

基础研究

环氧化酶 2 与血管内皮生长因子在
突出腰椎间盘中的表达及意义俞海明¹, 李毅中¹, 林金矿¹, 姚学东¹, 邱建龙²

(1 福建医科大学附属第二医院骨科; 2 病理科 362000 泉州市)

【摘要】目的:探讨环氧化酶 2(COX-2)、血管内皮生长因子(VEGF)在突出腰椎间盘中的表达及其意义。**方法:**62 个突出椎间盘标本取自 58 例腰椎间盘突出症手术患者,包括突起型 22 个,破裂型 20 个,游离型 20 个。取材部位分别为突出组织或游离组织(A 部位)和椎间隙残余髓核组织(B 部位)。对照组取自 4 例新鲜年轻尸体的 L3/4、L4/5 及 L5/S1 椎间盘组织共 12 个标本,取材部位为椎间盘边缘(A 部位)和中央髓核(B 部位);应用免疫组化法对各组标本中 COX-2 和 VEGF 的表达进行检测;应用图像分析系统测量标本中 COX-2 和 VEGF 表达量的平均光密度值。**结果:**在腰椎间盘突出组,特别是破裂型和游离型组的突出组织中存在富含新生血管的肉芽组织,COX-2 和 VEGF 染色阳性细胞主要表达于肉芽组织中及突出组织的椎间盘细胞中,对照组未见阳性染色细胞。在突出组的 A 部位从突起型、破裂型到游离型 COX-2 和 VEGF 的表达均逐渐增高,差异有显著性($P<0.01$)。突出组的 A 部位 COX-2 和 VEGF 的表达明显高于 B 部位($P<0.01$)。腰椎间盘组织中 COX-2 和 VEGF 的表达存在明显相关性($r=0.855, P<0.01$)。**结论:**COX-2、VEGF 参与腰椎间盘退变、突出的发病过程;随着腰椎间盘退变突出的进展,COX-2、VEGF 的表达均逐渐增高;COX-2 与 VEGF 表达密切相关。

【关键词】椎间盘退变;腰椎间盘突出症;环氧化酶 2;血管内皮生长因子

中图分类号:R681.5, Q554 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2007)-10-0777-04

Expression and clinical significance of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in lumbar disc herniation/YU Haiming, LI Yizhong, LIN Jinkuang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(10): 777-780

【Abstract】 Objective:To investigate the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor(VEGF) in lumbar disc herniation and explore their significance in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration and relationship between lumbar protrusion types.**Method:**62 discs from patients with lumbar disc herniation(22 inflation type, 20 extrusion type, 20 sequestration type) were collected. The disc herniation were obtained from two zone of disc: zone A was hernia tissue or separate fragment, zone B was the remainder nucleus pulposus of lumbar intervertebral disc. In control group, 12 normal discs were harvested from 4 young fresh specimens obtained from two zone of disc: zone A was the margin of lumbar intervertebral disc, zone B was the center nucleus pulposus of lumbar intervertebral disc. The expression of COX-2 and VEGF were evaluated immunohistochemically, and their average optical density were assayed by image analysis system.**Result:**COX-2 and VEGF were overexpressed in LDH group especially in extrusion and sequestration type. There were no expression in control group. The expression of COX-2 and VEGF gradually raised from inflation, extrusion to sequestration type at zone A in LDH group($P<0.01$). The expression of COX-2 and VEGF were higher at zone A than at zone B in LDH group ($P<0.01$). A positive correlation was found between the expression of COX-2 and VEGF in LDH group ($r=0.855, P<0.01$).**Conclusion:**COX-2 and VEGF are involved in the pathogenesis of lumbar disc degeneration and lumbar disc herniation. COX-2 and VEGF play critical role in the development of lumbar disc degeneration and herniation. The inhibition of COX-2 and VEGF should be promising in dealing with early disc degeneration.

