

椎间盘内注射医用臭氧对椎间盘退变模型自身免疫反应的影响

陈荣涛, 寿康全, 付纳新, 黄 晖

(三峡大学第三临床医学院骨外科 443002 湖北省宜昌市)

【摘要】目的:观察椎间盘内注射医用臭氧对椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)动物模型自身免疫反应的影响,探讨其作用机理。**方法:**50 只新西兰兔随机分为 A、B、C、D、E 共 5 组,其中 A 组为正常组,不作处理;B 组为假手术组,仅暴露纤维环而不穿刺;C、D、E 组采用后外侧纤维环穿刺的方法建立腰椎间盘退变模型(L6/7),在造模后 14d, D 组模拟临床手术椎间盘内注射臭氧干预, E 组椎间盘内注射医用纯氧,于造模后 14d、21d 对 5 组动物进行自由行走疼痛行为学评分,并于 21d 获取各组动物外周血, L6、L7 神经根及 L6/7 髓核,运用透射比浊法测定各组动物血清中免疫球蛋白 IgG 和 IgM 水平, ELISA 法测定血清中 TNF- α 、IL-1、IL-6 的含量;免疫组化染色观察髓核中抗原抗体复合物沉积情况,应用图像分析系统记录染色阳性细胞的累积光密度值(integrated optical density, IOD);BCA 蛋白定量法检测腰神经根中 PLA2 的活性。**结果:**造模后 1 周左右(平均 7.4d) C、D、E 组动物手术侧后肢活动减少,并在爬行前进时明显偏离手术侧,行走疼痛学评分分别为 2.81 ± 0.13 分、 2.69 ± 0.11 分、 2.64 ± 0.31 分,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);D 组注射臭氧后上述异常行为逐渐减轻,处死前行走疼痛学评分为 0.54 ± 0.12 分,低于 C 组(2.75 ± 0.17 分)及 E 组(2.52 ± 0.96 分)($P < 0.05$);D 组动物血清中 IgG、IgM 水平(6.05 ± 0.49 g/L, 1.98 ± 0.28 g/L)低于 C 组(8.98 ± 0.77 g/L, 2.40 ± 0.25 g/L)及 E 组(8.52 ± 0.63 g/L, 2.91 ± 0.31 g/L)($P < 0.05$),与 A 组(5.43 ± 0.29 g/L, 1.72 ± 0.15 g/L)及 B 组(4.97 ± 0.35 g/L, 1.66 ± 0.27 g/L)比较差异无统计学意义($P > 0.05$);D 组炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 的含量(98 ± 11 pg/ml, 247 ± 21 pg/ml, 149 ± 23.4 pg/ml)亦低于 C 组(256 ± 39 pg/ml, 404 ± 19 pg/ml, 231 ± 41.3 pg/ml)及 E 组(244 ± 45 pg/ml, 410 ± 15 pg/ml, 249 ± 21.7 pg/ml)($P < 0.05$),与 A 组(70 ± 6 pg/ml, 223 ± 17 pg/ml, 141 ± 12.6 pg/ml)及 B 组(79 ± 11 pg/ml, 238 ± 32 pg/ml, 138 ± 17.4 pg/ml)比较差异无统计学意义($P > 0.05$);D 组髓核中抗原抗体复合物阳性沉积光密度值(7.40 ± 3.56)小于 C 组(27.49 ± 12.84)及 E 组(29.55 ± 10.38)($P < 0.05$),其相应节段腰神经根 PLA2 活性(0.0189 ± 0.0072 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{L}$)较 C 组(0.1685 ± 0.0103 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{L}$)及 E 组(0.1994 ± 0.080 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{L}$)明显下降($P < 0.01$),与 A 组(0.0036 ± 0.0081 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{L}$)和 B 组(0.0098 ± 0.0043 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{L}$)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**医用臭氧能够在一定程度上抑制腰椎间盘退变模型中异常的自身免疫反应,这可能是臭氧治疗椎间盘退变引起的腰痛的作用机制之一。

