

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.21.016

脊柱结核椎间盘 MMPs 和 TIMPs 表达的意义

王 寒, 蒋电明[△]

(重庆医科大学附属第一医院骨科 400016)

[摘要] 目的 探讨基质金属蛋白酶(MMPs)和基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)在脊柱结核椎间盘中表达的意义。方法 选取该院 2011 年 1 月至 2014 年 5 月在脊柱外科接受手术治疗的脊柱结核患者 42 例作为脊柱结核组(TB 组);选取同期因椎间盘突出接受手术治疗的 40 例患者作为椎间盘突出组(ID 组);另选同期因外伤性脊柱骨折接受手术治疗的 34 例作为对照组;应用 ELISA 和免疫组织化学检测受试者椎间盘中 MMP-1、MMP-13、TIMP-1 及 TIMP-3 的表达水平。结果 TB 组中 MMP-1、MMP-13 和 TIMP-3 的表达水平, MMP-1/TIMP-1 和 MMP-13/TIMP-3 比值均高于其他两组, TIMP-1 表达水平低于另两组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MMPs 和 TIMPs 在脊柱结核椎间盘破坏的发病机制中发挥了重要的作用。

[关键词] 椎间盘;基质金属蛋白酶类;基质金属蛋白酶抑制剂;脊柱结核

[中图分类号] R681.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)21-2926-02

Expression and significance of MMPs and TIMPs in intervertebral disc of spinal tuberculosis

Wang Han, Jiang Dianming[△]

(Department of Orthopedic, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMPs) in intervertebral disc of spinal tuberculosis. **Methods** Forty two cases of spinal tuberculosis underwent surgical treatment in our hospital from January 2011 to May 2014 were collected as tuberculosis group (TB group); forty patients who underwent surgery for lumbar disc herniation were selected as lumbar disc herniation (ID group); and other 34 cases of fracture patients underwent surgery due to trauma spine were collected as the control group; enzyme linked immunosorbent assay and immunohistochemical detection were used to detect the expression level of MMP-1, MMP-13, TIMP-1 and TIMP-3 of the subjects in intervertebral disc. **Results** The expression levels of MMP-1, MMP-13 and TIMP-3, MMP-1/TIMP-1 and MMP-13/TIMP-3 ratio in TB group were higher than those of the other two groups, the expression level of TIMP-1 was lower than that of the other two groups, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** MMPs and TIMPs play important role in the pathogenesis of the intervertebral disc damage in spinal tuberculosis.

[Key words] intervertebral disk; matrix metalloproteinases; tissue inhibitors of metalloproteinases; spinal tuberculosis

WHO 报道 2010 年全球新发结核病患者约 880 万^[1]。其中, 1%~5% 的人会发生脊柱结核^[2]。脊柱结核占骨结核的 50%~60%, 可致骨破坏、脊柱畸形、脊髓神经压迫损伤、甚至截瘫等, 致残率较高^[3]。结核分枝杆菌可以诱导巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶(MMPs), 对结核患者的局部组织造成损伤, 在脊柱结核的发病机制中发挥重要作用。MMPs 为细胞外基质(ECM)降解的重要细胞因子, MMPs 在人体蛋白激酶活化作用下, 具有降解细胞基底膜、分解 ECM、减低细胞内黏附力等作用, 基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)则为 MMPs 的特异性拮抗剂。本研究采用 ELISA 技术和免疫组化技术, 检测 MMP-1、MMP-13、TIMP-1 和 TIMP-3 在结核性椎间盘组织、退行性椎间盘组织和正常椎间盘组织内的表达情况及差异性, 旨在为阐明脊柱结核患者椎间盘损害的发生机制, 为脊柱结核治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2011 年 1 月至 2014 年 5 月在脊柱外科接受手术治疗的脊柱结核患者 42 例作为脊柱结核组(TB 组), 其中男 24 例, 女 18 例, 年龄 21~72 岁, 平均(41.4±16.9)岁。纳入标准: 具有中度发热、肢体乏力、腰痛和下肢肌力减退等脊柱结核的典型症状; 患者血液检查, 结核菌素皮肤试验, 组织病理学检查和影像学检查, 如 X 线摄影, 计算机断

