

持久脊柱负荷与椎间盘组织中 MMP-2 表达关系的研究

李俊杰 刘 亚[△] 邱玉金 田云虎 李 坤

(潍坊医学院附属医院 山东 潍坊 261042)

摘要 目的:建立一压力可控型椎间盘退变模型,并探讨持久的脊柱负荷对椎间盘 MMP-2 表达的影响。方法:选用 54 只成年 Wistar 大鼠随机分为三组,分别模拟人类在站立(A 组 1.12N)、坐位直立(B 组 1.68N)、坐位前屈(C 组 3.08N)三种状态下椎间盘内的负荷情况,给予大鼠尾椎 Co9/10 椎间盘恒定压力加压,以相邻 Co8/9 椎间盘不加压作为对照(D 组)。三组分别在 3、7、14 天后取受压及对照椎间盘标本,进行 HE 染色组织学观察及免疫组织化学分析,观察椎间盘退变情况及 MMP-2 在椎间盘组织中的含量变化。结果:随时间与压力的增加,椎间盘组织学评分与 MMP-2 表达增高($P<0.05$),MMP-2 表达与椎间盘退变程度成正相关($r=0.870$, $P<0.05$)。结论:持久的脊柱负荷可引起椎间盘退变及 MMP-2 表达增加,MMP-2 可能在椎间盘退变的过程中发挥重要作用。

关键词 椎间盘退变;模型;生物力学;MMP-2

中图分类号:Q95-3 R68 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)14-2730-04

Relationship Between Prolonged Spinal Loading and Expression of MMP-2 in Intervertebral Discs

LI Jun-jie, LIU Ya[△], QIU Yu-jin, TIAN Yun-hu, LI Kun

(The Affiliated Hospital of Wei Fang Medical College Shandong Weifang 261042 China)

ABSTRACT Objective: To establish an in vivo mouse model of compression-control degeneration and to investigate the effects of prolonged mecnal loading on MMP2. **Methods:** A total of 54 adult Wistar rats were randomly divided into three groups, group A: the pressure was 1.12N (simulating human pressure of the disc when human stand), group B: the pressure was 1.68N (simulating human sitting), group C: the pressure was 3.08N (simulating human sitting flexion). Group D: control group without any pressure to the disc. Static compression was applied to mouse coccygeal discs in vivo for 3, 7, or 14 days. The expression of MMP-2 in four groups were detected by immunohistochemical technique. **Results:** The degeneration of disc and the expression of MMP-2 increased with the increasing of the time and pressure ($P<0.05$), and a positive correlation was observed between the degeneration grade of disc and the amount of MMP-2 ($r=0.870$, $P<0.05$). **Conclusion:** Prolonged spinal loading cause the disc degeneration and the increasing expression of MMP-2, MMP-2 may be one of the important factors leading to intervertebral disc degeneration.

Key words: Disc degeneration; Model; Biomechanics; MMP-2

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R68 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)14-2730-04

前言

椎间盘退变是下腰痛的主要原因之一^[1],其发生是多种因素综合作用的结果,其中异常生物力学因素是诱发和促进椎间盘退变的主要因素之一^[2],椎间盘疾病的发生与人类脊柱长时间处于异常应力环境有关。因此,本研究在大鼠尾椎上安装一恒定加压装置,分别模拟人类在站立、坐位直立、坐位前屈三种常见状态下椎间盘的压力情况,施加压力于大鼠尾椎,间接增加椎间盘负荷。取不同时间段观察受压椎间盘的退变情况及 MMP-2 的含量变化情况,探讨不同的压力及时间与椎间盘退变和 MMP-2 表达的关系,揭示持久脊柱负荷与 MMP-2 表达的关系及 MMP-2 与椎间盘退变的关系。

1 材料与方法

作者简介:李俊杰(1983-)男,硕士研究生,主要研究方向:脊柱外科学 E-mail: lijunjie8398@yahoo.com.cn Tel: 13516367153
△通讯作者:刘亚,男,教授,硕士生导师 E-mail: qiuhaoliu@163.com
(收稿日期:2011-01-29 接受日期:2011-02-23)

