

脊柱侧凸顶椎区椎间盘纤维环中 多聚蛋白多糖的表达及意义

贺永雄,邱 勇,王 斌,俞 杨,朱泽章,钱邦平

(南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008 江苏省南京市)

【摘要】目的:探讨脊柱侧凸患者顶椎区椎间盘纤维环中多聚蛋白多糖的表达及其意义。**方法:**采集 2003 年 7 月至 2004 年 9 月间行前路松解或矫形手术的 40 例脊柱侧凸患者侧凸顶椎区椎间盘组织。青少年特发性脊柱侧凸患者(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)25 例,胸椎椎间盘 11 例,腰椎椎间盘 14 例;先天性脊柱侧凸患者(congenital scoliosis, CS)15 例,胸椎椎间盘 6 例,腰椎椎间盘 9 例。利用 RT-PCR 扩增多聚蛋白多糖(Aggre-can),琼脂糖凝胶电泳,在 UVP(紫外光测定法)成像系统进行扫描, GelWork 图像分析系统中进行灰度测定半定量分析。分别计算 AIS 组和 CS 组凹侧、凸侧纤维环中 Aggre-can 含量,并对 CS 组和 AIS 组胸椎和腰椎以及椎间盘的凹侧和凸侧进行比较。**结果:** AIS 组和 CS 组椎间盘凹侧纤维环中 Aggre-can 含量低于凸侧,差异有显著性($P<0.01$),胸椎椎间盘纤维环中 Aggre-can 的含量低于腰椎,但无统计学差异。 AIS 组 Aggre-can 的含量和 CS 组相应部位 Aggre-can 的含量无明显差别。**结论:** AIS 椎间盘纤维环凹凸侧存在 Aggre-can 代谢差异,并且可能是脊柱侧凸所致的继发改变,但也可能是脊柱侧凸发生、发展中的重要因素。

【关键词】 脊柱侧凸;椎间盘;表达;多聚蛋白多糖

中图分类号:R682.3, R363.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2006)-03-0225-04

The expression of Aggre-can in annular fibral of intervertebral disc in apex of the curve in scoliosis/HE Yongxiong, QIU Yong, WANG Bin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2006, 16 (3):225~228

【Abstract】 Objective: To study the expression of the Aggre-can in the concave and convex side of intervertebral disc(apex of the curve) for scoliosis. **Method:** 40 cases of scoliosis including 25 cases of adolescent idiopathic scoliosis(AIS, 11 thoracic and 14 lumbar intervertebral disc) and 15 cases of congenital scoliosis(CS, 6 thoracic and 9 lumbar intervertebral disc). Specimens of the intervertebral disc(apex of the curve) were harvested during anterior surgery and total RNA were extracted. The amplification reaction products of Aggre-can were resolved on 1.0% agarose and analyzed through reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The gray scale was measured by the UVP imaging system and GelWork image analysis system, the Aggre-can content in concave and convex side of intervertebral disc were compared with One-Way ANOVA and the results were analyzed using Paired Samples T-Test. **Result:** The content of Aggre-can were significantly decreased in annulus fibrosus of concave side compared with that in convex side both in AIS and CS($P<0.01$), and there was even lower expression in the thoracic intervertebral disc than that in lumbar, which had no statistical difference. There were no difference in content of Aggre-can in the similar region between AIS and CS. **Conclusion:** The different Aggre-can metabolism between concave side and convex side in annulus fibrosus may be one of the important correlative factors during the progression of AIS.

【Key words】 Scoliosis; Intervertebral disc; Expression; Aggre-can

【Author's address】 Spine Service and Scientific Research Department, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing, 210008, China

基金项目:江苏省 135 医学重点人才项目(RC2001001)

第一作者简介:男(1977-),住院医师,医学硕士,研究方向:脊柱外科

电话:(025)83304616-12101 E-mail:spinedoctor@hotmail.com

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)是最常见的脊柱畸形。关于其发病机制的研究有多种学说^[1-4]。椎间盘是脊柱的重要组成成分,在维持脊柱的平衡和稳定中

起重要作用,被认为是脊柱侧凸发生的重要因素之一^[5]。基质蛋白多糖(proteoglycan,PG)是椎间盘的重要组成成分之一,其含量和成分的改变可直接导致椎间盘生物力学功能的减退和丧失,甚至诱发脊柱不稳定的发生。椎间盘 PG 主要分为可聚合的 PG,即蛋白多糖聚合体(Aggrecan)^[6]和不可聚合的 PG 两大类。本研究旨在探讨 AIS 患者不同部位椎间盘 Aggrecan 的表达,并和先天性脊柱侧凸(congenital scoliosis,CS)患者进行比较,探讨 Aggrecan 在 AIS 发生、发展过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象

