

## • 基础研究 •

## MMPs 抑制剂对退变腰椎间盘中 MMP-3 表达的影响

陈德胜<sup>1</sup>, 金群华<sup>1</sup>, 李燕<sup>2</sup>, 杨文君<sup>2</sup>, 昌晓红<sup>3</sup>

[摘要] 目的 探讨基质金属蛋白酶(MMPs)抑制剂对退变腰椎间盘中 MMP-3 的作用。方法 采用大鼠建立腰椎间盘退变动物模型;将 32 只大鼠随机分为实验组和对照组各 16 只。造模 4 周后,实验组动物每日皮下注射四环素 25 mg,对照组注射生理盐水,2 周后取椎间盘组织,采用免疫组织化和 Western blotting 法检测 MMP-3 的表达。结果 实验组大鼠椎间盘组织 MMP-3 表达低于对照组( $P < 0.05$ )。结论 MMPs 抑制剂能降低退变腰椎间盘中 MMP-3 的表达。

[关键词] 腰椎间盘;退变;基质金属蛋白酶;抑制剂

Effect of Metalloproteinases Inhibitor on Expression of MMP-3 in Degenerated Lumbar Intervertebral Disc CHEN De-sheng, JIN Qun-hua, LI Yan, et al. The Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Ningxia Medical College, Yinchuan 750004, Ningxia, China

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of metalloproteinases (MMPs) inhibitor on expression of MMP-3 in degenerated lumbar intervertebral disc. **Methods** The animal model of degenerated lumbar intervertebral disc was established with rats. The 32 rats were randomly divided into the experimental group and control group with 16 animals in each group. From the fourth week after operation, the animals of the experimental group were injected with tetracycline 25 mg per day, those of the control group with saline. Two weeks later, the tissue of degenerated lumbar intervertebral disc was taken and the expression of MMP-3 was tested by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** The expression of MMP-3 in the experimental group decreased and significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** MMPs inhibitor can decrease expression of MMP-3 in degenerated lumbar intervertebral disc.

**Key words:** lumbar intervertebral disc; degeneration; metalloproteinases; inhibitor

[中图分类号] R681.5 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)08-0692-02

[本文著录格式] 陈德胜,金群华,李燕,等. MMPs 抑制剂对退变腰椎间盘中 MMP-3 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(8): 692—693.

下腰痛、腰腿痛及腰椎间盘突出症是临床常见的疾患,其病理基础是椎间盘退变,而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)表达异常则是引起椎间盘退变的重要因素。通过抑制 MMPs 的合成及其活性阻遏椎间盘退变,是一条有意义的途径<sup>[1]</sup>。本实验在建立腰椎间盘退变模型的基础上,采用 MMPs 抑制剂——四环素作用于模型动物,通过免疫组织化学及 Western blotting 方法检测 MMP-3 在椎间盘组织中的表达水平,以初步探讨椎间盘退变形成的机制及 MMPs 抑制剂对退变椎间盘组织 MMP-3 表达的影响。

## 1 材料与方法

1.1 动物与分组 采用雄性 SD 大鼠(体重 375 ~ 450 g,由宁夏医学院实验动物中心提供)制作椎间盘退变动物模型。按随机数字表随机将 32 只大鼠分为对照组和实验组各 16 只。

1.2 主要试剂 四环素购于美国 Sigma 公司;免疫组化试剂盒 SP-9003 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;MMP-3 多克隆抗体购于 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.3 动物模型制备 大鼠称重后,用 6.5%的水合氯醛 0.055 ml/kg 腹腔注射麻醉,取俯卧位,固定四肢,腰背部备皮,消毒铺单,沿腰背部做后正中切口,切开皮肤、皮下,沿骨膜下剥离,咬

骨钳去除棘突、关节突和棘上棘间韧带,切断双侧竖棘肌,依层缝合皮下筋膜、皮肤。术后单独放入笼中饲养。动物模型建立 4 周后,对照组皮下注射生理盐水,实验组每日皮下注射四环素 25 mg,持续 2 周。动物模型建立 8 周后,手术取椎间盘组织,一部分置于中性福尔马林固定,另一部分置于液氮中保存。

1.4 免疫组织化学检测 应用免疫组织化学 SP 法检测椎间盘组织中 MMP-3 的表达,1 抗按 1:50 稀释。设置不加 1 抗的阴性对照。石蜡包埋组织 4  $\mu$ m 连续切片,60℃烘烤过夜,二甲苯脱蜡,不同梯度酒精切片进水,水洗。3%过氧化氢室温下孵育阻断内源性过氧化物酶,0.01 M 枸橼酸钠缓冲液 92℃~100℃抗原热修复;抗原封闭;滴加 1 抗,4℃过夜;滴加 2 抗显色。苏木精复染,二甲苯透明,中性树脂封片。每个标本随机选取不重叠 10 个视野,用 Leica Q500 MC 系统进行图像分析。根据不同染色部位的灰度值自动计算阳性细胞的平均灰度,根据公式:光密度值(OD) = 1g 空白灰度/平均标本灰度,得出平均光密度值(MOD),表示表达强度,同时计算标准差(SD)。

