

不同月龄兔椎间盘组织中碱性成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子的表达

孙小航¹, 范清宇¹, 邓迎春², 文艳华¹, 马保安¹, 钱济先¹

(1 第四军医大学唐都医院骨科; 2 胸外科 710038 西安市)

【摘要】目的:观察不同月龄新西兰大白兔椎间盘组织中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达,探讨其与椎间盘退变的关系。**方法:**40只健康新西兰大白兔,1、3、6、9、12、18、24、30月龄各5只,每只取椎间盘(L5/6、L6/7和L7/S1)组织制作石蜡切片,行HE染色观察各月龄椎间盘组织结构情况,行免疫组织化学染色检测VEGF和bFGF的表达情况,应用图像分析系统测定染色阳性细胞的累积光密度(integrated optical density, IOD)。**结果:**HE染色显示,低月龄(1、3、6月龄)组椎间盘组织增生活跃,软骨终板均可见血管长入,尤其是1月龄组;中间月龄(9、12月龄)组椎间盘结构完整清晰,未见血管;18月龄组椎间盘出现退变,24月龄组椎间盘退变加重,30月龄组椎间盘结构破坏及老化严重,24、30月龄组椎间盘血管重新长入。免疫组化检查显示,bFGF和VEGF的IOD值在1月龄组表达最高(分别为 38.22 ± 14.13 和 57.67 ± 15.36),随后逐渐下降,12月龄组表达最低(其IOD值分别为 7.47 ± 4.08 和 12.41 ± 3.74),以后随月龄增加表达逐渐增多,30月龄组bFGF和VEGF的IOD值分别为 27.93 ± 11.64 和 37.54 ± 7.32 。低月龄组和高月龄组bFGF和VEGF的IOD值与中间月龄组比较均有显著性差异($P < 0.01$)。**结论:**兔椎间盘的结构及血管的发生都随月龄增加发生相应变化;bFGF和VEGF的表达也随月龄增加发生相应改变,两者变化具有相似性。

【关键词】碱性成纤维细胞生长因子;血管内皮生长因子;椎间盘;兔

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2009.02.15

中图分类号:R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-02-0143-04

Study on expression of age-related basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in intervertebral disc tissues of rabbits/SUN Xiaohang, FAN Qingyu, DENG Yingchun, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(2):143~146

【Abstract】Objective:To investigate the expression of the basic fibroblast growth factor(bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in intervertebral disc tissue of rabbits at different months and find out the relationship between bFGF and VEGF and degeneration of the intervertebral disc.**Method:**Sections from intervertebral discs(L5/6, L6/7, L7/S1) tissues of 40 rabbits(5 in each of 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 and 30 months old) were obtained and stained by haematoxylin eosin(HE) and immunohistochemical staining. The disc texture and structure was observed under HE staining, the expression of VEGF and bFGF were tested under immunohistochemistry. The integrated optical density(IOD) of staining-positive cell was processed by image analyzing system with higher the IOD value, higher expression of VEGF and bFGF.**Result:**Under HE staining, the disc tissue progressed actively in early month group(1, 3, 6 months) with blood vessel ingrowth into end plate, which was visualized specially in 1 month group; while blood vessel ingrowth into end plate was not visualized in mid-month groups (9, 12 months) with disc structure keeping intact. Disc degeneration was evidenced in 18-month group, which became severe in 24-month group, while disc structure proceeded into destruction in 30-month group, and blood vessel reingrowth can be seen in 24- and 30-month group. Under immunohistochemistry, IOD value of VEGF and bFGF reached highest point at 1-month group (38.22 ± 14.13 and 57.67 ± 15.36 respectively), lowest point at 12-month group(7.47 ± 4.08 and 12.41 ± 3.74 respectively), which progressed gradually with months and reached 27.93 ± 11.64 and 37.54 ± 7.32 at 30-month group respectively. There was significant difference in IOD value among low-month group, mid-month group and high-month group($P < 0.01$). **Con-**

第一作者简介:男(1981-),医学硕士,研究方向:脊柱疾病的基础与临床

电话:(029)84777591 E-mail:qianjx@fmmu.edu.cn

通讯作者:钱济先

clusion: The structure and vascularizations of intervertebral disc vary with month, along with the expression of bFGF and VEGF, which has the similarity.