【Key words】Intervertebral disc degeneration; Lumbar disc herniation; Cyclooxygenase-2; Vascular endothelial growth factor

【Author's address】 Department of Orthopaedics Surgery, the Second Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Quanzhou, 362000, China

第一作者简介:男(1972-),主治医师,医学硕士,研究方向:脊柱外科

电话:(0595)22860307 E-mail:yuhaiming99@yahoo.com.cn

腰椎间盘突出退变(IDD)、突出(LDH)的确切发病机制仍不清楚。近年来的研究发现炎症在腰椎间盘突出退变、突出的发病机制中起关键作用。组织学观察发现腰椎间盘突出组织中存在炎症反应和新生血管形成^[1]。环氧化酶-2(COX-2)是局部炎症的标志性介质,血管内皮生长因子(VEGF)是诱导血管形成的关键因子。本研究应用免疫组化方法对不同病理类型的突出腰椎间盘中 COX-2 和 VEGF 的表达和分布情况进行研究,探讨其在腰椎间盘突出退变、突出发病过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 取材和分组

1.1.1 病变组 腰椎间盘突出症患者 58 例,其中男 34 例,女 24 例,年龄 20~59 岁,平均 39.4 岁。共有 62 个腰椎间盘突出,L4/5 32 个,L5/S1 30 个。患者均有典型的坐骨神经痛症状,术前 2 周停止服用 NSAIDs 类药物。手术采用后路椎板间开窗髓核摘除术,根据术中探查结果将 LDH 按病理类型分为:突起型(protrusion),椎间盘突起纤维环外层完整,22 例;破裂型(extrusion),纤维环破裂,突出物与椎间盘相连,20 例;游离型(sequesters),髓核组织游离,20 例。取材部位为突出组织或游离组织(A 部位)和椎间隙残余的髓核组织(B 部位)。

1.1.2 对照组 4 例因意外 24h 内急性死亡的成人尸体,年龄 20~38 岁,平均 26.5 岁。肉眼观察无腰椎间盘突出,组织学检查椎间盘无退变。取 L3/4、L4/5、L5/S1 椎间盘组织,共 12 个标本,取材部位为椎间盘边缘组织(A 部位)和中央髓核组织(B 部位)。

1.2 检测方法

标本取出后,立即用生理盐水反复洗涤去除血液,置于 100ml/L 中性福尔马林溶液 4℃固定 24h。石蜡包埋制成蜡块,保存备用。统一制作连续

切片,厚度 4μm,贴于明胶化的玻片上,室温下干燥过夜。采用即用型快速免疫组化 MaxVision™ 试剂盒(迈新公司提供)进行 COX-2 和 VEGF 免疫组化染色。试剂:一抗为兔抗人 COX-2 单克隆抗体(美国 NEOMARKERS 生产,FT21)、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(美国 NEOMARKERS 生产,ZH121);试剂盒成分(二抗):聚合辣根过氧化物酶山羊抗鼠 IgG 和聚合辣根过氧化物酶山羊 IgG。阳性对照用已知阳性切片,阴性对照用磷酸缓冲液(PBS)替代一抗。DBA 显色,苏木素复染。

1.3 染色结果判断和图像分析

以胞膜或胞浆内出现棕黄色颗粒样物质为 COX-2、VEGF 染色阳性。在高倍显微镜(10×40 倍)下进行染色结果分析,每张切片随机选 5 个视野应用计算机彩色图像分析系统(JD801 形态学图像分析系统 Version1.0)进行定量分析,输入计算机作为测定视场,取平均光密度(OD)代表染色的强度,OD 值越大提示免疫反应越强。

1.4 统计学分析

数据结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,所有数据输入 SPSS 12.0 统计软件包分析。多组比较用方差分析,病变组内多样本均数间多重比较用 LSD-*t* 检验,双变量间相关分析用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

见图 1~12(后插页Ⅲ、Ⅳ)和表 1。COX-2 和 VEGF 均表达于突出腰椎间盘中。

COX-2 免疫组化染色显示,在腰椎间盘突出组中特别是在破裂型和游离型组的突出组织中存在富含新生血管的肉芽组织并伴随着大量的炎性巨噬细胞浸润,染色阳性的细胞大部分存在侵入椎间盘的肉芽组织中,特别是新生血管周围和巨噬细胞中,突出组织中可见染色阳性的椎间盘软骨样细胞;在突起型中几乎无肉芽组织。病变组在

