

基础研究

基质细胞衍生因子-1 在人正常和退变
椎间盘中的表达、分布及意义

王 琨,王 锋,吴小涛,洪 鑫,王运涛,时 睿,蔡 峰,王 炎

(东南大学附属中大医院骨科 210009 南京市)

【摘要】目的:比较人正常和退变椎间盘髓核中央区、髓核与纤维环交界区、纤维环外层、纤维环内层及软骨终板 5 个相邻部位的基质细胞衍生因子-1(SDF-1)的表达情况,探讨退变椎间盘 SDF-1 的表达在上述五个相邻部位是否具有差异。**方法:**获取 20 例腰椎间盘突出症患者的椎间盘(L4/5,病理证实为退变椎间盘组织),并纳入退变组;7 例急性腰椎爆裂骨折患者的椎间盘(L3/4)及 3 例脊柱侧凸患者的椎间盘(L2/3,病理证实为正常椎间盘组织),纳入正常组。HE 染色观察两组椎间盘的组织学结构,免疫组织化学、Western-blot、rt-PCR 检测椎间盘髓核中央区、髓核与纤维环交界区、纤维环内层、纤维环外层及软骨终板 5 个部位的 SDF-1 表达情况及分布,并将退变椎间盘上述 5 个部位的 SDF-1 免疫组化积分光密度值与供者年龄、椎间盘 Thompson 分级作相关分析。**结果:**正常组的上述 5 个部位 SDF-1 免疫组化积分光密度值分别为 420.87 ± 89.93 、 407.80 ± 100.76 、 380.02 ± 85.05 、 342.89 ± 63.76 、 344.06 ± 88.97 ;Western-blot 灰度比值分别为 0.08 ± 0.03 、 0.08 ± 0.05 、 0.07 ± 0.04 、 0.05 ± 0.03 、 0.05 ± 0.02 ;rt-PCR 灰度比值分别为 0.22 ± 0.06 、 0.22 ± 0.05 、 0.20 ± 0.04 、 0.20 ± 0.04 、 0.20 ± 0.04 。退变组上述 5 个部位 SDF-1 免疫组化积分光密度值分别为 7355.13 ± 2271.74 、 5959.58 ± 2436.23 、 5397.49 ± 3044.80 、 1605.44 ± 825.31 、 361.91 ± 104.22 ;Western-blot 灰度比值分别为 0.55 ± 0.29 、 0.52 ± 0.28 、 0.42 ± 0.18 、 0.21 ± 0.12 、 0.06 ± 0.04 ;rt-PCR 灰度比值分别为 0.75 ± 0.30 、 0.71 ± 0.26 、 0.55 ± 0.22 、 0.36 ± 0.17 、 0.22 ± 0.13 。退变椎间盘 5 个部位的 SDF-1 表达均高于正常组($P < 0.05$),且 SDF-1 表达量髓核中央区>纤维环内层>纤维环外层>软骨终板,差异有统计学意义($P < 0.05$),而髓核中央区和髓核与纤维环交界区比较无统计学差异($P > 0.05$);退变椎间盘上述 5 个部位的 SDF-1 表达与椎间盘 Thompson 分级、年龄呈正相关性($P < 0.05$)。**结论:**SDF-1 广泛表达于退变和正常的椎间盘中,其表达在退变椎间盘中上述 5 个相邻部位存在差异。

【关键词】基质细胞衍生因子-1;椎间盘退变;正常椎间盘

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2013.10.09

中图分类号:R681.5,Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2013)-10-0916-08

The expression, distribution and significance of stromal cell-derived factor-1 in the normal and degenerative intervertebral disc/WANG Kun, WANG Feng, WU Xiaotao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(10): 916-923

【Abstract】Objectives: To compare the expressions of stromal cell-derived factor-1(SDF-1) in different areas of normal and degenerative intervertebral disc, and to explore the expression pattern of SDF-1 in five adjacent parts of the intervertebral disc, which was the inner nucleus pulposus(INP), transitional nucleus pulposus(TNP), inner annulus fibrosus(IAF), outer annulus fibrosus(OAF) and cartilage endplate(CEP). **Methods:** 20 patients with lumbar intervertebral disc herniation were collected as the degeneration group(the degenerated discs were all located in L4/5, confirmed by surgical pathology). 7 patients with acute bursting fracture and 3 patients with scoliosis were included as the control group. Intervertebral disc was divided into five areas, which included INP, TNP, IAF, OAF, CEP. HE staining was used to detect the structure of the intervertebral disc in both groups; immunohistochemistry, Western blot and rt-PCR were used to detect the expression and distribution of SDF-1 in the five adjacent areas between two groups. Finally, the relationship between the results

基金项目:国家自然科学基金(项目编号:81071493,31070876)

第一作者简介:男(1988-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(025)83262331 E-mail:wangkunspine@163.com

