doi:10.11659/jjssx.12E022151

·基础研究·

颈椎钩椎关节退行性变对VEGF及其受体表达的影响

陈 杰[1],李 琨[1,2],张少杰[1,2],李筱贺[1],高 尚[1],王海燕[1],李志军[1,2],马 渊[2],赵丹阳[2],史 君[3],王 星[1,2]（1.内蒙古医科大学基础医学院人体解剖学教研室,内蒙古 呼和浩特 010110;2.内蒙古医科大学基础医学院数字医学中心,内蒙古 呼和浩特 010110;3.内蒙古医科大学基础医学院生理学教研室,内蒙古 呼和浩特 010110）

［摘 要］ **目的** 探讨颈椎退行性变对血管内皮生长因子(VEGF)及血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)表达的影响。**方法** 取成年尸体双侧健康颈椎C_3~C_7节段为对照组,取成年尸体双侧退行性变颈椎C_3~C_7节段为实验组。通过免疫组织化学、免疫荧光染色技术及实时定量PCR观察并分析2组VEGF及VEGFR-2表达的变化。**结果** 实验组VEGF及VEGFR-2的蛋白和mRNA表达均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 颈椎钩椎关节退行性变显著上调VEGF及VEGFR-2的表达,与类关节结构退变引发的钩椎关节周围微环境改变密切相关。

［关键词］颈椎;钩椎关节;退行性变;VEGF;VEGFR-2

［中图分类号］R322 ［文献标识码］A ［收稿日期］2022-12-29

Effect of cervical Luschka joint degenerative change on expression of VEGF and its receptor

CHEN Jie[1], LI Kun[1,2], ZHANG Shao-jie[1,2], LI Xiao-he[1], GAO Shang[1], WANG Hai-yan[1], LI Zhi-jun[1,2], MA Yuan[2], ZHAO Dan-yang[2], SHI Jun[3], WANG Xing[1,2] (1. Department of Human Anatomy, Basic Medical School, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010110, China; 2.Center of Digital Medicine, Basic Medical School, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010110, China; 3. Department of Physiology, Basic Medical School, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010110, China)

Abstract: Objective To observe the effect of cervical degenerative change on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2). **Methods** The C_3 to C_7 segments of bilateral healthy cervical vertebrae of adult cadavers were taken as the control group, and the C_3 to C_7 segments of bilateral degenerative cervical vertebrae of adult cadavers were taken as the experimental group. The expression changes of VEGF and VEGFR-2 of the two groups were observed and analyzed by immunohistochemistry, immunofluorescence staining and real-time quantitative PCR. **Results** The protein and mRNA expressions of VEGF and VEGFR-2 in the experimental group were higher than those in the control group, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** Cervical Luschka joint degenerative change significantly up-regulates the expression of VEGF and VEGFR-2, which is closely related to the microenvironmental changes around the Luschka joint caused by degeneration of joint-like structure.

Keywords: cervical vertebra; Luschka joint; degenerative change; VEGF; VEGFR-2

颈椎退行性变主要指颈椎的骨质发生退行性改变,退行性改变常常伴随年龄增长,出现骨质疏松导致的脱钙及脊柱老化,发生神经、血管损害等[1-3]。钩椎关节,又称Luschka关节,结构基础是在C_3~C_7之间,后外侧边缘下位椎体向上方凸起形成的钩突与上位椎体斜下方形成的坡状吻合以及与周围软组织共同包裹形成的具有外翻形状的类关节结构[4-5]。颈椎特有的钩椎关节是维持颈椎正常形态及脊柱正常生理功能的基础,在颈椎病发生发展及颈椎手术方式的选择中具有重要临床意义。伴随科学研究的深入,针对骨与关节的研究已逐渐由以形态学为主转为形态学与分子生物学并重的模式,为此本研究从细胞外基质对骨、关节微环境的变化及生理功能稳定[6-7]的角度出发,通过对比血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)以及血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor-2,VEGFR-2)在颈椎钩椎关节退行性变发生前后的表达变化情况,