收集 2003 年 7 月到 2004 年 9 月南京鼓楼医院脊柱外科在脊柱前路手术中获取的脊柱侧凸患者的椎间盘,其中 AIS 患者 25 例,CS 患者 15 例(表 1)。AIS 患者术前体检神经系统无异常发现,且均进行全脊髓 MRI 检查,排除了可能存在的脊髓或椎管内病变。手术过程用尖刀准确切取顶椎区椎间盘纤维环,分凹侧和凸侧两部分。用剪刀充分剪碎,用锡箔纸分份包裹后投入液氮中保存备用。

1.2 RNA 的提取和扩增

采用膜结合柱分离法试剂盒(SV total RNA isolation system,美国 Promega 公司)从椎间盘纤维环中提取总 RNA,利用紫外分光光度仪测量 OD260/OD280 的比值和 RNA 的浓度。优化 PCR 条件,确定反应循环数为 30,退火温度为 60℃。用表 2 所示的引物和一步法 RT-PCR(Promega 试剂

表 2 Aggrecan 和 GAPDH 的引物序列

名称	引物序列(5'—3')	目的片断
Aggrecan	上游:CACTGTTACCGCCACTTCCC	184bp
	下游:ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG	
GAPDH	上游:TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC	190bp
	下游:ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	

盒)的方法扩增 Aggrecan 和内参照 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH),每管 50μl 反应体系中加入如下试剂:RNase-free 水(去离子水)X μl,5×RNA PCR AMV 缓冲液 10μl,10mM dNTP 1μl,上游引物 1μl,下游引物 1μl,25mM MgCl₂ 2μl,AMV 逆转录酶 1μl,DNA 聚合酶 1μl,RNA 模板 Y μl。Y(μl)=1μg×1000÷模板浓度(μg/ml);X(μl)=50(μl)-17(μl)-Y(μl)。反应条件如下:(1)48℃ 45min,1 个循环;(2)94℃ 2min,1 个循环;(3)94℃ 30s(变性),60℃ 30s(退火),68℃ 1min(延伸),共 30 个循环;(4)68℃ 7min(终延伸),1 个循环;(5)4℃保存。

1.3 PCR 扩增产物的测定

扩增的 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中 100mV 下电泳 15min,UVF 生物成像系统将凝胶成像,用 Gelwork 图像分析软件将各个目的条带进行扫描和灰度积分,分别记录对应条带的积分值,并计算 Aggrecan 条带与 GAPDH 的吸光度(A)值的比值。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS 11.5 软件进行配对单因素方差分析、配对 t 检验和相关性分析。

2 结果

见表 3、4。AIS 和 CS 患者 Aggrecan 的表达无论在凸侧还是凹侧胸椎均比腰椎低,但无统计学差异($P>0.05$)。AIS 组和 CS 组椎间盘凹侧纤维环中 Aggrecan 含量均低于凸侧,差异有显著性($P<0.01$)。AIS 组 Aggrecan 的含量和 CS 组相应部位 Aggrecan 的含量无显著性差异($P>0.05$)。AIS 患者胸椎和腰椎凹凸侧纤维环 Aggrecan 的表达和年龄及 Cobb 角无线性相关性($P>0.05$),CS 组 Aggrecan 的表达和年龄、Cobb 角成显著性负相关。

表 1 AIS 和 CS 患者手术中切取顶椎区椎间盘部位及患者情况

节段	例数	年龄 (岁)	Cobb角 (°)	取材部位 及例数	Risser 征
AIS 胸椎	11 (M4,F7)	12~17 (14.5)	39°~58° (47.1°)	T8/9(5), T9/10(6)	3.3
	14 (M2,F12)	12~17 (14.6)	30°~65° (46.6°)	L1/2(14)	3.3
CS 胸椎	6 (M4,F2)	8~17 (12.3)	40°~155° (75.8°)	T7/8(2), T8/9(4)	2.5
	9 (M7,F2)	9~16 (13.7)	37°~101° (66.8°)	T12/L1(4), L1/L2(5)	1.9

注:表中 M 为男性,F 为女性

表 3 AIS 与 CS 患者顶椎区椎间盘纤维环 Aggrecan 的表达

	胸椎		腰椎	
	凸侧	凹侧	凸侧	凹侧
AIS	0.74±0.12 ^①	0.46±0.15	0.78±0.21 ^①	0.57±0.24
CS	0.71±0.14 ^①	0.42±0.09	0.79±0.25 ^①	0.47±0.15

注:①与凹侧比较 $P<0.01$ **表 4 AIS 与 CS 患者顶椎区椎间盘纤维环 Aggrecan 的表达与年龄及 Cobb 角的相关性分析**

	P值			
	AIS凸侧	AIS凹侧	CS凸侧	CS凹侧
年龄	0.48	0.21	0.008 ^①	0.045 ^②
Cobb角	0.19	0.15	0.04 ^②	0.004 ^①

