

骨关节结核与 TNF- α 基因多态性的关系林春燕¹, 杨玉芳², 方菊飞², 杨梅²

(1 广西医科大学 530021; 2 广西医科大学第一附属医院 530021 广西南宁市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.05.17

中图分类号: R529.2, Q786

文献标识码: B

文章编号: 1004-406X(2011)-05-0427-03

骨关节结核是常见的肺外结核, 好发于脊柱及长骨骺端, 其中脊柱结核在全身骨关节结核中发病率最高, 并且有高达 10% 的截瘫率^[1]。研究表明, 抗肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 治疗可增加结核感染率或复发风险^[2], 而 TNF- α 基因在不同种族存在基因多态性, TNF- α 基因的多态性与骨关节结核易感性的相关报道较少, 笔者检测骨关节结核患者和正常对照组 TNF- α -308、-238 位点基因多态性, 探讨其与骨关节结核易感性是否存在相关性。

资料与方法 所有病例均为在广西医科大学第一附属医院住院治疗, 经临床综合诊断和病理检查确诊为骨关节结核的患者共计 46 例, 男 29 例, 女 17 例, 其中壮族 22 例, 汉族 24 例, 年龄 19 岁~62 岁, 平均 39.2 $\pm$ 13.6 岁。脊柱结核 36 例, 病变位于颈椎 3 例、胸椎 14 例、腰椎 6 例、颈胸椎 3 例、胸腰椎 8 例、腰骶椎 2 例; 肩关节结核 1 例, 髋关节结核 3 例, 髌关节结核 2 例, 膝关节结核 3 例, 踝关节结核 1 例。正常对照组为在广西医科大学第一附属医院进行健康体检者, 40 例, 男 17, 女 23, 年龄 29~59 岁, 平均 39.9 $\pm$ 7.4 岁, 壮族 15 例, 汉族 25 例。

DNA 提取: 对每个病例及健康者抽取外周静脉血 0.5ml, 用 EDTA-K2 抗凝, 改良碘化钠-氯仿法提取白细胞 DNA, -20℃ 保存备用。引物设计及合成: 等位基因特异引物 PCR (AS-PCR) 用于检测无相应限制性内切酶识别的基因改变。每个突变点的检测, 需设计两套引物, 第一套为等位基因特异性引物, 第二套为普通引物。当有点突变时, 只有第一套引物扩增出特异性条带; 没有点突变时, 只有第二套引物扩增出特异性条带。用 Primer Premier 5.0 进行引物设计, 在 NCBI 网页 blast 验证引物, 委托上海生物工程有限公司合成, 引物序列为 R1: 5'-GAGGCTGAACCCCGTCCC-3'; F1: 5'-GCAATAGGTTTTCAGGGGCATGA-3'; R2: 5'-TCCCCATCCTCCCTGCTCC-3'; F2: 5'-GAAGACCCCTCGGAATCA-3'; RX: 5'-GGGGTCTGTAGTTGCTTCTCTCC-3'; FX: 5'-AAGCCCTCCAGTTCTAGTTCTATC-3', RX 和 FX 为内对照引物对。FX 和

R1/RX 检测 TNF- α -308G, RX 和 F1/FX 检测 TNF- α -308A, FX 和 R2/RX 检测 TNF- α -238G, RX 和 F2/FX 检测 TNF- α -238A。AS-PCR 反应体系及条件: 在 50 μ l 的反应体系中, 含 TaKaRa Premix Taq 25 μ l, DNA 模板 1 μ g, 内对照引物各 1 μ l, 特异引物各 0.75 μ l。94℃ 预变性 3min, 然后 94℃ 变性 1min, 63.3℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 循环 30 次, 最后经 72℃ 延伸 5min。取扩增产物 5 μ l 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 使用美国 Bio-Rad Gel DOC 2000 凝胶电泳成像分析系统判断结果。TNF- α 基因型判定: 每份样本 PCR 反应产物均出现 455bp 的内参照条带, 以出现 135bp 条带的反应来判断为 TNF- α -308 位点 GG 基因型 (野生型纯合子), 出现 360bp 条带的反应判断为 TNF- α -308 位点 AA 基因型 (野生型纯合子), 135bp、360bp 条带同时出现的反应为 TNF- α -308 位点 GA 基因型 (突变型杂合子); 以出现 206bp 条带的反应来判断为 TNF- α -238 位点 GG 基因型 (野生型纯合子), 出现 287bp 条带的反应判断为 TNF- α -238 位点 AA 基因型 (野生型纯合子), 206bp、287bp 条带同时出现的反应为 TNF- α -238 位点 GA 基因型 (突变型杂合子, 图 1)。统计软件选用 SPSS 13.0 统计软件包, 基因型、等位基因频率的比较采用卡方检验。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

