

· 技术与方法 ·

兔退变椎间盘纤维环及髓核组织中的 PG、MMP-3、TIMP-2 表达变化及意义

刘 林, 骆文远, 张 超, 宋玉鑫, 舍 炜
(甘肃省人民医院骨二科, 兰州 730000)

摘要:目的 观察兔退变椎间盘纤维环和髓核组织中蛋白多糖(PG)、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(TIMP-2)的表达,并探讨其意义。方法 新西兰大白兔 42 只,直立位下建立椎间盘退变模型,均分为实验组和对照组。两组分别于建模后 4、8、12 周各取 7 只动物,取 L₄₋₅ 椎间盘组织采用高碘酸-希夫(PAS)染色检测髓核与纤维环组织中的 PG,以灰度值表示其相对表达量;免疫组化 SP 法检测椎间盘纤维环和髓核组织中的 MMP-3 及 TIMP-2,以平均光密度值(MOD)表示其相对表达量。结果 实验组、对照组建模 4、8、12 周髓核组织中 PG 灰度值均高于纤维环组织($P < 0.05$);两组建模 12 周时纤维环、髓核 PG 灰度值均高于 8 周时,且建模 8 周时髓核 PG 灰度值高于 4 周时($P < 0.05$)。随着建模时间的延长,实验组中 MMP-3 和 TIMP-2 的相对表达量均增加明显。髓核中,对照组及实验组同一时间点 MMP-3 的平均 MOD 值明显高于 TIMP-2。实验组纤维环中 TIMP-2 较 MMP-3 表达变化明显。结论 椎间盘退变过程中髓核中 PG 的含量变化早于纤维环,通过对 MMP-3/TIMP-2 在椎间盘退变中所起作用的研究结合髓核 PG 的变化可能会对临床诊断、基因治疗和组织工程技术的应用有一定帮助。而且对 MMPs 和 TIMPs 的表达水平的调节来控制椎间盘基质代谢的平衡,可能会成为治疗椎间盘退变的新方向。

关键词:椎间盘;基质金属蛋白酶 3;金属蛋白酶 3 组织抑制剂;纤维环;髓核

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.17.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)17-2178-03

Expression changes and meaning of PG, MMP-3, TIMP-2 in rabbit degenerated intervertebral disc fibrous ring and nucleus pulposus tissues

Liu Lin, Luo Wenyuan, Zhang Chao, Song Yuxin, She Wei

(Second Department of Orthopaedics, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To observe the expression of proteoglycan (PG), MMP-3, TIMP-2 in the rabbit degenerative intervertebral disc fibrous ring and nucleus pulposus tissues and to investigate their significance. **Methods** 42 New Zealand white rabbits were used for establishing the intervertebral disc degeneration model under the upright position and equally divided into the experimental group and the control group. The L₄₋₅ intervertebral disc tissues were taken in 7 rabbits per group at 4, 8, 12 weeks after modeling. The periodate Schiff (PAS) staining was adopted to detect PG in the nucleus pulposus and fibrous ring tissues with the grayscale value for expressing the relative expression quantity; the immunohistochemical SP method was adopted to detect MMPs-3 and TIMP-2 in the disc fibrous ring and nucleus pulposus tissues, with the mean optical density (MOD) value for expressing the relative expression quantity. **Results** The PG gray values in the nucleus pulposus tissue after 4, 8, 12 weeks in the experimental group and the control group model were higher than those in the fiber ring tissue ($P < 0.05$); the PG gray values in the nucleus pulposus and fiber ring tissue at 12 weeks were higher than those at 8 weeks, and at 8 weeks of modeling, the PG gray value in the nucleus pulposus was higher than that at 4 weeks ($P < 0.05$). As the time extension of modeling, the relative expression amounts of MMP-3 and TIMP-2 in the experimental group were significantly increased. The average MOD value of MMP-3 in the nucleus pulposus at the same time point in the control group and the experimental group was obviously higher than that of TIMP-2. The expression of TIMP-2 in the fibrous ring in the experimental group had more change than the expression of MMP-3. **Conclusion** During the intervertebral disc degeneration process, the change of PG content in the nucleus pulposus is earlier than that of the fibrous ring. The study of the MMP3/TIMP-2 role in the intervertebral disc degeneration in combination with the changes of nucleus pulposus PG may conduce to clinical diagnosis, gene therapy and the application of tissue engineering technique. Moreover regulating the expression level of MMPs and TIMPs for controlling the balance of intervertebral disc matrix metabolism could become the new direction for treating the intervertebral disc degeneration.

