

# 基质金属蛋白酶 3 和其组织抑制剂 1 在椎间盘中的表达及其意义

杨圣 史可中 安荣泽 廖文波 谢锡芬  
(遵义医学院第一附属医院, 贵州 遵义 563003)

**【摘要】** 目的 检测突出和非突出椎间盘中是否有基质金属蛋白酶 3(MMP3) 及其组织抑制剂 1(TIMP1) 的表达, 了解椎间盘退变和突出的发病机制。方法 采用 ABC 免疫组化方法, 测定 60 例突出椎间盘标本(分为凸出型、脱出型、游离型) 和 16 例非突出椎间盘标本内 MMP3 和 TIMP1 的表达情况。结果 突出椎间盘中的 MMP3 比非突出椎间盘的多, 其差异有显著性意义。脱出型及游离型内的 MMP3 比突出型的多, 其差异有显著性意义。脱出型及游离型内的 MMP3 无显著性差异。非突出椎间盘和凸出型椎间盘内 TIMP1 为阴性, 脱出型和游离型内 TIMP1 为阳性, 但无显著性差异。结论 MMP3 和 TIMP1 的不平衡表达也许是椎间盘退变的因素。椎间盘退变程度的差异可能是椎间盘突出症临床分型的基础。

**【关键词】** 椎间盘移位 免疫组织化学 软骨

**Statement of Metalloproteinase 3 and Its Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 in Intervertebral Disc and Its Significance** YANG Sheng, SHI Kezhong, AN Rongze, et al. The First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College(Guizhou Zunyi, 563003)

**【Abstract】 Objective** To detect whether the matrix metalloproteinase 3 and its tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expressed among intervertebral disc and comprehend the pathogenesis of intervertebral disc herniation and degeneration. **Methods** MMP3 and TIMP1 statement in 60 specimens of disc herniation(classified as protrusions, extrusions, sequestrations) and 16 nonherniated discs were detected by immunohistochemistry(ABC assay). **Results** Statement of MMP3 observed in prolapsed discs was significantly higher than in nonprolapsed disc. The MMP3 positive cell ration in the extrusion and sequestration types were significantly higher than in the protrusion type. No significant difference of MMP3 positive cell ration was found between the extrusion and sequestration type. Positive statement of TIMP1 were not observed in nonherniated discs the protrusion type while were observed and in the extrusion and sequestration types and there were no significant difference between them. **Conclusion** Imbalanced statement of MMP3 and TIMP1 in intervertebral disc may induce the intervertebral disc degeneration. Difference in degenerative degrees of intervertebral disc may be the biological basis of different disc herniated types in clinic.

**【Key Words】** Intervertebral disk displacement Immunohistochemistry Cartilage

基质金属蛋白酶(MMP3) 是一族依赖 Zn 离子, 具有降解细胞外基质(ECM) 主要功能的蛋白酶, 它有 20 个成员<sup>[1]</sup>。基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIM P1) 是一组具有特异性抑制 MMP 功能的酶, 它有 4 个成员<sup>[1,2]</sup>。国外研究<sup>[3,4]</sup> 表明, MMP3 和 TIMP1 与椎间盘退变和突出有关。我们采用 ABC 免疫组化方法, 检测突出椎间盘和非突出椎间盘内 MMP3 和 TIMP1 的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂 MMP3 和 TIMP1 单克隆抗体, L-多聚赖氨酸

等购自福州迈新生物技术开发公司, ABC 免疫组化试剂盒购自华美生物工程公司上海分公司。

**1.2 标本的收集和处理** 60 例突出椎间盘标本(颈椎间盘凸出型 3 例、腰椎间盘凸出型 17 例、腰椎间盘脱出型和腰椎间盘游离型各 20 例) 取自因椎间盘突出症而手术的患者(平均 41.2 岁)。16 例非突出椎间盘标本取自无椎间盘突出症但行脊柱手术的病人(脊柱骨折 12 例、第 5 腰椎滑脱 4 例; 平均 32.7 岁)。标本用 10% 福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 并作病理检查。

**1.3 免疫组化方法及结果判断** 应用 ABC 全组分浓缩型试剂盒对石蜡切片进行检测, DAB 显色、苏木素浅染。用

MMP3 单克隆抗体测定椎间盘软骨细胞内 MMP3 的表达。用 TIMP1 单克隆抗体测定椎间盘软骨细胞内 TIMP1 的表达。同时设置阳性和阴性对照。阳性对照切片由迈新公司提供。实验中用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

MMP3 和 TIMP1 都定位于细胞浆, 故它们的阳性结果均表现为: 软骨细胞胞浆内有棕黄色或棕褐色颗粒(见图 1、2)。苏木素浅染后细胞核为蓝色。每张切片随机观察 5 个视野, 并记录阳性软骨细胞数和软骨细胞总数。每个标本检测两张切片, 该标本阳性软骨细胞率 = 10 个视野内阳性软骨细胞总数 ÷ 10 个视野内软骨细胞总数 × 100%。阳性软骨细胞率 < 5% 记为阴性; 阳性软骨细胞率 ≥ 5% 记为阳性。