结果 两组间年龄、民族组成和性别构成均无统计学差异 ($P > 0.05$), 具有可比性。病例组和对照组 TNF- α -308、-238 位点基因型和等位基因频率数据见表 1, 本研究中未检出 AA 型突变纯合子。骨关节结核患者 TNF- α -308、-238 位点基因型和等位基因频率与正常对照组间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

图 1 TNF- α -308、-238 位点的不同基因型电泳图谱

M: DNA Marker (100-600bp), 1: TNF- α -308 位点 GG 基因型, 2: TNF- α -308 位点 GA 基因型, 3: TNF- α -238 位点 GG 基因型, 4: TNF- α -238 位点 GA 基因型

第一作者简介: 女 (1981-), 在读硕士, 研究方向: 临床药学

电话: (0771) 5356154 E-mail: 59921249@qq.com

通讯作者: 杨玉芳 E-mail: yyf_69@163.com

表 1 病例组和对照组 TNF-α-308、-238 位点基因型及等位基因频率比较

碱基位	基因型频率(n)		P值	等位基因频率(n)		P值
	GG	GA		G	A	
-308 位						
病例组(46)	0.935(43)	0.065(3)	0.245	0.967(89)	0.033(3)	0.249
对照组(40)	1.000(40)	0.000(0)	(>0.05)	1.000(80)	0.000(0)	(>0.05)
-238 位						
病例组(46)	0.935(43)	0.065(3)	1.000	0.967(89)	0.033(3)	1.000
对照组(40)	0.925(37)	0.075(3)	(>0.05)	0.963(77)	0.038(3)	(>0.05)

讨论 来自于对结核易感的种族变异研究和对双胞胎的研究都表明,宿主的基因在易感结核杆菌和发展成为结核病的过程中起了重要的作用^[3]。至今已有多种与结核的遗传易感性有关的基因相继被发现,例如核体蛋白 Sp110 基因^[4]、自然抗性相关巨噬细胞蛋白 1 基因^[5]、维生素 D 受体基因^[6],还有 TNF-α 基因、人类组织相容性抗原 (HLA) 基因等。

TNF-α 由 TNF-α 基因编码,其表达水平的调节主要集中在 TNF-α 基因启动子区域^[7],该区域内的单核苷酸多态性影响 TNF-α 表达水平,调节机体对结核感染的抵抗力和易感性。TNF-α 主要由活化的巨噬细胞产生,当巨噬细胞受到结核杆菌感染后,释放 TNF-α,它参与巨噬细胞抵抗结核杆菌的感染和结核性肉芽肿的形成。TNF-α 是宿主抗结核保护性免疫应答中必不可少的组分,但 TNF-α 生成失调也能在体内诱导免疫病理反应,在结核杆菌感染过程中起保护作用还是破坏作用,取决于感染局部 TNF-α 量的多少^[8]。结核分枝杆菌超声裂解产物具有诱导骨髓基质细胞分泌 TNF-α 的作用^[9],TNF-α 通过多种方式参与破骨细胞的分化及生物学活性的调控^[10],这可能是结核菌引起骨坏死的最终原因。