层扫描(CT)和磁共振成像(MRI)均支持脊柱结核疾病诊断; 排除获得性免疫缺陷综合征(AIDS), 肿瘤和强直性脊柱炎的患者。选取同期因椎间盘突出接受手术治疗的 40 例患者作为椎间盘突出组(ID 组), 其中男 27 例, 女 13 例, 年龄 24~75 岁, 平均(42.3±17.2)岁。椎间盘突出组患者临床症状以及影像学检查均符合椎间盘突出症诊断标准。另选同期因外伤性脊柱骨折接受手术治疗的 34 例作为对照组, 其中男 19 例, 女 15 例, 年龄 19~68 岁, 平均(39.4±16.6)岁。患者手术前明确为外伤所致的脊柱骨折, 手术前影像学检查未有椎间盘退行性改变。排除脊柱相关性疾病, 如脊柱结核、椎间盘突出、强直性脊柱炎的患者。本研究经伦理委员会批准, 所获得的标本均履行告知义务并签署知情同意书, 符合国务院颁布的《医疗机构管理条例》的相关要求。

1.2 检测仪器与试剂 MK3 型酶标仪购自美国 Thermo 公司, 采用 ELISA 免疫法测定 MMP-1、MMP-13、TIMP-1 及 TIMP-3 水平, 试剂盒由上海生物科技有限公司提供, 操作步骤严格按照说明书进行。MMP-1 和 TIMP-1 鼠抗人单克隆抗体购自福州迈新公司, MMP-13 和 TIMP-3 兔抗人单克隆抗体购自美国 San Cruz 公司, 两步法 SP 抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.3 方法 外科手术获得标本后,经两名经验丰富的病理学家检查,以确保样本的准确性。每位患者标本均分成两份,第 1 份制成石蜡切片行 HE 染色、免疫组化法;第 2 份进行 ELISA 检测。取部分组织以 10% 甲醛固定 48 h,以石蜡包埋切片,部分组织迅速移至 -80 °C 冰箱冻存备用,供 ELISA 检测。使用酶标仪测定标准品和标本的光密度值。试验前先将椎间盘组织称质量,超声波粉碎,加入 PBS 研磨制成匀浆,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液。采用 ELISA 法测定两组椎间盘组织中的 MMP-1、MMP-13、TIMP-1 及 TIMP-3。按说明书进行操作。所有髓核组织标本用 10% 甲醛常规固定,石蜡包埋,4 μm 切片,一片作常规 HE 染色,其余采用 SP 免疫组化方法检测 MMP-1、MMP-13、TIMP-1 及 TIMP-3 的表达。所有免疫组化切片应用 Image-ProPlus 5.1 图像分析系统对所拍照片进行分析,每张切片随机取 5 个视野计算出平均值,作为这张切片的平均灰度值,以灰度值反映阳性表达率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较运用 *t* 检验和单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ELISA 检测 MMP-1、MMP-13、TIMP-1 和 TIMP-3 在不同组髓核中的表达 MMP-1、MMP-13、TIMP-1 和 TIMP-3 在不同组椎间盘中均能检测。TB 组中 MMP-1、MMP-13 水平和 TIMP-3 水平, MMP-1/TIMP-1 和 MMP-13/TIMP-3 比值均高于其他两组, TIMP-1 水平低于另两组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1、2。

表 1 不同组髓核中 MMP-1、TIMP-1 和 MMP-1/TIMP-1 的比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

| 组别 | <i>n</i> | MMP-1 | TIMP-1 | MMP-1/TIMP-1 |
|------|----------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 34 | 4.12 ± 1.05 | 12.45 ± 2.86 | 0.35 ± 0.12 |
| ID 组 | 40 | 13.27 ± 3.51 ^a | 5.84 ± 1.43 ^a | 2.58 ± 0.96 ^a |
| TB 组 | 42 | 22.54 ± 5.62 ^{ab} | 4.29 ± 1.34 ^{ab} | 5.57 ± 1.34 ^{ab} |

