

椎间盘退变过程中碱性成纤维细胞生长因子和转移生长因子- β 1 的表达及其意义

彭宝淦¹, 姜笃银², 吴闻文¹, 侯树勋¹, 张春丽¹, 杨毅³, 付小兵²

(1 解放军第 304 医院骨科; 2 创伤修复研究室; 3 病理科 100037 北京市阜成路 51 号)

【摘要】目的:研究椎间盘退变过程中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和转移生长因子- β 1(TGF- β 1)的表达及其意义。**方法:**收集腰椎后路手术切除的 15 例椎间盘源性下腰痛患者的 21 个通过腰椎间盘造影证实的疼痛椎间盘,同时收集 16 个在 MRI T2 加权像上信号强度明显减弱的无腰痛症状的生理老化椎间盘和 10 个正常对照椎间盘,行组织学检查并用免疫组化方法检测 bFGF、TGF- β 1 及其受体在不同椎间盘组织中的表达,观察增殖细胞核抗原在不同椎间盘的表达。**结果:**免疫组化染色显示 bFGF、TGF- β 1 及其受体在疼痛椎间盘大量表达,生理老化椎间盘有少量表达,正常对照椎间盘没有表达。增殖细胞核抗原在疼痛椎间盘的肉芽组织区大量表达,在非肉芽组织区有少量表达;生理老化椎间盘有少量表达,正常对照椎间盘组织没有表达。**结论:**椎间盘退变和椎间盘源性下腰痛起源于椎间盘纤维环的损伤修复过程。bFGF、TGF- β 1 在纤维环外层的损伤修复和随之的椎间盘退变过程中可能起关键作用。

【关键词】椎间盘;退变;生长因子;增殖细胞核抗原

中图分类号:R681.5,Q507 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-06-0353-04

The expression and significance of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor- β 1 during lumbar intervertebral disc degeneration/PENG Baogan,JIANG Duyin,WU Wenwen,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2005,15(6):353-356

【Abstract】Objective:To study the expression and significance of basic fibroblast growth factor(bFGF) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) during lumbar intervertebral disc degeneration.**Method:**Twenty one specimens of lumbar intervertebral discs from 15 patients with discogenic low back pain undergoing posterior lumbar interbody fusion,and 16 senescent discs from patients without low back pain,and 10 normal discs as control were collected,their histopathological features such as the expressions of basic fibroblast growth factor (bFGF) and its receptor (Flg),transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) and its receptor(TGF- β R I) were reviewed by immunohistochemistry.Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) was assessed to evaluate proliferating activities of disc cells.**Result:**The immunohistochemical staining showed that there were high expressions of bFGF and TGF- β 1 and their receptors in the zones of granulation tissue in the painful discs,but only weak expressions in the senescent discs,and no expression in the control discs.There was a strong expression of PCNA in granulation tissue zone in the painful discs,a weak expression in zone of nongranulation tissue and senescent discs,and no expression in normal discs.**Conclusion:**The degeneration of disc might be originated from the injury and subsequent repair of annulus fibrosus.Growth factors such as bFGF and TGF- β 1 might play a key role in the repair of the injured annulus fibrosus and subsequent disc degeneration.

【Key words】 Intervertebral disc; Degeneration; Growth factor; Proliferating cell nuclear antigen

【Author's address】 Department of Orthopaedics, 304th Hospital, Beijing, 100037, China

创伤修复的最新研究成果已公认生长因子参与调控创伤修复的全过程。许多生长因子如碱性

成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β ,TGF- β)对创伤修复有促进作用。但这些生长因子也可能促进组织不正常的改变,如诱导组织纤维化和细胞异常分化。目前还不清楚生长

第一作者简介:男(1964-),副主任医师,医学博士后,研究方向:脊柱外科
电话:(010)66848371 E-mail:pengbaogan@163.com

因子在椎间盘损伤修复和椎间盘退变中的作用。本研究采用组织学和免疫组化方法检测 bFGF 和 TGF- β 1 及其受体在不同椎间盘组织中的表达,旨在探讨其与椎间盘退变的关系。