目前有不同人群 TNF-α-308、-238 位点基因多态性与结核感染的相关性研究报道,但研究结果不尽相同^[11-15]。TNF 基因多态性不作为北印度人结核感染的风险因素^[9],TNF-α-308、-238 位点基因多态性也与泰国人肺结核易感性无关联^[13],而 TNF-α-308A 等位基因与伊朗人肺结核易感性相关^[14]。未见有关 TNF-α 基因多态性与骨关节结核的相关性研究报道。本研究发现骨关节结核病例组和正常对照组 TNF-α-308、-238 位点 GG、GA 基因型频率和 G、A 等位基因频率组间差异无统计学意义 ($P>0.05$),未发现 TNF-α-308、-238 位点的多态性与骨关节结核的易感性相关。这与 Sharma、Vejbaesya 等^[12,13]关于肺结核的研究结果相似。本研究结果显示,骨关节结核病例组和正常对照组 TNF-α-308、-238 位点 GG、GA 基因型频率和 G、A 等位基因频率组间差异无统计学意义 ($P>0.05$),未发现 TNF-α-308、-238 位点的多态性与骨关节结核的易感性相关。造成各研究结果差异的可能原因有:①肺结核与骨关节结核具有不同的易感基因型,目前研究多集中在 TNF

基因多态性对肺结核易感性的影响,TNF 基因对骨关节结核发病的影响未见报道;②从遗传角度看,机体对骨关节结核易感性受多个基因共同影响,和其他易感基因相比,TNF 基因多态性可能对其影响的权重较小;③人种以及地理位置的差异:我国汉族人群 TNF-α-308A、-238A 突变基因频率(9.71%、1.46%)均低于白种人^[16]。广西地区汉族人群 TNF-α-238 位点基因型以 GG 型频率(95.9%)最高,两种多态性基因型分布在男女间均无显著差异,且未检测到 AA 型基因型,TNF-α-238A 等位基因频率(2.1%)低于欧洲人^[17];④本研究由于条件有限,收集病例数较少,可能会在一定程度上造成结果的偏倚。

参考文献

- 胥少汀,葛宝丰,徐印坎.实用骨科学[M].北京:人民军医出版社,2006.1278.
- Jacobs M,Samarina A,Grivennikov S,et al.Reactivation of tuberculosis by tumor necrosis factor neutralization [J].Eur Cytokine Netw,2007,18(1):5-13.
- 张黎,王导新.人类基因与结核相关性研究进展[J].临床肺科杂志,2008,13(2):191-192.
- Kerrie T,Sarah J,Katherine F, et al. Variants in the SP110 gene are associated with genetic susceptibility to tuberculosis in West Africa [J].Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(27):10364-10368.
- Kim JH,Lee SY,Lee SH, et al. NRAMPI genetic polymorphisms as a risk factor of tuberculous pleurisy[J].Int J Tuberc Lung Dis,2003,7(4):370-375.
- Wilkinson RJ,Llewelyn M,Toossi Z,et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London:a case-control study[J].Lancet,2000,355(9204):618-621.
- Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex.The MHC sequencing consortium[J].Nature,1999,401(6756):921-923.
- Bekker LG,Moreira AL,Bergtold A,et al.Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent [J].Infect Immun,2000,68(12):6954-6961.
- 毕龙,胡蕴玉,孟国林,等.结核分枝杆菌超声裂解产物体外诱导破骨细胞形成的相关实验研究[J].中华小儿外科杂志,2006,

经侧隐窝神经根管扩大入路再手术治疗复发性腰椎间盘突出症

杨利民, 任跃兵, 张承韶, 胡海升

(青岛市市立医院东院脊柱外科 266071 山东省青岛市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.05.18

中图分类号: R681.5 文献标识码: B 文章编号: 1004-406X(2011)-05-0429-03

腰椎间盘突出症手术后的复发率文献报告为 5%~18%^[1-5]。复发性腰椎间盘突出症患者多需要再次手术治疗, 而再次原入路手术难度大, 主要是因需要面对上次手术造成的脊膜周围的瘢痕组织。2006 年 2 月~2010 年 7 月, 我科对 29 例复发性腰椎间盘突出症患者采用经侧隐窝神经根管扩大入路手术治疗, 取得较好的临床效果, 总结报告如下。