通讯作者:吴小涛 E-mail:wuxiaotao@medmail.com.cn

of immunohistochemistry of SDF-1, donor age and Thompson classification of the intervertebral disc in both groups were analyzed. **Results:** In control group, the immunohistochemistry IOD value of SDF-1 in the above-mentioned five areas was 420.87 ± 89.93 , 407.80 ± 100.76 , 380.02 ± 85.05 , 342.89 ± 63.76 , 344.06 ± 88.97 respectively; Gray value of Western-blot was 0.08 ± 0.03 , 0.08 ± 0.05 , 0.07 ± 0.04 , 0.05 ± 0.03 , 0.05 ± 0.02 respectively; Gray value of rt-PCR was 0.22 ± 0.06 , 0.22 ± 0.05 , 0.20 ± 0.04 , 0.20 ± 0.04 , 0.20 ± 0.04 respectively. As for the degeneration group, the OD value of SDF-1 in those five areas was 7355.13 ± 2271.74 , 5959.58 ± 2436.23 , 5397.49 ± 3044.80 , 1605.44 ± 825.31 , 361.91 ± 104.22 respectively; Gray value of Western-blot was 0.55 ± 0.29 , 0.52 ± 0.28 , 0.42 ± 0.18 , 0.21 ± 0.12 , 0.06 ± 0.04 respectively; Gray value of rt-PCR was 0.75 ± 0.30 , 0.71 ± 0.26 , 0.55 ± 0.22 , 0.36 ± 0.17 , 0.22 ± 0.13 respectively. The expression of SDF-1 in the five areas in the degeneration group was higher than the control group ($P < 0.05$). Besides, the expression of SDF-1 in the five areas presented as a gradient manner, with the highest in the inner annulus fibrosus and the lowest in the cartilage endplate, which showed statistically significant difference ($P < 0.05$). However, the central nucleus pulposus and border area nucleus pulposus had no difference ($P > 0.05$). The expressions of SDF-1 in five areas had a positive correlation with the donor age and the Thompson classification. **Conclusions:** SDF-1 is expressed widely in the degenerative and normal intervertebral disc, and the distribution of SDF-1 in degenerated intervertebral disc at adjacent areas was in a gradient manner.

[Key words] Stromal cell-derived factor-1; Intervertebral disc degeneration; Normal intervertebral disc

[Author's address] Department of Orthopaedics, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing, 210009, China

近年来骨髓间充质干细胞(MSCs)在重建和恢复椎间盘生物学功能方面有着巨大潜能, MSCs 通过在椎间盘内迁移发挥修复作用, 而 MSCs 迁移受到基质细胞源性因子-1(SDF-1)及其受体趋化因子-4(CXCR4)信号轴的影响^[1]。目前关于椎间盘内 SDF-1 表达情况研究较少, 高表达 CXCR4 基因的 MSCs 在椎间盘内迁移的路线不甚明了。本研究旨在从组织、蛋白、基因水平分别检测并比较人正常和退变椎间盘髓核中央区、髓核与纤维环交界区、纤维环外层、纤维环内层及软骨终板 5 个相邻部位的 SDF-1 的表达情况, 探讨退变椎间盘 SDF-1 的表达在上述 5 个相邻部位是否具有差异。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Elivision plus 试剂盒(福州迈新生物科技有限公司)、辣根过氧化物酶显色试剂盒(DAB Kit, 福州迈新生物科技有限公司)、苏木素染色液(南京建成公司)、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司)、SDF-1-抗体(ABCAM)、通用型 IgG(PIRCE)、Trizol(Invitrogen)、cDNA 第一链合成试剂盒(KeyGen)、Taq DNA Polymerase(Fermentas)

1.2 主要仪器

切片机(美国 Reichert HistoSTAT)、孵箱(上

海精宏实验设备有限公司)、显微镜(Olympus)、超净工作台(苏州净化)、CO₂ 培养箱(SANYO)、Western 电泳仪(Bio-Rad) NC(PALL)、医用 X 线胶片(柯达)、PCR 循环仪(Labnet)、核酸电泳仪(北京六一)、凝胶成像仪(BIO-RAD)。

1.3 椎间盘标本的获取

术中获取东南大学附属中大医院脊柱外科 30 例患者的椎间盘标本, 其中退变组 20 例, 正常组 10 例。退变组纳入标准: 腰椎间盘突出症、椎滑脱、椎管狭窄等患者, 且病理和 MRI 证实为退变椎间盘组织; 正常组纳入标准: 外伤或脊柱侧凸或符合要求的意外死亡患者, 且病理和 MRI 证实为正常椎间盘组织。均经患者本人及家属同意且签署同意书。退变组中, 男 11 例, 女 9 例, 年龄 45~75 岁, 平均 58 岁, 均为腰椎间盘突出症伴腰椎管狭窄的患者, 行经椎间孔腰椎管减压、椎间盘切除及椎体间融合术(TLIF), 每例取出的椎间盘均为 1 个, 即 L4/5 椎间盘, 且病理证实为退变椎间盘组织。正常组中, 7 例男性, 年龄 20~44 岁, 平均 30 岁, 既往健康, 无脊柱病变史, 为急性腰椎爆裂性骨折行椎管内减压内固定术患者, 均取 L3/4 椎间盘, 且病理证实为正常椎间盘组织; 3 例女性, 年龄均为 12 岁, 为脊柱侧凸行前路松解术患者, 均取 L2/3 椎间盘且病理证实为正常椎间盘组织。对所有获取的椎间盘组织按照 Thompson 椎

