doi:10.11659/jjssx.03E017005

·临床研究·

椎间盘病变椎间盘髓核及纤维环 MMP-1 及 TIMP-1 表达变化及意义

冯习坤[1],孙马玲[2],曾昭池[3],郭立新[3,4] (1.解放军第169医院暨湖南师范大学附属湘南医院体检中心,湖南 衡阳 421002;2.解放军第169医院暨湖南师范大学附属湘南医院医务科,湖南 衡阳 421002;3.解放军第169医院暨湖南师范大学附属湘南医院骨科,湖南 衡阳 421002;4.解放军第169医院暨湖南师范大学附属湘南医院院长办公室,湖南 衡阳 421002)

[摘 要] **目的** 研究椎间盘病变椎间盘髓核及纤维环 MMP-1 及 TIMP-1 表达变化及意义。**方法** 选取我院 2014 年 8 月至 2016 年 8 月收治的 34 例椎间盘突出症患者作为观察组,将同期 34 例突发创伤致椎体骨折手术摘除椎间盘患者作为对照组。手术分离椎间盘髓核及纤维环,用免疫组化法检测 MMP-1、TIMP-1 表达,分析 MMP-1、TIMP-1 表达与椎间盘退行性病变的关系。**结果** 观察组髓核 MMP-1、TIMP-1 表达量明显高于对照组($P>0.05$);且在突出型、脱出型、游离型椎间盘退变中,髓核 MMP-1、TIMP-1 表达量依次下降($P<0.05$)。观察组纤维环 MMP-1、TIMP-1 表达量明显高于对照组($P>0.05$);且在突出型、脱出型、游离型椎间盘退变中,纤维环 MMP-1、TIMP-1 表达量依次下降($P<0.05$)。髓核及纤维环 MMP-1、TIMP-1 高表达,发生椎间盘退行性病变的风险明显高于 MMP-1、TIMP-1 低表达者($P<0.05$)。MMP-1 作为预测椎间盘退行性病变的灵敏度为 82.35%,特异度为 94.11%;TIMP-1 作为预测椎间盘退行性病变的灵敏度为 79.41%,特异度为 88.24%;联合二者,其预测椎间盘退行性病变的灵敏度为 90.91%,特异度为 97.14%。**结论** 椎间盘退行性病变患者椎间盘髓核及纤维环 MMP-1、TIMP-1 的表达明显增高,对协助诊断椎间盘退行性病变具有重要临床意义。

[关键词] 椎间盘髓核;椎间盘纤维环;椎间盘病变;MMP-1;TIMP-1
[中图分类号] R681.5 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-03-25

Expression and significance of MMP-1 and TIMP-1 in the nucleus pulposus and anulus fibrosus of intervertebral disc with different lesions

FENG Xi-kun[1],SUN Ma-ling[2],ZENG Zhao-chi[3],GUO Li-xin[3,4] (1.Physical Examination Center,169th Hospital of PLA,Xiangnan Hospital of Hunan Normal University,Hengyang Hunan 421002,China;2.Medical Department,169th Hospital of PLA,Xiangnan Hospital of Hunan Normal University,Hengyang Hunan 421002,China;3.Orthopedics Department,169th Hospital of PLA,Xiangnan Hospital of Hunan Normal University,Hengyang Hunan 421002,China;4.Administrative Office,169th Hospital of PLA,Xiangnan Hospital of Hunan Normal University,Hengyang Hunan 421002,China)