［基金项目］国家自然科学基金(81860382;81860383);内蒙古自然科学基金(2020MS03061;2020MS08109;2019MS08017;2019MS08319;2022SHZR0151);内蒙古自治区科技发展计划项目(2019GG158);内蒙古自治区卫生健康委医疗卫生科技计划项目(202201217);内蒙古自治区高等学校青年科技英才项目(NJYT22009);内蒙古医科大学科研重点项目(YKD2021ZD011)

［通信作者］王 星,E-mail:wangxing197911@163.com;史 君,E-mail:13948616829@163.com

以分析其与颈椎钩椎关节退行性变的相关性,以及颈椎钩椎关节退行性变对其周围血管环境变化的影响,为颈椎钩椎关节退行性变的治疗提供实验室研究证据及新的诊疗思路。

1 材料与方法

1.1 材料及分组

选取1例正常成人尸体标本,取双侧颈椎C_3~C_7节段共10个钩椎关节设为对照组,固定、包埋及提取RNA;选取1例有颈椎退行性变病史的成人尸体标本,取双侧颈椎C_3~C_7节段共10个钩椎关节设为实验组,固定、包埋及提取RNA。

1.2 主要仪器试剂

硬组织切片机(德国EXAKT公司)、膜片机(德国EXAKT公司)、光固化机(德国EXAKT公司)、4%多聚甲醛(北京索莱宝有限公司)、梯度乙醇(国药集团化学试剂有限公司)、7200树脂(德国Technovit公司)、砂纸(320目、800目、1 200目、4 000目;德国EXAKT公司)。一抗VEGF(英国Abcam公司)及VEGFR-2(英国Abcam公司)为兔抗小鼠多克隆抗体,荧光二抗(美国Thermo公司),DAPI(北京索莱宝有限公司)。TransStart One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(北京全式金生物技术有限公司)。

1.3 免疫组织化学观察

将2组标本经4%多聚甲醛固定48 h,经梯度乙醇脱水后,浸入无水乙醇:Technovit 7200树脂(3∶7)浸润2 d,再浸入无水乙醇:Technovit 7200树脂(1∶1)浸润2 d,之后入Technovit 7200树脂浸润7 d,最后换新的Technovit 7200树脂浸润3 d,经光固化机包埋聚合,制作完成的组织块经硬组织切片机不脱钙联合切片,经磨片机以320目、800目、1 200目顺序打磨成厚度为25 μm的硬组织切片,最后使用4 000目砂纸完成切片抛光。硬组织切片经下行梯度乙醇水化,PBS冲洗3次,每次5 min,之后进行抗原修复,PBS冲洗3次,每次5 min,滴加牛血清白蛋白室温封闭30 min,甩去多余液体。加一抗VEGF(1∶200)、VEGFR-2(1∶200),4 ℃过夜。第2天,恢复室温1 h,滴加二抗,37 ℃孵育30 min,PBS冲洗3次,每次5 min,DAB显色,适时PBS终止显色,封片,拍照。

阳性细胞判断标准:棕黄色即为阳性反应。每组取6张切片,于低倍镜下选择蛋白阳性表达的“热区”,用累积光密度(integrated optical density,IOD)值表示,取均值,即可全面反映蛋白表达量。

1.4 免疫荧光染色技术

制片、染色及一抗孵育步骤同免疫组织化学技术。实验第2天,恢复室温1 h,滴加荧光二抗,室温避光孵育60 min,PBS冲洗3次,每次5 min,DAPI染色10 min,PBS冲洗3次,每次5 min,抗荧光淬灭封片剂封片,拍照。

1.5 实时定量PCR检测

引物由上海生工生物工程技术服务有限公司设计及合成。VEGF上游引物为5′-GTAACGATGAAGCCCTGGAGT-3′,下游引物为5′-TGTTCTGTCTTTCTTTGGTCTGC-3′;VEGFR-2上游引物为5′-ACTGTCATCCTTACCA ATCCCA-3′,下游引物为5′-ATCTGGGGTGGGACATA CAC-3′。

利用TRIzol法提取总RNA;根据RNA浓度,将RNA反转录为cDNA,反应条件:42 ℃ 30 min, 85 ℃ 5 min,4 ℃ 1 h;实时PCR反应条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s;61 ℃ 30 min,72 ℃ 30 s(循环40次);95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,4 ℃ 1 h。

