

腰椎退变黄韧带中炎性细胞因子的表达

李 强¹, 赵建民¹, 张元智¹, 刘 聪²

(1 内蒙古医学院第一附属医院骨科; 2 内蒙古医学院外科学系 010050 内蒙古呼和浩特市)

【摘要】目的:观察腰椎退变黄韧带中炎性细胞因子的表达情况,探讨其在腰椎黄韧带退变过程中的作用。**方法:**收集腰椎退变性疾病患者在后路椎板切除减压治疗时取下的黄韧带标本 40 例(退变组),术前通过 CT、MRI 证实均有黄韧带肥厚;以 10 例脊柱外伤行后路手术治疗的青年患者的腰椎黄韧带作为对照(对照组)。将术中切除的黄韧带剔除骨、脂肪及筋膜等组织,修成约 2cm×1.5cm×0.3cm,在 10%福尔马林溶液中固定 24~48h 后取出,制备成石蜡切片,采用苏木精伊红(HE)染色,应用光学显微镜观察病理学改变,并用免疫组化技术观察黄韧带标本中白介素-1(IL-1)、IL-6 和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表达情况。**结果:**对照组黄韧带弹力纤维呈波浪状,排列规则,弹力纤维间可见少量的胶原纤维和散在的成纤维细胞(22.56±6.05 个/HP);退变组黄韧带弹力纤维明显减少,胶原纤维增多,并且伴软骨细胞、成纤维细胞、毛细血管的增生,成纤维细胞计数为 62.66±18.40 个/HP,两组成纤维细胞计数差异有统计学意义($P<0.05$)。退变黄韧带组织中 IL-1、IL-6、TNF-α 表达阳性率分别为 75%、77.5%、82.5%,对照组黄韧带组织中的表达阳性率分别为 40%、20%、40%,退变组明显高于对照组($P<0.05$)。**结论:**IL-1、IL-6、TNF-α 在腰椎退变黄韧带中有较高的表达,这些炎性因子可能参与了腰椎黄韧带退变的过程。

【关键词】黄韧带;炎性细胞因子;表达

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2011.01.16

中图分类号:R681.5,R363 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2011)-01-0063-04

The expression of inflammatory cytokines in ligamentum flavum of the degenerative lumbar and its clinical significance/LI Qiang,ZHAO Jianming,ZHANG Yuanzhi,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2011,21(1):63~66

【Abstract】Objective:To investigate the expression and effect of inflammatory cytokine in ligamentum flavum and the mechanism in degeneration.**Method:**40 ligamentum flavum specimens were harvested from 40 patients (degenerative group).All cases presented with ligamentum flavum hypertrophy on CT and MRI imaging and all underwent decompressive laminectomy.Specimens from 10 cases with spine trauma and underwent surgery were regarded as normal controls (normal group).The ligamentum flavum were free of bone,fat and soft tissue and all were trimmed into 2×1.5×0.3cm small pieces.The samples were immediately fixed in 10% buffered formalin for 24~48 hours and embedded in paraffin.Hematoxylin eosin(HE) staining were used to observe pathological changes,and tumor necrotizing factor-α (TNFα),interleukin-1 (IL-1),and interleukin-6 (IL-6) were tested by immunohistochemistry.**Result:**The elastic fibers in the ligamentum flavum of the normal group presented wave-shape and good arrangement,while it was not the case in the degenerative group.The elastic fibers decreased obviously,collagen fibers increased,and chondrocyte,desmocyte and capillary proliferation were noted.The amount of collagen fibers and fibrocyte showed significant difference between normal and degenerative group (22.56±6.05 cells/HP vs 62.66±18.40 cells/HP)($P<0.05$).The expression rate of TNF-α,IL-1 and IL-6 were significantly higher in the degenerative group than in the normal group.IL-1,IL-6 and TNF-α were not expressed or lowly expressed in the normal group,but highly expressive in the cytoplasm or nucleus of degenerative ligamentum flavum,which showed significant difference ($P<0.05$).**Conclusion:**The degenerative ligamentum flavum have higher expression of IL-1,IL-6 and TNF-α,which may be associated with the degeneration of ligamentum flavum.

