

持续压力对离体培养兔脊柱运动节段终板内 血管内皮生长因子及 β -catenin 的影响

展嘉文^{1,2} 王尚全¹ 朱立国^{1,2△} 冯敏山^{1,2} 韩涛¹ 尹逊路¹

[摘要] 目的:研究持续压力对离体培养兔脊柱运动节段终板内血管内皮生长因子(VEGF)及 β -catenin 表达的影响,进一步探讨 VEGF 与椎间盘退变之间的分子作用机制。方法:将 16 只新西兰白兔处死后在无菌条件下取出脊柱运动节段,随机分为对照组与压力组,均放入离体加载和培养装置中培养,其中压力组予持续 29.4 N 压力,对照组不予压力,于培养前及培养后第 3,7 及 14 天,两组各取 10 个样本,检测椎体终板内血管芽数量,应用免疫组化与 Western blot 检测 VEGF 及 β -catenin 的表达情况。结果:在持续压力条件下椎体终板形态逐渐被破坏,血管芽数量显著下降,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);免疫组化检测,持续压力下培养 1 周后,终板内 VEGF 染色强度显著下降(0.182 ± 0.063),与对照组(0.237 ± 0.051)相比差异有统计学意义($P<0.05$),培养 2 周时染色强度进一步降低(0.156 ± 0.035),差异有统计学意义($P<0.05$);相反,持续压力上调了终板内 β -catenin 的表达,培养期间与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$);Western blot 结果显示,与新鲜标本及对照组比较,持续压力同样引起 VEGF 显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$),却上调了 β -catenin 的表达。结论:持续压力导致离体培养兔脊柱运动节段内椎体终板血管芽数量减少、VEGF 表达下降、 β -catenin 表达上调,提示持续压力可能是通过 Wnt/ β -Catenin 信号通路调节椎体终板内 VEGF 表达。

[关键词] 终板;血管内皮生长因子(VEGF);Wnt/ β -Catenin;持续压力;椎间盘退变

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)06-0001-05

Effect of Continuous Pressure on Vascular Endothelial Growth Factor and β -catenin in Rabbit Intervertebral Disc of Motor Segments Endplate in Vitro Culture

ZHAN Jiawen^{1,2} WANG Shangquan¹ ZHU Ligu^{1,2△}

FENG Minshan^{1,2} HAN Tao¹ YIN Xunlu¹

¹Wangjing Hospital of China Academy of Science of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

²Beijing Key Laboratory of Manipulation Technique, Beijing 100102, China.

Abstract Objective: To study the effect of continuous pressure on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and β -catenin in vertebral endplate, and further explore the molecular mechanism between VEGF and intervertebral disc degeneration. **Methods:** Sixty New Zealand rabbits were sacrificed after removed under sterile conditions in the spinal motion segment, were randomly divided into control group and pressure groups were placed in vitro loading and cul-

ture device for culture. In the pressure group, which were treated with consistence pressure 29.4 N, the control group did not pressure. At the 3rd, 7th, 14th day after culture and pro-culture, 10 samples were collected from each group, and the number of vertebral endplate vascular bud and the expression of VEGF and β -catenin were detected by immunohistochemistry(IHC) and Western blot. **Results:** The morphology of the vertebral endplate was gradually destroyed, and the number of vascular buds decreased significantly under the consistence pressure condition, and there was a statistical difference compared with the controls($P<0.05$). IHC

基金项目:国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设
科研专项课题(JDZX2015274)

北京地区中医骨科康复服务能力与技术平台规范化
建设项目(110019)

国家体育总局中医特色技术在体育运动中的应用
(HXKT2017001)

国家自然科学基金项目(81774330)

¹ 中国中医科学院望京医院(北京,100102)