1.5 Western blotting 检测 采用抽提缓冲液提取椎间盘髓核的蛋白,紫外分光光度计进行蛋白定量,保存于-20℃。SDS-PAGE 电泳,蛋白印迹转至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉-TBST (TBS, 0.1% Tween-20)阻断液中孵育 1 h,洗膜后在辣根过氧化物酶标记的抗鼠抗体(1:1500)和抗生物素抗体(1:1000)的双抗阻断液中孵育 1 h,将 PVDF 膜与 10 ml Lumi GLO 作用 1 min,沥干后保鲜包裹,暗室内进行 X 线片曝光、显影、定影处理。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 11.0 统计软件进行两样本均数比较的  $t$  检验。

基金项目:宁夏回族自治区卫生厅科技计划重点项目(w200507)

作者单位:1. 宁夏医学院附属医院骨科,宁夏银川市 750004;2. 宁夏医学院基础学院生物化学与分子生物学教研室,宁夏银川市 750004;3. 北京大学人民医院妇科肿瘤实验室,北京市 100044。作者简介:陈德胜(1972-),男,广东阳江市人,主治医师,硕士研究生,主要研究方向:脊柱外科。

## 2 结果

**2.1 免疫组织化学检测** 阳性染色主要位于椎间盘髓核内组织中的脊索细胞和类软骨细胞的胞浆中(见中插一图 7.1、图 7.2)。实验组大鼠的椎间盘组织 MMP-3 表达为弱阳性, OD 值为  $(0.1201 \pm 0.0238)$ , 对照组表达明显, OD 值为  $(0.1465 \pm 0.0244)$ , 两组间有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 Western blotting 检测** 图像分析结果显示, MMP-3 的相对分子量  $M_r = 5.5 \times 10^4$ , 实验组、对照组的椎间盘髓核组织均有一定程度的 MMP-3 表达, MMP-3 表达平均吸光度值对照组为  $(147.4 \pm 27.2)$ , 实验组为  $(113.1 \pm 75.4)$ , 两组间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 见中插一图 7.3。

## 3 讨论

腰椎间盘突出是椎间盘源性下腰痛的重要原因之一,也是腰椎间盘突出症的病理学基础。对于椎间盘退变的病因、发病机制及如何早期发现并采取积极有效的措施,一直是近年来研究的热点。椎间盘退变的发生不仅有生物力学的机械性作用,炎性介质和细胞因子也参与这一过程<sup>[2,3]</sup>。随着基础研究的深入,细胞因子和炎性介质在椎间盘退变及其继发疾病的发病机制中的作用显得愈加突出,其中 MMPs 起着极为重要的作用。作为 MMPs 抑制剂之一,四环素类药物可以抑制 MMPs 的作用。

MMPs 是一类结构中含有  $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  的蛋白水解酶类,主要参与细胞外基质的代谢,是基质降解酶类中最重要的一种,几乎能降解细胞外基质的所有成分。MMPs 与一系列生理病理过程密切相关<sup>[4]</sup>。大量研究表明,椎间盘退变和 MMPs 的含量与活性密切相关<sup>[5]</sup>。Kaneneto 在实验中发现,免疫组化染色 MMP-3 的阳性率与 MRI 显示的椎间盘退变程度呈明显相关,椎间盘突出组明显高于非突出组,年龄和阳性率及 MRI 显示的退变程度无相关性<sup>[6]</sup>。Nishida 利用 RT-PCR 技术检测发现, MMP-3 mRNA 的表达水平在突出的椎间盘组织中明显高于非突出的椎间盘组织,同时发现 MMP-3 与基质金属蛋白酶-1 组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)之间的不平衡可能与椎间盘退变有关<sup>[7]</sup>。Robert 对 49 例退变突出的椎间盘进行免疫组化染色发现, MMP-1、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 的阳性率分别为 91%、71%、65% 和 72%<sup>[8]</sup>。四环素类抗生素及其衍生物是很有效的 MMPs 抑制剂,能通过多种途径抑制 MMP-1、MMP-3、MMP-13、MMP-2 和 MMP-9 的活性。研究显示,四环素及结构相似的化合物能抑制胶原酶和其他 MMPs 的效应,抑制 MMPs 的基质降解活性<sup>[9]</sup>。近年来有些学者经研究证实, MMPs 抑制剂包括 BB-94 (batimastate)、强力霉素等,而且相应浓度的强力霉素还能使体外培养的单核细胞 MMP mRNA 及蛋白表达降低<sup>[10]</sup>,从而推断强力霉素不仅能直接对抗 MMPs 的作用,而且可以减少单核巨噬细胞 MMPs mRNA 的表达和抑制 MMP 前体翻译后的激活过程。Liu 对腹主动脉瘤组织进行体外培养,加用强力霉素 2.5 ~ 40 mg/ml, 10 d 后发现, MMPs 的表达明显减少,故推测强力霉素能降低 MMPs 对细胞外基质的降解作用,从而起到潜在的治疗作用<sup>[11]</sup>。