【Key words】 Basic fibroblast growth factor; Vascular endothelial growth factor; Intervertebral disc; Rabbit

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038, China

流行病学调查表明, 大约有 80% 的人一生中有过腰痛的症状^[1,2], 而椎间盘退行性病变(intervertebral disc degeneration, IVDD) 被认为是腰腿痛最常见的原因。在椎间盘退变的发展过程中, 椎间盘血管的发生和发展都与其有着密切的关系。本研究通过观察不同月龄兔椎间盘中碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达情况, 探讨椎间盘内血管的变化与椎间盘退变的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂仪器

清洁级健康新西兰大白兔(第四军医大学实验动物中心提供)40只, 实验前椎间盘及椎体未受损伤或破坏, 雌雄不拘。在普通清洁级条件下喂养, 室内温度为 17℃~25℃, 相对湿度为 40%~70%。bFGF(北京博奥森生物技术有限公司)、VEGF(晶美生物工程有限公司), 多克隆抗体免疫组化试剂盒, 多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine, Sigma 公司)。LEICA RM2128 型切片机(LEICA, German)。BX51/DP70 型显微照相系统(Olympus, Japan)。Image-Pro Plus 5.1 (IPP, USA)/BX51/DP70 (Olympus, Japan) 彩色病理图文分析系统。

1.2 实验动物分组和标本取材

以兔月龄分为 1、3、6、9、12、18、24、30 月龄共 8 个月龄组, 每组 5 只。1、3、6 月龄为低月龄组(生长期), 9、12 月龄为中间月龄组(成熟期), 18、24、30 月龄为高月龄组(退变期)。以耳缘静脉注入空气栓塞的方法处死, 每只取同序数(L5/6、L6/7、L7/S1)腰椎间盘标本 3 个, 切取完整软骨终板、纤维环和髓核组织。室温下在 10% 的多聚甲醛溶液中固定 3d, Von Ebner 法脱钙 1 周, 常规石蜡包埋。所有标本沿椎间盘正中水平方向向上下按 5μm 厚度连续切片, 每个椎间盘标本选取两端包含纤维环及软骨终板, 中间包含纤维环及髓核的切片, 备用。

1.3 组织学检查

每只动物每个椎间盘取 2 张切片常规二甲苯脱蜡, 经各级浓度乙醇浸水, 水洗, 苏木素染色 5min, 自来水冲洗, 盐酸乙醇分化 30s, 自来水浸泡 15min, 置伊红液 2min, 常规脱水, 透明, 中性树脂封片。应用 BX51/DP70 型显微照相系统观察椎间盘组织结构情况。

1.4 bFGF 和 VEGF 的检测

每只动物每个椎间盘取 2 张切片二甲苯脱蜡, 酒精脱水, 滴加 3% 双氧水封闭 30min, 尿素消化 30min, 血清封闭 20min, 加一抗, 同时用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗设阴性对照, 4℃过夜。37℃复温 50min 后, 加二抗于 37℃孵育 50min, 再经 PBS 洗涤后滴加 1:100 稀释亲合素标记的辣根过氧化物酶, 置于 37℃孵育 50min, 最后加二氨基联苯胺(DAB)显色, 用树脂胺封片。bFGF 和 VEGF 主要位于胞浆中, 阳性为胞浆被染成棕黄色或棕褐色, 苏木精复染后胞核为蓝色, 胞浆不被染色。应用 IPP5.1/BX51/DP70 (Olympus, Japan) 彩色病理图文分析系统进行统计分析。每只兔的每张切片随机选 5 个不同视野进行观察, 应用 IPP 5.1 软件测量每个视野阳性表达的 IOD 值, 然后将其相加, 计算出一张切片平均 IOD 值, 再计算出每组的平均 IOD 值。平均 IOD 值高则说明 bFGF 和 VEGF 表达强, 低则表达弱。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 12.0 统计软件处理数据。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 不同月龄之间 bFGF 和 VEGF 表达的比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 组织学检查结果

低月龄组兔椎间盘组织结构十分清晰, 纤维环完整致密, 胶原纤维走行有序, 髓核与纤维环界限清晰, 髓核内细胞较小, 呈梭形和类圆形, 数量较多, 软骨终板结构清晰, 软骨细胞较多, 增生活跃, 各月龄组软骨终板中均可见毛细血管(图 1a,

后插页 V)。中间月龄组纤维环结构完整,胶原纤维增大增粗,细胞形态较低月龄增大,纤维环及软骨终板内未见血管长入(图 1b,后插页 V)。18 月龄组纤维环结构清晰,胶原纤维增大增粗,排列有序,髓核与纤维环分界不清,髓核内有条索状细胞群出现,未见血管长入;24 和 30 月龄组纤维环胶原纤维排列紊乱,出现缝隙,并可见纤维断裂或缺失,随着月龄的增加纤维环和髓核组织结构紊乱的程度逐渐加重;髓核内胶原排列紊乱,基质降解明显,细胞变大变圆,呈类软骨样,并且细胞群集,周围形成大量基质;软骨终板结构紊乱,钙化严重,24 和 30 月龄组还能见到毛细血管长入(图 1c、d,后插页 V)。在 30 月龄组靠近骶骨端的椎间盘组织破坏比较严重,椎间盘组织中可见散在钙化灶。

