

水通道蛋白1和3在腰椎间盘突出退变组织中的表达*

李绍波, 张永涛, 杨开舜

大理学院附属医院骨科, 云南省大理白族自治州
671000李绍波★, 男, 1974年生, 湖北省洪湖市人, 汉族, 2007年四川大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事脊柱外科基础与临床方面的研究。
lishaobo74@126.com通讯作者: 杨开舜, 主任医师, 大理学院附属医院骨科, 云南省大理白族自治州
671000
yangkaishun@vip.sina.com中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344(2012)48-09034-05收稿日期:2012-04-16
修回日期:2012-06-05
(20120116007/M·C)

文章亮点: 水通道蛋白1及水通道蛋白3在腰椎间盘突出退变中有着非常重要的作用,有可能是椎间盘退变的始动因素之一,抑制椎间盘中水通道蛋白1及水通道蛋白3的表达可能为治疗和延缓椎间盘退变提供新的思路和方法。

关键词: 腰椎间盘突出; 退变; 免疫组织化学; 水通道蛋白1; 水通道蛋白3; 医学植入体

摘要

背景: 腰椎间盘突出退变由多种因素引起,水通道蛋白变化规律在腰椎间盘突出退变中的作用研究较少。

目的: 比较正常腰椎间盘组织及退变腰椎间盘组织中水通道蛋白1、水通道蛋白3的表达。

方法: 收集大理学院附属医院骨科手术切除腰椎爆裂骨折患者腰椎间盘组织15份,退变椎间盘组织15份,应用苏木精-伊红染色、免疫组织化学染色方法观察水通道蛋白1、水通道蛋白3的表达,测量平均吸光度值。

结果与结论: 苏木精-伊红染色结果显示对照组椎间盘组织结构清晰,胶原纤维走行清楚,组织轻微水肿无黏液样变,病例组组织结构模糊紊乱,胶原纤维增生粗大、走行紊乱,组织炎性水肿严重、坏死黏液样变。免疫组织化学方法显示病例组水通道蛋白1、水通道蛋白3平均吸光度值明显低于对照组($P < 0.01$),提示水通道蛋白1、水通道蛋白3减少可能是腰椎间盘突出退变因素之一。

Expression of aquaporin 1 and aquaporin 3 in degenerative lumbar intervertebral disc tissue

Li Shao-bo, Zhang Yong-tao, Yang Kai-shun

Abstract

BACKGROUND: Lumbar intervertebral disc degeneration can be induced by many factors, the research on changing regular of aquaporins in the lumbar intervertebral disc degeneration is rarely reported.

OBJECTIVE: To compare the expression of aquaporin 1 and aquaporin 3 in normal lumbar intervertebral disc tissue and degenerative lumbar intervertebral disc tissue.

METHODS: Fifteen cases of normal lumbar intervertebral disc tissue from surgical intervention for lumbar bursting fracture and 15 patients with lumbar intervertebral disc degeneration were collected from the Department of orthopedics, Affiliated Hospital of Dali University. The expressions of aquaporin 1 and aquaporin 3 were tested by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry method, and the mean absorbance values of aquaporin 1 and aquaporin 3 were measured.

RESULTS AND CONCLUSION: Hematoxylin-eosin staining showed the limp structures of lumbar intervertebral disc tissue and collagen fibrins in control group, the lumbar intervertebral disc tissues were mild edema without mucoid degeneration; in the lumbar intervertebral disc degeneration group, the structure of lumbar intervertebral disc tissue was blar and mussy, hyperplastic collagen fibers, serious inflammatory edema and mucoid degeneration could be seen. Immunohistochemical staining showed mean optical density of aquaporin 1 and aquaporin 3 in lumbar intervertebral disc degeneration group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). The decreasing of aquaporin 1 and aquaporin 3 expression may be the reason of lumbar intervertebral disc degeneration.

Li SB, Zhang YT, Yang KS. Expression of aquaporin 1 and aquaporin 3 in degenerative lumbar intervertebral disc tissue. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(48): 9034-9038.