Key words: intervertebral disk; matrix metalloproteinase 3; tissue inhibitor of metalloproteinase-3; fibrous ring; nucleus pulposus; intervertebral disc degeneration

近年来研究发现,椎间盘基质的分解是椎间盘退变的一个主要特征,其中基质、胶原、蛋白多糖等是椎间盘的重要组成部分,并被椎间盘细胞产生的酶所降解。这些降解酶中最主要的是基质金属蛋白酶(MMPs)。其作用可表现为以下两个方面:翻译后对蛋白水解酶活性进行调节;激活酶类,通过和基质金

属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)结合,进一步对 MMPs 进行调节^[3]。但是,MMPs 及 TIMPs 对椎间盘退变的影响尚不清楚。本实验拟在建立兔椎间盘退变模型的基础上,观察退变椎间盘组织纤维环和髓核中蛋白多糖(PG)、MMP-3 和 TIMP-2 的表达变化。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 6 月龄普通级新西兰大白兔 42 只(影像学检查排除椎体先天性畸形和椎间盘病变),体质量(2.5±0.5)kg,雌雄不限,分为实验组和对照组,各 21 只。选择直径 110 mm、长 70 cm 的 PVC 管,将实验动物固定在 PVC 管中,实验组将 PVC 管直立,对照组将 PVC 管平放。将动物在管中连续固定 5 h/d,建立椎间盘退变模型。经 X 线检查实验动物脊柱发生退变,证实建模成功。分别于建模后 4、8、12 周各取 7 只动物的 L₄₋₅ 椎间盘组织。10% 甲醛溶液固定 24 h,经脱钙、脱水处理后,行矢状位取材,石蜡包埋后切片。

1.2 PG 的检测 用高碘酸-希夫(PAS)染色观察椎间盘中纤维环和髓核中的 PG。PAS 染色后细胞外基质中的 PG 呈紫红色^[4]。随机从每组 7 张组织切片中选取 1 张,在×100 视野下对纤维环和髓核随机选取 5 个不重复视野。采用 Image-Pro Plus6.0 软件进行分析处理,将灰度值阈值调为 0~255,以灰度值间接反映 PG 的相对含量(灰度值越高表明 PG 含量越低)。

1.3 MMP-3、TIMP-2 的检测 采用免疫组化 SP 法。鼠抗兔 MMP3 单克隆抗体、鼠抗兔 TIMP-2 单克隆抗体购自艾美捷科技有限公司,免疫组化 SP 试剂盒购自迈新生物技术公司。取两组椎间盘组织,石蜡 4 μm 切片后常规脱蜡至水化,3% 过氧化氢室温孵育 10 min,消除内源性过氧化物酶活性,微波修复抗原 3 min 后自然冷却,用正常羊血清工作液封闭 10 min,加入一抗稀释液 37℃ 孵育 3 h 后 PBS 冲洗 3 次,添加用生物素标记的二抗 37℃ 孵育 15 min 后 PBS 冲洗 3 次,添加辣根酶标记链霉卵白素工作液 37℃ 孵育 15 min 后 PBS 洗 3 次,DAB 显色,自来水充分冲洗,苏木精复染,PBS 冲洗返蓝,经梯度乙醇脱水干燥、透明中性树胶封片。从每组 7 张组织切片中随机选取 1 张,Olympus 光学显微镜×400 视野下对纤维环和髓核随机选取 5 个不重复视野拍摄照片,采用 Image-Pro Plus6.0 图像分析软件测定每张照片的平均光密度值(MOD)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内均数比较行 *t* 检验,组间均数比较予单因素方差分析(ANOVA)。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 建模不同时间两组椎间盘纤维环及髓核组织中 PG 的表达比较 髓核中染色呈紫红色的物质减少,经 4、8、12 周实验组和对照组相比较髓核的灰度值变化差异有统计学意义(P<0.05),且实验组、对照组内各造模时间段(4、8、12 周)髓核的灰度值变化差异也有统计学意义(P<0.05),见表 1。