1.4 统计学处理 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  记录, *t* 检验处理。

2 结果

大多数椎间盘软骨细胞内 MMP3 阳性、TIMP1 阴性。MMP3 和 TIMP1 均阳性的情况只在脱出型和游离型中出现。未见 MMP3 阴性而 TIMP1 阳性, 以及两者均阴性的现象(表 1)。突出椎间盘内的 MMP3 比非突出椎间盘内的多, 且有显著性意义(*t* = 9.520, *P* < 0.01)。脱出型和游离型内的 MMP3 比凸出型内的多, 且有显著性差异(表 2)。脱出型和游离型内的 MMP3 及 TIMP1 均无显著性差异。

表 1 免疫组化结果

组别	M+ T+	M+ T-	M- T+	M- T-	合计
颈椎间盘凸出	—	3	—	—	3
腰椎间盘凸出	—	17	—	—	17
腰椎间盘脱出	15	5	—	—	20
腰椎间盘游离	17	3	—	—	20
脊柱骨折	—	12	—	—	12
第 5 腰椎滑脱	—	4	—	—	4
合计	32	44	0	0	76

注: M = MMP3 T = TIMP1 (+) = 阳性 (-) = 阴性

表 2 突出椎间盘各型 MMP3 的表达水平( $\bar{x} \pm s$ , %, *n* = 20)

组别	MMP3	<i>t</i>	<i>P</i>
脱出型	54.90 ± 7.05	10.804	< 0.01
游离型	55.57 ± 7.99	10.386	< 0.01
凸出型	32.60 ± 5.96	—	—

注: 表内 *t* 值和 *P* 值为与凸出形比较

3 讨论

一般认为, 构成椎间盘突出的基本因素是椎间盘退变。本实验的所有椎间盘经病理检查证实: 它们均有不同程度的退变。椎间盘退变主要表现在构成基质的蛋白聚糖、胶原、弹性蛋白等的结构、功能、含量和类型的变化。对人突出椎间盘的研究显示: 有过量 MMP 存在。它们削弱了纤维环的保护作用, 从而使髓核易自侧后方和后方突出<sup>[1]</sup>。单纯增加髓核内的压力不会使其从椎间盘侧后方突出<sup>[1]</sup>。Kang 等<sup>[5]</sup>的研究表明: 突出髓核间盘内 MMP 的活性显著强于非突出椎间盘, 其中以基质溶解素和明胶酶活性的增加尤为明显。Kanemoto 等<sup>[4]</sup>认为 MMP3 和 TIMP1 之间的不平衡使椎间盘退变。

本实验观察到: 突出组和非突出组的 MMP3 均为阳性, 而且前者比后者多; 脱出型及游离型的又比凸出型的多。这提示脱出型及游离型的退变程度比凸出型的严重; 退变程度的差异可能是椎间盘突出症临床分型的基础; MMP3 阳性率对评价椎间盘退变程度可能有一定的价值。与 MMP3 不一样, TIMP1 在非突出和凸出型椎间盘内部为阴性。由上可推测, 椎间盘内 MMP3 和 TIMP1 的不平衡表达(即 MMP3 比 TIMP1 多)可能是椎间盘退变的因素。

Haro H 等<sup>[3]</sup>的研究表明: MMP3 在突出椎间盘的自行吸收中发挥作用。本实验中, MMP3 在所有椎间盘内均为阳性; TIMP1 却只在脱出型和游离型内有阳性表达。脱出型和游离型内的 MMP3 及 TIMP1 都无显著性差异。这提示脱出型和游离型内的 TIMP1 抑制了 MMP3 的基质降解功能, 阻碍了脱出及游离椎间盘的自行吸收。在临床上表现为绝大多数的脱出型和游离型椎间盘突出症非手术治疗无效, 必须手术治疗。

外伤是椎间盘突出症的重要诱因。它不仅在生物力学方面发挥作用, 还对 MMP3 和 TIMP1 有影响。椎间盘液静压随其负荷的增加而增高<sup>[6]</sup>: 在站立或坐位时, 液静压为 0.4MPa~ 0.6MPa。弯腰提重物时, 液静压可达到或超过 3MPa。当椎间盘的液静压 ≥ 3MPa 时, MMP3 的产生得到促进, TIMP1 基本无变化; 压力在 0.3MPa 时 TIMP1 的产生受到促进, MMP3 的产生却受到抑制。这可能是从事重体力劳动和举重运动者的椎间盘易退变和突出的原因之一。所以, 减少椎间盘内 MMP3 的含量或抑制其活性, 就有可能预防或减缓椎间盘退变, 减少椎间盘突出症的发生。目前国外已用 TIMP 对骨关节炎进行临床试验性治疗<sup>[1]</sup>。TIMP 在椎间盘突出症中的应用还有待研究。