1 材料和方法

1.1 标本来源

21 个疼痛椎间盘标本来自 15 例行后路椎体间植骨融合(PLIF)手术的严重下腰痛患者,取材方法同文献^[1]。男 9 例,女 6 例;年龄 19~68 岁,平均 42.4 岁;病程 6~240 个月,平均 42 个月。所有患者均摄腰椎正、侧位 X 线片,并行腰椎 MRI 检查。患者均无神经根性症状和体征,MRI 上无腰椎间盘突出。所有患者术前均行腰椎间盘造影术,以确定疼痛椎间盘,L3/4 2 个,L4/5 8 个,L5/S1 11 个。其中有 1 例患者行 L3~S1 3 个椎间隙融合,4 例患者行 L4~S1 2 个椎间隙融合。MRI 检查发现所有疼痛椎间盘在 T2 加权上信号强度均减弱。10 个正常对照椎间盘来自 5 具新鲜尸体(22~54 岁,平均 39 岁)的 L4/5 和 L5/S1 椎间隙,肉眼观察所有椎间盘均无椎间盘突出或膨出,死者生前无腰痛病史,组织学检查无异常。同时取 16 个无椎间盘突出或膨出但 MRI 检查显示椎间盘信号明显减弱的椎间盘,我们称之为生理老化椎间盘。这些椎间盘取自 6 例腰椎管狭窄症患者和 8 例多节段腰椎后路融合的患者,年龄 44~75 岁,平均 53.5 岁,男 8 例,女 6 例。腰椎管狭窄症患者主要表现为双下肢间歇性跛行,休息时基本无腰痛或轻度腰痛,术中未见椎间盘突出或膨出。多节段腰椎融合患者至少有一个疼痛椎间盘,邻近椎间盘明显退变,但椎间盘造影没有疼痛。

所有椎间盘包括后纵韧带、后方纤维环和部分髓核。疼痛椎间盘应包括椎间盘造影术后 CT 所示的裂隙部位,其手术切除范围根据术前腰椎间盘造影术后 CT 所示的裂隙部位将裂隙及其周

围椎间盘组织一并取下。正常椎间盘和生理老化椎间盘作对照。标本用 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋。

1.2 组织学观察

对疼痛椎间盘首先进行矢状面 5 μ m 连续组织学切片,间隔选取 3~5 张切片行 HE 染色,在显微镜下确定裂隙或含有肉芽组织条带区后,作连续组织切片。所有组织切片捞于 APES 和多聚赖氨酸(美国 Maxin 公司)包被的玻片上,行免疫组织化学染色。

1.3 免疫组织化学染色和观察

(1)材料:兔抗人 bFGF(147)和受体 Flg(C-15)、TGF- β 1(V-22)和受体 TGF- β RI(V-22),多克隆抗体以及增殖细胞核抗原(PCNA,PC10)单克隆抗体(美国 Santa Cruz Bio.Inc.)。所有抗体用抗体稀释液按 1:100~200 稀释。Ultra Sensitive™ S-P 法免疫组化染色试剂盒(美国 Maxin 公司)。(2)免疫组织化学染色方法:常规设阴性和阳性对照,切片脱蜡至水,用 1.25g/L 胃蛋白酶抗原修复后,按 Ultra Sensitive™ S-P 试剂盒说明书方法进行染色,结果以胞浆或/和胞膜、细胞外基质着棕色者为阳性染色。(3)观察方法:400 倍光镜下随机观察 5 个不同视野,分别计算 bFGF、Flg、TGF- β 1、TGF- β RI 和 PCNA 阳性细胞数。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用微软 Excel 2000 Student' test 作样本均数 t 检验, $P < 0.05$ 视为有显著性差异。

2 结果

见表 1。在正常对照椎间盘,无论是纤维环和髓核组织内都未见 bFGF 和 TGF- β 1 及其受体表达。在生理老化椎间盘,bFGF、TGF- β 1 及其受体表达微弱,阳性染色信号位于椎间盘基质细胞的胞浆和外层纤维环内血管内皮细胞。在椎间盘源

