

基础研究

长期直立与大鼠腰椎骨质增生的关系

卞 琴, 梁倩倩, 侯 炜, 王拥军, 施 杞

(上海中医药大学附属龙华医院脊柱病研究所 200032 上海徐汇区宛平南路 725 号)

【摘要】目的:通过诱导大鼠从爬行体位到直立体位, 观察长期直立与腰椎骨质增生的关系并探讨其可能机制。**方法:**20 只 SD 大鼠随机分为两组, 对照组不进行处理, 普通饲养笼喂养; 模型组通过肩关节离断术和抬高饲养笼水槽的方法诱导大鼠直立, 建立长期直立大鼠模型。所有动物术后 9 个月处死, 其中 L5 椎体进行藏红染色、天狼星红染色、免疫组织化学法观察; 余下腰椎边缘组织及椎间盘应用实时荧光聚合酶链式反应(RT-PCR)技术检测碱性磷酸酶、I 型胶原(Col1)、X 型胶原(Col10)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 及血管内皮生长因子(VEGF)基因的表达。**结果:**藏红染色显示模型组椎体下缘椎间盘外缘非基质成分增加, 类纤维细胞增多, 发生骨质增生; 对照组改变不明显。天狼星红染色显示模型组骨质增生部位胶原排列出现断裂, I 型与 III 型胶原明显增多; 对照组胶原排列较致密, III 型胶原少见。免疫组化染色显示模型组骨质增生形成部位 Col10, VEGF, TGF- $\beta 1$ 表达均较对照组增强。RT-PCR 显示模型组上述基因表达均较对照组上调($P < 0.05$)。**结论:**长期直立体位会导致大鼠腰椎边缘骨质增生, 该骨质增生可能与纤维环外层纤维软骨细胞化生相关, 并且与 TGF- $\beta 1$ 上调有关。

【关键词】 腰椎; 骨质增生; 长期直立; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.01.014

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2009)-01-0060-04

The effect of long-term upright posture on rats' lumbar hyperosteogeny/BIAN Qin, LIANG Qianqian, HOU Wei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(1): 60~63

【Abstract】Objective: To observe whether the long-term load induced by upright posture would cause lumbar vertebral hyperosteogeny and explore the inner mechanisms. **Method:** 20 SD rats were randomly divided into test group and control group. The rats in the control group were raised in common cage with no treatment. Others in the model group were enforced to keep in upright posture by shoulder disarticulation and raised in the custom-made cages to obtain water and food for 9 months. All the rats were sacrificed 9 months after surgery. The changes of the fifth lumbar vertebral and intervertebral disc edge specimen were examined with different methods of histology, sirius red staining, immunostaining and the others lumbar vertebrae margin and discs with real-time PCR. The molecules examined include bone formation marker such as alkaline phosphatase (ALP), type I collagen (Col1), chondrocyte hypertrophy marker of endochondral ossification, type X collagen (Col10), transform growth factor beta1 (TGF- $\beta 1$) as well as the factor that regulating microenvironment of bone formation, vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured routinely. **Result:** Safranin-O/Fast Green staining showed non-matrix and fibrocyte like cells increased obviously between lower margin of vertebrae and exterior margin of disc while few change in the control. Sirius red staining results showed some fracture in hyperosteogeny location with higher type I and III collagen. Collagens were good arranged in the control group with few type III collagen. Col10, VEGF and TGF- $\beta 1$ were more positively expressed in hyperosteogeny by immunostaining in the model group than those in the control. The gene expressions of ALP, Col1, Col10, TGF- $\beta 1$ and VEGF were up-regulated in model group compared with control ($P < 0.05$). **Conclusion:** Long-term upright posture induces rat lumbar vertebral hyperosteogenesis which is related to the upregulation of TGF- $\beta 1$ and may be relevant to fibrochondrocyte mataplasia from annulus fibrosus in outer layer.