² 中医正骨技术北京市重点实验室

△通信作者 E-mail:zhlg95@aliyun.com

staining showed that the VEGF staining intensity in the endplate decreased significantly (0.182 ± 0.063) after 1 weeks of culture under pressure. Compared with the control group (0.237 ± 0.051), the staining intensity was significantly different ($P < 0.05$), and the staining intensity was further decreased at 2 weeks (0.156 ± 0.035 , $P < 0.05$). On the contrary, the consistence pressure increased the expression of β -catenin in the endplate, and the difference was significant compared with that of the control group ($P < 0.05$). Western blot results showed that compared with fresh specimen and control group, consistence pressure also caused a significant decrease in VEGF ($P < 0.05$) but increased the expression of β -catenin. **Conclusion:** Continuous pressure leads to a decrease of the vascular bud number, a decrease of VEGF expression and an increase of the expression of β -catenin in the vertebral endplate of spinal motor segment, which suggests that continuous pressure may regulate the expression of VEGF in the vertebral endplate through the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords: vertebral endplate; vascular endothelial growth factor (VEGF); Wnt/ β -catenin; consistence pressure; intervertebral disc degeneration

椎体终板是椎间盘营养供应的重要途径^[1],终板内的血管芽是椎间盘营养物质交换的结构基础,其破坏与椎间盘退变密切相关。终板内的软骨细胞受到多种细胞因子的调节,其中血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)与终板内血管新生及椎间盘退变关系密切^[2,3]。笔者前期研究证实持续压力诱导椎间盘退变的机制与 Wnt/ β -catenin 信号通路有关^[4],而相关文献报道该通路对 VEGFs 也具有调控作用^[5,6]。据此,本研究应用离体培养兔脊柱运动节段压力退变模型,观察持续压力对椎体终板内血管及相关细胞因子的影响,以进一步阐述 VEGF 与椎间盘退变之间的分子作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康新西兰兔 16 只,4~6 月龄,雌雄不限,体质量 2.5~3.0 kg(中国中医科学院实验动物中心提供)。

1.2 主要仪器、试剂

ABI7900HT 实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),NAS-99 分光光度计(美国 ACTGene 公司),BioSens SC 810B 凝胶成像仪(上海山富科学仪器有限公司),BC-subMIDI 电泳仪(北京六一仪器厂),Beckman Allgre 21R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);qPCR 试剂盒(美国 KAPA Biosystems 公司),TRIZOL(美国 invitroge 公司),引物(上海生工生物工程公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 取材及培养 根据随机数字表法将 16 只实验新西兰兔随机分为压力组与空白对照组。新西兰兔麻醉后,耳缘静脉给予肝素钠,5 min 后空气栓塞处死,带入超净工作台;立即在无菌条件下自背部纵切口,自尾部完整取出腰段及下位胸段脊柱,入高渗肝素 PBS 液冲洗;在 2.5 倍放大镜下应用咬骨钳、手术刀片切取 $T_{12} \sim L_1$, $L_2 \sim L_3$, $L_4 \sim L_5$, $L_6 \sim S_1$ 脊柱运动节段(4 节

段),自相邻椎间盘的椎体与骨性终板结合处锐性分离,得到完整脊柱运动节段,包括髓核(NP)、纤维环(AF)、上下软骨终板(EP)及相邻椎体(VB);用带有 18 号针头的无菌注射器吸取含肝素的高渗 PBS 液冲洗标本表面的碎屑及终板上的血凝块,于含肝素的 HBSS 液(含 1 000 U/mL 青霉素,1 mg/mL 链霉素)中漂洗 2 min。

两组样本放入笔者研制的脊柱运动节段离体加载和培养装置中,压力组予 29.4 N 压力,对照组不予负荷。两组均予细胞培养液 DMEM,含有 10% 胎牛血清、25 μ g/mL 抗坏血酸、50 mg/mL 庆大霉素,并用 NaCl 将细胞培养液的渗透压调整到 410 mOsm/kg^[7]。

两组均置于 5% CO_2 , 37 $^{\circ}C$ 恒温培养箱进行整体培养,每 2 d 更换培养液。分别在培养前(0 d)和培养后第 3, 7 及 14 天,取出标本并沿软骨终板表下 2 mm 处分离出椎体终板。

