

肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-1 β 在脊髓型颈椎病中的表达及相关性研究

仇大鹏¹, 朱勋兵¹, 李微微², 袁伶俐¹, 陈笑天³

[摘要] **目的:**探讨人类颈椎间盘组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的表达及其与脊髓型颈椎病 (CSM) 的相关性。 **方法:**提取颈椎前路减压手术治疗的 25 例病人的颈椎间盘髓核组织, 其中 CSM 17 例 (CSM 组), 颈椎骨折或骨折合并脱位 8 例 (NC 组)。观察颈椎间盘髓核组织结构的改变, 检测颈椎间盘髓核组织中 TNF- α 、IL-1 β 的水平及 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的表达水平。 **结果:**2 组年龄差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 性别和颈椎位置差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 NC 组比较, CSM 组颈椎间盘髓核组织中胶原纤维排列紊乱; 颈椎间盘髓核组织中 TNF- α 和 IL-1 β 含量明显升高 ($P < 0.01$), 且 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。 **结论:**颈椎病病人的椎间盘中 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平升高, 与 CSM 的发生及发展存在相关性。

[关键词] 脊髓型颈椎病; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1 β

[中图分类号] R 681.53; R 392.12

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.07.001

Study on the expression of TNF- α and IL-1 β in cervical spondylotic myelopathy and the relationship of cervical spondylotic myelopathy

QIU Da-peng¹, ZHU Xun-bing¹, LI Hui-hui², Yuan Ling-li¹, CHEN Xiao-tian³

(1. Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233040,

2. Department of Histology and Embryology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030,

3. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) in human nucleus pulposus tissue of cervical intervertebral disc, and the relationship of cervical spondylotic myelopathy (CSM). **Methods:** Nucleus pulposus tissues of cervical intervertebral discs were obtained from 25 cases of patients treated with anterior cervical decompression, 17 cases of CSM (CSM group) and 8 cases of cervical spine fracture or fracture-dislocation patients (NC group). Morphological changes of nucleus pulposus tissue were observed, the levels of TNF- α , IL-1 β , TNF- α mRNA and IL-1 β mRNA in nucleus pulposus tissue were measured. **Results:** There was statistically significant difference in age between the 2 groups ($P < 0.05$), but no statistically significant difference in gender and cervical position ($P > 0.05$). Compared with NC group, collagen fibers in nucleus pulposus tissue of cervical disc were disordered, the levels of TNF- α and IL-1 β in nucleus pulposus tissue of cervical disc were increased significantly ($P < 0.01$), and the expressions of TNF- α mRNA and IL-1 β mRNA were increased significantly in CSM group ($P < 0.01$). **Conclusions:** The levels of TNF- α and IL-1 β were increased significantly cervical intervertebral disk of patients with cervical spondylotic myelopathy, which may be associated with the occurrence and development of CSM.

[Key words] cervical spondylotic myelopathy; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β

脊髓型颈椎病 (cervical spondylotic myelopathy, CSM) 是一种慢性的退行性疾病^[1], 也是目前世界公认的导致中老年人脊髓功能障碍的主要原因, 特

征性的病理生理反应为慢性脊髓压迫所导致的慢性炎症、细胞凋亡和微血管功能不全等^[2-3]。CSM 的治疗方式分为手术治疗与非手术治疗两种。颈椎前路减压手术对具备手术适应证的 CSM 病人的治疗是安全和有效的^[4], 针对无手术适应证的病人, 应用药物来进行治疗是非手术治疗的一个重要方面。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 是在炎症反应中起到重要作用的炎症因子, 随着近年来研究的深入, TNF- α 和 IL-1 β 在 CSM 的发生与发展中所起到的作用受到了大家的重视。本实验通过研究