1.1 实验动物与分组

将 54 只成年 Wistar 雄性大鼠随机分为 A、B、C 三组,根据人类椎间盘面积与大鼠椎间盘面积的大小,将人类在站立、坐位直立、坐位前屈三种状态下椎间盘内的压力换算为大鼠的椎间盘压力(人的椎间盘面积约为 1250mm²,典型大鼠椎间盘约为 2.8 mm²,人类在站立位时椎间盘内压力为 500N,坐位时为 750N,坐位前屈时为 1350N,换算成大鼠椎间盘的压力分别是 1.12N, 1.68N, 3.08N),分别施加于三组。

1.2 动物模型建立及取材

54 只 Wistar 大鼠术前定位尾椎并标记,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,麻醉成功后尾部清洁,去除表面皮屑。大鼠俯卧位固定四肢及鼠尾,防止鼠尾在穿刺时滚动。消毒后以自制钢针经皮垂直穿刺第 8、9、10 尾椎椎体中部,以经校正的弹力带给予 Co9/10 椎间盘恒定压力,其中 A 组给以 1.12N, B 组给予 1.68N, C 组给予 3.08N, Co8/9 椎间盘不加压作为对照组 D 组。分别于第 3、7、14 天每组随机抽取 4 只大鼠处死,取椎间盘标本进行观察。大鼠处死后完整取 Co8/9 及 Co9/10 椎间盘,4%

多聚甲醛固定 24 小时,5%硝酸脱钙 3 天。常规处理后石蜡包埋切片,制备制备 5μm 的组织切片,行 HE 染色和待免疫组织化学检查。

1.3 MMP-2 免疫组织化学分析

MMP-2 购自武汉博士德生物有限公司,PV-9000 二步法免疫组化检测试剂盒购自中杉金桥生物有限公司。具体步骤如下:①脱蜡,水化组织切片。②3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶。③0.01M 柠檬酸盐缓冲液 92~98℃

抗原修复 20 分钟。④滴加一抗,一抗按说明书 1:100 比例稀释,4℃过夜。PBS 冲洗,2 min× 3 次。⑤滴加试剂 1,37℃孵育 20 min,PBS 冲洗 2 min× 3 次。⑥滴加试剂 2,37℃孵育 30 min;PBS 冲洗 2 min× 3 次。⑦显色剂显色(DAB 试剂盒)。自来水充分冲洗,复染,脱水,透明,封片。

1.4 结果判定

1.4.1 组织学观察结果 光镜下观察椎间盘形态变化,运用组织学评分量表对切片进行组织学评分^[3]。

表 1 组织学分级量表*
Table 1 Histological Grading Scale*

Histological changes of the intervertebral disc		Grade
Morphology of the annulus fibrosus	Well-organized collagen lamellae without ruptured or serpentine fibers	1
	Inward bulging, ruptured or serpentine fibers in less than one third of the annulus	2
	Inward bulging, ruptured or serpentine fibers in more than one third of the annulus	3
Cellularity of the annulus fibrosus	Fibroblasts comprise more than 75% of the cells	1
	Neither ?broblasts nor chondrocytes comprise more than 75% of the cells	2
	Chondrocytes comprise more than 75% of the cells	3
Border between the annulus fibrosus and nucleus pulposus	Normal, without any interruption	1
	Minimal interruption	2
	Moderate or severe interruption	3
Cellularity of the nucleus pulposus	Normal cellularity with stellar shaped nuclear cells evenly distributed throughout the nucleus	1
	Slight decrease in the no. of cells with some clustering	2
	Moderate or severe decrease (>50%) in the number of cells with all the remaining cells clustered and separated by dense areas of proteoglycans	3
Morphology of the nucleus pulposus	Round, comprising at least half of the disc area in midsagittal sections	1
	Rounded or irregularly shaped, comprising one quarter to half of the disc area in midsagittal sections	2
	Irregularly shaped, comprising less than one quarter of the disc area in midsagittal sections	3

注: * 五项得分相加即为组织学评分,其中正常椎间盘 5 分,严重退变椎间盘 15 分

Note: * The scale is based on 5 categories of degenerative changes with scores ranging from 5 points (1 in each category) for a normal disc to 15 points (3 in each category) for a severely degenerated disc.

