



NO含量和NOS活性在兔软骨终板退变过程中的变化

椎间盘退变常可导致下腰痛、颈腰神经根病、脊髓型颈椎病、腰椎管狭窄等临床综合征,严重影响人们的身心健康。虽然椎间盘退变的病因及病理变化还有许多未明了之处,但有证据显示椎间盘的退变源于软骨终板退变[1][2][3]。一氧化氮(NO)作为一活跃的生物小分子,是由一氧化氮合成酶(NOS)作用于L-精氨酸产生的,它在关节炎形成的过程中起着重要的作用,现已证实,NOS在退变的椎间盘中有表达[4]。但有关其在软骨终板退变中的作用则未见报道。本研究通过对退变的软骨终板进行NO和NOS的检测,探讨其在软骨终板退变中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24只6~8月龄雄性清洁级新西兰白兔,体质量2.5~3.0 kg(南方医院动物实验中心提供)。

1.2 试剂及仪器

NO和NOS检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);722型一分光光度计。

1.3 动物模型及分组

10%水合氯醛20 mg/kg·b.w. 静脉麻醉后,将动物俯卧固定于手术台上,备皮,碘酒、酒精消毒,铺巾。动物均分为实验组和对照组。

实验组动物沿 $L_1\sim L_7$ 棘突做后正中切口,长约10 cm,贴棘突两侧切断椎旁肌,将附着于棘突、椎板及小关节的肌肉全部分离开,暴露棘突、椎板和关节突;然后依次切除 $L_1\sim L_7$ 的棘上、棘间韧带及两侧关节突关节后外1/2,依次缝合各层组织,术后动物在笼中自由活动。实验组分别于术后12、24和36周各随机处死4只动物。

对照组动物切开皮肤后不作肌肉分离及韧带切除,也分别于术后12、24和36周各随机处死4只动物。

1.4 X线摄片观察

各组动物分别于处死前,各随机取3只进行X线摄片,观察软骨终板变化情况。

1.5 NO和NOS检测

实验组和对照组动物处死后,立即在无菌操作下取出 $L_4\sim L_5$ 椎间盘。切开椎间盘,刮除髓核、切除纤维环及软骨终板下骨组织,软骨终板称重。将软骨终板置于24孔培养板内,在37℃,5% CO_2 条件下,用含10%胎牛血清的DMEM培养,72 h后取上清液,按试剂盒说明书操作,用硝酸还原酶将 NO_3^- 还原为 NO_2^- ,根据分光光度计显色深浅决定其浓度的高低,反映软骨终板中NO的水平。NO结果以 $mmol \cdot L^{-1} \cdot mg^{-1}$ 表示。NOS活性以 $U \cdot ml^{-1} \cdot mg^{-1}$ 表示。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS10.0软件包进行统计学分析,样本均数间比较使用方差分析。

2.1 X线摄片观察

从X线摄片可知，术后12周对照组的软骨终板无明显钙化(图1)，而实验组软骨终板钙化较明显(图2)；术后36周 实验组软骨终板钙化明显，密度增高(图3)，而36周对照组的软骨终板虽然也发生钙化，但不如实验组的明显(图4)。



图1术后12周对照组X线摄片

Fig.1 Lumbar X-ray of a rabbit in the control group 12 weeks after operation



图2术后12周实验组X线摄片

Fig.2 Lumbar X-ray of a rabbit in the experiment group 12 weeks after operation

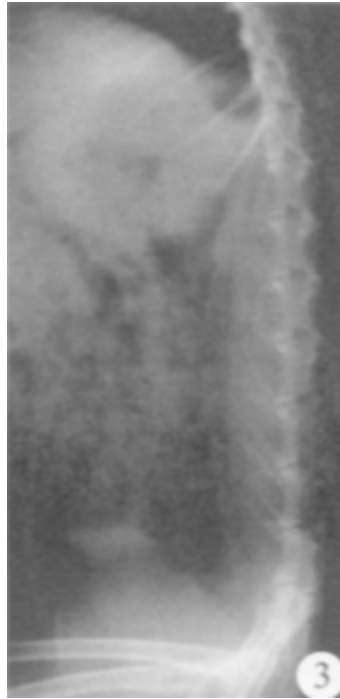


图3术后36周对照组X线摄片

Fig.3 Lumbar X-ray of a rabbit in the control group 36 weeks after operation



图4术后36周实验组X线摄片

Fig.4 Lumbar X-ray of a rabbit in the experiment group 36 weeks after operation

2.2 软骨终板中NO含量的变化

随着时间的延长，实验组与对照组中NO含量均升高，且两组间差异有显著性($P < 0.05$)；对照组组内各时间段的NO含量亦有显著性差异($P < 0.05$)；而实验组中24和36周之间NO含量则无显著性差异($P > 0.05$ ，表1)。

表 1 软骨终板中 NO 含量比较 ($n=4$, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

Tab.1 NO content in the rabbit cartilage endplate after operation ($n=4$, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, *Mean* \pm *SD*)