1.3.2 椎体终板血管芽数量检测 各组标本咬除椎体,分离出椎体终板核,常规固定、脱钙、包埋,各个标本连续 8 μ m 切片,苏木精-伊红染色。采用 Weidner 微血管计数方法(Micro Vessel Density, MVD)统计。每张切片先在 100 倍视野下选取血管最丰富的区域,然后在 400 倍视野下计数 3 个视野下的血管数,取其平均值作为 MVD 值。

1.3.3 免疫组织化学检测 椎间盘组织常规石蜡包埋、切片、脱蜡、水化,PBS 冲洗 5 min \times 3 次;热修复法抗原修复;山羊血清封闭 5 min,加入一抗,4 $^{\circ}C$ 过夜;PBS 清洗 5 min \times 3 次;加入二抗,室温孵育 20 min,PBS 清洗 5 min \times 3 次;滴加 DAB 显色,约 3 min,PBS 清洗;苏木精复染 30 s;梯度酒精脱水干燥,中性树脂胶封片后置显微镜下观察 VEGF 及 β -catenin 的表达情况。

1.3.4 Western blot 法检测 收集各时间点椎体终板,加入适量裂解液,样品置于冰上以 30% 振幅超声,工作 3 s 后间歇暂停 2 s,每个样品累积超声约 30 s 左

右,12 000 r/min 离心 15 min 后吸取上层总蛋白溶液。BCA 法测定蛋白浓度,等量分装后以上样缓冲液煮沸变性。SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜,5% BSA 封闭 1 h,相应一抗孵育过夜,TBST 洗膜,二抗孵育 1 h,TBST 洗膜,ECL 试剂检测蛋白表达,计算机图像分析仪测定灰度值。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用单因素方差分析,两组数据之间比较采用 t 检验,时间因素单独效应分析采用重复测量方

差分析双侧检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 椎体终板内血管芽数量

比较新鲜标本椎体终板内血管芽数量,对照组培养第 3 天时无明显减少,差异无统计学意义($P > 0.05$),培养至 1 周血管芽数量密度逐渐下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);在持续压力条件下,终板内血管芽数量第 3 天时显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),3 d 后血管芽数量密度进一步下降,培养期间各时间点与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 不同时间点两组椎体终板内血管芽数量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	培养前	第 3 天	第 7 天	第 14 天	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	10	12.60±1.68	12.10±1.37	11.70±1.92 ¹⁾	8.50±1.43 ¹⁾	20.417	<0.01
压力组	10	12.50±1.55	11.30±1.37 ¹⁾²⁾	9.40±1.50 ¹⁾²⁾	6.20±1.61 ¹⁾²⁾	29.481	<0.01

注:1)与同组培养前比较, $P < 0.05$;2)与对照组同时间点比较, $P < 0.05$ 。

2.2 免疫组化检测椎体终板中 VEGF 与 β -catenin 表达

培养前椎体终板中 VEGF 免疫组化法检测可见细胞外基质呈棕黄色染色,颜色较深,见图 1,持续压力状态下培养第 3 天时较新鲜标本明显下降,差异有

统计学意义($P < 0.05$),但与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),培养 1 周后,染色强度与对照组差异有统计学意义($P < 0.05$),培养 2 周时染色强度进一步降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

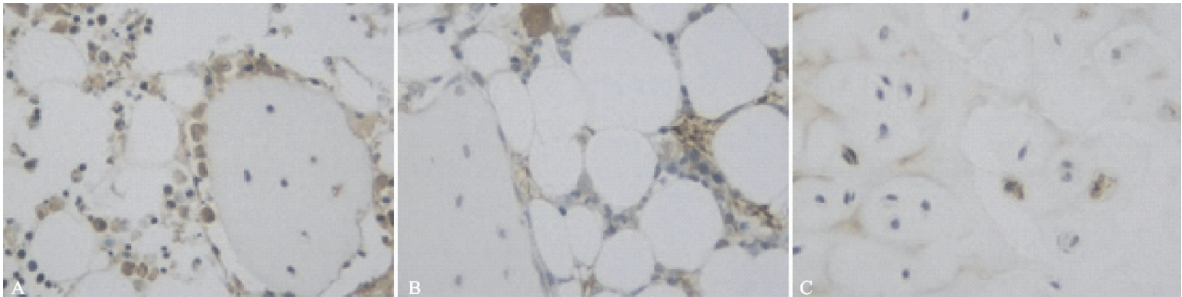


图 1 对照组与压力组椎体终板 VEGF 免疫组化染色(400×)