间盘退变病理分级进行组织学分级^[2]。

解剖显微镜下将组织分为髓核中央区(inner nucleus pulposus, INP)、髓核与纤维环交界区(transitional nucleus pulposus, TNP)、纤维环内层(inner annulus fibrous, IAF)、纤维环外层(outer annulus fibrous, OAF)以及软骨终板(cartilage endplate, CEP)5个部分。髓核中心的区域定义为INP;髓核与纤维环内层交界区域定义为TNP;纤维环的内1/3为IAF,纤维环的外2/3为OAF^[3];紧贴每个椎体上方或下方的薄层软骨为CEP。分离完后将组织一式2份,其中1份分别装在5个冻存管中,0℃保存并于半小时内送到实验室进行液氮保存;另1份于4%多聚甲醛溶液固定。

1.4 组织学评价

将分离完的5个部位组织置于4%多聚甲醛溶液固定48h,软骨终板用15%乙二胺四乙酸(EDTA)溶液脱钙,EDTA溶液量是固定组织的20倍左右,置于37℃温箱内,每周换液1次。4周后行梯度酒精脱水,石蜡包埋,进行横断面连续切片。每个椎间盘切片20张,每张厚约6μm。选择其中结构较为完整的8张切片进行伊红-苏木精(HE)染色。二甲苯透明,封片,光学显微镜(×400)观察组织结构并拍照。

1.5 免疫组织化学染色检测 SDF-1 在椎间盘各部位的表达

新鲜标本用生理盐水冲洗2~3遍,于液氮中行OCT包埋剂冷冻包埋。冰冻切片机横断面连续切片20张,每张厚约5~6μm。选择结构较为完整的10张切片进行染色观察。冷丙酮固定5min,晾干,磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,每次5min。3% H₂O₂ 封闭15min,0.3% TritonX-100,30min,PBS每次冲洗5min,共3次;10%羊血清封闭30min,倾去不洗,滴加I抗(1:150),4℃过夜。次晨37℃复温1h,PBS洗3次,每次5min;滴加II抗(1:100),37℃孵育30min,PBS洗3次;加DAB显色5min,终止反应,双蒸水充分冲洗,常规脱水,透明,封片。光学显微镜下观察组织细胞中SDF-1的表达情况,首先在40倍镜下观察组织整体形态,发现阳性表达区域后,调至400倍进一步观察阳性区域的表达,再进行拍照,最后使用专业图片分析软件Image-Pro Plus 6.0得出SDF-1积分光密度值(IOD)。

1.6 免疫蛋白印迹法(Western-blot)检测 SDF-1

蛋白在椎间盘各部位的表达

将少量组织置于冰上尽量碾碎后加入蛋白裂解液提取总蛋白,制备样品并配置SDS-PAGE凝胶,行SDS-PAGE凝胶电泳,将蛋白质电转移至硝酸纤维素膜(NC)膜和膜封闭,封闭结束后,加入适量一抗SDF-1抗体。摇床振荡孵育(4℃,过夜)。将膜与辣根过氧化物酶(HRP)结合的二抗(辣根过氧化物酶标记抗体,二抗用封闭液稀释(1:5000)室温下振荡孵育2h,然后用PBST充分洗膜,漂洗4次,每次10min。按0.1ml/cm²显影液计算用量,将显影液加于NC膜上,室温放置1min。用保鲜膜将膜包好(尽量避免气泡)。暗室中迅速将膜蛋白贴在X光胶片上曝光,洗片机中显影、洗像。调整曝光时间,直至出现最佳条带,β-actin作内参。用Gel-Pro32图像分析软件计算分析条带的灰度值,结果以SDF-1与β-actin条带值的比值表示。

1.7 rt-PCR 检测 SDF-1 在椎间盘各部位的表达

总RNA提取过程严格按照KeyGen试剂说明书进行,外分光光度计测定,经测定所用样品的A260/A280比值都在1.8~2.0。反转录过程也按试剂说明书进行操作。GAPDH上游引物序列:5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTT-3';下游引物序列:5'-AGATGATGACCCTTTTGGCTC-3';引物长度为352bp。SDF-1基因上游引物序列:5'-CTACAGATGCCCATGCCGAT-3';下游引物序列:5'-GTGGGTCTAGCGGAAAGTCC-3';引物长度为226bp。反应过程如下:94℃预变性3min,94℃变性30s,56.5℃(SDF-1)、58.5℃(GAPDH)退火30s,72℃延伸1min,5个循环后于72℃延伸5min。取产物置2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统进行拍照,BandScan 4.3软件分析灰度值,结果以目的基因SDF-1条带灰度值与内参照GAPDH灰度值的比值表示。

