

·基础研究·

基质金属蛋白酶组织抑制因子-2在退变腰椎间盘突出髓核与纤维环组织的表达及意义

张 博¹ 杨少华^{1,2} 林世洲¹ 陈 微¹

摘要

目的:测定基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(TIMP-2)在退变椎间盘组织标本髓核与纤维环细胞中的表达,探讨其在椎间盘退变中的意义。

方法:选取腰椎间盘突出症患者手术摘除椎间盘标本30例,分离椎间盘标本髓核与纤维环组织,设为实验组。创伤致腰椎椎体骨折经手术摘除椎间盘组织标本10例作为对照组。采用免疫组织化学法检测两组椎间盘组织标本髓核与纤维环细胞中TIMP-2的表达。

结果:TIMP-2在椎间盘组织标本髓核与纤维环细胞的表达中,实验组阳性率多于对照组($P<0.01$);在髓核细胞中的表达要强于纤维环,而且不同退变程度的表达也不同,TIMP-2在突出型中的表达较正常对照组组织标本中的表达增高($P<0.01$),TIMP-2在脱出型和游离型组织标本中的表达较突出型有所增高($P<0.01$)。

结论:实验组椎间盘髓核与纤维环细胞中TIMP-2表达程度与椎间盘退变程度呈正相关;TIMP-2参与了人类腰椎间盘突出组织的退变过程,TIMP-2可能作为MMPs的一个重要调节因素,与MMPs相互协调。

关键词 椎间盘退变;基质金属蛋白酶;基质金属蛋白酶抑制剂-2

中图分类号:R681.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2013)-04-0330-04

Expressions of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in the degenerative lumbar intervertebral disc/
ZHANG Bo,YANG Shaohua, LIN Shizhou, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(4):
330—333

Abstract

Objective:To observe the expressions of tissue inhibitor of metalloproteinase-2(TIMP-2) in the nucleus pulposus cells and the fibrous ring cells of degenerated intervertebral disc.

Method:Immunohistochemistry assay were used to detect the expressions of TIMP-2 in nucleus pulposus cells and fibrous ring cells in 40 patients with lumbar disc protrusion. Thirty cases with lumbar disc protrusion were recruited in experimental group and ten cases with lumbar fracture by trauma were in control group.

Result:The expressions of TIMP-2 in nucleus pulposus and fiber rings was more in experimental group than control group($P<0.01$); and the expressions in nucleus pulposus were superior to that in fiber rings,There were significant differences in TIMP-2 expression levels between the sequestration and transligamentous extrusion,between the extrusion and protrusion, between the control group and protrusion($P<0.01$).

Conclusion:The expressions of TIMP-2 in the disc nucleus pulposus and fiber ring cells were positively correlated with disc degeneration;TIMP-2 might participate in the degeneration of human intervertebral discs and coordinate each other. They were very important in the degeneration of cartilage in disc degeneration.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine,Affiliated Hospital of Guilin Medical College,Guilin,541004

Key word disc degeneration; matrix metalloproteinase; tissue inhibitor of metalloproteinase-2

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.04.011

1 桂林医学院附属医院康复医学科,广西壮族自治区桂林市,541004; 2 通讯作者

作者简介:张博,男,住院医师; 收稿日期:2011-11-22

椎间盘突出症是导致腰背疼痛的一个重要因素,在以往的研究中,我们发现在椎间盘细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的表达关系是处于合成代谢与分解代谢的一种平衡关系,由于基质成份的表达变化造成了两者之间关系的失衡,从而造成椎间盘组织中髓核水份及其固有弹性的丧失,通过一系列相互作用关系导致椎间盘生物力学功能的减退,从而出现椎间盘的退变^[1]。基质金属蛋白酶为ECM降解的重要细胞因子,基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMPs)则为基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的特异性拮抗剂,一般情况下,椎间盘组织中MMPs与TIMPs的表达关系始终保持着一种平衡状态,两者之间的相互作用关系决定细胞基质是合成代谢还是分解代谢。在影响细胞基质降解的诸多因素中,MMPs和TIMPs的表达失衡是导致基质过度降解的根本原因^[2]。近年MMPs与TIMPs的相互关系在椎间盘退变进展中研究较多,而TIMP-2在椎间盘退变中相互作用机制的研究并不多见。本文通过检测人腰椎间盘组织髓核和纤维环细胞中TIMP-2的表达,探讨其在腰椎间盘退变产生、发展中的相互作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