表 1 COX-2 和 VEGF 在腰椎间盘突出组织中表达的平均光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	A 部位		B 部位	
		COX-2	VEGF	COX-2	VEGF
突起型	22	0.155±0.033 ^①	0.180±0.034 ^①	0.108±0.013 ^②	0.105±0.010 ^②
破裂型	20	0.207±0.018 ^①	0.232±0.015 ^①	0.118±0.021 ^{①②}	0.132±0.039 ^{①②}
游离型	20	0.221±0.015 ^①	0.238±0.013 ^①	0.127±0.030 ^{①②}	0.150±0.043 ^{①②}
对照组	12	0.113±0.002	0.104±0.012	0.108±0.010 ^③	0.108±0.011 ^③

注:单因素方差分析,不同组别间比较 $P < 0.01$,①与对照组间相应部位比较 $P < 0.01$,②与同组 A 部位比较 $P < 0.01$,③与同组 A 部位比较 $P > 0.05$

A 部位中散在染色阳性的椎间盘软骨样细胞,在 B 部位中肉芽组织明显减少,染色阳性细胞数亦明显减少(图 1~6,后插页 III);对照组无染色阳性细胞。

VEGF 免疫组化染色显示染色阳性的细胞同样大部分存在于侵入椎间盘的肉芽组织中,特别是新生血管周围和巨噬细胞中,突出组织中散在染色阳性的椎间盘软骨细胞(图 7~12,后插页 III、IV)。而对照组无染色阳性细胞。

在腰椎间盘突出组中,COX-2 和 VEGF 的光密度值在突起型、破裂型、游离型组逐渐增加,单因素方差分析显示有统计学意义($P<0.01$);在腰椎间盘突出组的 B 部位,COX-2 和 VEGF 的表达明显减少,仅在破裂型和游离型中有少量表达,表达量明显低于 A 部位,两者之间差异有统计学意义($P<0.01$)。在对照组中,A 部位与 B 部位比较无显著性差异($P>0.05$)。

从连续切片的免疫组化染色看,COX-2 与 VEGF 的染色区域明显存在重叠,均大量表达于炎性肉芽组织周围,双变量相关分析结果显示 COX-2 和 VEGF 的表达存在正相关(图 13, $r=0.855, P<0.01$)。

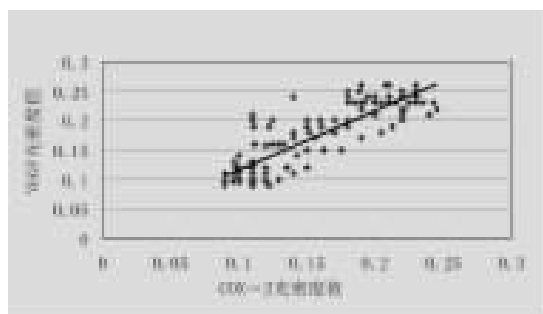


图 13 COX-2 和 VEGF 在突出腰椎间盘突出组织中表达的相关性

3 讨论

目前认为腰椎间盘突出是在椎间盘退变的基础上,经反复过度的不良机械负荷或创伤作用,引起纤维环破裂,继而发生髓核突出,而椎间盘突出后又加剧椎间盘退变,形成恶性循环。炎症、新生血管形成、遗传基因、椎间盘营养、不良机械刺激等因素与腰椎间盘突出有关^[2]。在炎症反应中,COX-2 是局部炎症反应的标志性介质,它通过上调前列腺素 E₂(PGE₂)的表达在人体内多种炎症相关性疾病的发病机制中起关键作用^[3]。然而关