【关键词】腰椎间盘退变;自身免疫应答;臭氧;兔

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2014.09.09

中图分类号: R681.5, R454.9 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2014)-09-0815-07

Experimental study of ozone injection for treating intervertebral disc degeneration with prolapsed type/ CHEN Rongtao, SHOU Kangquan, FU Naxin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(9): 815-821

【Abstract】 Objectives: To observe the influence of ozone injection on the abnormal autoimmunity of intervertebral disc degeneration(IDD) model(L6/7) in animal. **Methods:** An IDD model was established on rabbits. Then medical ozone was used for treatment while medical purified oxygen was used as the control. The immunoglobulin G and immunoglobulin M in serum were obtained at two weeks after the operation and examined by turbidimetry. The presence and distribution of antigen-antibody complexes in nucleus pulposus were examined by immunohistochemistry. And the levels of cytokine TNF- α , IL-1, IL-6 were detected by

第一作者简介:男(1977-),主治医师,研究方向:脊柱外科

电话:(0717)6714999 E-mail:jimmy9240@sina.com

通讯作者:寿康全 E-mail:41530161@qq.com

enzyme linked immunosorbent assay, and the BCA method was also used to analyze the activity of PLA2 in the nerve root. **Results:** After the operation, there were abnormal activities in the groups of model, ozone and oxygen, which had the scores of free walk pain showed as 2.81 ± 0.13 , 2.69 ± 0.11 and 2.64 ± 0.31 respectively, and improved when the medical ozone was applied. Compared with the levels of the immunoglobulin G and M as ($8.98 \pm 0.77 \text{g/L}$, $2.40 \pm 0.25 \text{g/L}$) and ($8.52 \pm 0.63 \text{g/L}$, $2.91 \pm 0.31 \text{g/L}$) on model group and medical oxygen group, the medical ozone group showed lower levels ($6.05 \pm 0.49 \text{g/L}$, $1.98 \pm 0.28 \text{g/L}$, $P < 0.05$); compared with the model group and medical oxygen group as ($256 \pm 39 \text{pg/ml}$, $404 \pm 19 \text{pg/ml}$, $231 \pm 41.3 \text{pg/ml}$) and ($244 \pm 45 \text{pg/ml}$, $410 \pm 15 \text{pg/ml}$, $249 \pm 21.67 \text{pg/ml}$) ($P < 0.05$) for the levels of cytokine $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 , IL-6 in the serum, the medical ozone group also showed lower values ($98 \pm 11 \text{pg/L}$, $247 \pm 21 \text{pg/L}$, $149 \pm 23.4 \text{pg/L}$); compared with the model group and medical oxygen group for the expression of antigen-antibody complexes in the nucleus pulposus (27.49 ± 12.84) and (29.55 ± 10.38), the value of medical ozone group was lower (7.40 ± 3.56) ($P < 0.05$); furthermore, the level of PLA2 in the lumbar nerve root of medical ozone group ($0.0189 \pm 0.0072 \mu\text{mol/min}\cdot\text{L}$) was also lower than the model group and medical oxygen group as ($0.1685 \pm 0.0103 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{L})$) and ($0.1994 \pm 0.080 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{L})$) ($P < 0.01$). **Conclusions:** Medical ozone injection can inhibit the abnormal autoimmunity of LDH model to an extent, which can be a main mechanism of therapy for the early stage of IDD.