实验组:挑选2010-2011年腰椎间盘突出症患者住院经手术治疗后取得的30例椎间盘组织,选取标准:年龄22—50岁,病程2个月—3年,其中在医院放射科MRI诊断下把病例分成突出型、脱出型、游离型各10例,并在手术暴露过程中得以术中确认诊断,取材部位:L3—S1椎间盘组织,在平时生活中无吸烟、偶有饮酒,入院常规检查排除患有高血压病、糖尿病、肝炎、结核、肿瘤等患者。对照组:同期意外创伤致腰椎椎体骨折经手术摘除椎间盘组织标本10例,选取标准:年龄20—40岁,取材部位:L1—L5椎间盘组织。对照组纳入标准:意外创伤致腰椎骨折,自诉术前无腰腿疼痛病史,其入院后MRI中TW2椎间盘组织信号为高信号,为判定退变椎间盘分型划分的标准^[3],同样排除患有高血压病、糖尿病、肝炎、结核、肿瘤等患者。

1.2 标本采集及处理

椎间盘突出症患者同意手术治疗经髓核摘除术后,术前、术中经分型将取出的椎间盘组织归类于实验组,分别用生理盐水冲洗3遍,洗去表面血液,即刻放到冰块保温箱带回病理科,在病理科有经验老师指导下分离椎间盘中纤维环与髓核组织,随后立即置于10%中性甲醛中固定48h,常规脱水后采用石蜡包埋组织,连续切片厚4、5 μ m。对照组标本取材于腰椎后路行减压内固定术所摘除椎间盘组织,标本处理方式与实验组相同。

1.3 方法

1.3.1 试剂与抗体:兔抗人MMP-1多克隆抗体原液,兔抗人TIMP-2多克隆抗体原液,二抗为武汉博士德生物有限公司出品。

1.3.2 切片染色制作方法:①60℃烤箱烤片3h;②二甲苯、梯度乙醇脱蜡水化;③柠檬酸盐高温煮沸25min作抗原修复;④滴加内源性过氧化物酶阻断剂,PBS液冲洗3min,共3次;⑤滴加一抗(稀释浓度均为1:100),37℃孵育1h,PBS液冲洗3min,共3次;⑥滴加生物素标记的二抗,PBS液冲洗3min,共3次;⑦显色剂显色,苏木素复染,常规脱水、烘干、封片,镜下观察。

1.3.3 阳性细胞计数评价^[4]:TIMP-2免疫组织化学染色分析:所有染色切片均由富有经验的实验室老师在同一条件下用光学显微镜采用双盲法阅片,确定细胞总数及阳性表达的细胞数。TIMP-2在组织标本中的表达结果判定标准:TIMP-2在椎间盘组织的阳性表达为棕黄色颗粒,主要存在于细胞浆。用光学显微镜检查显色反应,采用半定量方法:随机选取10个视野内阳性软骨细胞总数 $\div$ 软骨细胞总数 $\times 100\%$ 以计算阳性细胞百分数。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,对计数资料进行显著性检验及相关性分析。所得数据用均数 $\pm$ 标准差表示,组间相关性分析根据多重比较方法进行检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

所采集标本均经组织学HE染色后在光镜下分析:椎间盘组织标本中髓核细胞的形态近似圆形或

椭圆形,纤维环细胞的形态近似梭型,对照组中椎间盘组织纤维环经HE染色后镜下观察示仍保持着致密的板层结构,实验组中的椎间盘组织镜下观察则多呈纤维化样改变(见图1)。TIMP-2在实验组和对照组在髓核组织中的表达:TIMP-2在实验组和对照组均有阳性表达,阳性率分别为90%和20%,两组差异显著($P<0.01$);TIMP-2在实验组和对照组在纤维环组织中的表达:TIMP-2在实验组和对照组的阳性表达阳性率分别为83.3%和20%,两组差异显著($P<0.01$),如图2—3。结果提示TIMP-2在髓核中的表达要高于纤维环,而且不同退变程度的表达也不同。TIMP-2在实验组退变的椎间盘中的表达显著高于对照组($P<0.01$),而且不同退变程度的表达也不同($P<0.01$),统计学分析均有显著差异。