表 1 不同椎间盘组织 bFGF、Flg、TGF- β 1、TGF- β RI 和 PCNA 免疫组化染色结果 ($\bar{x} \pm s$, 阳性细胞数/单位面积)

标本	n	bFGF	Flg	TGF- β 1	TGF- β RI	PCNA
疼痛椎间盘	21					
肉芽组织区	21	42.47 $\pm$ 11.18 ^①	36.34 $\pm$ 7.72 ^①	57.48 $\pm$ 16.93 ^①	46.59 $\pm$ 14.08 ^①	40.85 $\pm$ 12.81 ^①
非肉芽组织区	21	4.42 $\pm$ 0.87 ^②	3.85 $\pm$ 1.53 ^②	8.84 $\pm$ 2.15 ^③	6.45 $\pm$ 2.65 ^③	9.18 $\pm$ 3.42 ^③
老化椎间盘	16	5.80 $\pm$ 1.14	3.66 $\pm$ 2.30	6.76 $\pm$ 1.60	4.25 $\pm$ 1.81	6.24 $\pm$ 2.47
正常椎间盘	10	0	0	0	0	0

注:①与非肉芽组织区和老化椎间盘比较 $P < 0.01$;②与老化椎间盘比较 $P > 0.05$;③与老化椎间盘比较 $P < 0.05$

性下腰痛患者的疼痛椎间盘, bFGF 和 TGF- β 1 及其受体呈强阳性表达, 尤其在肉芽组织条带区(图 1、2, 后插页 III)。离条带区越远, 生长因子及其受体表达越弱。两种生长因子的阳性染色信号主要位于成纤维细胞、血管内皮细胞、巨噬细胞和椎间盘基质细胞以及胞外基质。

在显微镜下将疼痛椎间盘组织切片分为肉芽组织区和非肉芽组织区。在疼痛椎间盘, 两种生长因子及其受体在肉芽组织区显著高于老化椎间盘($P<0.01$), 在非肉芽组织区, 两种生长因子的表达显著下降, bFGF 与老化椎间盘相当, TGF- β 1 表达高于老化椎间盘($P<0.05$)。PCNA 阳性物质定位于细胞核。所有正常对照椎间盘均未见 PCNA 阳性染色。生理老化椎间盘组织可见弱阳性 PCNA 表达。疼痛椎间盘组织肉芽组织区的 PCNA 表达明显增高, 显著高于生理老化椎间盘组织($P<0.01$)(图 3, 后插页 III)。

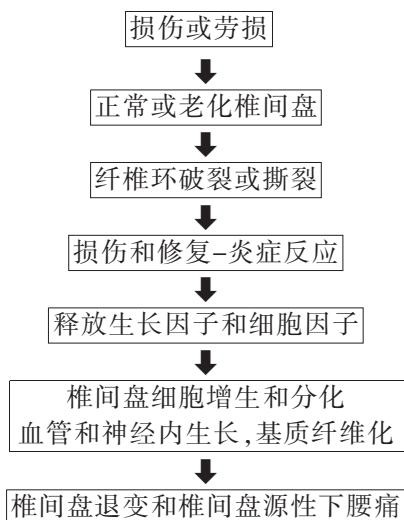
3 讨论

大约 80% 的人群在一生中的某个时候会经历下腰痛。在任何时候有约 18% 的人正被下腰痛所困扰^[2]。通常考虑它与腰神经根受压有关, 但 MRI 或 CT 检查经常发现并没有腰椎间盘突出和神经根受压^[3]。近来的研究发现腰椎间盘突出不是引起下腰痛的最主要原因, 由纤维环撕裂引起的椎间盘源性疼痛才是慢性下腰痛的主要原因^[4]。通过椎间盘造影证明的疼痛椎间盘, 在 MRI 的 T2 加权像上通常显示信号强度下降, 即所谓的椎间盘退变。50 岁以上无腰痛人群中, MRI 显示椎间盘退变是普遍的^[5], 但 MRI 不能区分在 T2 加权像上信号强度减弱的椎间盘是正常老化的椎间盘还是疼痛的病理椎间盘^[6]。在我们以前的研究中发现^[7], 组织学上疼痛的病理椎间盘的特征性改变是形成自纤维环后方外层到髓核的伴有广泛神经分布的肉芽组织条带区, 其对应于腰椎间盘造影术显示的裂隙。正常椎间盘仅纤维环表层有血管分布, 无症状的正常老化椎间盘的血管分布也仅见于外层纤维环, 绝不见于内层纤维环和髓核。深入髓核的血管肉芽组织条带区最可能起源于外层纤维环的机械性损伤或创伤和随之的创伤修复过程。单纯内层纤维环或髓核的撕裂因此部位缺乏血供不会诱发形成损伤后的血管肉芽组织的修复过程。