注:①为 $P<0.01$, ②为 $P<0.05$

3 讨论

3.1 椎间盘的组成及各组分的功能和变化的意义

椎间盘由髓核、纤维环和连接二者的移行区组成,纤维环承受张力,髓核富含粘多糖蛋白,起缓冲作用,是维持脊柱稳定和平衡的重要因素。早有学者提出椎间盘左右半柱生长不平衡是导致脊柱侧凸的重要因素^[9]。当脊柱侧凸患者的椎间盘发生楔形变时,椎间盘发生变性的同时基质代谢物质含量和分布也发生改变,这样势必会影响脊柱的稳定性,导致椎间盘退变和脊柱侧凸的加重。

基质蛋白多糖(proteoglycan, PG)是椎间盘的重要组成部分之一,主要分布于髓核,分为可聚合的 PG,即蛋白多糖聚合物(Aggrecan)^[6]和不可聚合的两大类。人椎间盘中 PG 的分布浓度从纤维环到髓核呈梯度增加,在不同节段的分布有明显的差异。髓核 PG 浓度以腰椎间盘最高,颈椎间盘最低,反映了颈椎侧重于旋转而腰椎侧重于负重的力学功能^[10];而在纤维环中则呈相反的分布。我们的研究发现, AIS 患者腰椎椎间盘凹凸侧纤维环 Aggrecan 的表达均比胸椎为高,虽无统计学意义,但与理论上的变化正好相反, CS 患者也有相似的变化。根据不同应力引起椎间盘物质代谢变化的差异和不同部位椎间盘自身的差别, AIS 患者椎间盘 Aggrecan 的变化可能是力学因素所致的一种继发性改变,可能是腰椎侧重于负重,在受到外界应力改变后适应性的刺激产生代偿性 Aggrecan 合成增多,而胸椎由于较为固定的解剖

关系,在受到应力改变后适应性较差,容易发生细胞活性的丧失和 Aggrecan 合成障碍。

椎间盘 PG 发生的退变首先表现为聚合体的变化。新生儿椎间盘中聚合体比例较高,随年龄的增长,其细胞合成的聚合体减少,分解增加^[11]。椎间盘中这种小分子 PG 还可与胶原相互作用,导致胶原纤维形成的延迟或形成较细的纤维^[12]。我们的研究发现,在 CS 患者椎间盘纤维环中 Aggrecan 和患者的年龄呈显著的负相关,随着年龄的增加 Aggrecan 的含量减少。这种聚合体的减少以及通过与胶原的相互作用,是 CS 椎间盘发生结构、功能的改变和侧凸加重的基础,也符合年龄变化的趋势,因此必然会有硫酸软骨素的改变,进而影响椎间盘的生物组成和力学稳定。但在 AIS 患者中并无这种差异的存在,我们还不能判断是患者年龄差距小的原因还是 AIS 本身存在不同于 CS 的变化机制。

3.2 生物力学改变对椎间盘 Aggrecan 表达的影响

实验研究显示,生物应力的改变是椎间盘发生退变的主要原因。Hutton^[13]研究表明,当椎间盘内压力超过正常范围一定限度后 PG 发生降解和丢失。Neidlinger 等^[14]研究发现,椎间盘在间断的静水压力作用下髓核中 I 型胶原和蛋白多糖的表达增加,而椎间盘纤维环中 Aggrecan 的表达则降低。我们也发现在 CS 组患者中 Aggrecan 和 Cobb 角的度数呈负相关, Cobb 角度数越大 Aggrecan 表达越低,说明随着脊柱侧凸的加重, Aggrecan 随着椎间盘受到的压力增大而减少。另外,不同的机械压力对椎间盘细胞的功能和基质降解酶的活性有明显影响。Valhmu 等^[15]对牛软骨外植体 Aggrecan mRNA 随负荷改变的研究结果发现,低负荷时软骨细胞 mRNA 的合成上调,而随着负荷作用时间的延长,其 mRNA 水平则逐渐降低。我们的研究发现 AIS 和 CS 患者的椎间盘纤维环凹侧 Aggrecan 表达显著低于凸侧($P<0.01$),说明机械应力作用下凹侧椎间盘已经超过了适应性调整的范围,细胞活性降低,合成蛋白多糖的能力下降,而且这种变化在 AIS 组和 CS 组之间没有明显的统计学差异, AIS 患者椎间盘 Aggrecan 的表达变化符合应力改变后物质代谢变化的规律。但 Aggrecan 作为细胞外基质的主要结构成分之一,生物因子和生物力学等因素都可影响其代谢水平,