表 2 不同时间点两组椎体终板内 VEGF 免疫组织化学染色强度值($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	培养前	第 3 天	第 7 天	第 14 天	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	10	0.286±0.090	0.243±0.076 ¹⁾	0.237±0.051 ¹⁾	0.211±0.038 ¹⁾	69.904	<0.01
压力组	10	0.279±0.081	0.223±0.049 ¹⁾	0.182±0.063 ¹⁾²⁾	0.156±0.035 ¹⁾²⁾	80.011	<0.01

注:1)与同组培养前比较 $P < 0.05$;2)与对照组同时间点比 $P < 0.05$ 。

椎体终板组织中 β -catenin 免疫组化法检测,见图 2,新鲜标本可见基质内棕黄色染色较浅,压力组培养 14 d 后基质内染色程度明显加深。与新鲜标本相比,

持续压力上调了终板内 β -catenin 的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$),培养期间与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

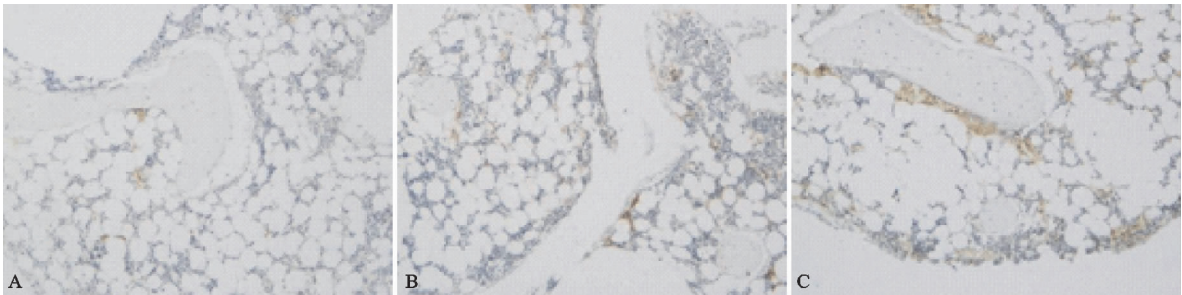


图 2 对照组与压力组椎体终板 β -catenin 免疫组化染色(100×)

表 3 不同时间点两组椎体终板内 β -catenin 免疫组织化学染色强度值($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	培养前	第 3 天	第 7 天	第 14 天	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	10	0.074 ± 0.003	0.096 ± 0.003 ¹⁾	0.087 ± 0.001	0.091 ± 0.008	535.092	<0.01
压力组	10	0.079 ± 0.001	0.125 ± 0.002 ¹⁾²⁾	0.169 ± 0.005 ¹⁾²⁾	0.202 ± 0.005 ¹⁾²⁾	168.711	<0.01

注:1)与同组培养前比较, $P<0.05$;2)与对照组同时间点比, $P<0.05$ 。

2.3 Western blot 检测椎体终板中 VEGF 与 β -catenin 表达

Western blot 结果(见图 3)显示,与新鲜标本及对照组比较,持续压力引起 VEGF 在椎体终板中的蛋白

表达水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。相反,持续压力上调了终板中 β -catenin 的表达,与无压力对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