[收稿日期] 2018-01-24 [修回日期] 2018-05-16

[基金项目] 安徽省自然科学研究项目 (1408085MH207); 安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (KJ2017A235); 安徽省教育厅自然科学研究项目 (KJ2015B013by); 蚌埠医学院自然科学研究项目 (Byky1257)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第二附属医院 骨科, 安徽 蚌埠 233040; 2. 蚌埠医学院 组织学与胚胎学教研室, 安徽 蚌埠 233030; 3. 蚌埠医学院第一附属医院 骨科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 仇大鹏 (1980-), 男, 硕士, 主治医师。

CSM 病人及无 CSM 病史的颈椎外伤病人的颈椎间盘髓核组织,测定 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,探讨两种炎症因子与颈椎间盘退变的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用的颈椎间盘髓核组织取自 2012 年 5 月至 2015 年 2 月在蚌埠医学院第二附属医院及第一附属医院骨科的 25 例颈椎手术病人。其中 CSM 17 例,男 13 例,女 4 例,年龄 45 ~ 66 岁,颈 3 ~ 4 椎间盘 2 例,颈 4 ~ 5 椎间盘 3 例,颈 5 ~ 6 椎间盘 7 例,颈 6 ~ 7 椎间盘 5 例。无颈椎病病史的外伤性颈椎骨折或骨折合并脱位手术病人 8 例 (NC 组),男 5 例,女 3 例,年龄 35 ~ 53 岁,颈 3 ~ 4 椎间盘 2 例,颈 4 ~ 5 椎间盘 2 例,颈 5 ~ 6 椎间盘 4 例。2 组病人均通过相同颈椎前路减压手术取得髓核组织 (见图 1、2)。手术中取出髓核组织,用 0.9% 氯化钠溶液冲洗至无肉眼可见血液污染后,一部分置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,后期进行石蜡切片的制作;其余标本置于冰盒中,4 h 内送至实验室,放入 -80 °C 的冰箱中保存,待标本集齐后,统一进行酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 TNF- α 和 IL-1 β 的水平,逆转录-聚合酶链方法 (reverse transcription polymerase chain method, RT-PCR) 检测 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的表达。



图1 磁共振检查
A: NC组(箭头示颈椎骨折脱位处); B: CSM组(箭头示颈椎受压处)

图1 磁共振检查

ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒购自 MBI Fermentas 公司; TNF- α 、IL-1 β 、 β -actin 引物均由上海生工生物工程公司合成,引物序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 颈椎间盘髓核组织的苏木精-伊红染色 (hematoxylin and eosin staining, HE) 对固定后的

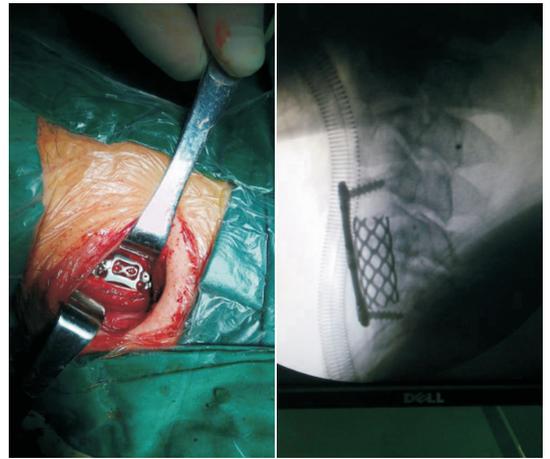


图2 颈椎前路减压手术

表 1 相关基因序列

基因	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
TNF- α	Sense: 5'- CGA GTC TGG GCA GGT CTA -3'	196
	Antisense: 5'- GTG GTG GTC TTG TTG CTT AA -3'	
IL-1 β	Sense: 5'- AAC TCC CTC ACT CTT TCT CAG G -3'	164
	Antisense: 5'- GGA CCA GAC ATC ACC AAG C -3'	
β -actin	Sense: 5'- GAG CTA CGA GCT GCC TGA CG -3'	416
	Antisense: 5'- CCT AGA AGC ATT TGC GGT GG -3'	