1.6 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件对结果进行分析。计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析并进行方差齐性检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果

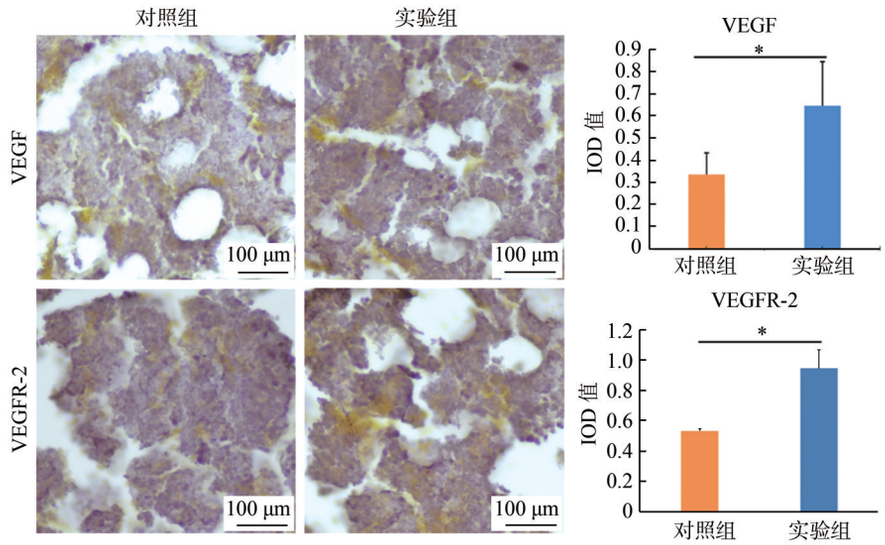
免疫组织化学染色结果显示,实验组VEGF及VEGFR-2蛋白主要表达于细胞质与细胞核,且实验组VEGF、VEGFR-2蛋白表达明显高于对照组,差异具有统计学意义(P<0.05),见图1。

2.2 免疫荧光染色结果

免疫荧光染色法检测结果显示,实验组VEGF及VEGFR-2的表达高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05),见图2。

