

基础研究

特发性脊柱侧凸患者骨组织中唾液酸蛋白的表达

朱 锋^{1,2}, 邱 勇^{1,2}, 杨晓恩^{2,3}, 李广文², 秦 岭^{2,3}, 郑振耀^{2,3}

(1 南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008; 2 香港中文大学-南京大学脊柱侧凸联合研究中心;

3 香港中文大学医学院矫形外科及创伤学系)

【摘要】目的:检测青少年特发性脊柱侧凸(AIS)患者脊柱不同部位和髂骨松质骨骨唾液酸蛋白(bone sialoprotein, BSP)的表达量,并与先天性脊柱侧凸(CS)患者比较,探讨非胶原结构蛋白与 AIS 患者骨代谢异常的关系。**方法:**从 12 例平均年龄为 13.8 岁的 AIS 患者取 7 块髂骨(7 例患者)、12 对关节突和 17 个棘突,从 10 例平均年龄为 11.2 岁的 CS 患者中收集 10 块髂骨。骨组织块固定脱钙处理,石蜡包埋切片,片厚 5 μ m,免疫组织化学染色,观察骨基质中 BSP 阳性面积比、骨基质总光密度/骨面积和阳性细胞比率。**结果:**BSP 在骨细胞和骨基质中均有表达,AIS 组和 CS 组患者髂骨骨基质总体光密度/骨面积(total OD/bone area)为 0.0678 $\pm$ 0.0003 和 0.0803 $\pm$ 0.0013,差异有显著性($P<0.05$),AIS 患者顶椎区凹、凸侧关节突的骨基质 BSP 阳性面积比和骨基质 BSP 面积 $\times$ 平均光密度/骨面积分别为 0.7363 $\pm$ 0.0632、0.5552 $\pm$ 0.0259 和 0.0761 $\pm$ 0.0079、0.0632 $\pm$ 0.0058,差异有显著性($P<0.05$)。AIS 患者上胸椎棘突与胸腰段棘突骨基质 BSP 染色阳性率分别为 63.2%和 65.5%,阳性细胞表达率分别为 58.7%和 61.2%,差异无显著性($P>0.05$)。**结论:**BSP 对 AIS 患者骨异常代谢及骨量降低的影响不大,非胶原结构蛋白可能不是 AIS 患者骨代谢研究的首要考虑对象;脊柱侧凸异常应力影响脊椎骨骼塑型和代谢,脊柱侧凸畸形对脊椎各结构的影响是多方面的。

【关键词】特发性脊柱侧凸;骨唾液酸蛋白;发病机理

中图分类号:R682.3,Q513 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2007)-04-0297-04

The expression of bone sialoprotein in trabecular bone in adolescent idiopathic scoliosis:an immunohistochemical study/ZHU Feng, QIU Yong, YANG Xiaoen, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(4):297~300

【Abstract】 Objective:To detect bone sialoprotein expression pattern in different part of vertebrae and iliac bone biopsy in adolescent idiopathic scoliosis(AIS) patients and to compare the results with those in congenital scoliosis (CS).**Method:**Bone samples were obtained during the posterior surgery intraoperatively from 12 AIS patients with average age of 13.8 years old including 7 iliac crests, 12 pairs facet joint, and 17 spinous processes were harvested. Ten iliac bone biopsy were harvested from iliac crest in congenital scoliosis with average age of 11.2 years old. The sections with 5 μ m in thickness were detected by immunohistochemical method. The parameters included BSP positive area/bone area, BSP area $\times$ OD average/bone area, total OD/bone area and also positive cell ratio.**Result:**By comparing AIS and CS patient, only total OD/bone area showed significant differences in the iliac crest between AIS and CS group (0.0678 $\pm$ 0.0003 vs 0.0803 $\pm$ 0.0013). 12 pairs of facet joint from apical vertebrae of AIS patients showed significant difference in two parameters of BSP positive area/Bone area and BSP area $\times$ OD average/bone area (0.7363 $\pm$ 0.0632 vs 0.5552 $\pm$ 0.0259, 0.0761 $\pm$ 0.0079 vs 0.0632 $\pm$ 0.0058 respectively) ($P<0.05$) with concave side large than convex side. In AIS group the BSP staining turned out to be invariable between upper thoracic and thoracolumbar spinous process ($P>0.05$).**Conclusion:**The abnormal bone mineral status in AIS patients may not be directly linked to abnormalities in the non-collagen proteins like BSP. The different expression of BSP between concave and convex side could be explained as bone adaptation under asymmetric loading.