髓核组织,进行石蜡包埋,切成 5 μ m 薄片,HE 染色后置于普通光学显微镜下观察。

1.2.2 ELISA 检测颈椎间盘髓核组织中 TNF- α 和 IL-1 β 水平 取 -80 °C 冰箱保存的髓核标本,研磨制成匀浆,加入磷酸盐缓冲溶液至 5 mL,台式离心机 4 °C, 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。按 ELISA 试剂盒说明书所示步骤检测 TNF- α 和 IL-1 β 的水平。

1.2.3 RT-PCR 检测颈椎间盘髓核组织中 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达水平 采用 Trizol 提取髓核组织总 RNA,反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增条件:95 °C 预变性 3 min 后,以 (1) 95 °C 50 s 变性, (2) β -actin 退火温度 59.8 °C 50 s; TNF- α 退火温度 56.8 °C 50 s; IL-1 β 退火温度 59.0 °C 50 s, (3) 72 °C 60 s,反应 30 个循环,最后一轮延伸 10 min。将 PCR 扩增产物与溴酚兰混匀,15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭显色。在 GIS 凝胶处理系统对凝胶图像拍摄记录,并使用图像分析软件扫描凝胶中每一扩增条带吸光度做半定量分析,以目的基因与内参对照的吸光度比值 (TNF- α / β -actin, IL-1 β / β -actin) 表示 mRNA 相对表达量。

1.3 统计学方法 采用 t 检验和 χ^2 检验。

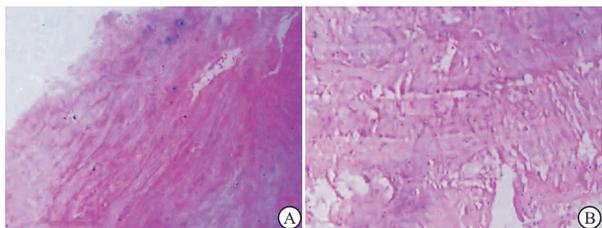
2 结果

2.1 2 组病人一般情况比较 2 组年龄差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而性别和颈椎位置差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2)。

表 2 2 组间年龄、性别、颈椎位置的比较

分组	n	年龄/岁	性别		颈椎位置			
			男	女	颈3-4	颈4-5	颈5-6	颈6-7
NC 组	8	45.25 ± 5.06	5	3	2	2	4	—
CSM 组	17	52.76 ± 7.67	13	4	2	3	7	5
t	—	2.50	1.05		1.65			
P	—	<0.05	>0.05		>0.05			

2.2 颈椎间盘髓核组织结构的改变 显微镜下观察, CSM 组胶原纤维排列紊乱, NC 组胶原纤维排列整齐, 呈网状结构, 胶原纤维间均混杂有少数体积较大的软骨细胞, 软骨细胞位于软骨陷窝中, 还可见多数体积较小的髓核细胞 (见图 3)。



A: NC组; B: CSM组

图3 颈椎间盘髓核组织HE染色

2.3 颈椎间盘髓核组织中 TNF- α 和 IL-1 β 的水平及 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的表达水平 与 NC 组比较, CSM 组的 TNF- α 、IL-1 β 水平及 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的表达水平明显升高 ($P < 0.01$) (见表 3 及图 4、5)。

表 3 2 组颈椎间盘髓核组织中 TNF- α 、IL-1 β 的水平及 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	TNF- α /(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)	TNF- α / β -actin	IL-1 β / β -actin
NC 组	8	5.89 ± 1.29	6.86 ± 1.50	0.10 ± 0.03	0.12 ± 0.04
CSM 组	17	21.35 ± 2.32	17.98 ± 1.36	0.43 ± 0.08	0.36 ± 0.06
t	—	17.52	18.52	10.70	10.29
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