[Key words] Medical ozone; Intervertebral disc degeneration; Autoimmunity; Rabbit

[Author's address] Department of Orthopaedic Surgery, the Third Clinical College of Three Gorges University, Yichang, 443002, China

应用医用臭氧治疗椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)引起的腰痛已有十余年的历史,具有并发症发生率低,安全性高,患者满意度好等优点^[1]。对于其作用机制,传统观念认为是通过氧化髓核组织,使椎间盘回缩,减轻神经根压迫而达到临床疗效。我们在临床观察中发现臭氧对椎间盘退变严重、纤维环破裂而椎间盘突出不明显的患者效果最好^[2]。前期的动物实验已经证明自体髓核可作为抗原诱发机体产生自身免疫反应^[3]。为进一步探讨臭氧是否对椎间盘退变机体的自身免疫反应有抑制作用,本研究对兔椎间盘退变模型进行臭氧注射干预,观察其对自身免疫状态的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组

健康成年新西兰大白兔 50 只 [普通品系,湖北三峡大学实验动物中心提供,SCXK (鄂) 2011-0012], 体重 $2.41 \sim 3.47 \text{kg}$, 平均 $2.92 \pm 0.33 \text{kg}$, 雌雄不限。采用随机数字法将实验动物分为 5 组, 每组 10 只: A 组, 正常组; B 组, 假手术组; C 组, 模型对照组; D 组, 医用臭氧组; E 组, 医用纯氧组。动物分笼单独饲养, 如出现饲养过程中疾病或死亡, 随时由健康动物替代。

1.2 主要试剂和仪器

兔免疫球蛋白 IgG、IgM 检测试剂盒 (武汉博

士德生物技术有限公司), S-P 超敏免疫组化染色试剂盒(兔), 生物素化羊抗兔 IgG; 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色剂 (福州迈新生物技术开发公司), 肿瘤坏死因子 α ($\text{TNF-}\alpha$) 试剂盒 (深圳晶美公司), 白介素-1 (IL-1) 试剂盒、白介素-6 (IL-6) 试剂盒 (Bender Medsystems 公司), 磷脂酶 A2 (PLA2) 检测试剂盒 (Cayman Chemical 公司); 2,2'-联喹啉-4,4'-二甲酸二钠 (BCA) 法蛋白定量试剂盒 (普利莱基因技术有限公司); BioTek Elx808 全自动酶标仪; 便携式 X 线机 (北京恒胜创新), Spectra MR 分光光度仪 (Dynex Technologies), 全自动生化分析仪 (Olympus)。酶联免疫检测仪 (E2500 型, Bio-Rad), SCR20BA 型高速离心机 (HITACHI 公司), BX51-DP70 (Olympus) 彩色病理图文分析系统 (Image-Pro Plus 5.1 软件)。

1.3 动物模型建立

采用后外侧纤维环穿刺法建立动物腰椎间盘退变模型: C、D、E 组动物用氯氨酮 50mg/kg 、安定 5mg/kg 联合肌肉注射麻醉后, 取俯卧位, 便携式移动 X 线机定位 L6/7 椎间隙。后正中线左侧旁开 2cm 处作切口, 显露椎板, 采用临床上类似椎板减压方法咬除左侧 L6 椎板以及 L7 椎板各 1/2, 显露硬膜囊及左侧 L7 神经根, 避开并谨慎保护。用 16 号注射器在 L6/7 椎间盘后外侧纤维环上刺入, 刺入深度为 5mm, 使髓核组织可通过渗漏而与硬膜外腔相通。局部喷洒含庆大霉素 8 万 U 的

生理盐水 2ml 以防感染, 随即逐层缝合各层组织和皮肤, 并用酒精纱布覆盖, 包扎固定。术后肌注青霉素 8 万 U 预防感染。A 组动物不作处理。B 组麻醉及切口同 C、D、E 组, 分离并显露硬膜囊及纤维环, 但不作纤维环穿刺, 喷洒庆大霉素预防感染后逐层缝合切口, 术后处理同前。

1.4 自由行走疼痛行为学评分

由同一实验人员在固定时间将兔置于无障碍物房间内自由行走, 待其适应 30min 后观察自由行走痛行为并评分, 结果取平均值。评分标准: 0 分, 行为正常; 1 分, 手术侧后肢轻度跛行; 2 分, 手术侧后肢跛行介于 1 分和 3 分之间; 3 分, 手术侧后肢严重跛行; 4 分, 基本不用双后肢, 靠匍匐前行。评分时相点为建模后 14d 注射臭氧前及建模后 21d 处死前。