基金项目: 国家杰出青年科学基金(30625043)

第一作者简介: 女(1980-), 在读博士研究生, 研究方向: 椎间盘退变疾病的防治

电话: (021)54232325 E-mail: bianqin213@126.com

通讯作者: 王拥军

[Key words] Lumbar vertebral; Osteophyte formation; Long-term upright posture; Rat

[Authors address] Spine Institute of Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200032, China

人体的骨关节面,如膝关节、颈椎、腰椎、跟骨等受力学因素的影响,容易导致骨质增生。骨质增生作为骨重建的产物,其生成与力学刺激关系密切,也遵守 Wolff 定律。骨质增生形成是对机械环境渐进性改变的适当应答^[1]。有关椎体骨质增生的组织来源目前尚没有定论,但大致都与椎间盘退变有关^[2,3]。本次研究中,我们通过诱导大鼠直立来增加腰椎负荷,观察长期直立与大鼠腰椎骨质增生的关系并探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组

1 月龄 SD 雄性大鼠 20 只(上海动物实验中心提供,准字号:SYXK2003-0002),随机分为正常组和模型组,每组 10 只。

1.2 动物模型制作

模型组大鼠进行直立造模^[2],具体方法为:腹腔内注射 0.1g/kg 氯胺酮,通过前路手术从肩关节部位截断双前肢,术后先在普通饲养笼内饲养 14d,然后改用特制饲养笼饲养。特制饲养笼较普通饲养笼高度增加,且食物槽和水瓶高度可任意调节。每周测量大鼠直立高度,按平均值调节食物槽和水瓶高度,迫使大鼠通过身体直立来获取食物和水。正常组大鼠喂养在普通饲养笼中。所有大鼠 9 个月后处死,取 L5 椎体固定包埋,余下腰椎取边缘部位及椎间盘进行 RNA 抽提。

1.3 形态学指标

标本在 4%多聚甲醛浸泡 24h 后清水冲洗 2h,10%乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙 4 周,每周换脱钙液一次。标本经过脱水后石蜡包埋。7 μ m 冠状位连续切片,每只鼠取 5 张切片(以椎间盘正中

即髓核处为中心选取)进行臧红染色和天狼星红染色,观察 L5 椎体下缘大致形态及基质(臧红染色)与非基质(固绿染色)成分的改变,胶原的排列与胶原成分。图像分析系统采片(Olympus BX50; 日本)。

1.4 免疫组织化学染色

同 1.3 方法每只鼠选取 5 张切片,将切片常规脱蜡后在 3% H₂O₂ 与甲醇 1:50 溶液中孵育 15min 去除内源性过氧化物酶,PBS 洗 2min,蛋白酶 K 消化 10min,加 5% BSA 封闭液,PBS 洗 2min $\times$ 3 次。加兔多克隆抗体 X 型胶原,VEGF, TGF- β 1(1:100 稀释,武汉博士德)一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗 2min $\times$ 3 次,生物素标记的山羊抗兔 IgG 二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 15min,PBS 洗 2min $\times$ 3 次,抗生蛋白链菌素-HRP,37 $^{\circ}$ C 孵育 10min,PBS 洗 2min $\times$ 3 次,DAB 显色剂显色,苏木素复染,常规脱水透明,中性树胶封片。观察上述一抗在细胞、细胞外基质的表达情况,棕色或褐色颗粒为阳性表现。

1.5 总 RNA 抽提和实时荧光 PCR 检测基因水平表达情况

按 Trizol 组织抽提法(Sigma, St.Louis, MO)抽提椎间盘与腰椎边缘组织总 RNA,逆转录试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)转录成 cDNA。配 20 μ l PCR 反应体系:cDNA,前后引物见表 1(TaKaRa 公司设计)各 1 μ l,7 μ l 去离子水,10 μ l 荧光素酶(Bio-Bad, Hercules, CA)。应用 Rotor Gene 实时 DNA 扩增系统(Corbett Research, 澳大利亚悉尼)扩增,步骤如下:95 $^{\circ}$ C 变性 20s,56 $^{\circ}$ C~62 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s,45 个循环,将结果导入标准曲线进行定量,通过管家基因 β -actin 进行标准化。采用 Rotor Gene 6.0 分析软件分析。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	正义链 5'-3'	反义链 5'-3'	产物长度(bp)
ALP	TTGAATCGGAACAACCTGACTGAC	GATGGCCTCATCCATCTCCAC	183
Beta-actin	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	150
Col1	TCCTGGCAATCGTGGTTCAA	ACCAGCTGGGCCAACATTTC	133
Col10	TTCACAAAGAGCGACAGAGA	TCAAAATGGGATGGAGCA	143
TGF β 1	TGCGCCTGCAGAGATTCAAG	AGCTAACGCCAGGAATTGTTGCTA	82
VEGF	TGGACCCTGGCTTTACTGCTG	GGCAATAGCTGCGCTGGTAGA	127

1.6 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理。数据均以均值±标准差表示,两组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