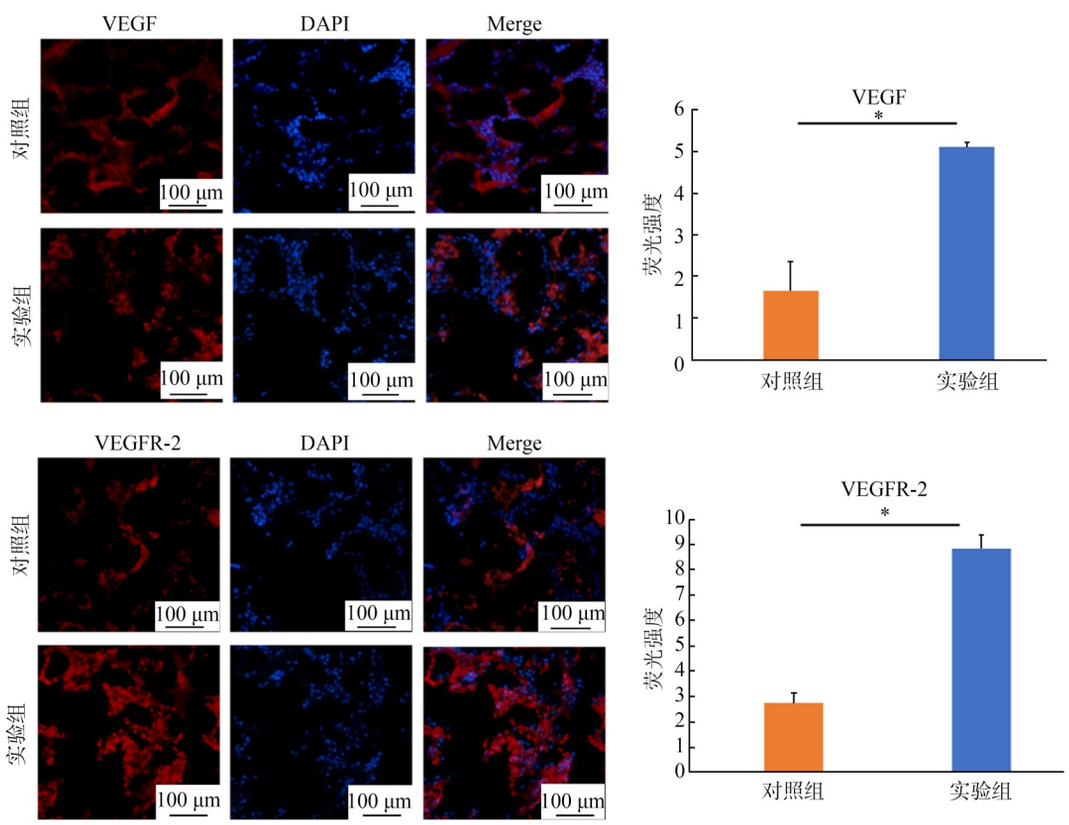
2.3 实时定量PCR检测结果

实时定量PCR检测结果表明,实验组VEGF及VEGFR-2的mRNA表达高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05),见图3。



*:P<0.05

图1 免疫组织化学染色图



*:P<0.05

图2 免疫荧光染色结果

3 讨论

钩椎关节作为重要的颈椎解剖学结构[8],是只存在于颈椎C_3~C_7节段的特殊结构,对于颈部运动如旋转、屈伸以及保持脊柱的4个生理性弯曲、多角度运动都发挥着非常重要的作用[9]。颈椎钩椎关节退行性变一方面会因为压迫脊神经、椎动脉等结构,导致颈椎疾病,另一方面由于软组织退变、滑膜炎症等导致颈椎病理改变[10]。VEGF作为血管生成的重要介质,促进内皮细胞增殖、迁移,在软骨细胞形成分化、成骨细胞增殖以及破骨细胞募集等过程中起重要作用[11];同时也是炎症、组织修复过程中血管形成的关键因子[12]。VEGFR-2作为特殊的酪氨酸激酶受体家族成员,主要

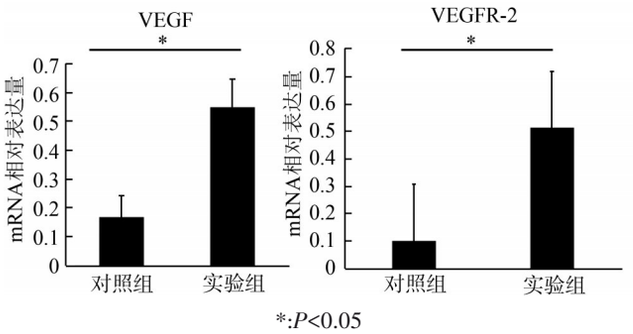


图3 实时定量PCR检测结果

分布在血管内皮细胞和淋巴管内皮细胞中,与血管通透性增加和血管生成密切相关[13]。骨组织生长代谢过程中以及骨关节炎发生过程中均有VEGF及VEGFR-2的表达[14]。

本研究结果显示,与对照组比较,实验组VEGF、VEGFR-2的蛋白和mRNA表达均显著较高,表明颈椎退行性变的发生启动了关节修复机制,触发了关节周围结构的物质交换,促进了新生血管形成,诱导了关节软骨分泌VEGF及VEGFR-2,刺激破骨细胞形成以完成骨的重塑[15-16]。而正常颈椎钩椎关节中无血管新生,关节软骨中无血管存在[16],只有在关节发生损害时,关节软骨及骨周围组织才会加速骨的重塑,完成血管新生等一系列修复程序。据报道,健康成人关节内无VEGF及VEGFR-2表达,但在轻度炎症环境的刺激下,其表达量可显著提升,有效逆转退行性变的发展,成为关节自我调节、修复的重要表现[17]。

综上所述,颈椎钩椎关节退行性变的标本中伴随关节退行性变的发生发展,在类关节自我修复机制的触发下,促进了VEGF及VEGFR-2的表达。作为正反馈调节的特例,退行性变颈椎微环境的变化,启动了血管新生机制,进而通过改善类关节周围血供及血管重建,加速退行性变的自我修复,从而缓解与改善由生理或病理造成的颈椎钩椎关节退行性变。因此,明确颈椎钩椎关节退行性改变与VEGF及VEGFR-2表达变化的规律,将为颈椎钩椎关节退行性变的实验研究及临床诊治提供新思路。

[参考文献]

[1] 梁 栋. 退行性下颈椎不稳症及颈椎管狭窄的三维非线性有限元研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2021. doi:10.27652/d.cnki.gzyku.2021.000014.