1.8 统计学处理

应用SPSS 18.0统计软件分析数据。对正常组和退变组的SDF-1免疫组化积分光密度值、Western-blot灰度比值、rt-PCR灰度比值分别做t检验;对退变组的SDF-1免疫组化积分光密度值与年龄、Thompson分级作Pearson线性相关分析;比较正常组和退变组椎间盘不同部位的SDF-1免疫组化积分光密度值、Western-blot灰度比值、rt-PCR灰度比值分别,用One-way ANOVA进行

统计学处理, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 椎间盘 Thompson 分级

正常组 10 例椎间盘均未见明显退变, 退变组 20 例椎间盘中 II 级 6 例, III 级 6 例, IV 级 6 例, V 级 2 例。

2.2 HE 染色

正常组、退变组椎间盘各部位 HE 染色结果见图 1。正常组髓核组织结构疏松, 含有大量基质成分, 胶原纤维量少, 呈细束状分散排列, 并可见散在的软骨样细胞; 纤维环板层结构致密, 细胞成分较多, 呈梭形纤维细胞样或呈软骨细胞样; 软骨终板结构良好, 层次清晰, 未见钙化。在退变组中, 各标本均表现出一定的退变特征: 髓核软骨细胞减少, 纤维细胞增生, 组织坏死, 玻璃样变及纤维

化, 髓核组织中有毛细血管形成, 炎性细胞浸润等; 纤维环板层结构紊乱, 软骨细胞巢状增生, 纤维环粘液样退变, 裂隙形成; 软骨终板细胞减少, 胶原纤维环聚集成片。

2.3 免疫组织化学法观察 SDF-1 在椎间盘各部位的表达

退变组、正常组椎间盘免疫组化染色结果见图 2。所有染片背景染色清晰, SDF-1 阳性反应呈棕褐色, 主要位于胞浆内。两组 INP、TNP、IAF、OAF、CEP 均有 SDF-1 表达, 退变组椎间盘高表达, 正常组椎间盘低表达, 且退变组与正常组间差异有显著性 ($P < 0.05$)。退变组中 SDF-1 积分光密度值: $INP > TNP > IAF > OAF > CEP$, INP 与 TNP 无统计学差异 ($P > 0.05$), 其余部位两两比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。正常组 INP、TNP、IAF、OAF、CEP 的 SDF-1 的表达差异不显著 ($P > 0.05$, 表 1)。