本实验结果显示,通过对 SD 大鼠皮下注射 MMP-3 抑制剂——四环素能够防止椎间盘基质的降解,并能治疗实验性腰椎间盘突出。四环素可以抑制椎间盘组织中 MMP-3 的表达表

明,抑制 MMPs 对椎间盘基质的降解是其作用的重要机制。同时也提示, MMPs 在腰椎间盘突出退变的发病过程中起着重要的作用。四环素可以在体内延缓和防止椎间盘退变的形成与发展,这为临床治疗腰椎间盘突出退变提供了一种有效手段。四环素可以通过对 MMPs 的直接抑制作用,或者抑制细胞酶的产生从而阻止椎间盘退变的形成。本研究观察了四环素对 MMP-3 的作用,但不能排除在椎间盘退变的发生、发展过程中,四环素对其他 MMPs 成员的作用可能与对 MMP-3 的作用同样重要。本研究结果显示,四环素抑制实验性腰椎间盘突出退变似乎与椎间盘周围炎症反应无关,应用四环素后腰椎间盘突出退变受到抑制,但是退变的椎间盘会受到各种因子的作用和其他因素的影响,炎症细胞浸润并未明显减轻。这也说明在此过程中,除其他炎症因子的作用,四环素对 MMPs 的抑制起到了关键的作用。

综上所述,四环素通过抑制椎间盘组织中 MMP-3 的表达,降低椎间盘细胞外基质的降解程度,从而延缓和抑制椎间盘的退变。本研究采用四环素及其衍生物治疗腰椎间盘突出退变尚处在实验性初步研究阶段,而四环素抑制 MMP-3 的深入研究及与其他 MMPs 的相互关系有待进一步的研究。

## [参考文献]

- [1] 陈德胜, 金群华. 基质金属蛋白酶及其抑制剂与椎间盘源性下腰痛的关系[J]. 脊柱外科杂志, 2005, 3(2): 121—123.
- [2] Fujita K, Nakagawa T, Hirabayashi K, et al. Neural proteinase in human intervertebral disc: Role in degeneration and probable origin [J]. Spine, 1993, 18(13): 1766—1773.
- [3] Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2 [J]. Spine, 1996, 21(3): 271—277.
- [4] Yanamaka H, Makino K, Takizawa M, et al. Expression and tissue localization of membrane types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in rheumatoid synovium [J]. Lab Invest, 2000, 80(5): 677—687.
- [5] Goupille P, Jayson MI, Valat JP, et al. Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration? [J]. Spine, 1998, 23(14): 1612—1626.
- [6] Kaneinoto M, Hukuda S, Komiya Y, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 human intervertebral disc [J]. Spine, 1996, 21(1): 1—8.
- [7] Nishida T. Kinetics of tissue and serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intervertebral disc degeneration and disc herniation. [J]. Kurume Med J, 1999, 46(1): 39—50.
- [8] Roberts S, Caterson B, Menage J. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of lumbar intervertebral disc [J]. Spine, 2000, 25(23): 3005—3013.
- [9] Acharya MR, Venitz J, Figg WD, et al. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases [J]. Drug Resist Updat, 2004, 7(3): 195—208.
- [10] Curci JA, Mao D, Bohner DG, et al. Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms [J]. J Vasc Surg, 2000, 31(2): 325—342.
- [11] Liu J, Xiong W, Bacar-Regen L, et al. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells [J]. J Vasc Surg, 2003, 38(6): 1376—1383.

(收稿日期: 2006-02-23 修回日期: 2006-05-11)



图5.1 DFU-1集落 ( $\times 100$ )

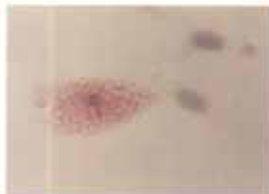


图5.2 诱导生成的脂肪细胞 ( $\times 400$ )



图6.1 实验组大鼠椎间盘免疫组化染色 ( $\times 100$ )

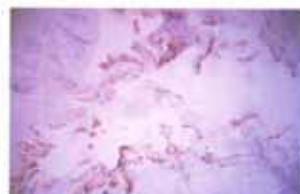


图6.2 对照组大鼠椎间盘免疫组化染色 ( $\times 100$ )

MW:  $9.5 \times 10^4$



对照组 实验组

图6.3 MMP3在椎间盘的表达