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金资助项目(编号:200408020928)

第一作者简介:男(1981-),在读硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(0471)6637637 E-mail:meledoy@126.com 通讯作者:赵建民 E-mail:nmzjmin@163.com

[Key words] Ligamentum flavum; Inflammatory cytokine; Expression

[Author's address] Orthopaedics, Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical College, Hohhot, 010050, China

黄韧带是脊柱后部的重要连接结构,主要由弹力纤维构成。作为脊柱运动节段的成分之一,具有维持脊柱稳定的作用。由于黄韧带退变导致其弹性下降,当脊柱后伸时黄韧带可出现皱褶或折叠而突入椎管,使椎管容积减少,尤其伴有椎间盘突出或关节突增生肥大时,可导致脊髓、神经根受压,出现神经症状,严重者可致瘫痪、病残。但黄韧带退变的机制至今仍不十分明了。有研究认为肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 (IL-1)、白介素-6 (IL-6) 与椎间盘退变有关^[1-3]。但是关于 IL-1、IL-6、TNF- α 等炎性细胞因子在退变的黄韧带中表达的相关研究国内外文献报道很少。为此我们对黄韧带退变标本与无退变标本进行病理学观察及免疫组化分析,对 IL-1、IL-6、TNF- α 在黄韧带退变过程中的作用进行初步探讨。

1 资料与方法

1.1 标本来源

退变黄韧带取自 40 例后路椎板切除减压治疗的腰椎管狭窄症或腰椎间盘突出症患者(退变组),其中男 22 例,女 18 例,年龄 40~74 岁,平均 57.2 岁;术前 CT/MRI 影像学资料证实均有黄韧带肥厚,无明显钙化及骨化,在 CT/MRI 横断面椎间隙平面测量黄韧带最大厚度超过 5mm。无退变黄韧带取自 10 例腰椎骨折的患者(对照组),其中男 6 例,女 4 例,年龄 19~30 岁,平均 23.9 岁;术前 CT/MRI 影像学资料证实无黄韧带增厚、钙化及骨化的征象,CT/MRI 椎间隙平面测量黄韧带最大厚度不超过 4mm。

1.2 主要试剂

IL-1 α 抗体、IL-6 抗体、TNF- α 抗体购自武汉博士德公司;二抗试剂盒、增敏二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.3 检测方法

将后路手术中切除的黄韧带剔除骨、脂肪及筋膜等组织,修成约 2cm×1.5cm×0.3cm,立刻放入 10%福尔马林溶液中固定 24~48h,取出后制备成石蜡切片。按 HE 染色步骤及免疫组化染色(S-P 法)流程染色。分别在低倍镜(×100)和高倍镜(×400)下观察两组 HE 切片,每张切片随机取 5 个

高倍视野(×400),计数成纤维细胞的总数。在免疫组化染色切片中观察 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的表达情况,每张切片随机观察 10 个高倍视野(×400),细胞胞浆或胞核中出现浅棕黄色、棕黄色或褐色染色为阳性。染色结果结合阳性细胞百分率和着色强度进行半定量分析,阳性细胞百分率 0~25%,0 分; >25%~50%,1 分; >50%~75%,2 分; >75%~100%,3 分。无着色,0 分;浅棕黄色,1 分;棕黄色,2 分;棕褐色,3 分。将两项评分相加,共分成 4 个等级,0 分为(-)、1~2 分(+),3~4 分(++),5~6 分(+++)。

1.4 统计学分析

成纤维细胞计数以均数±标准差表示,退变组与对照组组间差异应用两样本均数比较的 t 检验;免疫组化染色观察所得数据以阳性率表示,组间比较应用 χ^2 检验。应用 SPSS 13.0 软件, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果

对照组黄韧带在光镜下呈现典型的弹力致密结缔组织结构特点,主要由弹力纤维组成,弹力纤维呈波浪状,排列规则,与韧带纵轴一致,弹力纤维间可见少量的胶原纤维和散在的成纤维细胞(图 1)。退变组黄韧带在光镜下呈现弹力纤维明显减少、断裂且分布不规则,胶原纤维增多,并且伴软骨细胞、成纤维细胞、毛细血管的增生(图 2、3)。退变组和对照组的成纤维细胞计数分别为 62.66 ± 18.40 个/HP 和 22.56 ± 6.05 个/HP,两组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