0 引言

腰椎间盘突出引发的腰腿痛在临床十分常见, 每年因腰背痛所致的经济与人力资源的损失巨大。腰椎间盘突出变的原因一直是国内外学者关注的热点, 其机制包括分子生物学因素、遗传学因素、生物力学因素、营养因素等^[1-4]。腰椎间盘突出变的一个特征表现是含水量的减少, 椎间盘髓核的含水量在幼年时高达80%以上, 老年时则为70%, 因此, 可以从这个方面来探讨导致椎间盘退变的原因。

水是维持细胞生理功能的重要组成部分, 水进细胞有两种方式: 一是扩散渗透; 二是通过转运通道, 在水转运过程中同时有营养和代谢物质的转运, 水的跨膜转运对维持细胞正常代谢具有重要作用。随着分子生物学方面的发展, 人们逐渐认识到许多疾病的发生都伴随着水通道蛋白的改变^[5-7]。水通道蛋白1是水的转运通道, 在全身细胞广泛表达, 水通道蛋白3除转运水外还可转运甘油。有研究表明水通道蛋白1和水通道蛋白3可能参与腰椎间盘突出退变^[8-10]。本实验通过测定腰椎间盘突出组织水通道蛋白1和水通道蛋白3的表达变化规律, 探讨其在腰椎间盘突出退变中可能起到的作用。

1 材料和方法

设计: 病例-对照观察。

时间及地点: 实验于2007年6月至2009年12月在大理学院临床医学研究中心完成。

材料: 手术标本均由大理学院附属医院骨科提供。

对照组: 15例腰椎爆裂骨折患者手术切除的腰椎间盘突出组织, 主要为L₁₋₂、L₂₋₃椎间盘, 男11例, 女4例, 平均年龄28.5岁。在MRI片上采用Thompson分级方法^[11]观察腰椎间盘突出程度, 均表现为II级以下退变, 并经组织病理检查证实为正常腰椎间盘突出。

病例组: 15例诊断为腰椎间盘突出症、椎管狭窄症患者手术切除的退变椎间盘组织, 主要为L₄₋₅、L₅-S₁椎间盘, 男9例, 女6例, 平均年龄47.5岁。在MRI片上采用Thompson分级方法^[11]

观察腰椎间盘突出程度, 表现为III级以上退变, 并经组织病理检查证实为退变腰椎间盘突出。

主要试剂: 兔抗人水通道蛋白1及水通道蛋白3单克隆抗体, 购自北京中杉金桥有限公司。

实验方法:

标本处理: 选取椎间盘组织块约1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm, 体积分数为10%甲醛溶液固定24 h, 用流水冲洗后从低浓度到高浓度递增的顺序进行脱水, 从体积分数为30%乙醇开始, 经体积分数为70%, 85%, 95%直至无水乙醇, 每次时间为1 h。先经纯乙醇和透明剂正丁醇各半的混合液浸渍1 h, 再转入纯透明剂正丁醇中浸渍1 h, 用石蜡取代透明剂, 浸蜡后的组织材料块放在装有蜡液的容器中, 做成含有组织块的蜡块, 进行编号, 切片厚5 μm。

苏木精-伊红染色过程: 二甲苯(I)(10 min)→二甲苯(II)(5 min)→无水乙醇洗去二甲苯(1 min×2次)→体积分数为95%乙醇(I)(1 min)→体积分数为90%乙醇(II)(1 min)→体积分数为85%乙醇(1 min)→蒸馏水(2 min)→苏木精染色(1-5 min)→自来水冲洗(2 min)→1%盐酸乙醇分化(20 s)→自来水冲洗(1 min)→稀氨水(1%)反蓝(30 s)→自来水冲洗(1 min)→0.5%伊红液染色(2 min)→自来水洗(30 s)→体积分数为85%乙醇脱水(20 s)→体积分数为90%乙醇脱水(30 s)→体积分数为95%乙醇(I)(1 min)→体积分数为95%乙醇(II)(1 min)→无水乙醇(I)(2 min)→无水乙醇(II)(2 min)→二甲苯(I)(2 min)→二甲苯(II)(2 min)→二甲苯(III)(2 min)→中性树脂封固。