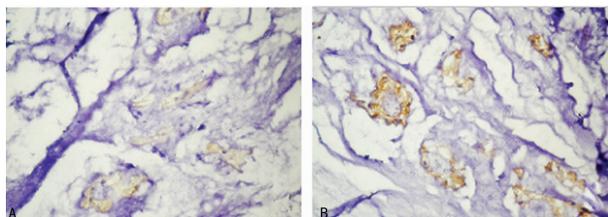
表 1 经 PAS 染色实验组及对照组髓核和纤维环中 PG 灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

时间	实验组		对照组	
	纤维环	髓核	纤维环	髓核
4 周	142.81±12.26	179.49±6.36 ^a	140.29±15.18	156.02±7.90 ^b
8 周	149.23±6.22	98.76±13.43 ^a	144.55±9.71	183.31±10.82 ^c
12 周	178.76±6.68	215.82±11.02 ^a	165.18±5.36	201.45±11.11 ^c

^a:P<0.05,与实验组纤维环平均灰度值相比较;^b:P>0.05;^c:P<0.05,与对照组纤维环平均灰度值比较。

2.2 MMP-3 和 TIMP-2 在椎间盘中的表达情况 MMP-3、TIMP-2 阳性为细胞质见棕色颗粒(图 1),在纤维环中(表 2),对照组中同一时间 MMP-3 和 TIMP-2 的平均 MOD 值比较,差异无统计学意义(P>0.05);随着造模时间的延长实验组各

时间段 TIMP-2 较 MMP-3 的平均 MOD 值差异明显(P<0.05),其中在 12 周时平均 MOD 值差异有统计学意义(P<0.01)。在相同组别不同时间段比较,对照组中 MMP-3 的平均 MOD 值在 8 周时无明显差异(P>0.05),在 12 周时平均 MOD 值较 8 周时发生明显变化(P<0.05);TIMP-2 的平均 MOD 值随着造模时间的延长变化明显,其中在 8 周时差异不明显(P<0.05),在 12 周时差异明显(P<0.01)。实验组中 MMP-3 随着造模时间的延长 MOD 值逐渐增大(P<0.05),而 TIMP-2 的平均 MOD 值在 8 周时相对 4 周无明显差异(P>0.05),在 12 周时平均 MOD 值明显增大(P<0.05)。



A:TIMP-2 蛋白;B:与 MMP-3 蛋白。

图 1 髓核组织中 TIM-P2 与 MMP3 的表达(SP×400)

表 2 MMP-3、TIMP-2 在实验组及对照组纤维环中平均 MOD 值的变化比较($\bar{x} \pm s$)

时间	实验组		对照组	
	MMP-3	TIMP-2	MMP-3	TIMP-2
4 周	0.014±0.002	0.024±0.005 ^a	0.008±0.003	0.012±0.002 ^b
8 周	0.018±0.004	0.030±0.006 ^a	0.013±0.003	0.015±0.002 ^b
12 周	0.023±0.004	0.038±0.003 ^c	0.017±0.007	0.024±0.003 ^b

^a:P<0.05,^c:P<0.01,与实验组 MMP-3 平均 MOD 值比较;^b:P>0.05,与对照组 MMP-3 平均 MOD 值比较。

在髓核中对 MMP-3、TIMP-2 比较平均 MOD 值(表 3)表明,在对照组及实验组同一时间点 MMP-3 和 TIMP-2 的平均 MOD 值比较差异有统计学意义(P<0.05)。在相同组别不同时间段进行比较结果表明随着时间的延长,对照组 MMP-3 及 TIMP-2 的平均 MOD 值在 8 周时差异无统计学意义(P>0.05),在 12 周时平均 MOD 值均增大明显(P<0.05);实验组 MMP-3 及 TIMP-2 的平均 MOD 值差异有统计学意义(P<0.05),且 MMP-3 在 12 周时平均 MOD 值增大差异明显(P<0.01)。

表 3 MMP-3、TIMP-2 在实验组及对照组髓核中平均 MOD 值的变化比较($\bar{x} \pm s$)

时间	实验组		对照组	
	MMP-3	TIMP-2	MMP-3	TIMP-2
4 周	0.042±0.006	0.012±0.005 ^a	0.010±0.005	0.002±0.001 ^b
8 周	0.057±0.011	0.027±0.009 ^a	0.018±0.004	0.005±0.004 ^b
12 周	0.076±0.009	0.044±0.014 ^a	0.025±0.006	0.014±0.004 ^b