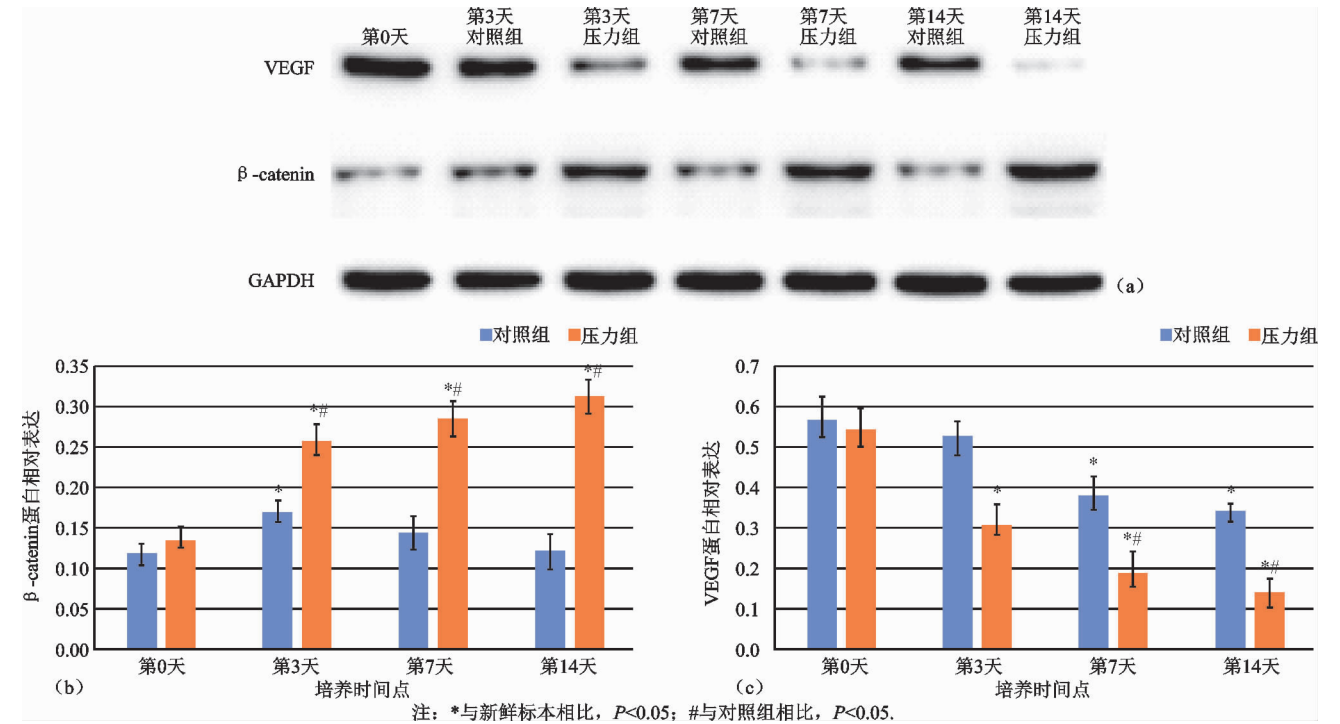


图 3 Western blot 检测椎体终板中 β -catenin 与 VEGF 蛋白表达

3 讨论

椎体终板内的血管芽是椎间盘营养物质交换的结构基础,其破坏将造成椎间盘营养障碍,导致椎间盘退变。而异常应力是终板损伤的重要诱因,相关文献报道持续压力可使终板下血管分布进行减少造成营养障碍^[8,9]。但异常应力导致终板内血管损伤的机制仍缺乏深入研究。

3.1 持续压力负荷对椎体终板内 VEGF 的影响

终板内的软骨细胞受到多种细胞因子的调节,其中血管(VEGF)与终板内血管新生及椎间盘退变关系密切^[10,11]。研究表明在正常关节软骨细胞中存在 VEGF 表达,并且正常椎体终板软骨细胞 VEGF 的表达明显高于退变终板软骨细胞^[12]。软骨细胞是终板中 VEGF 的重要来源细胞,VEGF 的表达上调可促进终板下毛细血管生成,维持终板下血管网的数量,延缓椎体终板退变,从而保证椎间盘的营养供应^[13]。相关实验还证实终板退变过程中 VEGF 和 VEGFR 的表达发生明显的变化,VEGF 分泌的减少导致终板血管芽的维持不足,引起椎间盘退变^[14,15]。

笔者前期研究发现^[16,17],持续的静态加载会逐渐抑制椎间盘的细胞合成代谢活力,破坏椎体终板内营

养通道、造成椎间盘营养供应障碍,进而引发椎间盘退变。在此基础上,本研究从分子作用水平进一步阐述异常应力导致椎间盘营养障碍诱发其退变的发生机制。实验结果表明,持续压力导致离体培养兔脊柱运动节段椎体终板内血管芽数量减少,并且 VEGF 表达减少,两者间存在正相关,这一结果提示 VEGF 参与了椎间盘压力退变过程,其在退变的发病过程中可能起着重要作用。

