

· 基础研究 ·

蛋白聚糖酶 2 与金属蛋白酶组织抑制剂 3 在腰椎间盘突出髓核退变中的表达及意义

陈微 杨少华 林世州 张博

【摘要】目的 观察人体腰椎间盘突出髓核在不同退变程度时蛋白聚糖酶 2 及金属蛋白酶组织抑制剂 3 (TIMP-3) 的阳性表达,探讨其在髓核退变过程中的作用。**方法** 选取脊柱外科腰椎手术摘除的髓核标本 45 例,采用 Pfirrmann 分级法对椎间盘髓核退变 MRI 进行分级。分为 3 组:对照组 (Pfirrmann 分级 I、II 级)、退变组 (Pfirrmann 分级 III-IV 级) 和严重退变组 (Pfirrmann 分级 V 级),每组 15 例。用 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋后,应用免疫组织化学方法检测髓核细胞中蛋白聚糖酶 2 及 TIMP-3 的表达。**结果** 椎间盘髓核细胞中蛋白聚糖酶 2 的阳性细胞率在对照组、退变组、严重退变组分别为 $(13.58 \pm 7.76)\%$ 、 $(33.48 \pm 13.95)\%$ 、 $(56.00 \pm 18.39)\%$,且退变组与对照组比较,表达增强 ($P < 0.01$);严重退变组分别与对照组和退变组比较,表达均增强 ($P < 0.01$)。对照组、退变组和严重退变组的 TIMP-3 阳性细胞率分别为 $(34.78 \pm 13.80)\%$ 、 $(46.77 \pm 10.98)\%$ 、 $(50.65 \pm 16.45)\%$,且退变组与对照组比较,表达增强 ($P < 0.05$);严重退变组与对照组比较,表达亦增强 ($P < 0.01$);严重退变组与退变组比较,表达也增强 ($P < 0.05$)。对照组、退变组和严重退变组的蛋白聚糖酶 2/TIMP-3 比值分别为 $(45.37 \pm 30.57)\%$ 、 $(75.90 \pm 40.30)\%$ 和 $(120.62 \pm 49.67)\%$;退变组与对照组比较,比值升高 ($P < 0.05$);严重退变组分别与对照组和退变组比较,比值均升高 ($P < 0.01$)。**结论** 在腰椎间盘突出髓核中蛋白聚糖酶 2 与 TIMP-3 的表达及蛋白聚糖酶 2/TIMP-3 比值均随髓核退变程度加重而升高,提示二者与髓核退变有密切关系,其比值升高与髓核退变程度呈正相关。

【关键词】 椎间盘退变; 蛋白聚糖酶; 金属蛋白酶组织抑制剂; 免疫组织化学

Expression of matrix aggrecanase 2 and a tissue inhibitor of metalloproteinases in degenerated intervertebral discs Chen Wei*, Yang Shaohua, Lin Shizhou, Zhang Bo. * Department of Rehabilitation, Guilin Hospital, Medical College of Guilin, Guilin 541000, China

Corresponding author: Yang Shaohua, Email: yjlg66@sina.com.cn

【Abstract】Objective To observe the expression of aggrecanase 2 and a tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP-3) in degenerate human lumbar intervertebral discs and their role in degeneration of the nucleus pulposus. **Methods** Pfirrmann classification was used to class degenerate intervertebral discs observed through MRI. They were divided into three groups: a control group (Pfirrmann grade I - II), a degeneration group (Pfirrmann grade III - IV), and a severe degeneration group (Pfirrmann grade V). A total of 45 cases accepted lumbar spine surgery for removing nucleus pulposus specimens. Each group contained 15 cases. After formalin-fixation and paraffin embedding, immunohistochemistry was used to detect aggrecanase 2 and TIMP-3 expression in the nucleus pulposus cells. **Results** The percentages of cells positive for aggrecanase 2 were $(13.58 \pm 7.76)\%$, $(33.48 \pm 13.95)\%$ and $(56.00 \pm 18.39)\%$ in the control, degeneration and severe degeneration groups respectively. These differences had statistical significance. The percentages of cells positive for TIMP-3 were $(34.78 \pm 13.80)\%$, $(46.77 \pm 10.98)\%$ and $(50.65 \pm 16.45)\%$, and these differences were again statistically significant. The aggrecanase 2/TIMP-3 ratios were also significantly different. **Conclusion** As the degree of degeneration of the nucleus pulposus increased, the expression of aggrecanase 2 and TIMP-3 rose, which indicates that both changes were closely connected with the degeneration. Their ratio was correlated with the degree of degeneration of the nucleus pulposus.