那么除了力学因素之外, AIS 患者椎间盘 Aggrecan 的变化是否由其它更重要的生物因子来调控我们还没有这样的依据和结论, 尚需进一步研究。

Aggrecan 除了机械应力外, 累计负荷的时间增加也可加快椎间盘细胞的凋亡, 使硫酸软骨素和 PG 合成减少^[15]。我们的研究发现, CS 组患者椎间盘凹侧纤维环 Aggrecan 的表达较 AIS 组低, 虽然没有统计学意义上的差别, 但也说明由于 CS 发病时间早, Cobb 角度数大, 凹侧椎间盘受到累计负荷的时间较 AIS 相对更长, 因此其 Aggrecan 的表达更低。AIS 和 CS 在椎间盘的凸侧纤维环则不存在差异。不过 CS 组 Aggrecan 的表达和 Cobb 角度数成负性相关, 且在承受应力较大的凹侧尤为显著 ($P < 0.01$)。提示 CS 患者由于椎间盘长期受到应力作用, 已经失去了代偿功能, 导致 Aggrecan 的合成障碍, 小分子蛋白多糖增多。小分子蛋白多糖和胶原结合改变了胶原纤维的表面性质, 从而导致胶原纤维形成延迟或形成较细的纤维^[12], 间接改变胶原功能的途径来影响椎间盘以及脊柱的稳定性。但 AIS 组患者 Aggrecan 的表达和 Cobb 角度数并无负性相关, 这种改变就不能完全用应力来解释, 也可能是胶原和蛋白多糖之间相互作用的结果。

总之, 我们还不能简单地用原发或者继发来描述脊柱侧凸椎间盘纤维环的这种异常的代谢模式。Aggrecan 代谢的异常可能是引发脊柱侧凸的影响因素之一, 在脊柱侧凸的发展中起重要作用。除了要考虑椎体相邻部位其它组织结构的因素外, 就物质代谢本身的途径而言也很复杂, 有关其详细的作用机理和途径还需要进一步研究。

4 参考文献

1. 邱勇, 朱丽华, 宋知非, 等. 脊柱侧凸的临床病因学分类研究[J]. 中华骨科杂志, 2000, 20(5): 265-268.
2. Machida M. Cause of idiopathic scoliosis[J]. Spine, 1999, 24(24): 2576-2583.
3. Lowe TG, Edgar M, Margulies JY. Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research [J]. J Bone Joint Surg (Am), 2000, 82(8): 1157-1168.
4. Porter RW. The pathogenesis of idiopathic scoliosis: uncoupled neuro-osseous growth[J]. Eur Spine J, 2001, 10(6): 473-481.
5. Heidari B, FitzPatrick D, Synnott K, et al. Modelling of annulus fibrosus imbalance as an aetiological factor in adolescent idiopathic scoliosis[J]. Clin Biomech, 2004, 19(3): 217-224.
6. Jahnke MR, McDevitt CA. Proteoglycans of the human intervertebral disc: electrophoretic heterogeneity of the aggregating proteoglycans of the nucleus pulposus [J]. Biochem J, 1988, 251(2): 347-356.
7. Luoma K, Riihimäki H, Raininko R, et al. Lumbar disc degeneration in relation to occupation [J]. Scand J Work Environ Health, 1998, 24(5): 358-366.
8. Baer AE, Wang JY, Kraus VB, et al. Collagen gene expression and mechanical properties of intervertebral disc cell-alginate cultures[J]. J Orthop Res, 2001, 19(1): 2-10.
9. Taylor JR. Scoliosis and growth: patterns of asymmetry in normal vertebral growth[J]. Acta Orthop Scand, 1983, 54(4): 596-602.
10. Scott JE, Bosworth TR, Cribb AM, et al. The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus [J]. J Anat, 1994, 184 (Pt 1): 73-82.
11. Sztrölovics R, Alini M, Roughley PJ, et al. Aggrecan degradation in human intervertebral disc and articular cartilage[J]. Biochem J, 1997, 326(Pt 1): 235-241.
12. Inkinen RI, Lammi MJ, Lehmonen S, et al. Relative increase of biglycan and decorin and altered chondroitin sulfate epitopes in the degenerating human intervertebral disc[J]. J Rheumatol, 1998, 25(3): 506-514.
13. Hutton WC, Elmer WA, Boden SD, et al. The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism [J]. Spine, 1999, 24(15): 1507-1515.
14. Neidlinger WC, Wurtz K, Liedert A, et al. A three-dimensional collagen matrix as a suitable culture system for the comparison of cyclic strain and hydrostatic pressure effects on intervertebral disc cells[J]. J Neurosurg Spine, 2005, 2(4): 457-465.
15. Valhmu WB, Stazzone EJ, Bachrach NM, et al. Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression [J]. Arch Oral Biochem Biophys, 1998, 353(1): 29-36.

(收稿日期: 2005-08-30 修回日期: 2006-02-05)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)