1.4.2 免疫组织化学结果判定 光镜下阅片,双盲法计数阳性细胞,统一染色结果判定标准,及细胞浆内见棕黄色颗粒的细胞即列为阳性细胞,每张切片随机选择 10 个高倍视野(High-power fields,HPFs),对每个视野的阳性细胞和总细胞数进行计数,得出每个样本细胞阳性表达率(总阳性细胞数/总细胞数 10HPFs),最后记算总体细胞阳性率。

1.5 统计学分析

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学结果

组织学检测见造模各组椎间盘标本表现出随时间及压力

进展的退变过程,对其进行组织学评分见表 2。A、B、C 三组椎间盘组织学评分分别在第 14、7、3 天开始与对照 D 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。B、C 两组不同时间点之间差异有统计学意义($P<0.05$)。如图 1 模型组别表现出随时间进展的退变过程,C 组退变明显,而 B 组退变相对较缓,A 组仅在第 14 天时与 D 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 免疫组织化学结果

MMP-2 免疫组织化学检测见第 3 天时 A、B、C 三组与对照 D 组之间比较 MMP-2 含量差异无统计学意义($P>0.05$);第 7 天时 B、C 两组椎间盘 MMP-2 含量比对照 D 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。A 组 MMP-2 含量无明显变化($P>0.05$);第 14 天时 B、C 两组 MMP-2 含量与对照 D 组相比均增加($P<0.05$)。A 组 MMP-2 含量变化与对照组相比较无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 各时间点组织学评分
Table 2 The histological grading at different point-in-time

Time	Group A	Group B	Group C	Group D
3 days	5.83± 0.75*	6.00± 1.10*	7.50± 1.05 [#]	5.67± 0.52
7 days	6.00± 0.89*	7.67± 0.52 [#]	10.50± 1.22 [#]	5.83± 0.75
14 days	6.83± 1.17 [#]	9.17± 1.17 [#]	13.17± 0.75 [#]	5.50± 0.55

注 * 与同一时间点对照组相比 P>0.05 Note: *the group compared with control group at the same point-in-time P>0.05 ;
注 # 与同一时间点对照组相比 P<0.05 Note: #the group compared with control group at the same point-in-time P<0.05

表 3 各时间点 MMP-2 阳性率
Table 3 The positive rate of MMP-2 at different point-in-time

Time	Group A	Group B	Group C	Group D
3 days	20.04± 2.92*	20.82± 2.44*	22.07± 2.75*	19.67± 1.95
7 days	23.55± 2.09*	26.29± 1.97 [#]	32.52± 2.46 [#]	22.15± 3.35
14 days	23.65± 1.17 [#]	41.19± 2.56 [#]	50.65± 3.30 [#]	22.43± 1.02

注 * 与同一时间点对照组相比 P>0.05 Note: *the group compared with control group at the same point-in-time P>0.05 ;
注 # 与同一时间点对照组相比 P<0.05 Note: #the group compared with control group at the same point-in-time P<0.05