【Key words】Idiopathic scoliosis; Bone sialoprotein; Pathogenesis

【Author's address】Spinal Surgery, Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing, 210008, China

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号 30672131)

第一作者简介:男(1977-),住院医师,医学博士,研究方向:脊柱外科

电话:(025)83105113 E-mail:cnspine@hotmail.com

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)的病因目前尚不明确,由于生长发育因素在特发性脊柱侧凸的发生发展中发挥重

要作用,在众多假说中最受关注的是生长发育与脊柱侧凸的关系^[1]。有研究发现,AIS 患者总体身高、坐高等参数较正常同龄青少年高^[2],而且部分女性患者还有月经和生长高峰提前表现^[3,4]。Deane 等^[5]对正常胸段脊柱的大体形态学研究发现前柱较后柱短;而 Roaf 等^[6]的研究却发现 AIS 患者脊柱前柱高于后柱。上述种种迹象均提示 AIS 患者的生长发育异常。骨量降低是部分 AIS 患者的另一重要临床表征并且被多次证实^[7,8]。部分学者指出 AIS 患者身高较高是因为软骨内成骨正常或相对较快,而骨量降低是由于膜内成骨异常导致骨骼周径或横向生长缓慢^[9],但目前尚没有研究证实这一假说。本研究拟通过对 AIS 患者骨组织中骨唾液酸蛋白(BSP)分布的研究,从而对这类患者骨代谢以及软骨内成骨和膜内成骨不平衡这一假说有更深入的认识。

1 材料与方法

1.1 研究对象

12 例 AIS 患者均明确诊断为特发性脊柱侧凸,因病情需要都必须接受后路矫形内固定手术治疗。排除关节松弛等结缔组织疾病、代谢性骨病、干骺发育不良、神经肌源性疾病;无心、肺、肾功能障碍或功能衰竭;近期没有进行化学治疗和针对脊柱的放射治疗,没有长时间的瘫痪或活动障碍。年龄 10~16 岁,平均 13.8 岁,术前 Cobb 角平均 70.5°(63°~94°),共取 7 块髂骨(来自 7 例患者)、12 对关节突和 17 个棘突。对照组为先天性脊柱侧凸(congenital scoliosis,CS)患者,共 10 例,年龄 8~14 岁,平均 11.2 岁,术前 Cobb 角平均 68.8°(50°~79°),收集 10 块髂骨。患者均因植骨融合需要取髂骨、棘突或顶椎区关节突,取材均经患者知情同意。

1.2 标本取材

髂骨:于后路融合手术时取髂后上棘后外侧 5×5×5mm 带骨皮质松质骨;棘突:于后路融合手术时取上下端椎区,截面积 5×5mm,包括皮质骨与松质骨;关节突:顶椎区,5×5×5mm 大小,标记凹、凸侧。骨组织块取下后在 4%中性福尔马林固定 12~24h,甲酸脱钙 3 周,然后进行组织自动处理脱水浸蜡,石蜡包埋,Leica Universal Microtome 切片机(Leica RM 2165,Leica,德国)切片,片厚 5μm。

1.3 免疫组织化学

切片用二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,新鲜配制的 3%双氧水反应 20min,磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗 5min,加胰蛋白酶反应液 37℃反应 5min,PBS 冲洗,加透明质酸酶 37℃下反应 10min,PBS 冲洗 5min,微波炉加热 95℃ 20s 加 40s,室温中冷却 30min,摇床上 PBS 冲洗 5min,室温下加山羊血清封闭抗原 30min,PBS 冲洗,快速滴加 1:800 稀释的一抗(美国国立卫生研究院牙病研究所 LW Fisher 教授提供),每片 100~150μl,抗体用胎牛血清/PBS 稀释,4℃过夜,PBS 冲洗 5min×3 次,加 2~3 滴生物素结合的二抗反应 30min,PBS 冲洗 5min×2 次,加 2~3 滴辣根过氧化物酶(HRP)反应 30min,PBS 冲洗,加显色剂 3,3'-二氨基联苯胺(Diaminobenzidine,DAB)2~3 滴,用双蒸水冲洗,Mayer's 苏木素衬染 3min,双蒸水反复冲洗多次。梯度酒精脱水,封片。阳性对照:使用具有已知抗原的组织检测免疫组织化学方法的正确性和可靠性;阴性对照:在组织切片上不加一抗以评价背景的颜色深浅,为图像分析作准备。