本实验的研究对象均为随机选取一特定时间段内两所医院骨科的住院手术病人, 2 组年龄有差异,

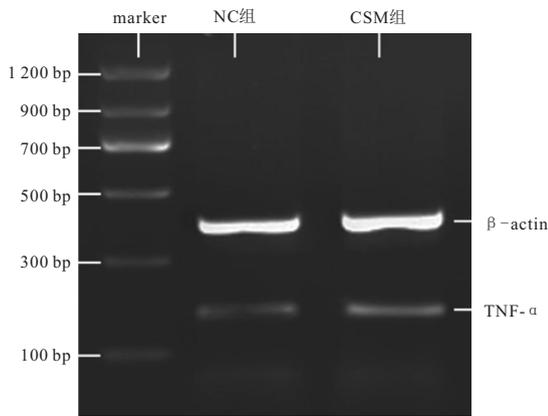


图4 颈椎间盘髓核组织中 TNF- α mRNA 琼脂糖凝胶电泳

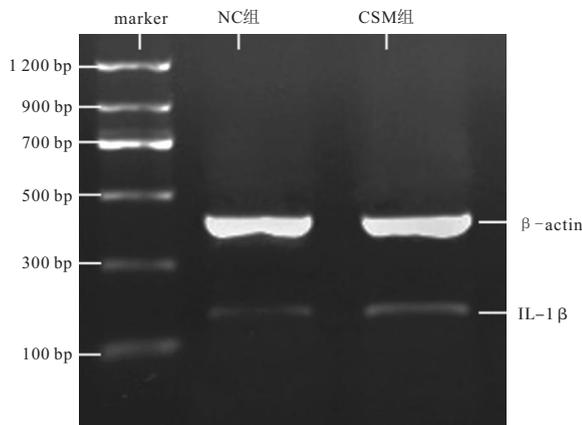


图5 颈椎间盘髓核组织中 IL-1 β mRNA 琼脂糖凝胶电泳

符合颈椎病的自然病程, 随着年龄的增长, 颈椎间盘退变的概率增大, 而颈椎病的发生早期本来就包含了颈椎间盘的退行性改变^[2-3], 而且 NC 组病人的人选标准包含有无颈椎病病史, 因此本实验的 NC 组与 CSM 组在病人年龄依据设定的条件存在差异, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 2 组病人在性别及颈椎位置上差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 对实验结果无影响, 符合本实验的设计。

在 CSM 的发病过程中, 退行性病变是椎间盘发生病理变化的重要环节, 其中与基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 有关的髓核基质降解是造成椎间盘退变的主要因素^[5]。MMP 是一组需要 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子作为辅助因子的同工酶, 其功能为参与细胞外基质的降解。

TNF- α 和 IL-1 β 可以激活髓核中的 MMP, 并使其表达升高, 从而参与到髓核细胞外基质的降解, 进而引起椎间盘的退行性改变^[6]。MERN 等^[7] 研究显示, 经过 TNF- α 、IL-1 β 预处理后的髓核细胞可加速髓核细胞外基质的降解及椎间盘的退行性改变。亦有实验证实通过转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 抵消 TNF- α 介导的 MMP-3

的表达升高作用,可以延缓椎间盘的退行性改变^[8];应用具有拮抗 TNF- α 、IL-1 作用的富血小板血浆,可显著降低人髓核细胞中 MMP-3 基因的表达,进而减少髓核细胞外基质的降解,延缓椎间盘的退行性改变^[9]。提示 TNF- α 和 IL-1 β 均能通过 MMP 有关的髓核细胞外基质的降解途径造成椎间盘退变。

除了上述的作用外, TNF- α 和 IL-1 β 还可以造成颈椎其他组织结构的退行性改变。退变的椎间盘产生的 TNF- α 可影响黄韧带导致其肥厚增生及骨化^[10]。IL-1 β 作为退变椎间盘组织产生的炎症因子,可诱导软骨终板的退行性改变^[11]。TNF- α 和 IL-1 β 一样都是破骨细胞生成剂,可能通过诱导活化单核细胞,并使其在局部聚集而诱发并刺激骨吸收,因此在颈椎退变中促进了骨的吸收,从而进一步加重了颈椎的退变^[12]。TNF- α 和 IL-1 β 的这些作用都会加速 CSM 发生及发展。