[2] 李梓瑜,刘宇航,史 君,等. 基于硬组织切片染色的颈椎钩椎关节的解剖研究[J]. 局解手术学杂志,2022,31(1):15-18. doi:10.11659/jjssx.07E021142.

[3] 杨 毅,刘 浩,孟 阳. 钩椎关节及其与颈椎病关系的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2019,29(9):851-855. doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.09.12.

[4] 王 星,阿格茹,吉热格乐根,等. 颈椎钩突的增龄形态学特征及临床意义[J]. 中国组织工程研究,2023,27(22):3580-3586.

[5] 冯 健,凌秀婷,施俊柱,等. 血清中IGFBP-6、HIF-1α及VEGF水平与不同活动度类风湿性关节炎相关性分析[J]. 中国骨与关节杂志,2022,11(7):533-536. doi:10.3969/j.issn.2095-252X.2022.07.010.

[6] 刘映鸿,伊亚婷. 血管生成在骨关节炎中的作用机制及治疗启示[J]. 中国组织工程研究,2023,27(2):307-313.

[7] 曹 硕,潘胜发,孙 宇,等. 钩椎关节退变与单节段颈椎人工间盘置换术后异位骨化形成的关系[J]. 中华医学杂志,2020,100(45):3578-3583. doi:10.3760/cma.j.cn112137-20200811-02347.

[8] 孟 阳. 颈椎钩椎关节融合器的设计制备及应用基础研究[J]. 成都:四川大学,2020.

[9] 张鸿悦,章耀华,李 强,等. 颈椎退行性变的相关因素分析[J]. 中国矫形外科杂志,2021,29(1):28-32. doi:10.3977/j.issn.1005-8478.2021.01.06

[10] 柳 椰,邬 波,马 旭,等. 膝关节骨关节炎患者血清及关节液中Eotaxin-1、MCP-1和VEGF水平变化与临床意义[J]. 大连医科大学学报,2021,43(6):514-519. doi:10.11724/jdmu.2021.06.07.

[11] 李聪翀,张彦琼,李玮婕,等. 从VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT信号轴所介导的血管新生调控网络探索白虎加桂枝汤干预类风湿关节炎热证的作用及其机制[J]. 药学学报,2022,57(4):1044-1053. doi:10.16438/j.0513-4870.2021-1585.

[12] 许 奇,钱佳佳,许炜民,等. 温经通络汤对膝骨关节炎模型小鼠VEGF/VEGFR2/ERK1/2信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(13):28-34. doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20211203.

[13] 余光书,林焱斌,王松清,等. 血管内皮生长因子介导的血管生成对膝骨性关节炎影响的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2022,30(11):85-88. doi:1005-0205(2022)11-0085-04.

[14] 卢启贵,谢平金,罗 臻,等. MicroRNA-20b-5p对早期膝骨关节炎模型大鼠软骨和软骨下骨血管新生的影响[J]. 中国组织工程研究,2022,26(29):4658-4665.

[15] Su W, Liu G, Liu X, et al. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development[J]. JCI Insight, 2020, 5(8): e135446. doi: 10.1172/jci.insight.135446.

[16] Chen Y, Zhang L, Li E, et al. Long-chain non-coding RNA HOTAIR promotes the progression of osteoarthritis via sponging miR-20b/PTEN axis[J]. Life Sci, 2020, 253: 117685. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117685.

[17] 李依寒,陈进春,邱明山. 类风湿关节炎痰瘀积分与VEGF、VEGFR-2等因子表达量的相关性研究[J]. 风湿病与关节炎,2018,7(9):10-13. doi:10.3969/j.issn.2095-4174.2018.09.002.

(编辑:刘 艺)