3.2 持续压力负荷对椎体终板内 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

Wnt 信号通路调控网络在椎间盘的形成、生长、退变和修复的过程中起着十分重要的作用^[18]。相关研究显示 Wnt/ β -catenin 信号过度激活,将引起严重的椎体软骨终板细胞破坏、纤维环细胞层状结构的紊乱和髓核细胞蛋白多糖的减少,从而引起椎间盘结构的变形^[19]。终板软骨细胞对 Wnt 信号通路非常敏感,并可引起不可逆的退变。但同时也有研究发现抑制 Wnt 信号通路会导致软骨终板和类软骨细胞发生不同程度的生长性损伤,Wnt/ β -catenin 信号通路的适度活化对上述椎间盘组织的生长发育以及功能起着不可或缺的作用。正确地控制 Wnt 通路对于建立椎间

盘组织和促进椎间盘组织的生长有重要的意义^[20,21]。

笔者前期研究发现适量的压力负荷短期内刺激了椎间盘表达分泌 II 型胶原,且有利于防止组织膨胀和保持细胞活性,但持续的静态加载会逐渐抑制细胞的合成代谢活力,尤其对蛋白多糖的影响较为明显,从而造成了椎间盘退变^[22,23],而初步试验结果显示持续压力诱导退变的机制与 Wnt/ β -catenin 信号通路密切相关。本研究重点观察了持续压力对终板内 Wnt/ β -catenin 信号通路中关键蛋白 β -catenin 的影响,结果显示持续压力上调了 β -catenin 的表达,而且随着压力状态下培养周期的延长其表达更加明显。

3.3 Wnt/ β -Catenin 信号通路与 VEGF

研究证实通过 Wnt/ β -catenin 经典途径能够促进血管内皮细胞的增殖、血管芽生与血管丛重塑以促进组织的修复与愈合^[24,25]。当 Wnt 信号通路被激活后,糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)蛋白的活性受到抑制,从而抑制了 β -catenin 的降解,使其在细胞质中大量聚集,并与转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)家族结合,转移至细胞核内,激活下游靶基因 VEGF 转录。大量研究证实 β -catenin 和 VEGF 具有明显的相关性^[25-27]。

本研究结果显示在持续压力状态下,随着离体培养时间延长,模型椎体终板内血管芽与 VEGF 表达逐渐下降,而 β -catenin 持续上调。基于此研究结果及文献报道,我们推测在椎体终板组织中 Wnt/ β -Catenin 通路对 VEGF 及血管生成具有调控作用,且压力负荷通过该途径影响终板内营养供应功能导致椎间盘退变。笔者下一步将深入研究椎体终板组织中 Wnt/ β -Catenin 信号通路对 VEGF 的具体调控机制,为相关发病及防治研究提供基础。

参考文献

- [1] 曹旺烽,陈长贤.椎间盘软骨终板退变的研究进展[J].中国中医骨伤科杂志,2016,24(10):70-74.
- [2] 冯璐,狄国虎,周庆军.血管内皮生长因子及其受体家族在角膜组织及角膜病变中的作用和研究进展[J].中国组织工程研究,2016,20(11):1644-1650.
- [3] 唐乾利,郭满,吴标良.血管内皮生长因子的研究现状与进展[J].中国烧伤创疡杂志,2017,29(2):77-87.
- [4] 朱立国,张平,宋庆慧,等.补肾活血方对沙鼠增龄过程中腰椎软骨终板钙化干预作用的初步研究[J].中国骨伤,2017,30(10):926-932.
- [5] 刘宣,王炎,李丹光,等.丹参酮 II A 对 COX-2 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路介导的人肠癌细胞 VEGF 表达的调控作用[J].中华中医药杂志,2013,28(1):108-112.
- [6] Han D,Cao C,Su Y,et al. Ginkgo biloba exocarp extracts inhibits angiogenesis and its effects on Wnt/ β -catenin-VEGF signaling pathway in Lewis lung cancer[J]. Journal of Ethnopharmacology,2016,192:406-412.
- [7] Risbud MV,Izzo MW,Adams CS,et al. An organ culture system for the study of the nucleus pulposus:description of the system and evaluation of the cells[J]. Spine(Phila Pa 1976),2003,28(24):2652-2658.