免疫组织化学染色步骤(SP法): 石蜡切片脱蜡至水→蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min→滴加胰酶(1:3稀释), 在37℃的恒温箱中孵育10 min进行抗原修复。PBS冲洗2 min×3次→体积分数为3%H₂O₂室温避光孵育10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性, PBS冲洗2 min×3次→体积分数为5%正常山羊血清封闭, 室温孵育15 min, 倾去血清, 勿洗→分别滴加兔抗人水通道蛋白1(1:400)及水通道蛋白3(1:400)单克隆抗体50 μL, 4℃过夜。阴性对照滴加PBS代替一抗→过夜后在室温放置30 min后, PBS冲洗2 min×3次→滴加生物素标记的抗兔IgG(1:150) 50 μL, 37℃孵育15 min→PBS冲

Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Dali University, Dali Bai Autonomous Prefecture 671000, Yunnan Province, China

Li Shao-bo★, Master, Associate professor, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Dali University, Dali Bai Autonomous Prefecture 671000, Yunnan Province, China
lishaobo74@126.com

Corresponding author: Yang Kai-shun, Chief physician, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Dali University, Dali Bai Autonomous Prefecture 671000, Yunnan Province, China
yangkaishun@vip.sina.com

Received: 2012-01-16
Accepted: 2012-06-05

洗2 min×3次→DAB显色, 在显微镜下掌握显色程度→自来水冲洗15 min→苏木精复染2 min, 盐酸乙醇分化→自来水冲洗10-15 min→脱水、透明、封固、镜检。

平均吸光度测量: 测量免疫组织化学阳性细胞或阳性着色区域面积, 从而将传统的主观测量转化为数字化测量, 用半定量方法分析研究水通道蛋白1及水通道蛋白3在两组标本中表达的差异性。用高清晰显微图像电脑分析系统(北京泰克仪器有限公司VER5.0显微图像分析系统), 保持显微镜相同光强度, 全部用手动设置等条件下, 拍摄×400数码照片, 每张切片随机采取5个视野照片。首先需要测量图片有效测量区域的面积, 再测量这个面积范围内阳性细胞染色的累积吸光度, 两者相除得到平均吸光度。测量照片的最高静态灰度, 再将程序系统的灰度单位转换成吸光度单位, 选定有效测量区域进行测量, 然后计算平均吸光度, 记录数据。

主要观察指标: 常规组织病理观察, 免疫组织化学观察及平均吸光度测量。

统计学分析: 应用SPSS 16.0统计软件, 采用Kolmogorov-Smimov方法对数据进行正态分布检验, 凡符合正态分布的数据, 同时方差齐时采用t检验, 若方差不齐则采用近似t检验; 若不符合正态分布则采用秩和检验。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 光学显微镜下常规切片的观察

对照组: 椎间盘组织结构较清晰, 胶原纤维走行较清楚, 组织轻微水肿无黏液样变, 见图1。

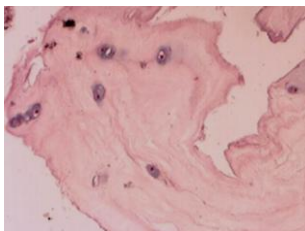


Figure 1 The lumbar intervertebral disc tissue in the control group (Hematoxylin-eosin staining, ×400)
图1 对照组腰椎间盘组织(苏木精-伊红染色, ×400)

病例组: 组织结构模糊紊乱, 胶原纤维增生粗大、走行紊乱, 组织炎性水肿严重、坏死黏液样变。在纤维软骨背景中, 活性软骨细胞数目减少或消失, 纤维粗大致密, 玻璃样变性。在髓核组织内软骨样细胞增多呈小巢状, 纤维增生, 走行紊乱, 黏液样物质增多,

见图2。

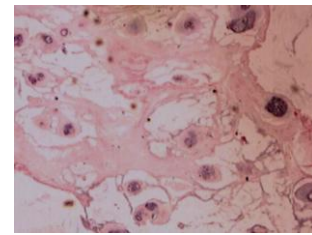


Figure 2 The lumbar intervertebral disc tissue in lumbar intervertebral disc degeneration group (Hematoxylin-eosin staining, ×400)
图2 病例组腰椎间盘组织(苏木精-伊红染色, ×400)