【Key words】 Intervertebral discs; Degeneration; Aggrecanase; Metalloproteinase inhibitors; Immunohistochemistry; Nucleus pulposus

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.01.006

基金项目:桂林市科学研究与技术开发计划项目(20120407-2)

作者单位:541001 桂林,桂林医学院附属医院康复医学科(陈微、林世州、张博),桂林医学院附属医院康复医学科(杨少华)

通信作者:杨少华,Email: yjlg66@sina.com.cn

大多数研究认为,椎间盘髓核退变是引起腰痛的一个主要因素,而髓核退变的主要原因是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的分解增强,ECM 退变早期的生物化学变化之一是蛋白聚糖的损失^[1]。Lim 等^[2]研究认为,蛋白聚糖酶 1 (Aggrecanase 1) 和蛋白聚糖酶 2 (Aggrecanase 2) 是蛋白聚糖的主要降解酶,其作用被金属蛋白酶组织抑制剂 3 (tissue inhibitors of metalloproteinases 3, TIMP-3) 强烈抑制。Le Maitre 等^[3]研究表明,椎间盘髓核细胞蛋白聚糖酶 1 的表达增加会导致椎间盘的退变。但目前对于蛋白聚糖酶 2 及 TIMP-3 在椎间盘髓核 ECM 中的表达研究尚鲜见报道。本研究通过检测和比较蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 在不同退变程度人体腰椎间盘髓核细胞中的表达,旨在探讨两者与椎间盘髓核退变的关系。

资料与方法

一、研究对象及分组

纳入标准:①有明确的手术适应证,需要进行腰椎间盘髓核摘除手术;②摘除腰椎间盘髓核标本前获得患者或亲属的知情同意,签署知情同意书,并获医院医学研究伦理委员会批准。

排除标准:①合并严重的心脑血管和脏器器质性病变患者;②合并有恶性肿瘤的患者;③既往有椎间盘髓核摘除手术病史患者。

分级标准:椎间盘髓核退变程度采用 MRI 影像 Pfirrmann 分级^[1]标准。I 级为椎间盘髓核为均匀高信号(白),同脑脊液信号,纤维环与髓核分界清晰,椎间盘高度正常;II 级为髓核为不均匀高信号(白),髓核内有或没有水平状信号带,纤维环与髓核分界清晰,椎间盘高度正常;III 级为髓核为不均匀中等信号(灰),纤维环与髓核分界不清晰,椎间盘高度正常或轻度下降;IV 级为髓核为不均匀中等或低信号(灰或黑),髓核与纤维环不能区分,椎间盘高度正常或中度下降;V 级为椎间盘髓核为不均匀低信号(黑),髓核与纤维环不能区分,椎间隙重度狭窄。

选取 2012 年 5 月至 2012 年 12 月桂林医学院收治且符合上述标准的脊柱外科腰椎手术摘除的髓核标本 45 例,按 Pfirrmann 分级^[1]情况分为 3 组:对照组 (Pfirrmann 分级 I ~ II 级)、退变组 (Pfirrmann 分级 III ~ IV 级) 和严重退变组 (Pfirrmann 分级 V 级),每组 15 例。对照组:男 11 例,女 4 例,平均年龄 (23.87 ± 5.99) 岁;退变组:男 9 例,女 6 例,平均年龄 (46.77 ± 10.98) 岁;严重退变组:男 8 例,女 7 例,平均年龄 (54.27 ± 12.00) 岁。

二、标本采集及免疫组织化学检测

术中摘除的腰椎间盘髓核,用生理盐水清洗 3 遍,

半小时内置于 4% 多聚甲醛中固定不超过 24 h,常规脱水石蜡包埋。连续切片厚 $4 \mu\text{m}$, 63°C 烤箱烤片 2 h,二甲苯脱蜡 3 次,由高到低梯度乙醇脱蜡脱水,蒸馏水浸泡;3% H_2O_2 避光室温下孵育 10 min, PBS 浸泡 3 次;滴加胰酶 (1:3 稀释,福州迈新生物技术开发有限公司) 至玻片抗原修复 25 min, PBS 浸泡 3 次;滴加蛋白聚糖酶 2 兔抗人多克隆一抗 (1:100 稀释,产品编号 bs-3573R,北京博奥森生物技术有限公司) 或 TIMP-3 兔抗人多克隆一抗 (即用型,产品编号 BA0577,武汉博士德生物工程有限公司) 室温孵育 1 h, PBS 浸泡 3 次;滴加二抗室温孵育 15 min, PBS 浸泡 3 次;DAB 显色剂 (编号:DA1010,北京索莱宝科技有限公司) 显色 15 min,蒸馏水浸泡,生物素衬染 5 min,蒸馏水浸泡,返蓝液 (编号:YY16014,上海源叶生物科技有限公司) 5 s, $40 \sim 50^\circ\text{C}$ 热水浴 1 min;由低到高梯度乙醇脱水,晾干后树脂封片,镜下观察,并记录。