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ID 组比较。

表 2 不同组髓核中 MMP-13、TIMP-3 和 MMP-13/TIMP-3 的比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

| 组别 | <i>n</i> | MMP-13 | TIMP-3 | MMP-13/TIMP-3 |
|------|----------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 34 | 5.34 ± 1.68 | 5.58 ± 1.46 | 0.97 ± 0.46 |
| ID 组 | 40 | 14.43 ± 3.05 ^a | 6.39 ± 1.85 ^a | 2.14 ± 1.18 ^a |
| TB 组 | 42 | 21.35 ± 4.27 ^{ab} | 7.23 ± 2.18 ^{ab} | 2.97 ± 1.25 ^{ab} |

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ID 组比较。

表 3 不同组髓核中 MMP-1、TIMP-1 和 MMP-1/TIMP-1 的比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

| 组别 | <i>n</i> | MMP-1 | TIMP-1 | MMP-1/TIMP-1 |
|------|----------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 34 | 4.23 ± 1.16 | 11.74 ± 3.56 | 0.38 ± 0.13 |
| ID 组 | 40 | 13.82 ± 3.28 ^a | 5.25 ± 1.81 ^a | 2.64 ± 0.96 ^a |
| TB 组 | 42 | 22.47 ± 6.47 ^{ab} | 3.12 ± 0.89 ^{ab} | 7.13 ± 2.28 ^{ab} |

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ID 组比较。

2.2 免疫组化检测 MMP-1、MMP-13、TIMP-1 和 TIMP-3 在不同组髓核中的表达 MMP-1、MMP-13、TIMP-1 和 TIMP-3 阳性表达均分布于细胞质,呈黄色或棕黄色颗粒。对照组椎间盘组织中 MMP-1 和 MMP-13 的表达较少, TB 组中 MMP-1、MMP-13 和 TIMP-3 表达, MMP-1/TIMP-1 和 MMP-13/

TIMP-3 比值均高于其他两组, TIMP-1 表达低于另两组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3、4。

表 4 不同组髓核中 MMP-13、TIMP-3 和 MMP-13/TIMP-3 的比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

| 组别 | <i>n</i> | MMP-13 | TIMP-3 | MMP-13/TIMP-3 |
|------|----------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 34 | 23.12 ± 6.27 | 13.56 ± 4.85 | 2.02 ± 0.79 |
| ID 组 | 40 | 66.26 ± 13.54 ^a | 21.83 ± 6.42 ^a | 3.14 ± 1.26 ^a |
| TB 组 | 42 | 86.35 ± 16.18 ^{ab} | 24.15 ± 6.94 ^{ab} | 3.86 ± 1.18 ^{ab} |

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ID 组比较。

3 讨 论

椎间盘破坏是脊柱结核的一个特征性改变。蛋白多糖是稳定椎间盘结构的重要成分,核心蛋白又是人体蛋白多糖的主要功能区。MMPs 是核心蛋白的重要降解酶^[4-5],其高水平表达有利于结核分枝杆菌的组织播散^[6]。TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制物, MMPs 与 TIMPs 两者之间的平衡状态,直接影响了体内细胞基质的降解情况。

MMP-1 主要降解 I、II、III 和 X 型原纤维胶原。TIMP-1 对所有胶原酶的活性均有抑制作用^[7]。研究发现,结核分枝杆菌对 MMP-1 表达具有特异性上调的作用^[8-9]。而新近研究表明,多脏器受累的结节病患者的 MMP-1 基因表达显著增加,空洞性肺结核病患者的 MMP-1 基因表达也呈现明显增加趋势^[10]。梁莉等^[11]发现 MMP-1 高表达是支气管结核狭窄的危险因素,参与了支气管结核的发病。本研究显示 3 组髓核均有 MMP-1 及 TIMP-1 表达, TB 组中有高表达的 MMP-1, 而 TIMP-1 增加甚少, MMP-1/TIMP-1 失调, TIMP-1 不能抑制 MMP-1 对细胞外基质的过度降解,导致 II 型胶原过度降解,细胞外基质中胶原纤维的结构破坏,髓核空洞形成、纤维化,甚至椎间盘破坏、塌陷,对脊髓容易形成压迫,发生瘫痪等严重并发症。