2.3 MMP-2 表达与椎间盘退变程度关系

MMP-2 表达与椎间盘退变程度成正相关 r=0.870 P<0.05。

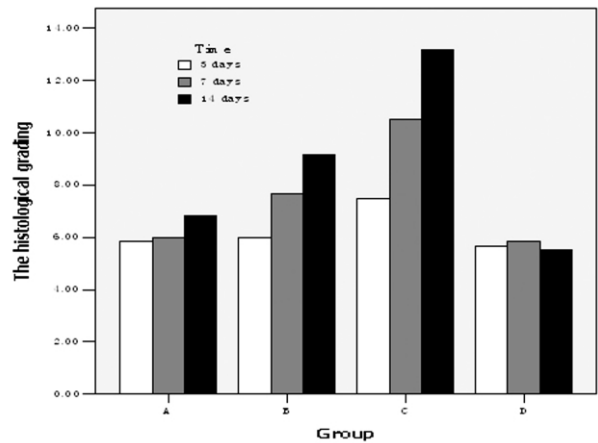


图 1 不同时间及压力下的椎间盘组织学评分

Fig.1 The histological grading at different point-in-time and under the different load

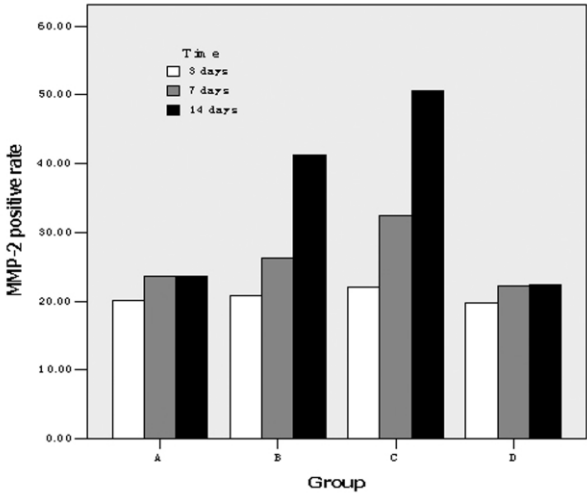


图 2 不同时间及压力下椎间盘组织中 MMP-2 阳性率

Fig.2 The positive rate of MMP-2 at different point-in-time and under the different load

3 讨论

椎间盘退变的病因、发病机制及如何早期发现并采取积极有效的措施 ,一直是近年来的研究热点 ,而选用一种可靠的、与人类相关性及其可比性均较强的椎间盘退变动物模型 ,可为椎间盘退变性疾病的深入研究 :如发病机制 ,治疗作用机制等提供良好的实验载体。本次实验通过模拟正常人类在站立、坐位、坐位前屈这三种最常见姿势下对椎间盘的不同压力设计了椎间盘退变模型作为实验载体 ,探讨长期负荷对 MMP-2 表达的影响及 MMP-2 与椎间盘退变程度的关系。椎间盘是一个高度特异的结构 ,包括纤维环、髓核和二者之间的移行带。外层的纤维

环富含抗张力作用的胶原 ,内层的髓核包含大量的蛋白多糖 ,蛋白多糖含有大量水份 ,借以抵抗压力。腰椎间盘突出产生的机制主要有力学机制(机械性作用)和化学机制(炎性介质和细胞因子作用)两种。力学机制如机械性压迫等常被认为是腰椎间盘突出退变的直接原因 ,但越来越多的研究表明椎间盘突出退变的出现不仅有生物力学的机械性作用 ,而且炎性介质和细胞因子作用等化学机制的作用更为突出^[4]。一般认为 ,椎间盘突出退变最重要的病理基础是椎间盘细胞数量减少及椎间盘细胞外基质的降解^[5] ,而椎间盘细胞外基质的主要成份就是 Ⅱ型胶原和蛋白多糖^[6]。退变椎间盘细胞外基质的主要变化是 Ⅱ型胶原和蛋白多糖含量的减少、Ⅰ型胶原含量的增加 ,引起载负能力的下降^[7]。细