三、观察指标

所有染色切片均由 2 位富有经验的实验室专职人员在同一条件下采用双盲法用光学显微镜阅片,确定细胞总数及阳性表达的细胞数。蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 结果判定标准:蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 阳性表达为棕黄色,主要存在于细胞核和细胞浆。采用半定量方法,随机选取 5 个 400 倍视野,计算椎间盘髓核细胞中蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 表达的染色阳性细胞数占总细胞数的百分比 (%) 及蛋白聚糖酶 2/TIMP-3 比值 (A/T 比值)。

四、统计学方法

使用 SPSS 17.0 版统计软件进行数据处理,免疫染色阳性细胞百分比值用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。3 组间比较使用单因素方差分析 (F 检验),两两组间比较使用 q 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

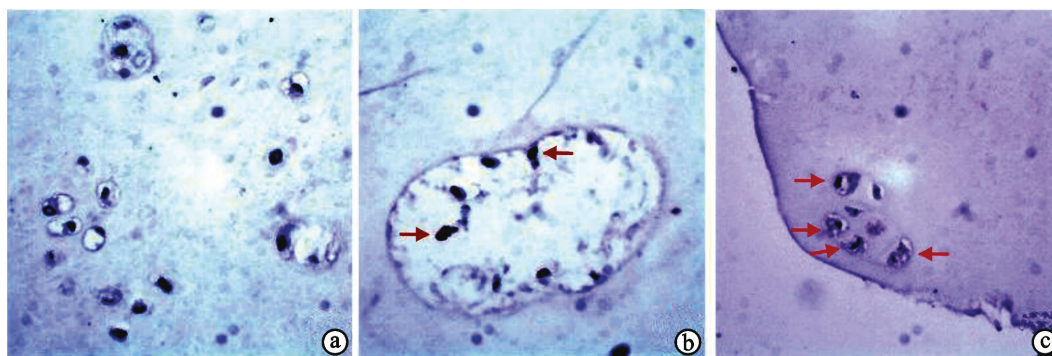
结 果

一、各组免疫组化染色切片显微镜下观察

蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 在椎间盘髓核细胞的细胞浆、细胞核均有表达,阳性反应呈棕褐色。对照组显微镜下可见椎间盘髓核细胞近似圆形或椭圆形,蛋白聚糖酶 2 少量阳性表达,TIMP-3 中等阳性表达。退变组和严重退变组可见椎间盘髓核细胞呈团簇状生长,蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 阳性表达均明显增多 (见图 1 和图 2)。

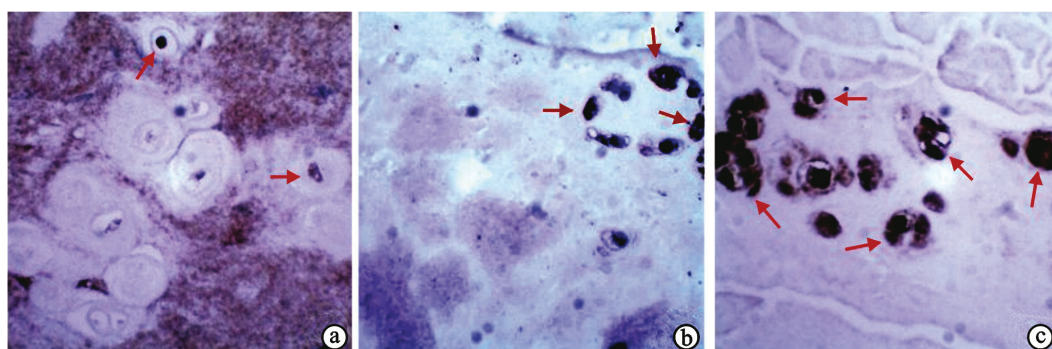
二、各组蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 的表达及蛋白聚糖酶 2/TIMP-3 比值

蛋白聚糖酶 2 表达:退变组椎间盘髓核细胞中蛋白聚糖酶 2 表达明显高于对照组 ($P < 0.01$),严重退变组蛋白聚糖酶 2 表达亦明显高于退变组和对照组 ($P < 0.01$)。详见表 1。



注:a 为对照组;b 为退变组;c 为严重退变组(红色箭头示蛋白聚糖酶 2 的阳性表达)