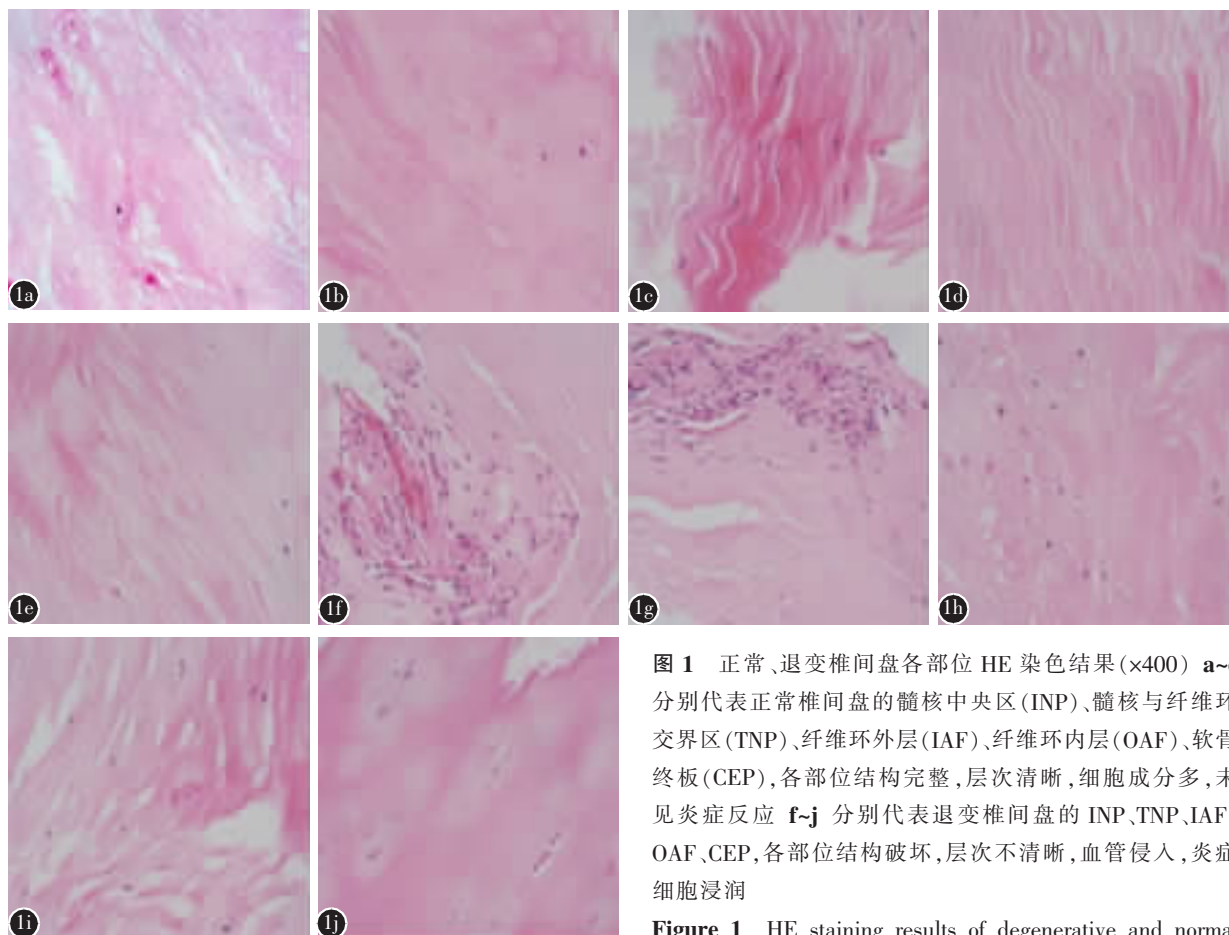


图 1 正常、退变椎间盘各部位 HE 染色结果($\times 400$) a~e 分别代表正常椎间盘的髓核中央区(INP)、髓核与纤维环交界区(TNP)、纤维环外层(IAF)、纤维环内层(OAF)、软骨终板(CEP), 各部位结构完整, 层次清晰, 细胞成分多, 未见炎症反应 f~j 分别代表退变椎间盘的 INP、TNP、IAF、OAF、CEP, 各部位结构破坏, 层次不清晰, 血管侵入, 炎症细胞浸润

Figure 1 HE staining results of degenerative and normal intervertebral disc ($\times 400$) a~e Results in the inner nucleus pulposus (INP), transitional nucleus pulposus (TNP), inner annulus fibrous (IAF), outer annulus fibrous (OAF) cartilage endplate (CEP) of the control group, respectively. Intact structure and no inflammatory was observed in each area f~j Results in the above-mentioned five areas of the degenerative group. Disrupted structure, vascular invasion and inflammatory cell infiltration were observed in each area

2.4 Western-blot 检测 SDF-1 蛋白在椎间盘各部位的表达

正常组和退变组椎间盘各部位 SDF-1 蛋白的凝胶电泳结果见图 3。退变组中 INP>TNP>IAF>OAF>CEP, INP 与 TNP 无统计学差异 ($P>0.05$), 其余部位两两比较有统计学差异 ($P<0.05$); 正常

组中, INP、TNP、IAF、OAF、CEP 的 SDF-1 的表达差异不显著 ($P>0.05$, 表 2)。

2.5 rt-PCR 法检测 SDF-1 mRNA 在椎间盘各部位的表达

正常和退变椎间盘各部位 SDF-1 mRNA 的表达情况见图 4。退变组中 INP>TNP>IAF>OAF>



图 2 退变组、正常组椎间盘各部位 SDF-1 免疫组化染色结果 (Envision $\times 40$), 插图是箭头所指区域的放大图 ($\times 400$) a~e 分别代表退变组椎间盘的髓核中央区 (INP)、髓核与纤维环交界区 (TNP)、纤维环外层 (IAF)、纤维环内层 (OAF)、软骨终板 (CEP) f~j 分别代表正常组椎间盘的 INP、TNP、IAF、OAF、CEP。所有染片背景染色清晰, SDF-1 阳性反应呈棕褐色, 主要位于胞浆内。退变、正常椎间盘均广泛表达 SDF-1, 退变的椎间盘高表达, 而正常的椎间盘相对低表达

Figure 2 SDF-1 immunohistochemistry staining results in degenerative and normal intervertebral disc (Envision $\times 40$), illustration is a larger version of arrow area ($\times 400$) a~e The degenerative group inner nucleus pulposus (INP), transitional nucleus pulposus (TNP), inner annulus fibrosus (IAF), outer annulus fibrosus (OAF), cartilage endplate (CEP) respectively f~j The normal group INP, TNP, IAF, OAF, CEP respectively

表 1 正常与退变椎间盘各部位 SDF-1 免疫组化积分光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Immunohistochemistry IOD value of different parts in normal and degenerative intervertebral disc						
	n	髓核中央区 INP	髓核与纤维环交界区 TNP	纤维环内层 IAF	纤维环外层 OAF	软骨终板 CEP
正常组 Normal Group	20	420.87 $\pm$ 89.93 ^①	407.80 $\pm$ 100.76 ^①	380.02 $\pm$ 85.05 ^①	342.89 $\pm$ 63.76 ^①	344.06 $\pm$ 88.97 ^①
退变组 Degenerative group	10	7355.13 $\pm$ 2271.74 ^②	5959.58 $\pm$ 2436.23 ^{②③}	5397.49 $\pm$ 3044.80 ^{②③}	1605.44 $\pm$ 825.31 ^{②③}	361.91 $\pm$ 104.22