2.2 免疫组化结果

退变黄韧带组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 在软骨细胞及成纤维细胞胞浆或胞核中均有较高表达,对照组表达明显低于退变组(图 4~9),两组阳性表达情况见表 1。各指标表达阳性率两组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 IL-1、IL-6、TNF- α 的生物学作用

IL-1、IL-6、TNF- α 被称为前炎性细胞因子,通过刺激炎症细胞的聚集、激活和炎症介质的释

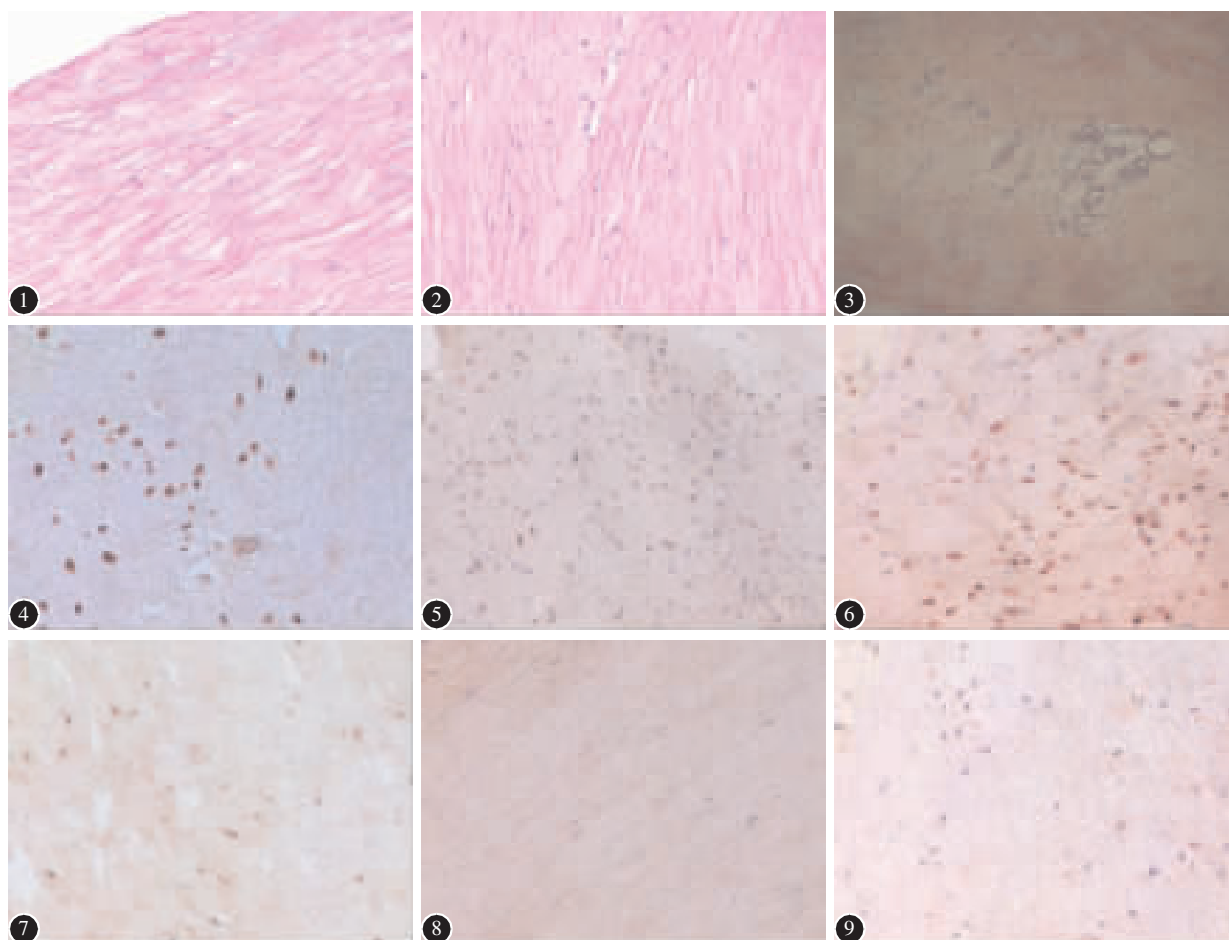


图 1 对照组黄韧带弹力纤维呈波浪状,排列规则,与韧带纵轴一致,弹力纤维间可见少量的成纤维细胞(HE 染色 $\times 100$) 图 2 退变黄韧带弹力纤维明显减少、断裂且分布不规则,胶原纤维则增多,伴成纤维细胞增生(HE 染色 $\times 100$) 图 3 退变黄韧带中可见毛细血管增生(HE 染色 $\times 100$) 图 4、5、6 退变组黄韧带组织 IL-1、IL-6、TNF- α 免疫组化染色可见胞浆或胞核呈棕黄色或棕褐色的阳性细胞,数量较多,阳性细胞为软骨细胞和成纤维细胞($\times 100$) 图 7 对照组黄韧带 IL-1 免疫组化染色可见散在浅棕褐色阳性细胞,阳性细胞数量明显少于退变组($\times 100$) 图 8 IL-6 免疫组化染色未见明显染色阳性细胞($\times 100$) 图 9 TNF- α 免疫组化染色可见散在浅棕褐色阳性细胞,阳性细胞数量明显少于退变组($\times 100$)

表 1 对照组与退变组黄韧带组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 表达情况比较

	例数	IL-1					IL-6					TNF- α				
		-	+	++	+++	阳性率	-	+	++	+++	阳性率	-	+	++	+++	阳性率