本文结果显示, NC 组颈椎间盘髓核组织中 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平极低, CSM 组颈椎间盘髓核组织中 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平较 NC 组明显升高;且光学显微镜下观察到 CSM 组的椎间盘髓核中胶原纤维排列紊乱,呈现出明显的椎间盘退行性改变的组织形态学变化。TNF- α 和 IL-1 β 在退变的椎间盘中启动了细胞外基质的降解和促进炎症反应,直接参与了椎间盘的退变过程;同时退变的颈椎间盘也促进了 TNF- α 和 IL-1 β 的释放,两者互为因果,相互促进,因此 TNF- α 和 IL-1 β 与 CSM 的发生及发展具有相关性。

既往的实验^[8-9] 已证实应用具备拮抗 TNF- α 和 IL-1 β 作用的细胞因子或血浆等可延缓椎间盘退变,显示临床上应用拮抗退变椎间盘产生的炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的药物预防及治疗 CSM 具有可行性。但髓核在解剖结构上属于乏血管区,使拮抗炎症因子药物通过血液循环直接作用于髓核存在困难,因此通过何种无损伤途径,使拮抗炎症因子的药物顺利直接作用于髓核,是目前研究的一个重点和需要解决的难点。

[参 考 文 献]

- [1] EMERY SE. Anterior approaches for cervical spondylotic myelopathy: Which When How[J]. Eur Spine J, 2015, 24 (Suppl 2): 150.
- [2] NOURI A, TETREAU L, ZAMORANO JJ, et al. Role of magnetic resonance imaging in predicting surgical outcome in Patients With cervical spondylotic myelopathy[J]. Spine, 2015, 40(3): 171.
- [3] KIELY PD, QUINN JC, DU JY, et al. Posterior surgical treatment of cervical spondylotic myelopathy: review article [J]. HSS J, 2015, 11(1): 36.
- [4] QUINN JC, KIELY PD, LEBL DR, et al. Anterior surgical treatment of cervical spondylotic myelopathy: review article [J]. HSS J, 2015, 11(1): 15.
- [5] 洪泽亚, 王永东. 基质金属蛋白酶在退变椎间盘组织中的研究及发现[J]. 疾病监测与控制杂志, 2014, 8(5): 307.
- [6] 徐林军, 许永涛. 基质金属蛋白酶在腰椎间盘退变中作用的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(20): 3678.
- [7] MERN DS, FONTANA J, BEIERFUß A, et al. A combinatorial relative mass value evaluation of endogenous bioactive proteins in three-dimensional cultured nucleus pulposus cells of herniated intervertebral discs: identification of potential target proteins for gene therapeutic approaches [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81467.
- [8] WANG X, WANG H, YANG H, et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin -1 β -dependent matrix metalloproteinase-3 expression in nucleus pulposus cells requires cooperative signaling via syndecan 4 and mitogen-activated protein kinase-NF- κ B axis: implications in inflammatory disc disease[J]. Am J Pathol, 2014, 184(9): 2560.
- [9] KIM HJ, YEOM JS, KOH YG, et al. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- α and IL-1[J]. J Orthop Res, 2014, 32(4): 551.
- [10] KANG YM, SUK KS, LEE BH, et al. Herniated intervertebral disk induces hypertrophy and ossification of ligamentum flavum[J]. J Spinal Disord Tech, 2014, 27(7): 382.
- [11] 郑为超, 牛凯, 赵永见, 等. 苦杏仁苷对 IL-1 β 诱导后大鼠椎间盘软骨终板细胞凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(12): 1734.
- [12] 项耀均, 沈洪兴, 沈茜, 等. 脊髓型颈椎病退变椎间盘局部炎症细胞因子的变化[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(7): 788.

(本文编辑 姚仁斌)