胞外基质合成和分解代谢的失衡在椎间盘退变的发生发展中起着重要的作用^[8],其中,异常或过量的基质金属蛋白酶出现是其重要原因^[9-10],椎间盘细胞通过保持合成代谢和分解代谢的平衡来调节椎间盘组织内环境的稳态。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一种重要的基质降解酶,是调节细胞外基质动态平衡重要的酶类^[11]。MMPs 家族是一个结构中含有金属离子 Zn^{2+} 的蛋白水解酶类^[12]。MMPs 按其结构和底物特异性可以分为胶原酶、明胶酶、基质溶解酶、膜型 MMPs 等几个亚群^[13]。MMP2 属于明胶酶类,主要作用 I、V、X、型胶原,以及纤维结合蛋白、弹性蛋白和蛋白多糖。在生理条件下,MMP-2 以酶原形式存在,在某些疾病状态下表达明显增高。本研究结果显示,在人体常见姿势下,随着椎间盘受压的压力增大,时间增长,椎间盘组织学分级升高--即椎间盘退变明显,椎间盘组织中 MMP2 的表达亦增高。Alon^[14]等研究发现椎间盘细胞凋亡的数目与所受应力负荷的大小时间成正相关,Wang DL 认为过高或过低的应力可诱导基质溶解酶类如金属蛋白酶和 NO 等细胞因子产生,它们可作用于蛋白多糖和胶原,促进基质的降解^[15]。我们的研究结果证实了上述观点。本研究发现,长期的异常脊柱负荷与 MMP2 的表达成正相关,MMP2 在椎间盘组织中的含量与椎间盘退变程度成正相关。因此可以认为,长期的异常脊柱负荷可加强 MMP2 的表达,影响细胞外基质的成分变化,MMP2 可能在椎间盘退行性变的发生发展过程中发挥重要作用。

参考文献(References)

- [1] Brisby H. Pathology and possible mechanisms of nervous system response to disc degeneration[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(suppl 2): 68-71
- [2] Taylor TK, Melrose J, Burkhardt D, et al. Spinal biomechanics and aging are major determinants of the proteoglycan metabolism of intervertebral disc cells[J]. Spine, 2000,25:3014-3020
- [3] Han B, Zhu K, Li F C, et al. A simple disc degeneration model induced by percutaneous needle puncture in the rat tail [J]. Spine, 2008, 33 (18):1925-1934
- [4] Kang JD, Georgescu HI, McIntyre LL, et al. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric

- oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. [J]. Spine, 1996, 21 (3): 271-277
- [5] Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y, et al. Immunohistochemical study of Matrix Metalloproteinase-3 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Human Intervertebral Discs[J]. Spine, 1996,21:1-8
- [6] Ravesloot JH, van Houten RJ, Ypey DL, et al. High-conductance anion channels in embryonic chick osteogenic cells [J]. J Bone Miner Res, 1991,6(4):35
- [7] Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? [J]. Spine, 2006,31(18):2151-2161
- [8] Sedowofia KA, Tomlinson IW, Weiss JB, et al. Collagenolytic enzyme systems in human intervertebral disc: their control, mechanism and their possible role in the initiation of biomechanical failure [J]. Spine, 1982,7(3):213-222
- [9] Kozaci LD, Guner A, Oktay G, et al. Alterations in biochemical components of extracellular matrix in intervertebral disc herniation: role of MMP-2 and TIMP-2 in type collagen loss [J]. Cell Biochem Funct, 2006,24(5):431-436
- [10] Sobajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, et al. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction [J]. Spine J, 2005,5(1): 14-23
- [11] Yanamaka H, Makino K, Takizawa M, et al. Expression and tissue localization of membrane-types 1,2, and 3 matrix metalloproteinases in rheumatoid synovium [J]. Lab Invest, 2000,80(5):677-687
- [12] Cawston TE, Billington C. Metalloproteinase in the rheumatic diseases [J]. Pathol, 1996,180(2):115-117
- [13] Massova I, Kotra LP, Fridman R, et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification [J]. FASEBJ, 1998, 12(12): 1075-1095
- [14] Alon L, Daniel HK. Effects of static compression with different loading magnitudes and durations on the intervertebral disc [J]. Spine, 2008,33(25):2721-2727
- [15] Wang DL, Jiang SD. Biologic response of the intervertebral disc to static and dynamic compression in vitro [J]. Spine 2007,32 (23): 2521-2528