2.2 免疫组化切片的观察 阳性表达为细胞浆染为棕黄色或棕褐色, 阴性表达为细胞浆无黄染。

水通道蛋白1对照组: 免疫组织化学图片显示在腰椎间盘的纤维环、软骨终板、髓核处都有阳性细胞表达, 细胞浆染为棕黄色或棕褐色, 在软骨终板和髓核处较多。外层纤维环中基本没有水通道蛋白1的表达, 见图3。

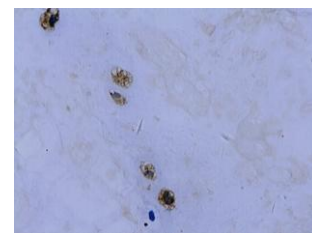


Figure 3 Immunohistochemistry of aquaporin 1 of the lumbar intervertebral disc tissue in the control group (Stneptavidin-perosidase, ×400)
图3 对照组腰椎间盘组织水通道蛋白1免疫组化(SP法, ×400)

水通道蛋白1病例组: 在病例组中免疫组织化学图片显示椎间盘中也有阳性细胞的表达, 但表达颜色比对照组弱, 阳性细胞数目少, 多数细胞无阳性表达, 见图4。



Figure 4 Immunohistochemistry of aquaporin 1 of the lumbar intervertebral disc tissue in lumbar intervertebral disc degeneration group (Stneptavidin-perosidase, ×400)
图4 病例组腰椎间盘组织水通道蛋白1免疫组化(SP法, ×400)

水通道蛋白3对照组: 免疫组织化学图片显示在腰椎

间盘的纤维环、软骨终板、髓核处都有阳性细胞表达, 细胞浆染为棕黄色或棕褐色, 在软骨终板和髓核处较多。在腰椎间盘突出各个区域都有表达, 但髓核处表达更多, 见图5。

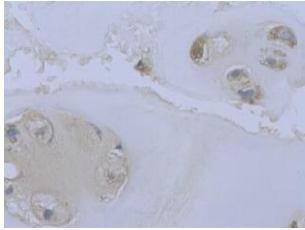


Figure 5 Immunohistochemistry of aquaporin 3 of the lumbar intervertebral disc tissue in the control group (Stneptavidin-perosidase, x400)

图5 对照组腰椎间盘突出组织水通道蛋白3免疫组化(SP法, x400)

水通道蛋白3病例组: 在病例组中免疫组织化学图片显示椎间盘中也有阳性细胞的表达, 但表达颜色比对照组弱, 阳性细胞数目少, 多数细胞无阳性表达, 见图6。

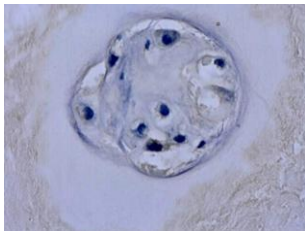


Figure 6 Immunohistochemistry of aquaporin 3 of lumbar intervertebral disc tissue in lumbar intervertebral disc degeneration group (Stneptavidin-perosidase, x400)

图6 病例组腰椎间盘突出组织水通道蛋白3免疫组化(SP法, x400)

2.3 平均吸光度测量 用高清晰显微图像电脑分析系统(北京泰克仪器有限公司VER5.0显微图像分析系统)进行测量后统计分析, 对所得数据进行 t 检验, 两组腰椎间盘突出组织中水通道蛋白1、水通道蛋白3的平均吸光度比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。

表1 病例组和对照组腰椎间盘突出组织中水通道蛋白1、水通道蛋白3的平均吸光度

Table 1 The mean absorbance of aquaporin 1 and aquaporin 3 in lumbar intervertebral disc tissue of control group and lumbar intervertebral disc degeneration group ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Group	Aquaporin 1	Aquaporin 3
Control	0.701±0.424	0.601±0.322
Intervertebral disc degeneration	0.318±0.177 ^a	0.314±0.111 ^a