Abstract: Objective To explore the expression and significance of MMP-1 and TIMP-1 in the nucleus pulposus and anulus fibrosus of intervertebral disc with different lesions. **Methods** From August 2014 to August 2016,34 cases of lumbar disc herniation (the observation group) and 34 case of surgical removal of intervertebral disc in patients with vertebral trauma caused by sudden trauma (the control group) in our hospital were stuided. The nucleus pulposus and anulus fibrosus of intervertebral disc were separated,and the expression of MMP-1 and TIMP-1 were detected by immunohistochemistry. The relationship between MMP-1 and TIMP-1 expression and intervertebral disc degeneration was analyzed. **Results** The MMP-1 and TIMP-1 expression of nucleus pulposus in the observation group were significantly higher than those in the control group($P>0.05$);and the MMP-1 and TIMP-1 expression of nucleus pulposus decreased successively in prominent type,extrusion type,free type lumbar intervertebral disc degeneration($P<0.05$). The MMP-1 and TIMP-1 expression of anulus fibrosus in the observation group were significantly higher than those in the control group($P>0.05$);and the MMP-1 and TIMP-1 expression of anulus fibrosus decreased successively in prominent type,extrusion type,free type lumbar intervertebral disc degeneration($P<0.05$). Patients with high expression of MMP-1 and TIMP-1 in nucleus pulposus and anulus fibrosus had more risk of degenerative disc disease($P<0.05$). As a sensitivity prediction of intervertebral disc degeneration,the sensitivity of MMP-1 was 82.35% while the specificity was 94.11%,and the sensitivity of TIMP-1 was 79.41% while the specificity was 88.24%. The prediction sensitivity of intervertebral disc degeneration was 90.91% and the specificity was 97.14% when combined MMP-1 with TIMP-1. **Conclusion** The expression of MMP-1 and TIMP-1 in the nucleus pulposus and anulus fibrosus of intervertebral disc degeneration was significantly increased,which is of great clinical significance in the diagnosis of intervertebral disc degeneration.

Keywords: nucleus pulposus of intervertebral disc;annulus fibrosus of intervertebral disc;intervertebral disc lesion;MMP-1;TIMP-1

腰椎间盘突出症为临床常见脊柱疾病,主要原因是椎间盘退行性改变后,因长期外力作用,使椎间盘纤

[基金项目] 湖南省卫计委 2015 年度科研计划项目(B2015-64)
[通信作者] 郭立新,E-mail:jfj169@163.com

维环破裂,髓核组织通过破裂处向椎管内突出,致相邻的脊神经根受到刺激及压迫,进而产生疼痛、患侧麻木等临床症状[1-2]。椎间盘退行性改变为一个复杂的生理过程,具体发生机制尚不明确。当细胞及细胞外基质发生改变,可出现椎间盘退行性改变,而椎间盘力学特性丧失主要与细胞外基质改变有关,椎间盘基质合成及分解失衡,基质成分代谢紊乱,椎间盘内髓核水分及固有弹性丧失,导致椎间盘生物力学功能下降,引发椎间盘突出[3-4]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP)是一种可降解细胞外基质的功能酶,当其过量分泌,致其与基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase,TIMP)比例失衡,引发软骨细胞外基质降解[5]。MMPs 及 TIMPs 与骨关节软骨退变相关,而骨关节软骨细胞外基质与椎间盘细胞外基质相似[6],因此,学者认为 MMPs 及 TIMPs 与椎间盘退行性改变发生发展有一定相关性。本研究椎间盘病变椎间盘髓核及纤维环 MMP-1 及 TIMP-1 表达变化及意义,旨在了解 MMP-1 及 TIMP-1 表达与椎间盘退行性改变间的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取我院 2014 年 8 月至 2016 年 8 月收治的 34 例椎间盘突出症患者作为观察组,将 34 例同时期突发创伤致椎体骨折手术摘除椎间盘患者作为对照组。观察组患者病理证实为退变椎间盘;对照组患者伤前无腰痛、腿痛及椎管手术病史,并排除与研究相关椎间盘退变性疾病,术后病理证实为正常椎间盘。2 组患者的性别、年龄等一般情况见表 1。本研究经我院伦理委员会审核批准,向患者及家属交代研究方案,并获得患者及家属知情同意。

表 1 2 组患者一般情况比较($n=34$)

组别	男/女(例)	年龄(岁)	体质量指数(kg/m^2)	病变类型(例)		
				游离型	脱出型	突出型
对照组	18/16	46.32±5.81	22.32±3.17	–	–	–
观察组	17/17	47.93±5.55	21.87±3.40	10	11	13
χ^2/t	0.058 9	1.168 4	0.564 5		–	
P	0.808 3	0.246 9	0.574 4		–	