1.4 图像分析

所有图像在 Leica 显微镜 MDLS 下拍照,放大 100 倍,图像分析系统(Leica Q500MC,德国)下测量 BSP 阳性区域(BSP positive area),整体骨组织区域(bone area),平均光密度值(OD average),总体光密度值(total OD)和阳性细胞数,其中光密度值通过阴性对照片作对比来评价基质染色的深浅,以反应基质中 BSP 的丰富程度。每张玻片测量 10 个视野,然后计算平均值。

1.5 统计学分析

数据记录后计算出均值与标准差。采用独立 *t* 检验分别比较 AIS、CS 患者髂骨和 AIS 患者两侧关节突、上胸椎和胸腰椎棘突各指标。所有统计全部在 SPSS 统计软件下完成(版本 11.0,芝加哥,美国)。 $P \leq 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

见表 1~3 和图 1~4(后插页 I)。在 AIS 和 CS 患者髂骨骨细胞和骨基质中均有 BSP 表达,AIS 患者髂骨骨细胞和骨基质中阳性表达率与 CS 患者无显著性差异,但 AIS 患者和 CS 患者的髂骨骨基质中总体光密度值/整体骨组织区域(total OD/bone area)有显著性差异($P < 0.05$)。

AIS患者顶椎区凹、凸侧关节突关节骨细胞的 BSP 阳性细胞无显著性差异, 顶椎区凹侧关节突 BSP 阳性区域比例 (positive area/bone area) 和 BSP 面积×平均 OD/骨面积高于凸侧关节突, 差异有显著性 ($P<0.05$)。

AIS 患者上胸椎棘突 BPS 阳性细胞表达率与胸腰椎棘突比较无显著性差异; 上胸椎与胸腰段棘突基质 BSP 染色阳性等指标与胸腰椎棘突亦无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 1 AIS 与 CS 患者髂骨骨细胞与骨基质中唾液酸蛋白 (BSP) 免疫组织化学染色比较 ($\bar{x}\pm s$)

	AIS组 ($n=7$)	CS组 ($n=10$)
骨基质 BSP 面积/骨面积	0.6172±0.0157	0.6723±0.0246
骨基质 BSP 面积×平均光密度/骨面积	0.0569±0.0003	0.0589±0.0042
骨基质总体光密度/骨面积	0.0678±0.0003	0.0803±0.0013 ^①
骨细胞阳性比率	0.6574±0.048	0.6041±0.0384

注: ①与 AIS 组比较 $P<0.05$

表 2 AIS 患者凹、凸侧关节突唾液酸蛋白 (BSP) 免疫组织化学染色比较 ($n=12, \bar{x}\pm s$)

	凹侧	凸侧
骨基质 BSP 面积/骨面积	0.7363±0.0632	0.5552±0.0259 ^①
骨基质 BSP 面积×平均光密度/骨面积	0.0761±0.0079	0.0632±0.0058 ^①
骨基质总体光密度/骨面积	0.0644±0.0009	0.0589±0.0017
骨细胞阳性比率	0.6368±0.029	0.6017±0.0034

注: ①与凹侧比较 $P<0.05$

表 3 AIS 患者上胸椎和胸腰段棘突 BSP 染色比较 ($\bar{x}\pm s$)

	上胸椎 ($n=7$)	胸腰段 ($n=10$)
骨基质 BSP 面积/骨面积	0.6318±0.0613	0.6546±0.0341
骨基质 BSP 面积×平均光密度/骨面积	0.0554±0.0008	0.0593±0.0044
骨基质总体光密度/骨面积	0.0478±0.0032	0.0569±0.0012
骨细胞阳性比率	0.5866±0.0334	0.6121±0.0314

注: 胸腰段各指标与上胸椎比较 $P>0.05$

3 讨论

3.1 AIS 患者骨基质中 BSP 代谢

生长发育异常和骨量改变是 AIS 患者的重要表现^[1,9,10]。Cheng 等^[10]研究发现 AIS 患者中约有 25% 的患者表现为骨量降低以及骨小梁边缘的成骨细胞数量较少。目前针对 AIS 患者骨组织代谢关注较多的是各种生长因子的基因表达, 对非胶