^a $P < 0.05$, vs. control group

3 讨论

3.1 腰椎间盘突出退变的影响因素及分期 腰椎间盘突出退变的机制尚不明确, 引起退变的因素多种多样, 可能是多种因素共同作用的结果, 有研究者将椎间盘退变的原因归结为: ①椎间盘软骨终板的退变以及髓核纤维化和水化程度的下降, 导致椎间盘细胞营养和存活力的下降。②基质成分的降解和修饰, 致使椎间盘形态和承受负荷能力下降。③机械负荷对椎间盘基质的影响^[12]。

随着影像学的发展, 可根据MRI表现对椎间盘退变程度进行分期。Thompson等^[11]把椎间盘退变分为5级: I级, 髓核呈胶冻状, 纤维环排列整齐, 透明软骨厚度均匀, 椎体边缘规则; II级, 髓核边缘纤维组织增生, 纤维环内出现黏液样蛋白质, 透明软骨厚度不一, 椎体边缘不规则; III级, 髓核纤维化, 纤维环和髓核界线不清楚, 纤维环内蛋白样物质沉积, 透明软骨灶状缺损, 椎体边缘生有骨赘; IV级, 髓核内出现裂隙, 纤维环出现放射状或破裂, 软骨终板灶状钙化, 椎体边缘骨赘大量生长; V级, 髓核和纤维环内出现贯穿整个椎间盘的裂隙, 软骨终板广泛钙化, 椎体骨赘 $> 2 \text{ mm}$ 。Videman等^[13]根据椎间盘含水量的变化将退变分为4级, 临床应用不多。Pfarrmann等^[14]把椎间盘退变分为5级, Griffith等^[15]又对其进行了改良。对于腰椎间盘突出退变的分期到目前仍然没有公认的标准, 因此今后在探索椎间盘退变机制的同时对于椎间盘退变的分级仍然要多大量的工作, 并不断探索改进椎间盘退变的临床治疗方法。

3.2 水通道蛋白与椎间盘退变的关系 自Agre^[16]首先从红细胞中发现水通道蛋白以来, 目前鉴定出200多种水通道蛋白, 在哺乳动物细胞中已发现13种亚型(水通道蛋白0-12)。水通道蛋白在体内广泛分布, 按其功能特异性可分为两类: 一类具有高度选择的水通透性, 即除水之外不转运其他小分子溶质, 如水通道蛋白0、水通道蛋白1、水通道蛋白2、水通道蛋白4、水通道蛋白5、水通道蛋白6、水通道蛋白8; 另一类具有相对选择的水通透性, 水通道蛋白3及水通道蛋白7对尿素和甘油均具有较高的通透性, 而水通道蛋白9仅对尿素有通透性^[17-20]。

本实验可观察到水通道蛋白1及水通道蛋白3在椎间盘软骨细胞上的表达, 推测其与软骨终板的水化程度密切相关, 软骨终板的水化程度高, 其渗透率高, 营养及代谢物转运快。退变椎间盘中水分减少, 营养物质渗透到椎体细胞受阻, 导致细胞营养不足进而影响细胞功能直至细胞死亡, 使水通道蛋白1及水通道蛋白3在椎间

盘中表达减少, 而水通道蛋白的减少又可促使椎间盘含水量减少, 进一步使营养物质弥散受阻, 形成恶性循环。本实验证明对照组椎间盘中水通道蛋白 1 和水通道蛋白 3 的表达水平要高于病例组, 差异有显著性意义。因此可推断水通道蛋白 1 及水通道蛋白 3 的减少可能是腰椎间盘突出退变的重要原因之一。

总之, 不管是何种因素引起椎间盘退变, 其共同特点是含水量减少, 其中水通道蛋白 1 及水通道蛋白 3 在腰椎间盘突出退变中有着非常重要的作用, 有可能是椎间盘退变的始动因素之一, 抑制椎间盘中水通道蛋白 1 及水通道蛋白 3 的表达可能为治疗和延缓椎间盘退变提供新的思路和方法。