^a:P<0.05,与实验组 MMP-3 比较;^b:P<0.05,与对照组 MMP-3 比较。

3 讨 论

本研究考虑到手术中取出的人类椎间盘可能会破坏其完整性,故选择用动物模型来观察完整椎间盘纤维环和髓核退变中 PG、MMP-3、TIMP-2 的表达变化。通过本实验发现,在椎间盘的退变过程中早期髓核中 PG 的变化明显快于纤维环。且不论实验组还是对照组髓核组织中 PG 均较纤维环组织中

变化明显。有研究表明,人类椎间盘退变早期改变表现为 PG 聚合体数量的减少以及髓核的脱水^[6],多种因素导致的椎间盘组织学中改变首先影响终板,其次是髓核,最后是纤维环^[7],本研究结果与以上研究结论相一致。

本研究发现,随着造模时间的延长,对照组及实验组同一时间点髓核中 MMP-3 的表达明显高于 TIMP-2。且随着建模时间的延长实验组中 MMP-3 和 TIMP-2 的表达均增加明显。对照组同一时间点随着造模时间的延长纤维环中 MMP-3 和 TIMP-2 的平均 MOD 值比较差异无统计学意义($P>0.05$);实验组随着造模时间的延长各时间段 TIMP-2 较 MMP-3 的表达变化明显。该结果提示在椎间盘退变的过程中 MMP-3 和 TIMP-2 在椎间盘的纤维环和髓核中表达不同,其中 MMP-3 主要在髓核中表达,而 TIMP-2 主要在纤维环中表达。这可能和其所起的作用不同有关。髓核内细胞在胚胎为脊索样细胞,在健康成人主要以软骨样细胞为主,合成 II 型胶原和 PG。纤维环中为梭形的类成纤维细胞,主要合成 I 型胶原。PG 及核心蛋白的表达在髓核最高,由内向外逐渐减弱,在椎间盘退变过程中,PG 逐渐被富含胶原组织的纤维组织所替代,最后导致髓核纤维化,水分随之丧失。而 MMP-3 作为一种基质降解酶,其作用底物范围广,其主要作用底物是基质中 PG 和糖蛋白^[8]。MMP-2 作为一种明胶酶,和胶原酶共同在纤维环中降解胶原,而 TIMP-2 在纤维环中的高表达,可能和 TIMP-2 在组织中可以 1:1 以非共价键形式与活化的 MMP-2 形成复合物,有效地抑制 MMP-2 的胶原分解活性及明胶活性有关^[9]。

因此,对 MMP-3、TIMP-2 在椎间盘退变中所起作用的研究结合髓核 PG 的变化可能会对临床诊断、基因治疗和组织工程技术的应用有一定帮助。但是细胞因子作为一种复杂的网络系统,还需要进一步深入研究其相互之间的作用机制。

参考文献:

[1] Paesold G, Nerlich AG, Boos N. Biological treatment

strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings[J]. Eur Spine J, 2007, 16(4): 447-468.

- [2] Gomis-Rüth FX. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases[J]. J Biol Chem, 2009, 284(23): 15353-15357.
- [3] Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis[J]. Semin Cancer Biol, 2000, 10(6): 415-433.
- [4] 董妙珠,肖萍,叶于薇,等. PAS、AB 染色法在软骨蛋白多糖检测中的运用[J]. 上海预防医学, 2004, 16(9): 419-420.
- [5] 于萍,步宏,王华,等. 免疫组化结果的图像分析与人工计数方法的对比研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2003, 20(2): 288-290.
- [6] Nguyen AM, Johannessen W, Yoder JH, et al. Noninvasive quantification of human nucleus pulposus pressure with use of T1rho-weighted magnetic resonance imaging [J]. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(4): 796-802.
- [7] Leung VY, Tam V, Chan D, et al. Tissue engineering for intervertebral disk degeneration [J]. Orthop Clin North Am, 2011, 42(4): 575-583.
- [8] Roberts S, Caterson B, Menage J, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc [J]. Spine, 2000, 25(23): 3005-3013.
- [9] Tim Yoon, Nilpesh M, Patel S. Molecular therapy of the intervertebral disc [J]. Eur Spine J, 2006, 15 Suppl 3: S379-388.

(收稿日期:2013-11-09 修回日期:2014-02-15)

《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB 3358-1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 M(QR) 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要清楚区分百分率和百分比。

4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对于具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达:应写明采用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体指(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P>0.05, P<0.05$ 和 $P<0.01$ 3 种表达方式,无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时,再给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间。