MMP-13 又称胶原酶-3,具有极强的 II 型胶原降解能力。MMP-13 的高表达有利于结核破坏部位的细胞外基质降解,与结核扩散转移及其预后密切相关。动物研究发现椎间盘在负荷状态下发生退变,其组织中 MMP-13 表达也显著增强^[12-13]。国内外研究还发现, MMP-13 显著表达可以有效降解椎间盘髓核的 II 型胶原,从而导致椎间盘髓核细胞外基质的过度降解。González-Avila 等^[14]证实结核分枝杆菌通过增加人肺成纤维细胞中 MMP-1 和 MMP-13 的表达,参与了多种胶原蛋白的合成和降解。本研究发现, TB 组的 MMP-13 表达显著增高,明显高于 ID 组和对照组,而 TIMP-3 虽有增加, MMP-13/TIMP-3 比值进一步扩大, TIMP-3 不能调控 MMP-3 对 II 型胶原的过度降解,可见 MMP-13 同样参与了椎间盘的结核性破坏过程,而且比在椎间盘退行性过程中表达更加强烈,作用更加明显。

MMPs 和 TIMPs 在脊柱结核椎间盘的破坏性过程中发挥了重要的作用,但是脊柱结核的发病机制是一个十分复杂的过程,而 MMPs 和 TIMPs 参与脊柱结核椎间盘破坏的发病机制中的具体作用环节还不明了,需要进一步深入研究。

参考文献

[1] Ramsay A, Steingart KR, Cunningham J, et al. Translating tuberculosis research into global policies: the example of an international collaboration on diagnostics [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2011, 15(10): 1283-1293. (下转第 2930 页)

肿瘤,特别是肾癌进行鉴别,高密度肾囊肿平扫可以是高密度,与肾实质间也可表现为交界面平直或尖端成角,但增强扫描一般不会出现强化^[11]。肾脏恶性肿瘤有许多征象与乏脂肪 RAML 类似^[2,4,10],这也是术前误诊的主要原因,但上述征象同时出现在肾脏恶性肿瘤的概率远远低于乏脂肪 RAML,这有利于鉴别诊断。

本研究一方面仅对 CT 图像进行了分析,而未对其他影像学(超声及磁共振成像)进行对照研究,另一方面病例数量偏少,仍需继续积累病例资料作进一步详尽研究。

总之,乏脂肪 RAML 的 CT 表现在平扫密度、强化方式及与肾实质关系等具有一定特征性,熟悉这些征象有助于与肾恶性肿瘤鉴别,由此可减少误诊发生率而使患者获益。

参考文献

- [1] Davenport MS, Neville AM, Ellis JH, et al. Diagnosis of renal angiomyolipoma with Hounsfield unit thresholds: effect of size of region of interest and nephrographic phase imaging[J]. *Radiology*, 2011, 260(1): 158-165.
- [2] Millet I, Doyon FC, Hoa D, et al. Characterization of small solid renal lesions: can benign and malignant tumors be differentiated with CT? [J]. *Am J Roentgenol*, 2011, 197(4): 887-896.
- [3] Kim JK, Park SY, Shon JH, et al. Angiomyolipoma with minimal fat: differentiation from renal cell carcinoma at biphasic helical CT[J]. *Radiology*, 2004, 230(3): 677-684.
- [4] 康钦钦, 马超, 张火俊, 等. 肾脏乏脂肪血管平滑肌脂肪瘤

与透明细胞癌的高分辨螺旋 CT 特征分析[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2013, 34(10): 732-737.