2.2 bFGF 和 VEGF 的检测结果

bFGF 在低月龄兔纤维环最外围均匀表达,染色比较重,纤维环外层血管内皮细胞胞浆表达阳性,软骨终板中的软骨细胞和血管内皮细胞呈阳性表达(图 2a,后插页 V)。中间月龄的纤维环中 bFGF 染色较低月龄组逐渐变浅,软骨终板表达减弱,髓核中几乎见不到阳性表达产物(图 2b,后插页 V)。高月龄兔纤维环中的类软骨细胞和成纤维细胞中表达逐渐增强,特别是在纤维环的前部圆形的类软骨细胞和新生成的血管内皮细胞中 bFGF 高度表达;髓核中基质、纤维细胞、类软骨细胞也呈阳性表达,并随月龄增大而逐渐增强(图 2c、d,后插页 V)。各月龄组 bFGF 染色阳性细胞的 IOD 值见表 1。1 月龄组最高,以后逐渐下降,在 12 月龄时最低,然后又逐渐上升,30 月龄组升至较高值。低月龄组内和高月龄组内两两比较均有显著性差异($P<0.05$),中间月龄组内无显著性差异($P>0.05$);低月龄组和高月龄组与中间月龄组组间比较均有显著性差异($P<0.01$);18 月龄组与 1、3、6 月龄组比较及 24 月龄组与 1、3 月龄组比较均有差异性显著($P<0.05$),24 月龄组与 6 月龄组比较无显著性差异($P>0.05$),30 月龄组与 1 月龄组比较有显著性差异($P<0.05$),与 3、6 月龄组比较均无显著性差异($P>0.05$)。

VEGF 在低月龄兔纤维环及髓核内细胞有阳性表达,纤维环及软骨终板的血管内皮细胞表达强阳性(图 3a,后插页 V);中间月龄较低月龄的 VEGF 表达有所下降,呈逐渐减弱趋势,阳性表达

表 1 不同月龄兔椎间盘中 bFGF 和 VEGF 表达的累积光密度 (IOD) 值 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

	bFGF	VEGF
1 月龄组	38.22±14.13	57.67±15.36
3 月龄组	27.05±5.36	47.31±7.49
6 月龄组	21.17±7.82	31.02±9.35
9 月龄组	9.30±3.16	16.25±7.81
12 月龄组	7.47±4.08	12.41±3.74
18 月龄组	12.59±6.63	18.76±6.55
24 月龄组	21.67±8.15	22.19±9.11
30 月龄组	27.93±11.64	37.54±7.32

注:bFGF 和 VEGF 均为 1、3、6 月龄之间两两比较 $P<0.05$,9、12 月龄比较 $P>0.05$,18、24、30 月龄之间两两比较 $P<0.05$,1、3、6 与 9、12 月龄之间两两比较 $P<0.01$,18、24、30 月龄与 9、12 月龄之间两两比较 $P<0.01$,18、24 月龄分别与 1、3 月龄比较均 $P<0.05$,30 月龄与 1 月龄比较 $P>0.05$,与 3、6 月龄比较 $P<0.05$;24 月龄的 bFGF 与 6 月龄比较 $P>0.05$,24 月龄的 VEGF 与 6 月龄比较 $P<0.05$

主要集中在纤维环周围部位血管内皮细胞,软骨终板、髓核内几乎看不到阳性细胞(图 3b、c,后插页 V);高月龄组表达又出现逐渐增强趋势,纤维环内纤维细胞、髓核内类软骨细胞都呈阳性表达,尤其是 30 月龄组椎间盘中大量出现的血管内皮细胞中呈强阳性表达(图 3d,后插页 V)。各月龄组的 IOD 值见表 1。VEGF 的表达在 1 月龄组最高,以后逐渐下降,12 月龄最低,后又逐渐上升,在 30 月龄组又升至较高值。低月龄组内和高月龄组内两两比较均有显著性差异($P<0.05$),中间月龄组内无显著性差异($P>0.05$);低月龄组和高月龄组与中间月龄组组间比较均有显著性差异($P<0.01$);18、24 月龄组分别与 1、3、6 月龄组比较均有差异性显著($P<0.05$),30 月龄组与 1 月龄组比较有显著性差异($P<0.05$),与 3、6 月龄组比较均无显著性差异($P>0.05$)。

bFGF 和 VEGF 的表达从 1 月龄到 9 月龄都随月龄增加表达逐渐减少,12 月龄最低,从 18 月龄到 30 月龄又逐渐增加。两者具有很大相似性。

3 讨论

椎间盘是连接脊柱各椎体的纤维软骨盘,由髓核、纤维环及上、下软骨终板构成。随着月龄的增加,椎间盘各组织都会发生退行性改变。而椎间盘的退行性变又是导致椎间盘突出的重要因素。