1.2 方法

1.2.1 标本采集与处理 2 组患者手术切除的椎间盘组织用生理盐水冲洗 3 遍,分类髓核及纤维环组织,置于 10% 中性甲醛中固定 48 h,常规脱水后石蜡包埋,制成 4.0 μm 厚度切片。每一份椎间盘组织标本取一片标本进行 HE 染色,进行病理学分析,另一片作为阴性对照。

1.2.2 MMP-1、TIMP-1 表达检测 每个患者标本取 2 片进行 MMP-1、TIMP-1 免疫组化染色,切片于 60 ℃孵箱中加热 1 h,进行脱蜡、水化,除去内源性过氧化物酶,将组织非特异性抗原封闭;抗体标记:①一抗选用兔抗人 MMP-1 单克隆抗体,4 ℃条件下孵育 24 h,二抗选用经生物素标记的羊抗兔 IgG,37 ℃条件下孵育 30 min;②一抗选用兔抗人 TIMP-1 单克隆抗体,4 ℃条件下孵育 24 h,二抗选用经生物素标记的羊抗兔 IgG,37 ℃条件下孵育30 min;经 DAB 染色、苏木精染色;光镜下排长分析。

1.2.3 镜检结果分析 用双盲法,由两位病理师独立读片。MMP-1 及 TIMP-1 表达阳性,可见胞浆染色,即髓核细胞及软骨细胞的胞浆中可见棕黄色颗粒。免疫组化结果采用定量分析法,每张切片随机选取 5 个高倍镜视野,对髓核细胞及阳性细胞进行计数,阳性细胞表达率 = 5 个视野总髓核染色阳性细胞数/5 个视野总髓核细胞数 ×100%。

1.3 观察指标

观察指标有:①患者 MMP-1、TIMP-1 阳性表达量;②MMP-1、TIMP-1 表达情况,阳性表达细胞数大于 25% 为高表达;无阳性细胞表达或阳性表达细胞数小于 25% 为低表达。

1.4 统计学分析

数据用 SPSS 15.2 软件处理,MMP-1、TIMP-1 表达量等计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 t 检验比较差异,高、低表达的患者情况采用[例(%)]表示,用 χ^2 检验比较差异,当 $P<0.05$ 时,认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-1、TIMP-1 在患者髓核中表达结果

观察组髓核 MMP-1、TIMP-1 表达量高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);且在突出型、脱出型、游离型椎间盘退变中,髓核 MMP-1、TIMP-1 表达量依次下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 MMP-1、TIMP-1 在患者髓核中表达结果($\bar{x} \pm s$)

组别		n	MMP-1	TIMP-1
对照组		34	9.45 ± 4.50	5.00 ± 1.35
观察组	游离型	10	25.71 ± 6.14[a]	11.31 ± 1.64[a]
	脱出型	11	37.09 ± 7.23[ab]	16.42 ± 1.75[ab]
	突出型	13	55.03 ± 7.04[ac]	22.04 ± 1.87[ac]

a:与对照组比较,P_{MMP-1} = 0.002 1、P_{TIMP-1} = 0.003 7;b:与游离型比较,P_{MMP-1} = 0.026 9、P_{TIMP-1} = 0.031 3;c:与脱出型比较,P_{MMP-1} = 0.003 9;P_{TIMP-1} = 0.007 4

2.2 MMP-1、TIMP-1 在患者纤维环中表达结果

观察组纤维环 MMP-1、TIMP-1 表达量高于对照组,差异具有统计学意义(P < 0.05);且在突出型、脱出型、游离型椎间盘退变中,纤维环 MMP-1、TIMP-1 表达量依次下降,差异具有统计学意义(P < 0.05),见表 3。

2.3 MMP-1、TIMP-1 表达与椎间盘退变的关系

髓核及纤维环 MMP-1、TIMP-1 高表达,发生椎间盘退行性病变的风险高于 MMP-1、TIMP-1 低表达者,差异具有统计学意义(P < 0.05),见表 4。