Group	Time		
	12 weeks post-operation	24 weeks post-operation	36 week post-operation
Control [#]	26.38 \pm 3.97	52.55 \pm 7.91	81.61 \pm 8.94
Experiment [*]	134.14 \pm 15.71	383.44 \pm 21.53 ^Δ	403.09 \pm 23.18 ^{ΔΔ}

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ within the control group;

^Δ $P<0.05$ vs the experiment group 12 weeks post-operation;

^{ΔΔ} $P>0.05$ vs the experiment group 24 weeks post-operation

2.3 软骨终板中NOS活性的变化

实验组与对照组中NOS活性随着时间的延长而升高，两组间差异有显著性($P<0.05$)；对照组组内各时间段的NOS活性亦有显著性差异($P<0.05$)；而实验组中24和36周之间NOS活性则无显著性差异($P>0.05$ ，表2)。

表 2 软骨终板中 NOS 活性比较 ($n=4$, $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

Tab.2 NOS activity in the rabbit cartilage endplate after operation ($n=4$, $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, *Mean* \pm *SD*)

Group	Time		
	12 weeks post-operation	24 weeks post-operation	36 week post-operation
Control [#]	0.79 \pm 0.15	1.10 \pm 0.14	1.40 \pm 0.15
Experiment [*]	1.36 \pm 0.17	2.22 \pm 0.21 ^Δ	2.36 \pm 0.24 ^{ΔΔ}

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ within control group; ^Δ $P<0.05$ vs

the experiment group 12 weeks post-operation; ^{ΔΔ} $P>0.05$ vs the

experiment group 24 weeks post-operation

3 讨论

腰椎间盘突出性变为引起腰腿痛的主要原因目前仍不清楚 [5]，只有在全面了解了椎间盘退变机制的基础上，才可能进一步研究延缓甚或阻止其退变的方法。目前，许多学者认为椎间盘退变是多种环境因素共同作用的结果，其发病机制大致可归结于软骨终板的退变，营养供应减少，细胞老化，椎间盘内部降解酶活性的升高，以及基质疲劳衰竭等，而上述机理中最重要的是椎间盘软骨终板的退变[6]。这是因为椎间盘的生物化学构成成分包括水、胶原、蛋白多糖等，它们是椎间盘发挥生理机能的物质基础，而软骨终板是供应椎间盘营养的主要通道，因此如果软骨终板发生退变，造成椎间盘营养供应的障碍，则可使其生化成分发生变化，从而导致椎间盘退变。

人类椎体终板与鼠、兔等爬行动物的主要区别是人类椎体没有骨骺。但动物与人类的椎体生长发育过程是基本相似的，即都是通过椎体骺软骨不断钙化和骨化来增加椎体的高度[7]。从这一点来看，爬行动物与直立动物椎体的应力传导结构和方向是基本相同的。因此，对爬行动物的实验研究，其结果是有一定比较意义的

[8]。

椎骨、椎间盘和脊柱韧带维持椎间关节稳定和平衡的作用为静力平衡，而脊柱周围肌肉、肌腱及内压维护椎间关节稳定和平衡的作用为动力平衡。本实验即通过改变稳定脊柱的动、静力平衡，造成椎间失稳，从而引发软骨终板退变。结果中X线片示，随着时间的增长，实验组的软骨终板钙化程度逐渐加重，且与对照组相比较钙化明显。因此，可以认为，本实验所采用的造模方法可造成软骨终板退变。

NO是带有不配对电子的小分子自由基。它的结构简单，性质活泼，极易扩散通过生物膜的特性，这使得NO在体内成为极为重要的生物信使分子[9]。NOS是合成NO的限速酶，是调节NO的最重要成分。因此，本文通过对NO的稳定代谢产物亚硝酸盐及总NOS活性的测定，研究它们在软骨终板退变中的作用。

本实验研究表明，随着时间的增加，实验组与对照组的NO含量和NOS活性均增加；12、24和36周实验组与对照组间的NO含量和NOS活性均有显著性差异($P < 0.05$)，各组组间差异显著($P < 0.05$)。但24周和36周实验组间无显著性差异($P > 0.05$)，提示24周后实验组NO含量和NOS活性将不再增加或增加不大。由于本实验未对36周以后实验组继续进行观察，因此，此后的NO含量和NOS活性的变化趋势有待于进一步研究。通过以上结果可知，NO在软骨终板退变过程中发挥着重要促进作用。

软骨终板为透明软骨，其基质主要由II型胶原和蛋白多糖(PG)组成，而由基质所维持的正常分解和合成代谢对于其生物学功能至关重要[10]。推测NO作为一种信号分子，可能通过调节基质代谢而在软骨退变中发挥作用。它主要通过抑制 SO_4^{2-} 结合到氨基葡聚糖(GAG)上，影响新生成的GAG硫酸化，并且阻断Fn和粘蛋白 $\alpha_5\beta_1$ 结合引起的信息传递，干扰软骨细胞、基质间信息传递，降低软骨细胞中的某些生长因子，从而抑制蛋白多糖的合成；通过抑制II型胶原的合成及软骨细胞增殖，激活金属蛋白酶和环氧合酶，促进胶原降解并使前列腺素 E_2 上升，从而造成对软骨的破坏。