(本文图 1, 2 见封 3)

参考文献

- [1] Goupille H, Jayson M, Valat J, et al. Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration? Spine, 1998, 23: 1612-1626.
- [2] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological function. Eur J Cell Biol, 1997, 74(2): 111-122.
- [3] Haro H, Shinomiya K, Murakami S, et al. Upregulated expression of matrilin and neutrophil collagenase in human herniated discs. J Spinal Disord, 1999, 12(3): 245-249.
- [4] Kanemoto M, Hukuda S, Komiyama Y, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase 3 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in human intervertebral discs. Spine, 1996, 21: F8.
- [5] Kang JD, Georgescu HI, McIntyre Larkin L, et al. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases nitric oxide, interleukin 6, and prostaglandin E2. Spine, 1996, 21: 271-277.
- [6] Handa T, Ishihara H, Ohshima H, et al. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc. Spine, 1997, 22: 1085-1091.

(收稿: 2000-02-25 修回: 2000-05-31 编辑: 李为农)

## 基质金属蛋白酶-3 和其组织抑制剂-1 在椎间盘中的表达及意义

(正文见 204 页)

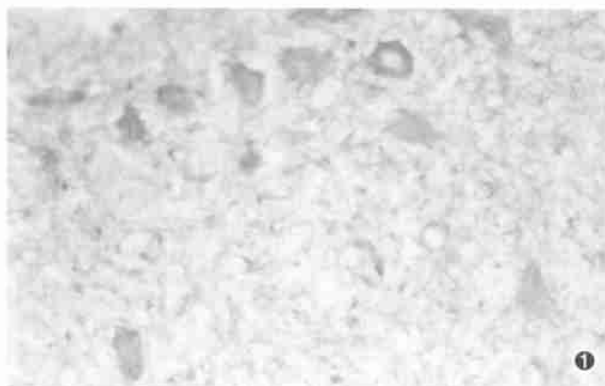


图 1 软骨细胞 MMP3 染色阳性; 细胞核为蓝色; 细胞浆为棕黄色。ABC  $\times 400$

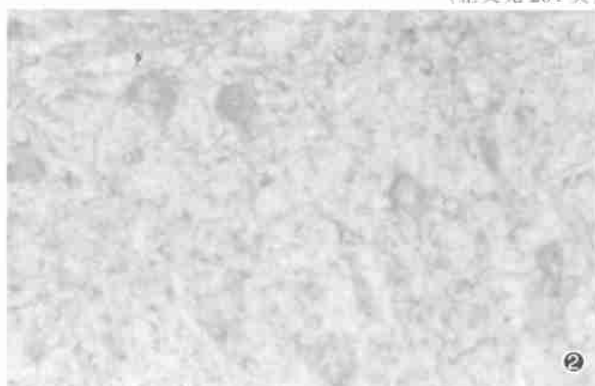


图 2 软骨细胞 TIMP-1 染色阳性; 细胞浆为棕黄色; 细胞核为蓝色。ABC  $\times 400$

## 胚胎脊髓移植后大鼠损伤脊髓 c-Jun 免疫反应的变化及其意义

(正文见 206 页)



图 1 A 组大鼠脊髓损伤后 7 天 c-Jun 免疫反应的表达,  $\times 200$



图 2 B 组大鼠脊髓损伤后 7 天 c-Jun 免疫反应的表达,  $\times 200$

## 去睾大鼠骨丢失的组织学机理研究

(正文见 209 页)



图 1 病理组: 广泛的骨吸收表面, 提示: 骨吸收增强, 骨重建单位激活率增高, 骨转换加快 (甲苯胺蓝染色 光镜  $\times 400$ )

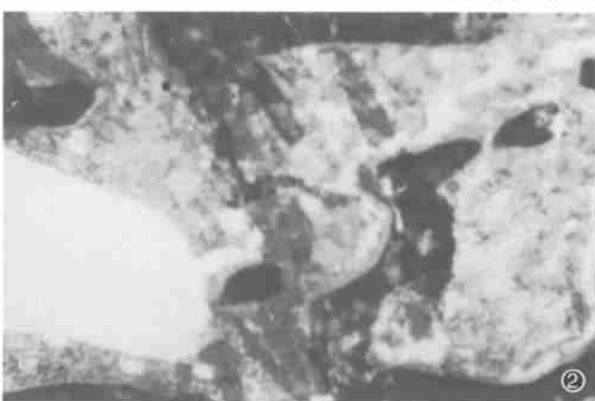


图 2 病理组: 骨小梁稀疏、较薄, 且有较多的中断现象, 说明骨量丢失, 骨转换加快导致骨结构破坏 (甲苯胺蓝染色 光镜  $\times 100$ )