对照组	10	6	4	0	0	40%	8	2	0	0	20%	8	2	0	0	40%
退变组	40	10	15	5	10	75% ^①	9	12	10	9	77.5% ^①	7	11	9	13	82.5% ^①

注:①与对照比较 $P < 0.05$

放,启动和促进炎症反应过程。

IL-1 是纤维化的重要因子,它能刺激成纤维细胞的增殖及胶原合成,在肉芽组织及病理性瘢痕组织中均有较强表达。IL-1 还可能促进成纤维细胞分泌血小板源性生长因子(PDGF),后者再刺激 IL-1 增殖。PDGF 通过对成纤维细胞的促分裂增殖、趋化及刺激纤维粘连蛋白合成等作用参与创伤修复,并且通过刺激成纤维细胞胶原合成及

胶原酶活化,对胶原合成、分解也有调节作用^[4],调节细胞外基质的更新。IL-1 还能引起成纤维细胞 I 型和 III 型前胶原蛋白 mRNA 表达,并且通过促进或抑制胶原酶的活力来影响细胞外间质成分堆积。它通过上调细胞间粘附因子-1 表达,诱导炎性细胞粘附、迁移,通过诱导间充质细胞释放基质金属蛋白酶(MMPs)调节细胞外基质(ECM)降解。经 IL-1 处理后的成纤维细胞可产生大量的前

列腺素 E2(PGE2),而 PGE2 的释放可增强胶原的活力。TNF- α 也是一种致纤维化因子,可刺激成纤维细胞增殖及血管增生。在 IL-1 及 TNF- α 的共同作用下,导致成纤维细胞增生,胶原纤维合成增加,最终导致黄韧带肥厚。此外 TNF- α 作为一种重要的炎性介质,可增强中性粒细胞和嗜酸性粒细胞功能,刺激它们产生超氧化物,释放溶酶体酶,对其周围细胞产生毒性作用^[2]。在这些炎性介质的共同作用下,导致黄韧带周围血管内皮细胞受损、血管通透性增高、渗出增加、组织水肿,这些不仅使原本狭小的椎管空间更加拥挤,还导致局部的血循环障碍。

此外,IL-1 与 TNF- α 能够诱导组织细胞产生 PGE2,前列腺素是重要的炎症调节因子,可引起组织的炎症损害,并且是重要的致痛因素^[9],其机理可能是降低伤害感受器的阈值并刺激 C2 类神经纤维^[9],还可以提高其他致痛物质的敏感性,从而加强致痛作用,进而产生神经性疼痛。