- [8] 芮泽,张宁,胡志毅,等.持续性压力促进成骨细胞分泌 VEGF 的机制[J].南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(7):1002-1006.
- [9] 孙旗,柳根哲,贾育松,等.不同静水压对兔椎体终板软骨细胞相关基因表达的影响[J].中国矫形外科杂志,2014,22(8):753-757.
- [10] 张小海,徐宏光,吴天亮.椎间盘退变与生物力学[J].国际骨科学杂志,2010,31(3):137-138.
- [11] 彭宝淦,贾连顺,施杞,等.软骨终板钙化在椎间盘退变过程中的作用机理[J].中国矫形外科杂志,2000,7(2):40-43.
- [12] 王弘,陈学武,徐宏光,等.颈椎病终板软骨组织中血管内皮生长因子和缺氧诱导因子-1 α 表达的相关性[J].实用医学杂志,2008,24(16):2745-2747.
- [13] 沈颖.血管内皮生长因子(VEGF)在血管外膜成纤维细胞的表达研究[J].当代医学,2012,18(24):24-26.
- [14] 王弘,陈学武,徐宏光,等.血管内皮生长因子及其受体在颈椎椎体软骨终板中的表达变化[J].实用医学杂志,2008,24(8):1336-1338.
- [15] 王拥军,施杞,周重建,等.益气化瘀方对大鼠颈椎间盘软骨终板内血管的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2002,10(4):3-6.
- [16] Zhu LG,Feng MS,Zhan JW,et al. Effect of static load on the nucleus pulposus of rabbit intervertebral disc motion segment in ex vivo organ culture [J]. Chinese medical journal,2016,129(19):2338-2346.
- [17] Zhan JW,Feng MS,Zhu LG,et al. Effect of static load on the nucleus pulposus of rabbit intervertebral disc motion segment in an organ Culture[J]. BioMed Research International,2016:2481712.
- [18] 梁广胜,殷明,刘玉亮,等.Wnt 信号通路与椎间盘的发展[J].中国矫形外科杂志,2014,22(5):441-444.
- [19] 任东成,丁金勇.终板软骨细胞退变相关信号通路的研究进展[J].中国脊柱脊髓杂志,2017,27(7):657-662.
- [20] 陈志刚,吕书军,张建平,等. β 连环素在腰椎间盘退变组织中的表达及意义[J].江苏医药,2015,41(4):408-410.
- [21] 廖军,谢巧瑜,张乐,等.电针对颈椎模型大鼠椎间盘纤维环细胞 Wnt- β -catenin 信号通路的影响[J].中国针灸,2014,35(12):1203-1207.
- [22] 冯敏山,展嘉文,朱立国,等.体外培养条件下兔脊柱运动节段髓核组织的变化[J].中国组织工程研究,2015,9(51):8241-8246.
- [23] 朱立国,展嘉文,冯敏山,等.兔椎间盘器官与脊柱运动节段离体培养条件下髓核组织的变化[J].中国骨伤,2015,18(9):824-831.
- [24] Easwaran V,Lee SH,Inge L,et al. β -Catenin Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Colon Cancer[J]. Cancer Research,2003,63(12):3145-3153.
- [25] 程华,孙芳玲,艾厚喜,等.Wnt 信号通路与血管发生研究进展[J].神经药理学报,2011,1(6):60-63.
- [26] 江华基,江小成,贺飞林,等.黄芩素通过 WNT/ β -catenin 信号通路促进大鼠腱骨愈合[J].分子影像学杂志,2016,39(3):297-301.
- [27] 余文珍,陈实,张永亮,等.活血化瘀法对鼠颈动脉粥样硬化损伤血管 wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J].世界中医药,2016,11(3):498-501.