4 参考文献

- [1] Song Y, Sham P, Cheung K, et al. Genetics of disc degeneration. *Current Orthopaedics*. 2008;22(2): 259-266.
- [2] Sobajima S, Kim JS, Gilbertson LG, et al. Gene therapy for degenerative disc disease. *Gene Ther*. 2004;11(4):390-401.
- [3] Li SJ, Liang HJ, Ke CQ, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(22):4303-4307.
李松军, 梁寒洁, 柯楚群, 等. 腰椎间盘突出物及髓核炎性因子变化与症状性疼痛的关系[J]. *中国组织工程研究与临床复*, 2008, 12(22):4303-4307.
- [4] Yuan Y, Zhao J, Li YM, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(22):4111-4114.
原野, 赵静, 李永民, 等. 核因子 κ B、基质金属蛋白酶 3 在退变腰椎间盘突出组织中的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(22):4111-4114.
- [5] Nestic O, Lee J, Ye Z, et al. Acute and chronic changes in aquaporin 4 expression after spinal cord injury. *Neuroscience*. 2006;143(3):779-792.
- [6] Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem*. 2004;39(1):1-83.
- [7] Yang B, Ma T, Verkman AS. Erythrocyte water permeability and renal function in double knockout mice lacking aquaporin-1 and aquaporin-3. *J Biol Chem*. 2001;276(1):624-628.
- [8] Cao GY, Yang YY, Jiang Y, et al. *Chongqing Yixue*. 2011; 40(4):359-361.
曹国永, 杨渝勇, 蒋勇, 等. 椎间盘退变过程中软骨终板 AQP3 的表达变化[J]. *重庆医学*, 2011, 40(4):359-361.
- [9] Wang F, Zhu Y. *Zhonghua Linchuang Yishi Zazhi*. 2011;5(6): 1634-1638.
王锋, 朱悦. 影响髓核细胞表达水通道蛋白 1 相关因素的实验研究[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5(6):1634-1638.
- [10] Richardson SM, Knowles R, Marples D, et al. Aquaporin expression in the human intervertebral disc. *J Mol Histol*. 2008;39(3):303-309.
- [11] Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, et al. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1990; 15(5):411-415.
- [12] Li BJ, Guang XM. *Zhongguo Jiaoxing Waikexue*. 2007; 15(5):364-365.
李宝俊, 关晓明. 椎间盘退变的基础研究进展[J]. *中国矫形外科杂志*, 2007, 15(5):364-365.
- [13] Videman T, Nummi P, Battié MC, et al. Digital assessment of MRI for lumbar disc desiccation. A comparison of digital versus subjective assessments and digital intensity profiles versus discogram and macroanatomic findings. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19(2):192-198.
- [14] Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(17):1873-1878.
- [15] Griffith JF, Wang YX, Antonio GE, et al. Modified Pfirrmann grading system for lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(24):E708-712.
- [16] Agre P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004; 43(33): 4278-4290.
- [17] Hedfalk K, Törnroth-Horsefield S, Nyblom M, et al. Aquaporin gating. *Curr Opin Struct Biol*. 2006;16(4):447-456.
- [18] Hibuse T, Maeda N, Nagasawa A, et al. Aquaporins and glycerol metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(8): 1004-1011.
- [19] Hashido M, Ikeguchi M, Kidera A. Comparative simulations of aquaporin family: AQP1, AQPZ, AQP0 and GlpF. *FEBS Lett*. 2005;579(25):5549-5552.
- [20] Magni F, Sarto C, Ticozzi D, et al. Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics*. 2006; 6(20): 5637-5649.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 实验设计为李绍波、杨开舜, 实验实施为李绍波、杨开舜、张永涛, 实验评估为杨开舜, 资料收集为李绍波、张永涛。李绍波成文, 杨开舜审校, 李绍波对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 参与研究的患病个体及其家属同意将其诊疗经过信息用于科学研究, 实验方案经医学伦理委员会批准。

关键信息: 通过免疫组织化学方法研究显示水通道蛋白 1、水通道蛋白 3 在腰椎间盘突出退变病例中降低, 其可能是腰椎间盘突出退变因素之一。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。