bFGF 和 VEGF 作为检测血管发生发展的重要指标,对椎间盘组织中血管发生的研究具有重要意义。在椎间盘的发育、成熟和退变的过程中,

椎间盘组织中血管经历了从有到无,再从无到有的过程^[3,4]。本研究发现,低月龄兔 bFGF 和 VEGF 分别在纤维环外层及软骨终板中的血管内皮细胞中高度表达;中间月龄兔随着椎间盘血供的减少它们的表达都逐渐减弱,甚至呈阴性表达;而随着月龄的增大,高月龄组 bFGF 和 VEGF 的表达又都逐渐增强,尤其是在血管内皮细胞中。这与组织学检查的结果具有相似性,说明 bFGF 和 VEGF 的表达与椎间盘中血管的发生发展关系密切。并且 bFGF 和 VEGF 之间的变化具有相似性。随着月龄的增加,bFGF 和 VEGF 的表达都经历了从多到少、再从少到多的变化,其表达强度也都随着月龄的增加从强到弱、再从弱到强。

在椎间盘的生长期,椎间盘髓核内的髓核细胞、纤维环内的血管内皮细胞都表达 VEGF,说明 VEGF 作为一种重要的血管形成刺激因子,在该期维持椎间盘中毛细血管的存在和正常功能发挥重要作用,使得椎间盘纤维环中、外层有部分血供,为此期椎间盘发育和成熟提供了必要的营养成分;至成年,椎间盘发育成熟,纤维环中、外层的血管完全退化消失,使椎间盘成为机体最大的无血管组织,表现在椎间盘细胞不再表达 VEGF,提示 VEGF 的消失导致的血管丧失可能是椎间盘退变的一个原因^[5]。bFGF 分泌并作用于缺血的血管壁,促进 VEGF 表达,同时又直接促进血管内皮细胞的增殖,起到与 VEGF 协同的作用^[6]。椎间盘生长发育所需的营养都必须有血管供给,边缘部分可以直接供应,中间则要通过弥散作用来实现。本研究结果显示,随着月龄的改变,血管的变化与 bFGF 和 VEGF 在椎间盘中的改变是相似的。

在成熟期,bFGF 和 VEGF 随着血管的退化而逐渐减少,使椎间盘成为机体最大的无血管组织,表现在椎间盘细胞中 bFGF 和 VEGF 表达显著减少,bFGF 和 VEGF 的表达减少导致的血管丧失可能是椎间盘退变的一个原因。而在椎间盘退变时,早期又出现 bFGF 和 VEGF 的表达,可能是机体试图修复组织损伤的反应^[7],但是随着引起退变因素的进一步加强,血管的形成也造成炎症细胞及炎症介质的入侵,炎性反应会加剧椎间盘的退变,从而导致纤维环的破裂,髓核的脱出。Tolonen 等^[8]的研究认为生长因子在椎间盘的退变过程中起级联作用。

Antoniou 等^[9]认为毛细血管的出现是椎间盘

退变的原因,因为椎间盘退变的实质是基质的降解,成熟的椎间盘是一个无血供组织,而血管的侵入满足胶原酶激活所需的条件,从而导致基质降解,椎间盘的退变,髓核的破裂突出。Yasuma 等^[10]认为椎间盘退变和突出所出现的新生毛细血管可能是椎间盘组织损伤和突出的继发性改变。

总之,不同月龄兔椎间盘中 bFGF 和 VEGF 的表达与血管化的进程密切相关,而血管的出现对椎间盘发育、成熟和退变具有重要的调节作用。如何利用 bFGF 和 VEGF 的表达与血管的形成关系来减缓和治疗椎间盘的退变,还需要进一步的研究和探索。

4 参考文献

1. German JW, Foley KT. Disc arthroplasty in the management of the painful lumbar motion segment[J].Spine,2005,30(Suppl 16):S60-67.
2. Anderson PA, Rouleau JP. Intervertebral disc arthroplasty[J].Spine,2004,29(23):2779-2786.
3. Nerlich AG, Schaaf R, Wälchli B, et al. Temporo-spatial distribution of blood vessels in human lumbar intervertebral discs [J].Eur Spine J,2007,16(4):547-555.
4. 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.
5. 龙厚清,李佛保,胡有谷,等.腰椎间盘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.
6. Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, et al. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells [J].Circulation,1995,92(1):11-14.
7. 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.
8. Tolonen J, Gronblad M, Vanharanta H, et al. Growth factor expression in degenerated intervertebral disc tissue [J].Eur Spine J,2006,15(4):588-596.
9. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for change in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing and degeneration [J].J Clin Invest,1996,98 (4):996-1003.
10. Yasuma T, Araik K, Yamanochi Y. The histology of lumbar intervertebral disc herniation. [J].Spine,1993,18 (16):1761-1765.

(收稿日期:2008-06-05 末次修回日期:2008-12-11)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)