图 1 各组蛋白聚糖酶 2 在髓核细胞内的镜下观 (DAB 染色, ×400)



注:a 为对照组;b 为退变组;c 为严重退变组(红色箭头示 TIMP-3 的阳性表达)

图 2 各组 TIMP-3 在髓核细胞内的镜下观 (DAB 染色, ×400)

表 1 3 组髓核中蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 阳性率表达及 A/T 比值比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	蛋白聚糖酶 2 表达	TIMP-3 表达	A/T 比值
对照组	15	13.58 ± 7.76	34.78 ± 13.80	45.37 ± 30.57
退变组	15	33.48 ± 13.95 ^a	46.77 ± 10.98 ^b	75.90 ± 40.30 ^b
严重退变组	15	56.00 ± 18.39 ^{ac}	50.65 ± 16.45 ^{ad}	120.62 ± 49.67 ^{ac}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与退变组比较,^c $P < 0.01$,^d $P < 0.05$

TIMP-3 表达:退变组椎间盘髓核细胞中 TIMP-3 表达高于对照组($P < 0.05$),严重退变组 TIMP-3 表达亦明显高于对照组($P < 0.01$),且亦高于退变组($P < 0.05$)。详见表 1。

A/T 比值:退变组的 A/T 比值明显高于对照组($P < 0.05$),严重退变组 A/T 比值亦显著高于对照组($P < 0.01$),严重退变组 A/T 比值亦显著高于退变组($P < 0.01$)。详见表 1。

讨 论

髓核组织中大量的蛋白聚糖与Ⅱ型胶原结合形成网眼状结构,可储存大量水分子,维持髓核内水和离子浓度的稳定,保持髓核的凝胶状态及黏弹性,为椎间盘提供抵抗压缩载荷能力。随着基因敲除及转基因技术的引入,Glasson 等^[4]分别敲除小鼠蛋白聚糖酶 1 和蛋白聚糖酶 2 基因并通过手术制成关节机械失稳模型,与无此缺陷的手术大鼠相比,组织形态学观察和血清学检测显示单基因敲除后可使严重软骨损害的速率显著降低。而且蛋白聚糖酶 2 比蛋白聚糖酶 1 在羧基末

端多了 1 个血小板凝血酶敏感蛋白序列 2 区(thrombospondin type-2 motif,TSP-2)^[5],该区能与 ECM 中蛋白聚糖特异性结合,从而证明蛋白聚糖酶 2 是关节软骨蛋白聚糖分解最重要的酶。Karsdal 等^[6]提出基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)介导的蛋白聚糖和Ⅱ型胶原蛋白的分解对软骨造成不可逆的损害,而蛋白聚糖酶介导的蛋白聚糖分解是完全可逆的。在众多动物椎间盘退变模型中也可以检测到蛋白聚糖酶 2 的 mRNA 和蛋白表达^[7]。

而蛋白聚糖酶 2 的抑制剂可以分为内源性抑制剂和外源性抑制剂两大类,其中内源性抑制剂主要包括 TIMP-3 和 $\alpha 2$ -巨球蛋白($\alpha 2$ -macroglobulin)。TIMP-1、2、4 可出现在组织和循环中,而 TIMP-3 仅出现在 ECM 中^[8]。TIMP-3 的电性比蛋白聚糖酶强,能够按 1:1 的比例与靶酶的活性部位锌结合位点形成非共价结合,从而紧密结合带负电荷的蛋白聚糖发挥其抑制作用^[9]。而且 TIMP-3 能够抑制白介素 1 α (interleukin 1 α ,IL-1 α)和维甲酸诱导的蛋白聚糖酶活性,且抑制程度呈剂量依赖性^[10];对蛋白聚糖酶 1 抑制常数(Ki)为 3.30 nmol/L,对蛋白聚糖酶 2 抑制常数为 0.66 nmol/L。Sahebjam 等^[11]研究发现,敲除 TIMP-3 基因后,鼠关节软骨中蛋白聚糖明显丢失,且出现大量蛋白聚糖酶的裂解片段积聚,这也从侧面反映 TIMP-3 对蛋白聚糖酶具有较强的抑制作用;说明 TIMP-3 在关节软骨中可能是作为蛋白聚糖酶的天然抑制剂调节蛋白聚糖酶的活性。