椎间盘髓核和纤维环组织突出型中的TIMP-2的表达较对照组组织中的表达增高($P<0.01$),椎间盘髓核和纤维环组织脱出型中和游离型标本的TIMP-2的表达均较突出型增高($P<0.01$),见表1。

表1 TIMP-2在对照组与实验组髓核、纤维环中免疫组织化学染色的表达比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

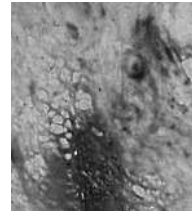
组别	例数	TIMP-2 表达($\bar{x}\pm s, \%$)	
		髓核	纤维环
对照组	10	3.05 ± 1.39	2.33 ± 1.26
突出型组	10	4.70 ± 1.44	4.28 ± 1.32
脱出型组	10	5.81 ± 2.33	5.14 ± 1.63
游离型组	10	7.96 ± 1.60	7.27 ± 2.88
F值		13.467	11.704
P值		≤ 0.01	≤ 0.01

3 讨论

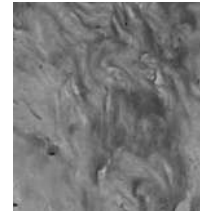
椎间盘组织的成份主要由胶原蛋白多糖、非胶原蛋白、细胞成份及大部分水组成^[5],椎间盘中的蛋白多糖可与胶原或弹性蛋白相结合形成稳固的结构,具有黏合润滑及缓冲外界压力的作用,并具有亲水性,对保持椎间盘组织中水份的含量有重要作。腰椎间盘的退变发生时间较早,大约开始于16—20岁,椎间盘长期高负荷受力等因素可加速退变进程^[6],当椎间盘发生退变时相关研究表明,髓核在维持椎体的正常形态、椎间盘生物力学传导、缓冲应力重新分布^[7]及椎间盘营养、代谢过程中起重要作用^[8];髓核水份丢失、代谢异常等是退变椎间盘ECM的主要生化变化,MMPs是细胞外基质降解过程中主要

图1 实验组退变椎间盘标本及对照组椎间盘标本

(HE染色, $\times 400$)



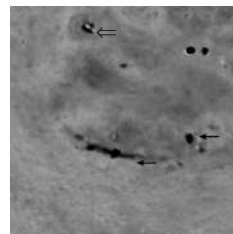
实验组退变椎间盘标本
纤维环裂隙形成及黏液样变性



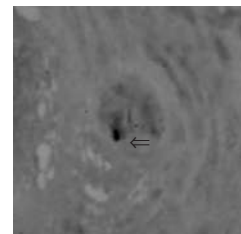
对照组椎间盘标本
纤维环仍保持着致密的板层结构

图2 TIMP-2在对照组椎间盘髓核、纤维环中免疫组织化学染色

($\times 400$)



空心箭头为TIMP-2在对照组椎间盘髓核中免疫组织化学染色的阳性表达

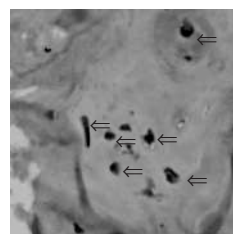


空心箭头为TIMP-2在对照组椎间盘纤维环中免疫组织化学染色的阳性表达

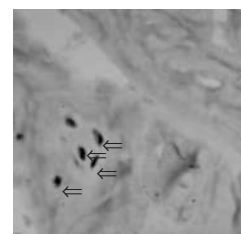
对照组中视野内见少量椎间盘细胞胞浆见棕黄色颗粒,胞膜淡黄染

图3 TIMP-2在实验组椎间盘髓核、纤维环中免疫组织化学染色

($\times 400$)



空心箭头为TIMP-2在实验组椎间盘髓核中免疫组织化学染色的阳性表达



空心箭头为TIMP-2在实验组椎间盘纤维环中免疫组织化学染色的阳性表达

实验组中视野内有多量甚至大量椎间盘细胞胞浆见棕黄色颗粒,胞膜黄染

细胞因子,几乎能够降解多糖以外的所有细胞外基质成分,它还可以激活其他MMPs产生连锁放大效应,而TIMP则是MMPs的特异性和内源性抑制因子之一,可以非共价结合的方式与有活性的MMPs1:1稳定结合而发挥作用^[9]。同时,TIMP还有抑制细胞凋亡,刺激增殖的作用^[10]。