动物造模及饲养中无死亡发生。去双前肢大鼠早期通过食物诱导才能直立起来,但在中后期(4~5 个月左右),在不进食的情况下,大鼠也能保持直立体位。对照组大鼠 10 月龄时 L5 椎体下缘非基质成分薄,胶原排列较致密,无明显断裂,Ⅲ型胶原(绿色)^[3]少见。同月龄直立 9 个月大鼠(即模型组)的腰椎边缘靠近椎间盘的部位出现了骨质增生,并且该骨质增生与椎间盘纤维环外环连续,中心部位细胞量较多,边缘部位基质多,且有细胞从纤维环外层向骨质增生中心爬行的趋势;椎体下缘胶原排列出现断裂,Ⅰ型胶原增多(粉红色),Ⅲ型胶原增多(图 1、2,后插页 I)。

Col10 免疫组化染色观察对照组仅在椎体与

椎间盘连接边缘肥大软骨细胞内有阳性染色,基质染色范围小,阳性表达弱。模型组在椎间盘纤维环外层的肥大纤维软骨细胞中有阳性表达,且在椎体边缘的基质中呈大范围强阳性表达(图 3,后插页 I)。

VEGF 免疫组化染色观察到正常组 L5 椎体边缘,尤其是纤维环外层出现许多细胞阳性染色,且向纤维环内层移行,越靠近纤维环内层阳性细胞越多。而模型组的阳性细胞主要集中在纤维外环向椎体移行的部位,越靠近椎体部位阳性细胞越多,且阳性染色强于正常组(图 4,后插页 I)。

TGF- β 1 免疫组化染色观察到正常组在椎体边缘已出现阳性细胞表达,基质成分表达弱。模型组在纤维环外层阳性细胞表达较多,在边缘骨质增生区域基质呈阳性表达(图 5,后插页 I)。

实时荧光 RT-PCR 检测显示模型组 ALP、Col1、Col10、VEGF、TGF- β 1 基因表达均高于正常组,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

表 2 两组大鼠 ALP、Col1 α 2、Col10 α 1、VEGF、TGF- β 1 基因表达情况

	ALP	Col1	Col10	VEGF	TGF- β 1
正常组	18.32±4.68	35.12±4.49	0.0065±0.0014	0.67±0.10	0.71±0.13
模型组	49.36±6.85 ^①	161.07±39.84 ^①	0.0286±0.0063 ^①	3.46±0.81 ^①	2.71±0.84 ^①

注:①与正常组比较 $P<0.05$

3 讨论

椎体骨质增生在临床常见。其形成的生物力学基础也得到了认可。但有关骨质增生形成的动物模型却为数不多。本次实验成功建立了长期直立大鼠腰椎骨质增生形成的模型,从力学上较好地模拟了骨质增生的成因。

有关椎体骨质增生的来源,即组织学的改变,目前研究观点还不一致。主要包括了血肿机化形成的多种成分的混合体^[4,5],椎间盘纤维环软骨化生及软骨终板软骨细胞增殖^[6,7]。Nagano 等^[8]提出骨质增生来源于纤维环成纤维细胞的增生,化生为软骨细胞,这些软骨细胞增殖越过椎间盘边缘产生软骨内化骨而变成骨质增生。本研究中,我们发现直立 9 个月后大鼠的腰椎边缘靠近椎间盘的部位出现了骨质增生,并且该骨质增生与椎间盘纤维环外环连续,中心部位细胞量较多,边缘部位基质多。且有细胞从纤维环外层向骨质增生中心爬行的趋势。与 Nagano 等的观点较相符合。施杞

等^[9]认为骨质增生形成原因是椎间盘退变、萎缩,纤维环松弛,椎体连接失稳,椎体运动时纤维环牵拉关节软骨的拉应力增大造成的,尤其是外层纤维环。在我们的既往研究中已证实该模型会导致椎间盘发生退变,纤维环纤维排列疏松,甚至会断裂^[2],进一步说明该骨质增生的产生可能与外周纤维环纤维牵拉有关,这种反复刺激导致纤维环内纤维软骨再生并且化生。Kauppila^[10]发现椎间盘退变程度与外侧纤维环血管增加程度成正比,提出血管内生长与骨质增生形成有关。本研究中,骨质增生生成部位,即纤维环外层 VEGF 表达明显增加,提示局部微环境可能已发生变化,刺激软骨细胞终端分化为肥大软骨细胞,分泌大量碎裂的 X 型胶原,发生基质钙化。X 型胶原的出现标志着肥大软骨细胞的出现并开始出现基质钙化^[11]。与此同时,化生的纤维软骨细胞在应力的作用分泌大量起支撑作用的Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原。ALP 的增高也说明了钙浓集增加,有成骨倾向。这与彭