- [5] 周海生, 张爱伟, 郑汉朋, 等. 肾脏乏脂肪血管平滑肌脂肪瘤的 CT 和 MRI 表现[J]. *医学影像学杂志*, 2014, 24(2): 268-271.
- [6] 卢晓玲, 丁建国, 王培军. 乏脂肪性肾血管平滑肌脂肪瘤的 CT 和 MR 表现[J]. *临床放射学杂志*, 2008, 27(3): 368-371.
- [7] 王海屹, 叶慧义, 袁静, 等. 乏脂肪肾脏血管平滑肌脂肪瘤的 MR 表现[J]. *中华放射学杂志*, 2010, 44(12): 1268-1271.
- [8] Silverman SG, Morteale KJ, Tuncali K, et al. Hyperattenuating renal masses: etiologies, pathogenesis, and imaging evaluation[J]. *Radiographics*, 2007, 27(4): 1131-1143.
- [9] Verma SK, Mitchell DG, Yang R, et al. Exophytic renal masses: angular interface with renal parenchyma for distinguishing benign from malignant lesions at MR imaging [J]. *Radiology*, 2010, 255(2): 501-517.
- [10] 康钦钦, 马超, 张火俊, 等. 肾脏乏脂肪血管平滑肌脂肪瘤与透明细胞癌的高分辨螺旋 CT 特征分析[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2013, 34(10): 732-737.
- [11] Ascenti G, Mazziotti S, Zimbaro G, et al. Omplex cystic renal masses: characterization with contrast-enhanced US [J]. *Radiology*, 2007, 243(1): 158-165.

(收稿日期: 2015-01-11 修回日期: 2015-03-15)

(上接第 2927 页)

- [2] Schirmer P, Renault CA, Holodniy M. Is spinal tuberculosis contagious? [J]. *Int J Infect Dis*, 2010, 14(8): e659-666.
- [3] Jin D, Qu D, Chen J, et al. One-stage anterior interbody autografting and instrumentation in primary surgical management of thoracolumbar spinal tuberculosis [J]. *Eur Spine J*, 2004, 13(2): 114-121.
- [4] Merdad A, Karim S, Schulten HJ, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(3): 1355-1366.
- [5] Bauters D, Van Hul M, Lijnen HR. Gelatinase B (MMP-9) gene silencing does not affect murine preadipocyte differentiation[J]. *Adipocyte*, 2014, 3(1): 50-53.
- [6] Ciurea ME, Cernea D, Georgescu CC, et al. Expression of CXCR4, MMP-13 and β -catenin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2013, 54(4): 939-951.
- [7] Erwin WM, Islam D, Inman RD, et al. Notochordal cells protect nucleus pulposus cells from degradation and apoptosis: implications for the mechanisms of intervertebral disc degeneration[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(6): R215.
- [8] Iizuka S, Ishimaru N, Kudo Y. Matrix metalloproteinases:

the gene expression signatures of head and neck cancer progression[J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(1): 396-415.

- [9] Said AH, Raufman JP, Xie G. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(1): 366-375.
- [10] Huang CD, Lin SM, Chang PJ, et al. Matrix metalloproteinase-1 polymorphism is associated with persistent airway obstruction in asthma in the Taiwanese population [J]. *J Asthma*, 2009, 46(1): 41-46.
- [11] 梁莉, 乐军, 刘丽蓉, 等. MMP-1 基因 1 G/2 G 多态性在支气管结核狭窄中的作用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(11): 2261-2264.
- [12] Omlor GW, Lorenz H, Engelleiter K, et al. Changes in gene expression and protein distribution at different stages of mechanically induced disc degeneration—an in vivo study on the New Zealand white rabbit [J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(3): 385-392.
- [13] MacLean JJ, Roughley PJ, Monsey RD, et al. In vivo intervertebral disc remodeling: kinetics of mRNA expression in response to a single loading event [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(5): 579-588.
- [14] González-Avila G, Sandoval C, Herrera MT, et al. Mycobacterium tuberculosis effects on fibroblast collagen metabolism[J]. *Respiration*, 2009, 77(2): 195-202.

(收稿日期: 2015-01-19 修回日期: 2015-03-25)