本实验中,实验组与对照组的椎间盘组织

TIMP-2 阳性表达差异明显,实验组椎间盘组织 TIMP-2 阳性表达的程度随椎间盘退变的程度呈正相关,如图 2,显示为:突出型<脱出型<游离型。说明椎间盘突出的程度的影像学分型与实验表达结果是相符,且在髓核中的含量表达要高于纤维环,提示髓核的退变程度高于纤维环的可能。从以往的相关研究^[7]证实 MMPs 与人椎间盘退变有关,椎间盘退变主要表现为细胞外基质的变化,MMP5 通过影响基质合成及降解导致基质成分紊乱及功能的改变在椎间盘退变中发挥作用 MMPs 表达加强可表现在椎间盘组织的过度破坏,引起椎间盘基质的降解和蛋白多糖含量下降,使其组成成份和胶原类型的发生改变,从而破坏纤维环的结构,最终导致椎间盘组织中髓核突出。本研究 TIMP-2 在实验组与对照组椎间盘均有表达,且在髓核中的含量要强于纤维环。实验组 TIMP-2 阳性率高于对照组,可能与椎间盘退变过程中 MMPs 降解作用刺激 TIMP-2 升高有关,而 TIMP-2 则起保护作用,说明 TIMP-2 参与 MMP-TIMP 复合体的工作,起到抑制 MMPs 的作用。结合以往的研究我们认为在椎间盘组织中,MMPs 与 TIMP-2 可能处于一种动态平衡关系,随着退变的椎间盘中 MMPs 表达的增加,TIMP-2 的表达反馈性增加,抑制 MMPs 对椎间盘基质的降解,从而延缓椎间盘退变。随着 MMPs 的表达不断增加,TIMP-2 失代偿,两者平衡被打破后,TIMP-2 失去对 MMPs 的抑制,导致椎间盘退变的发展。

综上所述,对退变椎间盘组织中的 TIMP-2 表达的研究,提示椎间盘组织中 MMPs/TIMP-2 表达失衡,可能是基质降解是导致椎间盘发生组织学退变的原因之一,从而在椎间盘退变中扮演重要角色。同时是否可通过调节 MMPs 和 TIMPs 的表达水平来

控制椎间盘基质代谢,为临床治疗椎间盘突出症提供一种新的探索途径。有关这方面的问题还需我们更进一步的研究。

参考文献

- [1] Sakai D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease[J]. Eur Spine J, 2008, 17(Suppl 4):452—458.
- [2] 李振华, 智春升, 谢林. 基质金属蛋白酶与腰椎间盘退变的研究进展[J]. 中国医疗前沿, 2008, (6):11—12.
- [3] 吴剑宏, 阮狄克. 腰椎间盘退变的 MRI 诊断分级及其临床应用进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(6):511—515.
- [4] Habermariam A, Gronblad M, Virri J, et al. A comparative immunohistochemical study of inflammatory cells in acute-stage and chronic-stage disc herniations[J]. Spine, 1998, 23: 2159—2166.
- [5] 魏波, 宋丽君, 李康华. 细胞因子对退变椎间盘成份的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 10(12):1225—1227.
- [6] Samartzis D, Karppinen J, Chan D, et al. The association of lumbar intervertebral disc degeneration on MRI in overweight and obese adults: A population-based study[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(5):1488—1496.
- [7] Li FC, Zhang N, Chen WS, et al. Endplate degeneration may be the origination of the vacuum phenomenon in intertebral discs[J]. Med Hypotheses, 2010, 75(2):169—171.
- [8] Gruber HE, Gordon B, No. on HJ, et al. Analysis of cell death and vertebral end plate bone mineral density in the annulus of the aging sand rat[J]. Spine, 2008, 8(3):475—481.
- [9] 胡有谷. 腰椎间盘突出症[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2003.166—173.
- [10] Wurtz S, Schrohl AS, Srensen NM, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in breast cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2005, 12(2):215—227.
- [11] Le Maitre CL, Pockelt A, Buttle DJ, et al. Matrix synthesis and degradation in human intertebral disc degeneration[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 4):652—655.