原蛋白在 AIS 各组织中表达的研究不多见^[11,12]。骨基质中非胶原基质蛋白发挥细胞黏附、小分子物质传输、钙及羟基磷灰石结合和骨组织矿化的功能, 这些蛋白的表达和骨组织矿物含量密切相关。本研究利用脊柱矫形手术术中取材对脊柱不同部位及髂骨标本进行 BSP 定量测定, 发现 BSP 在 AIS 患者脊柱关节突、棘突和髂骨松质骨的骨基质和骨细胞中均有阳性表达, 但是在不同的解剖部位表达量有所差异, 这种差异可能和 BSP 的功能有关。BSP 是重要的骨基质结构蛋白, 为酸性磷酸化糖蛋白, 由成骨细胞、骨细胞、破骨细胞甚至软骨细胞分泌。BSP 等非胶原蛋白被分泌至细胞外基质中, 与钙、磷结合, 然后, 沿胶原分子的长轴, 钙和磷结合到胶原分子侧链的胶原氨基酸残基上, 形成羟磷灰石结晶, 负责基质的矿化^[13]。

3.2 AIS 与 CS 患者 BSP 表达的比较

一直以来, AIS 脊柱标本 (椎间盘、骨骼、生长板) 研究的一个重要缺陷是无法分辨究竟这些改变是脊柱侧凸畸形的原发因素还是继发因素。髂骨处在非负重区, 因而不会受到脊柱侧凸畸形的继发性影响, 其发生的各种改变应当是疾病本身所具有的改变。AIS 和 CS 患者髂骨松质骨 BSP 阳性细胞比率和细胞基质阳性面积比两项参数均没有差异, 虽然总体 OD 值有差异, 但是将平均 OD 值与阳性面积的乘积比上骨面积则没有显著性差异, 说明这两种不同脊柱畸形的 BSP 在细胞和基质中的含量没有差异。CS 是由于胚胎时期脊椎前体受到外界因素干扰而出现脊椎形成障碍或脊椎间分节不良, 在出生时这种脊椎畸形已经存在, 随着儿童和青少年生长高峰出现, 不对称的脊椎生长逐渐导致各种脊柱畸形, 尽管先天性脊柱侧凸的病因还不十分明确, 但最大的可能为外界刺激 (如病毒和细菌感染、化学物理中毒等) 通过改变决定早期躯干生长发育的基因而影响脊椎的正常发育。目前尚无文献报道 CS 患者胶原、非胶原等骨基质的代谢异常, 因此至少目前可以认为 CS 患者 BSP 代谢与正常人相似, AIS 与 CS 患者在非负重区 BSP 表达的一致性说明 BSP 在 AIS 患者骨量降低甚至病因发病学中没有特殊意义。今后对 AIS 病因学探寻应更多地集中在胶原等其他骨代谢相关基因上。

3.3 不对称应力对骨骼代谢的影响

以前的研究证实长骨如在生长过程中受到持

续压力、牵张力或扭力等异常应力时其骨骼能够不断重塑调整以适应改变的外部环境, 脊柱侧凸畸形下脊椎骨承受异常的应力, 这些组织结构如何作出调整、重塑对脊柱侧凸畸形的进展相当关键^[14]。杨晓恩等^[15]曾通过 micro CT 扫描发现 AIS 患者骨小梁微结构重塑调整以适应外部环境的改变, 如顶椎区骨小梁厚度凹侧大于凸侧, 骨小梁分离度及骨面积体积比凹侧小于凸侧且有显著性差异。本研究发现骨基质非胶原蛋白 BSP 在 AIS 患者的凹侧和凸侧也有显著性差异, 凹侧有更多的基质显示 BSP 阳性染色, 说明凹侧有更多 BSP 生成, 由于 BSP 对钙和羟基磷灰石的沉积非常重要, 是骨基质钙化的重要连接蛋白, 因而说明凹侧有更多的钙化骨生成。