1.5 动物模型干预

建模后 14d, 行为学评分后 D 组及 E 组动物麻醉后俯卧, 常规消毒铺巾, 便携式移动 X 线机定位 L6/7 椎间隙, 穿刺点选取为棘突左侧旁开 1cm 左右, 穿刺角度与矢状面成 45°, 模仿临床臭氧注射过程, 用 22G 硬膜外穿刺针进行穿刺, 进针深度约 2.0~2.2cm, 感觉刺破纤维环进入髓核中后 X 线机正侧位透视, 证实穿刺针位于椎间盘中 1/2 处后, D 组推注 30 μ g/ml 医用臭氧气体约 1ml, E 组推注医用纯氧气体约 1ml。术中监测动物生命体征, 术后观察动物活动情况及双后肢有无瘫痪等异常情况。A、B、C 组动物不作干预。

1.6 动物标本获取及检测指标

建模后 21d 行为学评分后, 5 组动物均取耳缘静脉血约 4ml; B、C、D、E 组动物麻醉后取俯卧位, 作原切口, 依次分离皮下及椎旁肌肉, 显露椎板, 切除黄韧带, 进一步扩大椎管, 小心去除硬膜外脂肪, 显露左侧 L6 及 L7 神经根, 切取神经根椎管内段(相当于人类的侧隐窝), 置于-70℃容器中单独存放; 继续沿椎管前缘显露先前处理的 L6/7 椎间盘中央髓核组织, 置于 4%多聚甲醛缓冲液中。实验动物采取空气栓塞法处死。A 组动物借助 X 线机定位 L6/7 椎间隙后手术取出 L6/7 髓核及 L6、L7 神经根作为对照。

1.6.1 血清总 IgG、IgM 含量测定 应用免疫透射比浊法, 按照兔免疫球蛋白 IgG、IgM 检测试剂盒说明书操作, 于 Olympus AU 560 全自动生化分析仪上检测。

1.6.2 血清 TNF- α 、IL-1、IL-6 检测 血样置于 EDTA 抗凝管中, 在 15min 内离心, 1000r/min, 收集上清液封闭于 Ep 管内-80℃冰箱保存待检。按酶联免疫吸附法 (ELISA) 操作方法检测血清中 TNF- α 、IL-1、IL-6 的含量。

1.6.3 腰神经根磷脂酶 A2 (PLA2) 活性测定 神经根组织解冻, 在 500 μ l 的裂解缓冲液中匀浆。裂解液配方为 50mM 三羟甲基氨基甲烷 (Tris-HCL) base (pH 值 7.5), 150mM NaCl, 6 μ g 磺酞氟化二苯甲烷, 6ng 抑酞酶, 6ng 亮肽素, 0.6ml 0.1% 诺乃洗涤剂 P-40, 0.3ml 0.05% 去氧胆酸钠, 加双蒸水 (ddH₂O) 定容至 5ml。0℃裂解 30min。1200r/min、2℃下离心 15min。取上清液-20℃保存。检测时采用美国 Cayman 公司提供的 PAF-AH 活性测定试剂盒, 使用 BioTek Elx808 全自动酶标仪, 读取上清液中 PLA2 的活性。

1.6.4 髓核内抗原抗体复合物沉积情况观察 采用免疫组化 LSAB(SP) 法: 标本石蜡包埋, 4 μ m 厚度连续切片, 脱蜡, 水化; 消除内源性过氧化物酶; 抗原修复; 封闭; 加生物素化的羊抗兔 IgG (作为二抗加入, 一抗为抗原抗体复合物中的 IgG), 4℃过夜。滴加链霉素抗生物素-过氧化物酶 (SP) 溶液, 37℃下 30min, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。染色结果判断, 阳性为浅黄色、棕黄色或棕褐色, 阳性沉积物存在于髓核软骨样细胞周围的软骨陷窝中, 用 PBS 代替生物素化的羊抗兔 IgG 作为阴性对照。采用 BX51-DP70 彩色病理图文分析系统, 应用 Image-Pro Plus 5.1 软件 (USA) 进行统计分析。每只兔取 5 张切片, 每张切片随机选 4 个不同视野进行观察, 测量每个视野免疫复合物阳性表达的 IOD 值, 再将 4 个 IOD 值累加, 得出一张切片平均 IOD 值, 计算出每组动物平均 IOD 值。平均 IOD 值高说明免疫复合物表达强, 反之则弱。