注: ①与退变组相同部位比较 $P<0.05$; ②与同组 CEP 比较 $P<0.05$; ③同组 TNP、IAF、OAF 之间比较 $P<0.05$
Note: INP, inner nucleus pulposus; TNP, transitional nucleus pulposus; IAF, inner annulus fibrous; OAF, outer annulus fibrous; CEP, cartilage endplate; ①Compared with degenerative group, $P<0.05$; ②Compared with CEP, $P<0.05$; ③Compared between TNP, IAF, OAF, $P<0.05$

CEP, INP 与 TNP 比较无统计学差异 ($P>0.05$), 其余部位两两比较有统计学差异 ($P<0.05$); 正常组中, INP、TNP、IAF、OAF、CEP 的 SDF-1 表达无显著性差异 ($P>0.05$, 表 3)。

2.6 SDF-1 免疫组化积分光密度值与患者年龄、

Thompson 分级相关性分析结果

经 Pearson 等级相关分析, 退变组 INP、TNP、IAF、OAF、CEP 的 SDF-1 免疫组化积分光密度值与 Thompson 分级、年龄呈正相关性 ($P<0.05$, 表 4)。

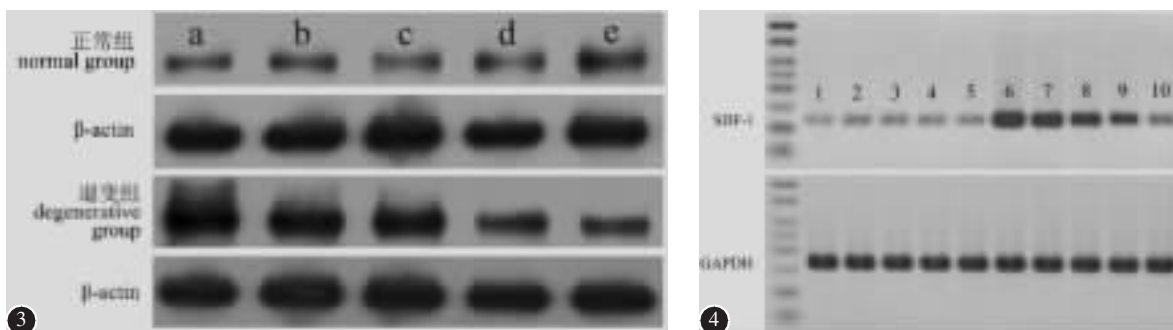


图 3 正常组和退变组椎间盘各部位 SDF-1 蛋白的凝胶电泳结果(a:髓核中央区;b:髓核与纤维环交界区;c:纤维环内层;d:纤维环外层;e:软骨终板) **图 4** 正常和退变椎间盘各部位 SDF-1 半定量 PCR 结果(Marker 从上到下:1000bp、800bp、600bp、500bp、400bp、300bp、200bp、100bp; GAPDH 基因:352bp, 为内参照; SDF-1 基因:226bp; 1、2、3、4、5 分别代表正常组髓核中央区、髓核与纤维环交界区、纤维环内层、纤维环外层、软骨终板的 SDF-1mRNA 的含量; 6、7、8、9、10 分别代表退变组髓核中央区、髓核与纤维环交界区、纤维环内层、纤维环外层、软骨终板的 SDF-1mRNA 的含量)

Figure 3 The results of SDF-1 protein gel electrophoresis of the normal and degenerative groups(a: inner nucleus pulposus, b: transitional nucleus pulposus, c: inner annulus fibrosus, d: outer annulus fibrosus, e: cartilage endplate) **Figure 4** SDF-1 mRNA expression in the normal and degenerative group disc; GAPDH gene as internal reference: 352bp; SDF-1 gene: 226bp; 1, 2, 3, 4, 5 normal group represent the inner nucleus pulposus, transitional nucleus pulposus, inner annulus fibrosus, outer annulus fibrosus, the cartilage endplate respectively; 6, 7, 8, 9, 10 represent respectively the degeneration group inner nucleus pulposus, transitional nucleus pulposus, inner annulus fibrosus, outer annulus fibrosus, the cartilage endplate respectively

表 2 正常与退变椎间盘各部位 SDF-1/ β -actin 灰度比值

($\bar{x} \pm s$)

Table 2 SDF-1/ β -actin gray value ratio of different parts of normal and degenerative intervertebral disc

	<i>n</i>	INP	TNP	IAF	OAF	CEP
正常组 Normal Group	10	0.08 $\pm$ 0.03 ^①	0.08 $\pm$ 0.05 ^①	0.07 $\pm$ 0.04 ^①	0.05 $\pm$ 0.03 ^①	0.05 $\pm$ 0.02 ^①
退变组 Degenerative group	20	0.55 $\pm$ 0.29 ^②	0.52 $\pm$ 0.28 ^{②③}	0.42 $\pm$ 0.18 ^{②③}	0.21 $\pm$ 0.12 ^{②③}	0.06 $\pm$ 0.04