更多 BSP 蛋白产生的具体机制还有待进一步证明, Antoniou 等^[16]的研究说明凹凸侧骨骼代谢的差异与终板软骨的适应性改变并不相同, 他通过免疫组织化学方法发现凸侧生长板细胞活性明显较凹侧高, 说明凹侧过度压力导致生长板分化成骨能力降低。脊柱生长板在脊柱侧凸状态下的表现可以用 Hueter-Volkman 和 Delpech 定律解释, 这两个定律分别描述了在牵张应力下生长板活性升高而在持续压应力下生长板分化成骨能力降低。与生长板的适应性改变不同, 脊椎骨小梁的适应性改变更多的是依赖骨小梁中骨细胞形成代谢增强。

通过对骨细胞基质代谢的研究, 我们对骨骼塑形重建有了更深入清晰的了解, 对 Wolff 定律在脊柱畸形中的应用也有了深入认识。说明脊柱侧凸时脊椎骨骼的重塑能力从某种程度上可以阻止脊柱侧凸畸形的进展, 因为凹侧的脊椎变得更为坚强, 可以有效地抵抗侧凸下压缩力, 从而防止脊椎的变形和脊柱侧凸的加重。可见 Hueter-Volkman 和 Delpech 定律对脊椎生长板的影响对脊柱侧凸的进展可能发挥了更大作用。

总之, 通过与 CS 患者比较, 可以排除 BSP 在 AIS 患者异常代谢的可能及其对 AIS 骨量降低的影响, 非胶原结构蛋白可能不是 AIS 骨代谢研究的首要考虑对象; BSP 在 AIS 患者顶椎凹、凸侧的差异反应脊柱侧凸异常应力对脊椎骨骼塑形和代谢的影响。

4 参考文献

1. Willner S, Johnson B. Adolescent idiopathic scoliosis; etiology.

In: Weinstein SL(eds). The Pediatric Spine[M]. New York: Raven Press, 1994. 445-462.

2. Nicolopoulos KS, Burwell RG, Webb JK. Stature and its components in adolescent idiopathic scoliosis; cephalo-caudal disproportion in the trunk of girls[J]. J Bone Joint Surg Br, 1985, 67(4): 594-601.
3. Goldberg CJ. Adolescent idiopathic scoliosis- early menarche, normal growth[J]. Spine, 1993, 18(5): 529-535.
4. Hagglund G, Karlberg J, Willner S. Growth in girls with adolescent idiopathic scoliosis[J]. Spine, 1992, 17(1): 108-111.
5. Deane G, Duthie RB. A new projectional look at articulated scoliotic spines[J]. Acta Orthop Scand, 1973, 44(4): 351-365.
6. Roaf R. The basic anatomy of scoliosis[J]. J Bone Joint Surg Br, 1966, 48(4): 786-792.
7. Cheng JC, Guo X, Sher AH. Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: a longitudinal follow up study [J]. Spine, 1999, 24(2): 1218-1222.
8. Cook SD, Harding AF, Morgan EL, et al. Trabecular bone mineral density in idiopathic scoliosis[J]. J Pediatr Orthop, 1987, 7(2): 168-174.
9. Cheng JC, Qin L, Cheung CS, et al. Generalized low areal and volumetric bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(8): 1587-1595.
10. Cheng JC, Tang SP, Guo X, et al. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: a histomorphometric study[J]. Spine, 2001, 26(3): E19-23.
11. 朱锋, 邱勇, 郑伟娟, 等. 青少年特发性脊柱侧凸椎间盘纤维环 I 型、II 型胶原的分布异常和其意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2004, 14(4): 233-236.
12. 孙强, 邱勇, 刘臻, 等. SOX9 在青少年特发性脊柱侧凸患者骨髓间质干细胞的表达及意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(3): 215-219.
13. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix[J]. J Cell Physiol, 1990, 143(3): 420-430.
14. Wilson-MacDonald J, Houghton GR, Bradley J, et al. The relationship between periosteal division and compression or distraction of the growth plate: an experimental study in the rabbit[J]. J Bone Joint Surg Br, 1990, 72(3): 303-308.
15. 杨晓恩, 朱锋, 邱勇, 等. 特发性脊柱侧凸患者脊柱不同部位松质骨三维微结构比较[J]. 中华外科杂志, 2004, 42(12): 777-780.
16. Antoniou J, Arlet V, Goswami T, et al. Elevated synthetic activity in the convex side of scoliotic intervertebral discs and endplates compared with normal tissues [J]. Spine, 2001, 26(10): E198-206.

(收稿日期: 2006-10-17 修回日期: 2007-02-14)

(英文编审 陆 宁)

(本文编辑 卢庆霞)