我们认为椎间盘源性下腰痛患者的疼痛椎间盘(即真正的退变椎间盘)起源于创伤有下面几个理由:(1)在我们的临床研究中发现很多椎间盘源性下腰痛患者年龄小于 20 岁, 很难想象它是与椎间盘老化相关的疾病;(2)椎间盘造影显示疼痛椎间盘总是伴有纤维环外层的撕裂;(3)组织学研究发现疼痛椎间盘的组织学特征是椎间盘后方形成炎性血管肉芽组织条带区, 它对应于椎间盘造影术后 CT 显示的纤维环撕裂, 且在一些椎间盘的条带区发现创伤修复的所有过程, 即炎症反应、肉芽组织和组织重建;(4)椎间盘后外层结构最为薄弱, 易于损伤, 这与椎间盘造影显示的撕裂部位是一致的^[8];(5)动物实验已经发现纤维环外层的损伤能够启动整个椎间盘的退变^[9-11]。

生长因子在体外能控制细胞的增殖或分化, 在体内能介导细胞之间的相互作用。它们不仅可以控制机体的发育、生长, 还可控制组织的再生和创伤愈合, 但也可促进组织的不正常改变。bFGF、TGF- β 通过各自的受体信号转导通路促进成纤维细胞和血管内皮细胞等间质细胞增殖和合成胶原蛋白, 是对创伤修复具有重要调控作用的生长因子^[1,12,13]。bFGF 作为一种重要的促有丝分裂原, 它可以直接作用于组织修复细胞(如成纤维细胞)周期, 使细胞 G1 期比例下降, S 期和 G2+M 期比例增加, 使细胞周期转换时间缩短, 加速细胞的分裂和增殖。TGF- β 作为一种多功能生长因子, 除作为化学催化剂催化炎性细胞与组织修复细胞向创面聚集外, 本身还能直接作用于成纤维细胞, 刺激细胞外基质中 I 型前胶原合成、肉芽组织生长以及修复后期的组织重建等。Thompson 等^[14]研究了生长因子对培养的椎间盘细胞的作用, 他们发现生长因子能够促进椎间盘细胞的增殖和基质的合成。Nagano 等^[15]通过椎间盘退变动物模型研究发现, bFGF 作为一种增殖促进因子, 可能以自分泌或旁分泌的方式刺激椎间盘软骨细胞的增殖, 促进了椎间盘的退变。Tolonen 等^[16]通过研究 bFGF 在突出腰椎间盘的表达, 发现 bFGF 不但促进了新血管向椎间盘的长入, 而且可能通过提高椎间盘内降解酶活性引起椎间盘基质的降解。本研究发现, 在疼痛椎间盘中不但在肉芽组织内有两种生长因子大量表达, 而且在非肉芽组织部位生长因子也有表达。正常髓核软骨样细胞不表达生长因子, 但在疼痛椎间盘软骨样细胞被成纤维