注: ①与退变组同部位比较 $P<0.05$; ②与同组 CEP 比较 $P<0.05$; ③同组 TNP、IAF、OAF 之间比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with degenerative group, $P<0.05$; ②Compared with CEP, $P<0.05$; ③Compared between TNP, IAF, OAF, $P<0.05$

表 3 正常与退变椎间盘各部位 SDF-1/GAPDH 灰度比值

($\bar{x} \pm s$)

Table 3 SDF-1/GAPDH gray value ratio of different parts of normal and degenerative intervertebral disc

	<i>n</i>	INP	TNP	IAF	OAF	CEP
正常组 Normal Group	10	0.22 $\pm$ 0.06 ^①	0.22 $\pm$ 0.05 ^①	0.20 $\pm$ 0.04 ^①	0.20 $\pm$ 0.04 ^①	0.20 $\pm$ 0.04 ^①
退变组 Degenerative group	20	0.75 $\pm$ 0.30 ^②	0.71 $\pm$ 0.26 ^{②③}	0.55 $\pm$ 0.22 ^{②③}	0.36 $\pm$ 0.17 ^{②③}	0.22 $\pm$ 0.13

注: ①与退变组同部位比较 $P<0.05$; ②与同组 CEP 比较 $P<0.05$; ③同组 TNP、IAF、OAF 之间比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with degenerative group, $P<0.05$; ②Compared with CEP, $P<0.05$; ③Compared between TNP, IAF, OAF, $P<0.05$

表 4 退变椎间盘 5 个部位的 SDF-1 免疫组化积分光密度值与 Thompson 分级、年龄相关性分析结果 (n=20)

Table 4 The correlation analysis of SDF-1 immunohistochemistry IOD value in the degenerative disc and Thompson classification, age

	INP		TNP		IAF		OAF		CEP	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
分级 Thompson	0.95	<0.01	0.91	<0.01	0.86	<0.01	0.58	<0.01	0.71	<0.01
年龄 Age	0.71	<0.01	0.66	<0.01	0.63	<0.01	0.45	0.049	0.62	0.049

3 讨论

SDF-1 又称为趋化因子配体-12 (CXCL-12), 是一类对免疫细胞有趋化作用的小分子蛋白质, 组成性地表达在基质细胞及其来源组织内, 或者由缺血损伤等低氧条件^[4]诱导性表达。趋化因子受体-4(CXCR4)是 SDF-1 的专一性受体, 广泛表达在循环和组织中的干(祖)细胞上。造血细胞移植时, 高表达 CXCR4 的造血祖细胞向着 SDF-1 高浓度的骨髓腔内迁移和归巢, 从而重建造血系统^[5]。在外周神经形成过程中, 高表达 CXCR4 的后根神经节祖细胞沿着神经发育沿途的 SDF-1 分布梯度迁移并生成感觉神经^[6,7]。同样, 在组织血管化过程中, 组织快速生长偏离脉管系统或缺血损伤导致局部氧张力低下时, 由低氧信号诱发上调的 SDF-1 随后趋化高表达 CXCR4 的血管内皮祖细胞(EPC)向靶区迁移、归巢^[8,9]。综上可见, 既然 SDF-1/CXCR4 能介导诸多干(祖)细胞的迁移和归巢, 那么 MSCs 在椎间盘内的迁移是否也同样受控于该信号轴的趋化, 以及能否通过 SDF-1/CXCR4 轴调控 MSCs 在椎间盘内的迁移和分布呢? 探讨椎间盘内 SDF-1 表达和分布梯度是回答上述问题的前提。

本研究发现退变椎间盘组织的 5 个部位 SDF-1 含量均高于正常椎间盘组织, 且具有统计学差异。我们之前研究发现 SDF-1 局部高表达的最显著特点是主要集中在细胞集落内, 而 Johnson 等^[10]研究发现, 细胞集落主要分布在纤维环内层以及髓核区域, 而上述区域往往是组织学层面退变最严重的区域, 因此 Johnson 课题组的研究从侧面支持了我们的研究, 即 SDF-1 倾向于在退变较严重的区域内高浓度表达。退变的椎间盘因缺血缺氧, 细胞保护性增殖并形成细胞集落, 首先试图通过细胞增殖、合成更多的基质成分来缓解退变, 同时高表达 SDF-1, 通过形成 SDF-1 高表达