2.4 MMP-1、TIMP-1 预测椎间盘退变的价值

MMP-1 作为预测椎间盘退行性病变的灵敏度为 82.35%,特异度为 94.11%,Youden 指数为 0.33;TIMP-1 作为预测椎间盘退行性病变的灵敏度为 79.41%,特异度为 88.24%,Youden 指数为 0.31;联合二者,其预测椎间盘退行性病变的灵敏度为 90.91%,特异度为 97.14%,Youden 指数为 0.59(表 5)。

表 3 MMP-1、TIMP-1 在患者纤维环中表达结果($\bar{x} \pm s$)

组别		n	MMP-1	TIMP-1
对照组		34	7.31 ± 3.12	4.36 ± 1.23
观察组	游离型	10	18.31 ± 4.11[a]	10.42 ± 1.52[a]
	脱出型	11	29.43 ± 5.07[ab]	14.65 ± 1.68[ab]
	突出型	13	43.39 ± 6.23[ac]	18.73 ± 1.77[ac]

a:与对照组比较,P_{MMP-1} = 0.001 1、P_{TIMP-1} = 0.002 1;b:与游离型比较,P_{MMP-1} = 0.003 7、P_{TIMP-1} = 0.011 7;c:与突出型比较,P_{MMP-1} = 0.000 0、P_{TIMP-1} = 0.014 0

表 4 MMP-1、TIMP-1 表达与椎间盘退变间的关系[例(%)]

指标		对照组	观察组	χ^2	P
MMP-1	高表达	2(4.88)	28(82.35)	40.322 8	0.000
	低表达	32(94.12)	6(17.65)		
TIMP-1	高表达	4(11.76)	27(79.41)	31.361 8	0.000
	低表达	30(88.24)	7(20.59)		

表 5 MMP-1、TIMP-1 预测椎间盘退变的价值

评价指标	灵敏度(%)	特异度(%)	Youden 指数	符合率(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)
MMP-1	82.35	94.11	0.33	88.23	93.33	84.21
TIMP-1	79.41	88.24	0.31	83.82	87.10	81.08
二者联合	90.91	97.14	0.59	94.12	96.77	91.89

3 讨论

椎间盘细胞外基质由蛋白多糖、胶原及水等组成,其中胶原对椎间盘的生理功能起着重要的作用[7]。当椎间盘发生退行性改变时,可表现为胶原减少、断裂及细胞凋亡[8]。细胞外基质成分的改变,是椎间盘力学特性丧失的直接原因,而其中蛋白水解酶起着关键作用[9-10]。基质金属蛋白酶可降解椎间盘中的基质胶原与粘多糖,并可激活其他酶类及部分细胞活性因子,激活的酶类及细胞活性因子可反过来直接或者间接参与基质胶原及粘多糖的降解[11-12]。椎间盘退变初发于髓核,临床上根据患者病情可进行保守治疗或外科切除椎间盘,以缓解患者疼痛,稳定脊柱生物力学平衡[13-14]。因椎间盘为机体躯干主要受力点,劳损较其他部位重,其椎间盘营养依靠软骨板渗透,营养有限,进而易出现退行性改变。椎间盘营养供应减少、细胞凋亡、基质酶活性改变及生物力学改变等因素,参与椎间盘的退行性改变,其中金属基质蛋白酶及金属蛋白酶抑制剂起着重要作用[15]。