研究表明,蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 不仅在动物的椎间盘中有表达,在人体椎间盘髓核细胞中也有表达。本研究中,对照组蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 的阳性表达均处于较低水平 $[(13.58 \pm 7.76)\%$ 和 $(34.78 \pm 13.80)\%]$,而退变组和严重退变组的蛋白聚糖酶 2 的表达逐渐升高 $[(33.48 \pm 13.95)\%$ 和 $(56.00 \pm 18.39)\%]$,各阳性表达组间差异均有统计学意义($P < 0.01$),提示随着蛋白聚糖酶 2 的升高导致蛋白聚糖含量下降,破坏 ECM,最终引起椎间盘髓核的退变。TIMP-3 阳性表达也在退变组和严重退变组中逐渐升高 $[(46.77 \pm 10.98)\%$ 和 $(50.65 \pm 16.45)\%]$,组间差异亦有统计学意义($P < 0.05$),那可能与蛋白聚糖酶 2 在降解蛋白聚糖过程中刺激 TIMP-3 升高有关,而 TIMP-3 则降低蛋白聚糖酶 2 的活性起到保护蛋白聚糖,从而保护椎间盘髓核。但蛋白聚糖酶 2 与 TIMP-3 阳性率的比值也快速升高,在对照组、退变组和严重退变组中 A/T 比值分别为 $(45.37 \pm 30.57)\%$ 、 $(75.90 \pm 40.30)\%$ 和 $(120.62 \pm 49.67)\%$,表达差异明显,说明蛋白聚糖酶 2 的升高速度比 TIMP-3 快得多。结合以往的研究,可以认为,蛋白聚糖酶 2 与 TIMP-3 之间可能存在一种动态平衡,随着退变椎间盘中蛋白聚糖酶 2 表达升高,TIMP-3 的表达反馈性升高,抑制蛋白聚糖酶 2 对蛋白聚糖的降解,从而延缓椎间盘髓核的退变。但随着蛋白聚糖酶 2 表达的不断升高,TIMP-3 难以完全抑制蛋白聚糖酶 2,两者之间的平衡被打破,导致髓核 ECM 中蛋白聚糖的分解增多,髓核储存的水分子减少,黏弹性下降,抗压缩载荷能力下降,在压力负荷的作用下,导致椎间盘退变。

综上所述,蛋白聚糖酶 2 在髓核 ECM 的蛋白聚糖分解过程中发挥了重要作用,蛋白聚糖酶 2 和 TIMP-3 之间比例失衡可能是椎间盘髓核退变的原因之一。通过对这两种酶的研究有可能为防治椎间盘退变提供有价值的基础研究依据,从而为治疗椎间盘突出症探索

一种新的治疗方案。

参 考 文 献

- [1] Pfirrmann CWA, Metzdoeff A, Zenetti M, et al. MB classification of lumbar intervertebral disc degeneration [J]. Spine, 2001, 26 (3): 1873-1878.
- [2] Lim NH, Kashiwagi M, Visse R, et al. Reactive-site mutants of N-TIMP-3 that selectively inhibit ADAMTS-4 and ADAMTS-5; biological and structural implications [J]. Biochem J, 2010, 431 (2): 113-122.
- [3] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc [J]. J Pathol, 2004, 204 (1): 47-54.
- [4] Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis [J]. Nature, 2005, 434 (7033): 644-648.
- [5] Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: A multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7 (2): 160-169.
- [6] Karsdal MA, Madsen SH, Christiansen C, et al. Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10 (1): 63-65.
- [7] Liang QQ, Zhou Q, Zhang M, et al. Prolonged upright posture induces degenerative changes in intervertebral discs in rat lumbar spine [J]. Spine, 2008, 33 (19): 2052-2058.
- [8] Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities [J]. Cell Sci, 2002, 115 (19): 3719-3727.
- [9] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. Circ Res, 2003, 92 (8): 827-839.
- [10] Qendron C, Kashtwagi M, Hughes C, et al. TIMP-3 inhibits aggrecanase-mediated glycosaminoglycan release from cartilage explants stimulated by catabolic factors [J]. FEBS Lett, 2003, 555 (3): 431-436.
- [11] Sahebjam S, Khokha R, Mort JS. Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of TIMP-3 mice [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56 (3): 905-909.

(修回日期:2013-10-20)

(本文编辑:汪 玲)

《中华物理医学与康复杂志》第七届编辑委员会通讯编委名单

(按姓氏笔画排序)

马 超	尹 勇	王俊华	王楚怀	王蓓蓓	白玉龙	刘雅丽	孙乐蓉	毕 胜
许 涛	许光旭	余 茜	张载福	李 丽	李铁山	李雪萍	杨卫新	汪 萍
汪 琴	汪军民	陆 敏	陈 刚	陈 翔	范晓华	姜志梅	胡昔权	胥方元
商晓英	舒 彬	谢 明	虞乐华					