1.7 统计方法

采用 SPSS 13.0 统计软件分析, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 及 LSD 法进行统计学处理; 计数资料采用确切概率法, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

实验观察期间, 动物饮食进水及作息未出现异常, 亦未出现下肢瘫痪或大小便失禁。造模后,

C、D、E 组动物在 1 周左右(平均 7.4d)时出现手术侧后肢活动减少,并在爬行前进时明显偏离手术侧(其中 D 组有一只动物在实验期间没有出现上述反应,判定造模失败,随即补充动物重新造模后成功)。5 组动物自由行走疼痛行为学评分比较见表 1。造模后 14d 时 C、D、E 三组组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);C 组和 E 组动物的异常行为持续至实验结束(造模后 21d),其疼痛学评分无明显改善($P>0.05$),而 D 组动物在注射臭氧后行为有明显改善,其疼痛学评分明显降低,与时间点 C 组及 E 组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

C 组与 A 组及 B 组比较,总 IgG、IgM 含量升高($P<0.05$),与 D 组比较,总 IgG、IgM 含量升高($P<0.05$),与 E 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);D 组与 C 组及 E 组比较含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),与 A 组及 B 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);A 组与 B 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)(表 2)。

C 组与 A 组及 B 组比较,外周血 TNF- α 、IL-1、IL-6 含量升高($P<0.05$),与 D 组比较,外周血 TNF- α 、IL-1、IL-6 含量升高($P<0.05$),与 E 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);D 组与 C 组及 E 组比较外周血 TNF- α 、IL-1、IL-6 含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),与 A 组及 B 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);A 组与 B 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)(表 3)。

C、E 组兔腰神经根 (L6、L7)PLA2 活性较 A、B 组明显升高 ($P<0.01$);D 组较 C、E 组有明显降

低,差异有统计学意义($P<0.01$),与 A、B 组比较无显著性差异 ($P>0.05$);E 组与 C 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);A 组与 B 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)(表 4)。

各组兔髓核中免疫复合物(IC)的沉积表达见图 1~4 和表 5。A、B 组髓核中无免疫阳性表达。C、E 组阳性于达大于 D 组,D 组的 IOD 值较 C、E 组明显下降 ($P<0.05$);E 组与 C 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 各组动物外周血总 IgG、IgM 含量比较 ($\bar{x}\pm s$, g/L)

Table 2 Comparison of the level of the immunoglobulin G and M in the peripheral blood of all groups

组别 Groups	只数 n	IgG	IgM
正常对照组(A组) Normal group(group A)	10	5.43 $\pm$ 0.29	1.72 $\pm$ 0.15
假手术组(B组) Shame operation group(group B)	10	4.97 $\pm$ 0.35	1.66 $\pm$ 0.27
模型对照组(C组) Model group(group C)	10	8.98 $\pm$ 0.77 ^①	2.40 $\pm$ 0.25 ^①
医用臭氧组(D组) Medical ozone group(group D)	10	6.05 $\pm$ 0.49 ^②	1.98 $\pm$ 0.28 ^②
医用纯氧组(E组) Medical oxygen group(group E)	10	8.52 $\pm$ 0.63 ^①	2.91 $\pm$ 0.31 ^①

注:①与 A、B 组比较 $P<0.05$;②与 C、E 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group A and B, $P<0.05$; ②Compared with group C and E, $P<0.05$