于 COX-2 在腰椎间盘突出、突出发病过程中作用的研究仍较少。

环氧化酶(COX)是花生四烯酸转化为前列腺素(PG)代谢途径中的关键酶,有 COX-1 和 COX-2 两种异构酶。COX-1 是一种结构酶,产生具有生理作用的 PGs。COX-2 是一种诱导酶,正常情况下不被多数细胞表达,但在病理状态下体内多种细胞可以上调 COX-2 的表达,参与疾病的发病过程。Burke 等^[4]发现退变、突出的椎间盘组织中含高浓度的 PGE₂。Miyamoto 等^[5]将手术切除的突出椎间盘组织进行免疫组化分析发现存在 COX-2 表达;体外培养的椎间盘细胞在白介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)刺激下出现 COX-2 mRNA 表达上调,并伴有 PGE₂大量合成。PGE₂不仅有很强的致炎和致痛作用,而且参与对椎间盘内蛋白多糖合成的抑制作用^[5]。Faisal 等^[6]通过慢性炎症的细胞模型发现 COX-2 参与纤维蛋白酶和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的调控。

本研究表明,LDH 患者突出的椎间盘组织中存在 COX-2 的表达,而对照组中无 COX-2 表达。统计学显示,在突出或游离的椎间盘组织中 COX-2 表达的平均光密度值随着椎间盘退变突出病理程度的加重而增加,从突起型、破裂型到游离型表达量逐渐增加($P<0.01$)。在不同病理类型中,COX-2 的表达部位不同,在破裂型和游离型突出组织中,COX-2 主要表达于肉芽组织中,而在突起型中,缺乏肉芽组织,COX-2 主要表达于椎间盘软骨样细胞中。说明 COX-2 与腰椎间盘突出密切相关。在腰椎间盘突出退变的早期,退变椎间盘细胞就表达 COX-2,随着退变突出的进展,纤维环完全破裂,髓核组织暴露,诱发急性创伤性炎症^[7],形成肉芽组织,进一步大量表达 COX-2,可能通过调控 MMPs 表达,导致椎间盘的退变的加剧。在 LDH 组椎间隙残余的髓核组织(B 部位)中 COX-2 表达少,与 A 部位间比较有显著统计学差异($P<0.01$),说明在腰椎间盘突出退变的早期,炎症始于椎间盘后部而不是中央髓核。

与腰椎间盘突出有密切关系的另一个因素是退变椎间盘出现新生血管。正常椎间盘是人体内最大的无血管组织,随着年龄的增加,退变的椎间盘边缘出现新生血管侵入,特别是在腰椎间盘突出组织中^[8]。本研究的组织学检查显示突出的椎

间盘组织有富含新生血管的肉芽组织并伴随炎症巨噬细胞浸润,特别是在破裂型和游离型突出组织中。VEGF 是一种重要的血管形成刺激因子,在组织生长和再生过程中具有重要调节作用;VEGF 还是很强的纤溶蛋白酶诱导剂,而后者可以激活 MMPs,使基质降解退变^[9]。Koike 等^[1]发现腰椎间盘突出组织中 VEGF 表达与巨噬细胞浸润呈正相关。本研究结果显示,在 LDH 的突出组织中不仅肉芽组织中有大量的 VEGF 表达,而且椎间盘的软骨样细胞也有表达;表达主要集中在 A 部位,在 LDH 组的 A 部位 VEGF 的表达量与 LDH 的病理类型有关,从突起型、破裂型到游离型表达量逐渐增加($P<0.01$),提示 VEGF 参与腰椎间盘突出退变的发病过程,退变椎间盘通过表达 VEGF 诱导新生血管由椎间盘边缘长入,吸引巨噬细胞浸润,激活 MMPs,进一步加剧椎间盘细胞外基质降解,导致退变加重。