椎间盘由髓核、纤维环及软骨终板构成,其中髓核主要为胶原状组织,无血管及神经支配,Ⅱ型胶原及蛋白多糖为细胞外基质主要成分[16]。人类椎间盘组织蛋白质成分与相应软骨基质成分中的蛋白质具有相同的 N 末端,因此,MMPs 在椎间盘退行性病变中也发挥一定作用[17]。TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制物,TIMPs 氨基末端可与 MMPs 结合,形成 MMP-TIMP 复合物,从而抑制 MMPs 与胶原底物结合,对维持细胞外基质的合成与降解平衡具有重要作用[18]。MMP-1 为胶原酶亚型,在软骨基质中对Ⅱ型胶原降解起着关键作用,因此,MMP-1 及 TIMP-1 也参与Ⅱ型胶原的代谢[19]。本次研究结果显示,椎间盘突出症患者髓核 MMP-1、TIMP-1 表达量明显高于突发创伤致椎体骨折手术摘除椎间盘患者;且在突出型、脱出型、游离型椎间盘退变中,髓核 MMP-1、TIMP-1 表达量依次下降。椎间盘突出症患者纤维环 MMP-1、TIMP-1 表达量明显高于突发创伤致椎体骨折手术摘除椎间盘患者;且在突出型、脱出型、游离型椎间盘退变中,纤维环 MMP-1、TIMP-1 表达量依次下降。结果说明,MMP-1 高表达,

但 TIMP-1 表达增加幅度较小,导致 MMP-1/TIMP-1 失衡,TIMP-1 对 MMP-1 抑制作用降低,致Ⅱ型胶原过度降解,细胞外基质中的胶原纤维结构破坏,髓核出现纤维化,椎间盘弹性能力降低,进而使椎间盘易突出。

椎间盘退行性病变基质较为复杂,研究发现 MMPs 与椎间盘退变有关,临床上还可以通过检测 MMPs 及 TIMPs 表达情况,作为诊断椎间盘突出及了解椎间盘退变程度的客观性指标[20]。本次结果表明髓核及纤维环 MMP-1、TIMP-1 高表达患者发生椎间盘退行性病变的风险明显高于 MMP-1、TIMP-1 低表达者;MMP-1 预测椎间盘退行性病变的灵敏度为 82.35%,特异度为 94.11%,Youden 指数为 0.33;TIMP-1 预测椎间盘退行性病变的灵敏度为 79.41%,特异度为 88.24%,Youden 指数为 0.31;联合二者,其预测预测椎间盘退行性病变的灵敏度为 90.91%,特异度为 97.14%,Youden 指数为 0.59。结果说明,诊断性检测 MMP-1 表达水平可作为一项评估患者椎间盘是否发生退行性病变的依据,同时,临床可通过抑制 MMP-1 活性,干预椎间盘退行性病变的发展进程,为治疗该疾病提供一种新的探索途径。

综上所述,MMP-1/TIMP-1 失衡为发生椎间盘退行性改变的重要原因之一,椎间盘退行性改变患者的椎间盘髓核及纤维环 MMP-1、TIMP-1 的表达显著增高,为临床诊断椎间盘退行性改变提供新策略,同时临床医师可通过调节 MMPs 及 TIMPs 的表达水平,控制椎间盘细胞外基质代谢,进而起到干预椎间盘退行性改变发展进程的作用。进一步研究 MMPs 与 TIMPs 的调控机制,对阐明椎间盘退行性病变发生机制具有重要的意义,可为椎间盘突出症的临床干预提供新的靶点。

[参考文献]

[1] Zhou ZWE. Clinical analysis of operative treatment of senile prolapse of lumbar intervertebral disc[J]. Evaluation,2015,21(1):47 - 64.

[2] 张帮可,卢旭华. 青少年腰椎椎间盘突出症流行病学及病因学研究进展[J]. 脊柱外科杂志,2015,13(4):247 - 249. doi:10.3969/j.issn.1672 - 2957.2015.04.013.

[3] Guo L,Gao T,Yuanzheng MA,et al. Experimental study of the influence of the different vibration frequency on the degeneration of the lumbar intervertebral disc and BMD in rats[J]. Chinese J Osteoporosis,2014,45(1):42 - 52.

[4] Risbud MV,Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration:pain and disc-content[J]. Nat Rev Rheumatol,2014,10(1):44. doi:10.1038/nrrheum.2013.160.