资料和方法 病例入选标准: (1) 原手术节段复发距初次手术有 6 个月及以上症状明显缓解或消失; (2) 临床有神经根压迫或刺激症状; (3) CT 或 MRI 显示相同节段有明显椎间椎间盘突出, 并与临床表现相符。本组男 19 例, 女 10 例, 初次手术年龄 18~69 岁, 平均 43.5 岁。初次手术后缓解 8~276 个月, 平均 73.7 个月; 初次手术和再次手术间隔时间 10~236 个月, 平均 81.2 个月。初次手术 16 例来自本院, 13 例来自外院。初次手术方式: 椎板部分切除开窗椎间盘切除 15 例, 病变节段上下方全椎板或半椎板切除 14 例, 其中 11 例患者同时行椎间植骨融合术。初次手术节

段: L3/4 2 例, L4/5 15 例, L5/S1 5 例, L4/5 及 L5/S1 7 例。再次手术节段: L3/4+L4/5 2 例, L4/5 14 例, L5/S1 6 例, L4/5+L5/S1 7 例。

所有患者均有明显的下肢疼痛, 单侧 25 例, 双侧 4 例, 10 例患者合并间歇性跛行。再手术前均行腰椎正侧位及过伸过屈位 X 线片检查, 判断患者腰椎病变节段稳定性及初次手术后椎间植骨融合情况。分别测量两相邻椎体上缘夹角, 用来判断腰椎稳定度, L3-4>15°、L4-5>20°、L5-S1>25°为腰椎失稳^[6], 作为应用内固定植骨融合稳定脊柱的手术指征。本组腰椎存在明显节段性不稳定 7 例。结合腰椎 CT 及 MRI 检查分析, 本组复发性腰椎间盘突出部位: 同侧突出 8 例, 对侧突出 17 例, 两侧突出 4 例; 其中 6 例继发椎管狭窄。

手术方法 患者硬膜外麻醉或全麻后俯卧位, 腹部悬空, 以病变椎间隙为中心取腰部正中纵切口, 分离至腰背筋膜下后, 保留腰椎正后方组织, 沿筋膜下向两侧分离, 有椎弓根钉棒固定者, 取下固定棒后, 再次术中探查椎间稳定性, 保留有棘突者用巾钳提拉相邻棘突, 无棘突者提拉椎弓根钉, 探查椎间植骨融合节段联动及稳定情况; 不稳定者保留椎弓根钉棒, 椎弓根钉松动者予以更换; 分离至小关节突, 充分显露小关节突及横突, 对于需要内固定

第一作者简介: 男 (1961-), 副主任医师, 硕士学位, 研究方向: 脊柱外科

电话: (0532) 88905495 E-mail: ren Yuebing@163.com

27(12): 646-649.

10. Kubota A, Hasegawa K, Suguro T, et al. Tumor necrosis factor- α promotes the expression of osteoprotegerin in rheumatoid synovial fibroblasts[J]. J Rheumatol, 2004, 31(3): 426-435.
11. Ates O, Musellim B, Ongen G, et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in tuberculosis[J]. J Clin Immunol, 2008, 28(3): 232-236.
12. Sharma S, Rathore J, Ghosh B, et al. Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians[J]. BMC Infect Dis, 2010, 10(1): 165.
13. Vejbaesya S, Chierakul N, Luangtrakool P, et al. NRAMP1 and TNF- α polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais[J]. Respiriology, 2007, 12(2): 202-206.
14. Merza M, Farnia P, Anoosheh S, et al. The NRAMP1, VDR and TNF- α gene polymorphisms in Iranian tuberculosis pa-

tients; the study on host susceptibility [J]. Braz J Infect Dis, 2009, 13(4): 252-256.

15. Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG+874T/A, IL10-1082G/A and TNF-308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study[J]. Hum Genet, 2008, 123(5): 477-484.
16. 周越塑, 王福生, 刘明旭, 等. 肿瘤坏死因子- α 基因启动子区点突变与乙型肝炎相关[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(2): 207-210.
17. 陈秉朴, 韦叶生, 解继胜, 等. 广西地区汉族人群 TNF- α 基因启动子-238G/A 多态性分布的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2005, 14(5): 488-490.

(收稿日期: 2010-10-18 修回日期: 2010-12-03)

(本文编辑 刘彦)