研究发现在人体多种疾病的发病机制中 COX-2 与 VEGF 存在密切关系。在肿瘤生长及转移的研究中证实肿瘤细胞通过 COX-2 调节 VEGF 的表达促进新生血管的形成^[10]。在一项炎症介质与角膜新生血管形成的动物实验研究^[11]中发现,在敲除 COX-2 基因的鼠模型中,炎症介质 IL-1 β 对鼠角膜的血管诱导作用明显减少。然而在腰椎间盘突出退变、突出中 COX-2 与 VEGF 表达的相关性仍不清楚。本研究表明,在 LDH 组中 COX-2 与 VEGF 的表达存在明显的相关性 ($r=0.855, P<0.01$),两者的表达量均与腰椎间盘突出退变的病理类型有关,从突起型、破裂型到游离型的表达均逐渐增加;连续切片染色也显示 COX-2 与 VEGF 的表达区域存在明显的重叠,均大量表达于椎间盘的炎症肉芽组织中。说明在腰椎间盘突出退变的病理过程中 COX-2 和 VEGF 的表达密切相关。Haro 等^[12]对椎间盘细胞体外培养发现 TNF- α 是诱导 VEGF 表达的必须介质。由于 TNF- α 可以诱导包括 COX-2 在内的多种炎症介质,故在腰椎间盘突出组织中 COX-2 是否参与 VEGF 表达的调控仍有待进一步研究。

本研究结果提示,在腰椎间盘突出退变突出的早期,椎间盘后部出现炎症反应,椎间盘细胞上调表达 COX-2 和 VEGF,局部的炎症反应可诱导新生血管并激活 MMPs,而 MMPs 的激活一方面使椎间盘细胞外基质降解导致腰椎间盘突出退变加剧,另一方面使纤维环和后纵韧带中的胶原结构破

坏,形成薄弱区,在不良负荷的作用下退变的髓核容易穿破纤维环和后纵韧带的薄弱区形成破裂型和游离型腰椎间盘突出,而纤维环破裂髓核暴露又进一步加剧了炎症反应。应用 COX-2 和 VEGF 抑制剂也许是治疗早期腰椎间盘突出退变的有效方法。

4 参考文献

1. Koike Y, Uzuki M, Kokubun S, et al. Angiogenesis and inflammatory cell infiltration in lumbar disc herniation [J]. Spine, 2003, 28(17):1928-1933.
2. Grang L, Gaudin P, Trocme C, et al. Intervertebral disk degeneration and herniation; the role of metalloproteinases and cytokines [J]. Joint Bone Spine, 2001, 68(6):547-553.
3. Miyamoto H, Saura R, Doita M, et al. The role of cyclooxygenase-2 in lumbar disc herniation [J]. Spine, 2002, 27(22):2477-2483.
4. Burke JG, Watson RW, McCormack D, et al. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators [J]. J Bone Joint Surg (Br), 2002, 84(2):196-201.
5. Roberts S, Caterson B, Menage J, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanase; their role in disorders of the human intervertebral disc [J]. Spine, 2000, 25(23):3005-3013.
6. Faisal K, Louise R. Extracellular matrix-induced cyclooxygenase-2 regulates macrophage proteinase expression [J]. J Biol Chem, 2004, 279(21):22039-22046.
7. Yoshida M, Nakamura T, Sei A, et al. Intervertebral disc cells produce tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, and monocyte chemoattractant protein-1 immediately after herniation: an experimental study using a new hernia model [J]. Spine, 2005, 30(1):55-61.
8. 龙厚清, 李佛保, 胡有谷, 等. 腰椎间盘突出中血管内皮生长因子的表达及其意义 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2002, 12(4):280-282.
9. Kato T, Haro H, Komori H, et al. Sequential dynamics of inflammatory cytokine, angiogenesis inducing factor and matrix degrading enzymes during spontaneous resorption of the herniated disc [J]. J Orthop Res, 2004, 22(4):895-900.
10. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis [J]. Neoplasia, 2001, 3(1):53-61.
11. Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, et al. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis [J]. FASEB J, 2004, (2):300-310.
12. Haro H, Kato T, Komori H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in herniated disc resorption [J]. J Orthop Res, 2002, 20(3):409-415.

(收稿日期:2007-04-20 修回日期:2007-07-26)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)