细胞所替代,且生长因子大量表达。椎间盘组织和其它部位的组织不同,因为椎间盘是全身最大的无血供组织,其它部位的组织创伤愈合过程是从内到外的,而椎间盘组织的创伤愈合过程正相反,它是从外到内的过程,因为只有椎间盘最外层纤维环和后纵韧带带有血管分布。当纤维环撕裂或损伤后,血管组织只能从纤维环外层向内层逐渐长入。向椎间盘内迁移的内皮细胞是新毛细血管形成的主体细胞。内皮细胞在多种生长因子作用下向无血管区的椎间盘组织内迁移、分化、增殖,逐渐形成丰富的毛细血管网。内皮细胞本身亦能产生纤溶酶原激活剂和胶原酶,为其迁移开道路。随着纤维环的损伤所激发的局部炎症血管反应,炎症部位的细胞大量产生生长因子,这些生长因子作用于与循环系统隔绝的椎间盘细胞,通过信号转导,促进了椎间盘细胞的分化、增殖和细胞外基质的大量合成。这可能是椎间盘退变的主要原因。疼痛椎间盘组织中 PCNA 的大量表达证明了这一点。PCNA 是一种非组蛋白核蛋白,是 DNA 合成所必需的 DNA 多聚酶 δ 的辅助蛋白,可使多聚酶 δ 的活性增加几百倍。目前认为它的表达是衡量细胞增殖的重要指标^[17]。由此,我们提出:



4 参考文献

1. Lee TY, Chin GS, Kim WJH, et al. Expression of transforming growth factor beta 1, 2 and 3 proteins in keloids [J]. Ann Plast Surg, 1999, 43(2): 179-184.
2. Andersson GB. Epidemiology of low back pain [J]. Acta Orthop Scand, 1999, 69(Suppl 281): 28-31.

3. Birski G, Silberstein M. The symptomatic lumbar disc in patients with low-back pain: magnetic resonance imaging appearances in both a symptomatic and control population [J]. Spine, 1993, 18(17): 1808-1811.
4. Schwarzer AC, Aprill CN, Derby R, et al. The prevalence and clinical features of internal disc disruption in patients with chronic low back pain [J]. Spine, 1995, 20(17): 1878-1883.
5. Jensen MC, Brant-Zawadzki MN, Obuchowski N, et al. Magnetic resonance imaging of the lumbar spine in people without back pain [J]. N Engl J Med, 1994, 331(1): 69-73.
6. Horton WC, Daftari TK. Which disc as visualized by magnetic resonance imaging is actually a source of pain? a correlation between magnetic resonance imaging and discography [J]. Spine, 1992, 17(Suppl): 164-171.
7. Peng B, Wu W, Hou S, et al. The pathogenesis of discogenic low back pain [J]. J Bone Joint Surg (Br), 2005, 87(1): 62-67.
8. Tsuji H, Hirano N, Ohshima H, et al. Structural variation of the anterior and posterior annulus fibrosus in the development of human lumbar intervertebral disc: a risk factor for intervertebral disc rupture [J]. Spine, 1993, 18(2): 204-210.
9. Osti OL, Vernon-Roberts B, Fraser RD. Annulus tears and intervertebral disc degeneration: an experimental study using an animal model [J]. Spine, 1990, 15(8): 762-767.
10. Hampton D, Laros G, McCarron R, et al. Healing potential of the annulus fibrosus [J]. Spine, 1989, 14(4): 398-401.
11. Kääpä E, Han X, Holm S, et al. Collagen synthesis and types I, III, IV, and VI collagens in an animal model of disc degeneration [J]. Spine, 1995, 20(1): 59-67.
12. Fu XB, Shen ZY, Chen YL, et al. Randomised placebo-controlled trial of use of topical recombinant bovine basic fibroblast growth factor for second-degree burns [J]. Lancet, 1998, 352: 1661-1664.
13. Martin P. Wound healing aiming for perfect skin regeneration [J]. Science, 1997, 276: 75-81.
14. Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors [J]. Spine, 1991, 16(3): 253-260.
15. Nagano T, Yonenobu K, Miyamoto, et al. Distribution of the basic fibroblast growth factor and its receptor gene expression in normal and degenerated rat intervertebral discs [J]. Spine, 1995, 20(18): 1972-1978.
16. Tolonen J, Gronblad M, Virri J, et al. Basic fibroblast growth factor immunoreactivity in blood vessels and cells of disc herniations [J]. Spine, 1995, 20(3): 271-276.
17. Prelich G, Tan CK, Kostura M, et al. Functional identify of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase δ auxiliary protein [J]. Nature, 1987, 326: 517.

(收稿日期: 2004-11-05 修回日期: 2005-02-18)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)