[5] 卢家灵. 基质金属蛋白酶(MMPS)与椎间盘退变相关性的研究进展[J]. 中国医学创新,2015,12(16):151 - 154. doi:10.3969/j.issn.1674 - 4985.2015.16.056.

[6] 王 涛,康 汇,李红川,等. 腰椎间盘突出患者组织 MMP 及 TIMP 指标的变化研究[J]. 湖南师范大学学报(医学版),2015,12(6):129 - 131.

[7] 李文举,李亦梅. 椎间盘退变机制研究现状及生物治疗展望[J]. 中国骨与关节外科,2014,7(1):66 - 69. doi:10.3969/j.issn.1674 - 1439.2013.10 - 016.

[8] 顾 军,谢 林,康 然,等. 椎间盘退变机制研究概况[J]. 世界中医药,2013,8(6):700 - 702. doi:10.3969/j.issn.1673 - 7202.2013.06.037.

[9] Williams LA,Wei A,Bhargav D,et al. Cartilage derived morphogenetic protein 2-a potential therapy for intervertebral disc regeneration? [J]. Biologicals,2014,42(2):65 - 73. doi:10.1016/j.biologicals.2013.12.003.

[10] Wang SZ,Rui YF,Lu J,et al. Cell and molecular biology of intervertebral disc degeneration:current understanding and implications for potential therapeutic strategies[J]. Cell Prolif,2014,47(5):381 - 390. doi:10.1111/cpr.12121.

[11] Deng B,Ren JZ,Meng XQ,et al. Expression profiles of MMP-1 and TIMP-1 in lumbar intervertebral disc degeneration[J]. Gene Mol Res,2015,14(4):19080. doi:10.4238/2015.December.29.16.

[12] 宋庆鑫,王 琨,唐沂星,等. 金属蛋白酶类及其抑制剂在椎间盘退变中作用研究进展[J]. 第二军医大学学报,2015,36(2):201 - 205. doi:10.3724/SP.J.1008.2015.00201.

[13] 胡有谷,陈伯华. 椎间盘退变基因治疗进展[J]. 中国骨与关节外科,2013,6(z1):11 - 16. doi:10.3969/j.issn.1674 - 1439.2013.05 - 002.

[14] 孟祥宇,夏建龙,杨 挺,等. 椎间盘退变的机制及修复[J]. 中国组织工程研究,2015,19(11):1768 - 1773. doi:10.3969/j.issn.2095 - 4344.2015.11.024.

[15] Zhao H,Ni CF,Huang J,et al. Effects of bone cement on intervertebral disc degeneration[J]. Exp The Med,2014,7(4):963 - 969. doi:10.3892/etm.2014.1531.

[16] Malandrino A,Noailly J,Lacroix D. Numerical exploration of the combined effect of nutrient supply,tissue condition and deformation in the intervertebral disc[J]. J Biomech,2014,47(6):1520 - 1525. doi:10.1016/j.jbiomech.2014.02.004.

[17] Teichtahl AJ,Urquhart DM,Wang Y,et al. Response to:'A dose-response relationship between severity of disc degeneration and intervertebral disc height in the lumbosacral spine'-authors' reply[J]. Arthritis Res Ther,2015,17(1):1 - 6. doi:10.1186/s13075 - 016 - 0945 - x.

[18] Baillet A,Grange L,Trocmé C,et al. Differences in MMPs and TIMP-1 expression between intervertebral disc and disc herniation[J]. Joint Bone Spine,2013,80(3):341 - 342. doi:10.1016/j.jbspin.2012.08.011.

[19] 王 祺,任龙韬,卫成刚,等. 正常与退变髓核细胞形态学及Ⅱ型胶原蛋白的定量分析[J]. 中国组织工程研究,2014,18(15):2363 - 2368. doi:10.3969/j.issn.2095 - 4344.2014.15.012.

[20] Song QX,Wang K,Tang YX,et al. Role of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc degeneration:research progress[J]. Academic Journal of Second Military Medical University,2015,36(2):201 - 205. doi:10.3724/SP.J.1008.2015.00201.

(编辑:左艳芳)