从本实验可知，NO在软骨终板退变中起着重要作用，因此如何通过调控退变软骨终板中NO的含量来达到预防和延缓椎间盘退变，是摆在我们面前的新课题。已有报道表明NOS或NO的抑制因子明显地改变动物关节炎模型中关节的损伤程度和关节炎病程，抑制炎症及组织损害。这提示我们可用特异性抑制NOS或NO的药物阻止或延缓腰椎软骨终板的退变过程，从而为临床上预防和治疗椎间盘退行性疾病开辟一条新的途径。

参考文献：

- [1] 彭宝淦，贾连顺，施 杞，等. 软骨终板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)：147-50.
- Peng BG, Jia LS, Shi Q, et al. Study on the mechanism of cartilage end-plate calcification on disc degeneration[J]. Orthop J chin, 2000, 7(2): 147-50.
- [2] Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs[J]. Spine, 1997, 22(24): 2781-95.
- [3] Peng BG, Hou SX, Shi Q, et al. The relationship between cartilage end plate calcification and disc degeneration: an experimental study[J]. Chin Med J, 2001, 114: 308-12.
- [4] Furusawa N, Baba H, Miyoshi N, et al. Herniation of cervical intervertebral disc: immunohistochemical examination and measurement of nitric oxide production[J]. Spine, 2001, 26(10): 1110-6.
- [5] Borenstein DG. Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain[J]. Curr Opin Rheumatol, 2001, 13(2): 128-34.
- [6] Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E_2 [J]. Spine, 1995, 20(22): 2373-8.
- [7] Revel M, Andre Deshays C, Roudier R, et al. Effects of repetitives train on vertebral endplates in young rats[J]. Clin Orthop, 1992, (279): 303-9.
- [8] 彭宝淦，施 纪，沈培芝，等. 软骨终板钙化与椎间盘退变关系的实验研究[J]. 中华外科杂志，1999，37(10)：613-6.

Peng BG, Shi Q, Shen PZ, et al. The relationship between cartilage end-plate calcification and disc degeneration: an experimental study[J]. Chin J Surg, 1999, 37(10): 613-6.

[9] 张新宇, 靳安民, 史占军, 等. 一氧化氮对骨肉瘤细胞体外跨膜侵袭能力的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 134-6.

Zhang XY, Jin AM, Shi ZJ, et al. Effect of nitric oxide on the invasive ability of human osteosarcoma through a filter membrane: an in vitro study[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(2): 134-6.

[10] 王吉兴, 姚 军. SV40LTA基因永生化软骨细胞体外培养的生物学特性[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(12): 1338-40.

Wang JX, Yao J. Observation of the biological behavior of in vitro cultured immortalized chondrocytes induced by SV40LTA gene transfection[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(12): 1338-40.

参考文献:

[1] 彭宝淦, 贾连顺, 施 杞, 等. 软骨终板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): 147-50.

Peng BG, Jia LS, Shi Q, et al. Study on the mechanism of cartilage end-plate calcification on disc degeneration[J]. Orthop J chin, 2000, 7(2): 147-50.

[2] Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs[J]. Spine, 1997, 22(24): 2781-95.

[3] Peng BG, Hou SX, Shi Q, et al. The relationship between cartilage end plate calcification and disc degeneration: an experimental study[J]. Chin Med J, 2001, 114: 308-12.

[4] Furusawa N, Baba H, Miyoshi N, et al. Herniation of cervical intervertebral disc: immunohistochemical examination and measurement of nitric oxide production[J]. Spine, 2001, 26(10): 1110-6.

[5] Borenstein DG. Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain[J]. Curr Opin Rheumatol, 2001, 13(2): 128-34.

[6] Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2[J]. Spine, 1995, 20(22): 2373-8.

[7] Revel M, Andre Deshays C, Roudier R, et al. Effects of repetitives train on vertebral endplates in young rats[J]. Clin Orthop, 1992, (279): 303-9.

[8] 彭宝淦, 施 纪, 沈培芝, 等. 软骨终板钙化与椎间盘退变关系的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1999, 37(10): 613-6.

Peng BG, Shi Q, Shen PZ, et al. The relationship between cartilage end-plate calcification and disc degeneration: an experimental study[J]. Chin J Surg, 1999, 37(10): 613-6.

[9] 张新宇, 靳安民, 史占军, 等. 一氧化氮对骨肉瘤细胞体外跨膜侵袭能力的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 134-6.

Zhang XY, Jin AM, Shi ZJ, et al. Effect of nitric oxide on the invasive ability of human osteosarcoma through a filter membrane: an in vitro study[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(2): 134-6.

[10] 王吉兴, 姚 军. SV40LTA_g基因永生化软骨细胞体外培养的生物学特性[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(12): 1338-40.

Wang JX, Yao J. Observation of the biological behavior of in vitro cultured immortalized chondrocytes induced by SV40LTA_g gene transfection[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(12): 1338-40.

[回结果列表](#)