与临床, 2005, 17(2): 138-139.
- [8] Dacic S, Finkelstein SD, Sanatomi E, et al. Molecular pathogenesis of pulmonary carcinosarcoma as determined by microdissection based allelotyping[J]. Am J Surg Pathol, 2002, 26(4): 510-516.
- [9] Thompspon L, Chang B, Barsky SH, et al. Monoclonal origins of malignant mixed tumors (carcinosarcomas). Evidence for a divergent histogenesis[J]. Am J Surg Pathol, 1996, 20(3): 277-285.
- [10] She R, Szakacs J. Carcinosarcom of the liver; a case report and review of the literature[J]. Arch Pathol Lab Med, 2005, 129(6): 790-793.
- [11] 潘光栋, 杨建青, 褚光平, 等. 肝癌肉瘤 1 例[J]. 中华普通外科杂志, 2009, 24(4): 343-344.
- [12] 刘筱青, 方铤华. 肉瘤样癌、癌肉瘤的临床与病理[J]. 医学理论与实践, 2004, 17(1): 33.

(收稿日期: 2012-07-09 修回日期: 2012-08-22)

(上接第 3858 页)

- [2] Mao B, Wu W, Davidson G, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signaling[J]. Nature, 2002, 417(6889): 664-667.
- [3] Nakashima K, de Crombrugge B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation[J]. Trends Genet, 2003, 19(8): 458-466.
- [4] 黄烽, 杨春华. 强直性脊柱炎临床及免疫发病机制的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2001, 17(6): 281-285.
- [5] Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, et al. Ankylosing spondylitis and HL-A 27[J]. Lancet, 1973, 1(7809): 904-907.
- [6] Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, et al. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis[J]. N Engl J Med, 1973, 288(14): 704-706.
- [7] Rauner M, Stupphann D, Haas M, et al. The HLA-B27 transgenic rat, a model of spondyloarthritis, has decreased bone mineral density and increased RANKL to osteoprotegerin mRNA ratio[J]. J Rheumatol, 2009, 36(1): 120-126.
- [8] Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease[J]. Blood, 2009, 113(3): 517-525.

- [9] Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, et al. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse[J]. Dev Cell, 2001, 1(3): 423-434.
- [10] Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma[J]. N Engl J Med, 2003, 349(26): 2483-2494.
- [11] Ebara S, Nakayama K. Mechanism for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity [J]. Spine(Phila Pa 1976), 2002, 27(16 Suppl 1): 10-15.
- [12] Kirker-Head C, Karageorgiou V, Hofmann S, et al. BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects[J]. Bone, 2007, 41(2): 247-255.
- [13] Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, et al. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell [J]. Kobe J Med Sci, 2007, 53(1/2): 25-35.
- [14] Carter S, Braem K, Lories RJ. The role of bone morphogenetic proteins in ankylosing spondylitis[J]. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2012, 4(4): 293-299.

(收稿日期: 2012-07-03 修回日期: 2012-10-08)