梯度来趋化更多的 MSCs 归巢并发挥修复效应; 细胞集落少, SDF-1 低表达。本研究发现, 在退变椎间盘组织中髓核区域 SDF-1 含量高于纤维环内层, 纤维环内层高于纤维环外层, 纤维环外层高于软骨终板, 相邻部位之间形成了 SDF-1 表达的差异, 且具有统计学差异。首先髓核区域已被证实是椎间盘内血供最少、氧分压最低的区域^[11], 尽管椎间盘主要通过纤维环外层的毛细血管网以及软骨终板的渗透获取氧份和营养, 但软骨终板的渗透途径极有可能因软骨终板钙化而过早受阻, 从而使得纤维环外层的毛细血管网成为椎间盘与外界物质交流的唯一或最主要途径, 进而导致髓核面临最显著的营养匮乏或缺血缺氧而上调表达 SDF-1; 其次椎间盘退行性变是个多因素综合作用的结果, 除了缺血缺氧和营养匮乏等因素外, 周期性的生理性或非生理性力学刺激的影响不容忽视, 因为椎间盘对脊柱力学负荷的缓冲作用主要依赖于髓核组织的凝胶样弹性特征, 这与我们所观察到的髓核区域 SDF-1 高表达的结果相一致。人在出生的时候椎间盘是有血供的, 纤维环富含血管, 到 6~12 岁, 椎间盘外层 1~2mm 纤维环中的血管与小毛细血管分离, 随着年龄的增长血管逐渐消失^[12,13], 成人的椎间盘实则是人体最大无血管结构, 只有一些极少的毛细血管分布到纤维环外层, 供应椎间盘边缘, 纤维环内层缺血缺氧的情况比纤维环外层严重, 纤维环外层及软骨终板区域因部分保留了血管网以及氧供而相对低表达 SDF-1^[14]。本研究也存在一些不足之处, 首先, 正常椎间盘组织获取困难, 导致正常椎间盘样本量较小; 其次, 由于主刀医生和研究者操作上的误差, 椎间盘髓核中央区、髓核与纤维环交界区、纤维环外层、纤维环内层、软骨终板这 5 个部位的区分不能十分精确。

学者们一直在努力寻找一种能从根本上逆转

椎间盘退变过程的方法。Li 等^[15]研究表明,椎间盘退变是由于椎间盘内有活性细胞减少、椎间盘正常合成代谢失衡而导致的蛋白聚糖等细胞外基质含量减少所致,而目前研究较多的是骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 的移植治疗。Sakai 等^[16]在兔椎间盘退变模型上的研究结果发现,移植后的 BMMSCs 能够分化并表现出髓核细胞的特征,提示自体 MSCs 移植是一种有价值的修复退变椎间盘的治疗方案。Ji 等^[17]研究发现,BMMSCs 能够表达 CXCR4, SDF-1 能够诱导干细胞定向迁移至损伤组织中并分化成特异的细胞从而促进损伤组织的修复。本研究证实人退变椎间盘高表达 SDF-1,且 SDF-1 在髓核中央区、髓核与纤维环交界区、纤维环外层、纤维环内层、软骨终板这 5 个相邻部位之间存在分布差异,后续我们将在动物体内研究 MSCs 在退变椎间盘内的迁移分布与 SDF-1/CXCR4 信号轴间的关系。

4 参考文献

1. Miller RJ, Banisadr G, Bhattacharyya BJ. CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development [J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 198(1-2): 31-38.
2. Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, et al. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc[J]. *Spine*, 1990, 15(5): 411-415.
3. Hee HT, Zhang J, Wong HK. An in vitro study of dynamic cyclic compressive stress on human inner annulus fibrosus and nucleus pulposus cells[J]. *Spine J*, 2010, 10(9): 795-801.
4. Xu X, Zhu F, Zhang M, et al. Stromal cell-derived factor-1 enhances wound healing through recruiting bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the wound area and promoting neovascularization[J]. *Cells Tissues Organs*, 2013, 197(2): 103-113.
5. Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers [J]. *Leukemia*, 2009, 23(1): 43-52.
6. Tiveron MC, Cremer H. CXCL12/CXCR4 signalling in neuronal cell migration[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2008, 18(3): 237-244.
7. Chalasani SH, Sabol A, Xu H, et al. Stromal cell-derived factor-1 antagonizes slit/robo signaling in vivo[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(5): 973-980.
8. Ceradini DJ, Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue [J]. *Trends in Cardiovasc Med*, 2005, 15(2): 57-63.
9. Cheng Z, Ou L, Zhou X, et al. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(3): 571-579.
10. Johnson WE, Eisenstein SM, Roberts S. Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation[J]. *Connect Tissue Res*, 2001, 42(3): 197-207.
11. Raj PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment[J]. *Pain Pract*, 2008, 8(1): 18-44.
12. Urban JP, Smith S, Fairbank JC. Nutrition of the intervertebral disc[J]. *Spine*, 2004, 29(23): 2700-2709.
13. Roberts S, Evans H, Trivedi J, et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88(Suppl 2): 10-14.
14. Grunhagen T, Shirazi-Adl A, Fairbank JC, et al. Intervertebral disk nutrition: a review of factors influencing concentrations of nutrients and metabolites[J]. *Orthop Clin North Am*, 2011, 42(4): 465-477.
15. Li J, Kim KS, Park JS, et al. BMP-2 and CDMP-2: stimulation of chondrocyte production of proteoglycan[J]. *J Orthop Sci*, 2003, 8(6): 829-835.
16. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(3): 335-345.
17. Ji JF, He BP, Dheen ST, et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(3): 415-427.

(收稿日期:2013-01-28 末次修回日期:2013-08-21)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)