宝淦等的研究结果一致^[12]。

文献报道, TGF- β 与骨质增生生成关系密切。过表达 TGF- β 可促进骨质增生生成^[13]。我们的实验中也发现, 骨质增生部位 TGF- β 1 表达上调, 与基因水平的改变一致。也有学者^[13]发现, TGF- β 在缺损的软骨(骨关节炎)中表达下调甚至缺失, 但在骨质增生中却高表达, 提示其发生了组织转移。而我们的模型中, 退变的椎间盘内 TGF- β 1 表达也发生下调, 提示了相似的机理。

本实验观察到长期直立体位会导致大鼠腰椎边缘骨质增生, 该骨质增生可能与纤维环外层纤维软骨细胞化生相关, 并且与 TGF- β 1 上调有关, 但 TGF- β 1 参与骨质增生的具体机制还有待进一步研究。

4 参考文献

1. He G, Xinghua Z. The numerical simulation of osteophyte formation on the edge of the vertebral body using quantitative bone remodeling theory[J]. Joint Bone Spine, 2006, 73(4): 95-101.
2. Liang QQ, Zhou Q, Zhang M, et al. Upright posture causes disc degeneration[J]. Spine, 2008, 33(19): 2052-2058.
3. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections[J]. Histochem J, 1979, 11(14): 447-55.
4. 赵定麟. 下腰痛[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社. 1990, 142-143.
5. 李超, 干阜生, 乔济民, 等. 经两侧腰椎板间开窗分割切除椎体后缘大块骨质增生的研究[J]. 中国矫形外科杂志, 1997, 4(2): 101-103.
6. Peng BG, Hou SX, Shi Q, et al. Experimental study on mechanism of vertebral osteophyte formation [J]. Chen J Trauma, 2000, 3(4): 202-205.
7. 彭宝淦, 侯树勋, 贾连顺, 等. 颈椎软骨终板钙化与颈椎间盘退变和椎体骨质增生形成的关系[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2001, 11(6): 340-342.
8. Nagano T, Yunenobu K, Miyatnoto S, 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.
9. 施杞, 彭宝淦, 贾连顺. 椎体骨质增生形成机理的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 1997, 4(5): 397-398.
10. Kauppila LI. Ingrowth of blood vessels in disc degeneration: angiographic and histological studies of cadaveric spines[J]. J Bone Joint Surg Am, 1995, 77(1): 26-31.
11. Delise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2000, 8(5): 309-334.
12. 彭宝淦, 贾连顺, 施杞. 退变椎体周边关节软骨产生碱性磷酸酶与骨质增生形成的关系[J]. 颈腰痛杂志, 1999, 20(3): 175-177.
13. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan PM, et al. Expression of transforming growth factor- β (TGF- β) and the TGF β signaling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation [J]. Ann Rheum Dis, 2006, 65(11): 1414-1421.

(收稿日期: 2008-08-04 修回日期: 2008-09-09)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

消息

欢迎订阅 2009 年《中国康复医学杂志》

本刊为国家级医学核心期刊(月刊, 每期 96 页), 由中国康复医学会主办。1986 年创刊, 是业内知名的权威学术期刊。先后为中国科学引文数据库(CSCD)、《中文核心期刊要目》、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)收录。

本刊及时刊载我国康复医学的最新科研成果, 内容涉及神经科、骨科、内科、儿科、精神科、肿瘤科、疼痛科等专科临床康复及相关学科的基础理论问题。设有院士论坛、专题述评、论著(包括基础研究及临床研究)、传统医学与康复、社区康复、康复医学工程、综述等栏目。

读者对象为康复医学专业人员、骨科、神经内外科、心血管内外科、儿科等医师、全科医师及康复工程专业人员。2009 年定价: 18.80 元, 全年价(全年 12 期): 225.60 元, 全国各地邮局均可订阅, 邮发代号: 82-361。本社全年办理杂志补订业务, 地址: 北京朝阳区和平街北口中日友好医院《中国康复医学杂志》, 100029。E-mail: rehabi@263.net; 电话及传真: (010) 64218095。

欢迎登录本刊网站(www.rehabi.com.cn), 了解更多信息!