IL-6 在退行性骨关节病和关节疾病中的病理作用研究较多,它已被认为是引起关节破坏和炎症的重要介质^[7]。IL-6 的致炎作用主要在于增加 IL-1 和 TNF- α 的效应,IL-6 作为炎症介质被认为是 TNF- α 的某些生物效应的放大因子^[8]。

3.2 黄韧带退变的机制

由于黄韧带的退变是一个随着年龄增长而缓慢发生的病理过程,所以到目前为止,尽管国内外专家对黄韧带的生物力学、细胞学、遗传学等进行了大量的研究,其退变的确切机制仍不清楚。动物模型及细胞培养已经成功复制了退变的黄韧带,但其与正常人体缓慢退变的黄韧带相比,在生物学行为上是否具有相似性,目前还不能做出准确判断。有研究发现,黄韧带肥厚程度与纤维化程度、弹性纤维减少程度均呈正相关^[9]。戴力扬等^[10]对手术后的黄韧带标本进行组织学研究,显示弹性纤维含量下降以及胶原纤维数量增加,正是黄韧带肥厚的原因。本研究结果显示,IL-1、IL-6、TNF- α 等炎性因子在腰椎退变黄韧带的表达水平均较高。与文献报道的结果一致。由此推断:黄韧带变性、增殖、肥厚可能与无菌性炎性因子的作用有关。TNF- α 在黄韧带组织纤维化中有可能是直接促进成纤维细胞的增殖及合成胶原蛋白和蛋白多糖,从而导致胶原纤维的合成及沉着,加速或

维持慢性炎症过程导致韧带纤维化;IL-6 在黄韧带组织纤维化中可以促进成纤维细胞的增生、分泌及合成胶原蛋白、层粘连蛋白和蛋白多糖,促进 I、III 型胶原 mRNA 的表达,减少胶原蛋白的降解,致使胶原蛋白沉积^[11,12]。

本结果显示,退变黄韧带组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 表达明显高于对照组黄韧带组织,我们推测 IL-1、IL-6、TNF- α 等炎性细胞因子参与调控的慢性炎症可能与黄韧带退变有关。

4 参考文献

1. 李新友,王民,刘森,等.白细胞介素-6 在突出的腰椎间盘中的表达及其意义[J].中国矫形外科杂志,2001,8(6):581-582.
2. 尚琦松,黄肇,盛文辉,等.炎性因子 TNF- α 及 IL-18 与椎间盘退变的相关性研究[J].中国矫形外科杂志,2009,17(5):385-387.
3. 赵序利,于锡欣.椎间盘退变的病因研究[J].中国矫形外科杂志,2002,9(3):273-274.
4. Yeo SW, Kim SW, Suh BD, et al. Effects of platelet-derived growth factor-AA on the healing process of tympanic membrane perforation[J]. Am J Otolaryngol, 2000, 21(3): 153-160.
5. 张益民,姜鑫,郭永智,等.腰椎间盘退变与炎症介质[J].实用骨科杂志,2008,14(9):534-535.
6. 俞海明,李毅中.炎症在腰椎间盘退变、突出、吸收发病机制中的作用[J].国际骨科学杂志,2006,27(4):248-250.
7. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinase, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2[J]. Spine, 1995, 20(Suppl 22): 2373-2378.
8. 高薇,鲁静,赵丽娟.炎性细胞因子与类风湿关节炎[J].中国现代医学杂志,2007,17(4):450-457.
9. Sairoy K, Biyani A, Goel VK, et al. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation related scar tissue[J]. Spine, 2007, 32(11): E340-347.
10. 戴力扬,杜晓冰.黄韧带退行性变的组织学观察及其与腰椎椎管狭窄症的关系[J].中华骨科杂志,1995,15(4):195-197.
11. Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Immune activation; the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states [J]. Pain, 1995, 63(3): 289-302.
12. Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses [J]. J Clin Invest, 1998, 101(2): 311-320.

(收稿日期:2010-07-14 修回日期:2010-10-18)

(英文编审 蒋欣/刘思麒/郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)