表 3 各组动物血清 TNF- α 、IL-1、IL-6 含量比较

($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

Table 3 Comparison of the level of TNF- α 、IL-1、IL-6 in the peripheral blood of all groups

组别 Groups	只数 n	TNF- α	IL-1	IL-6
正常对照组(A组) Normal group (group A)	10	70 $\pm$ 6	223 $\pm$ 17	141 $\pm$ 12.6
假手术组(B组) Shame operation group (group B)	10	79 $\pm$ 11	238 $\pm$ 32	138 $\pm$ 17.4
模型对照组(C组) Model group (group C)	10	256 $\pm$ 39 ^①	404 $\pm$ 19 ^②	231 $\pm$ 41.3 ^②
医用臭氧组(D组) Medical ozone group (group D)	10	98 $\pm$ 11 ^③	247 $\pm$ 21 ^④	149 $\pm$ 23.4 ^④
医用纯氧组(E组) Medical oxygen group (group E)	10	244 $\pm$ 45 ^①	410 $\pm$ 15 ^①	249 $\pm$ 21.7 ^①

注:与 A、B 组比较① $P<0.01$, ② $P<0.05$;与 C、E 组比较③ $P<0.01$, ④ $P<0.05$

Note: Compared with group A and B, ① $P<0.01$, ② $P<0.05$; Compared with group C and E, ③ $P<0.01$, ④ $P<0.05$

表 1 各组动物自由行走疼痛学评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the scores of free walk pain of all groups

组别 Groups	只数 n	建模后 14d 4 days after operation	建模后 21d 21 days after operation
正常对照组(A组) Normal group(group A)	10	0	0
假手术组(B组) Shame operation group(group B)	10	0	0
模型对照组(C组) Model group(group C)	10	2.81 $\pm$ 0.13	2.75 $\pm$ 0.17
医用臭氧组(D组) Medical ozone group(group D)	10	2.69 $\pm$ 0.11	0.54 $\pm$ 0.12 ^①
医用纯氧组(E组) Medical oxygen group(group E)	10	2.64 $\pm$ 0.31	2.52 $\pm$ 0.96

注:①与 C、E 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group C, and E, $P<0.05$

3 讨论

临床上应用医用臭氧治疗椎间盘退变引起的腰痛已经多年。我们在工作中发现,对于纤维环破

裂、椎间盘退变严重而突出较轻的患者用臭氧治疗的疗效往往较好;相反,对于脱垂型和游离型患者,臭氧注射治疗往往效果不佳^[4]。本研究目的在于探讨臭氧治疗椎间盘退变引起的腰痛,需排除

表 4 各组动物神经根 PLA2 含量比较

($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{L}$)

Table 4 Comparison of the level of PLA2 in the nerve roots

组别 Groups	只数 n	PLA ₂
正常对照组(A组) Normal group(group A)	10	0.0036±0.0081
假手术组(B组) Shame operation group(group B)	10	0.0098±0.0043
模型对照组(C组) Model group(group C)	10	0.1685±0.0103 ^①
医用臭氧组(D组) Medical ozone group(group D)	10	0.0189±0.0072 ^②
医用纯氧组(E组) Medical oxygen group(group E)	10	0.1994±0.080 ^①

注:①与 A、B 组比较 $P < 0.01$;②与 C、E 组比较, $P < 0.01$

Note: ① Compared with group A and B, $P < 0.01$; ② Compared with group C and E, $P < 0.01$

表 5 各组动物髓核免疫复合物表达的 IOD 值比较

($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the IOD for the expression of IC of all groups

组别 Groups	只数 n	IOD
正常对照组(A组) Normal group(group A)	10	0
假手术组(B组) Shame operation group(group B)	10	0
模型对照组(C组) Model group(group C)	10	27.49±12.84
医用臭氧组(D组) Medical ozone group(group D)	10	7.40±3.56 ^①
医用纯氧组(E组) Medical oxygen group(group E)	10	29.55±10.38

注:①与 C、E 组比较 $P < 0.05$

Note: ① Compared with group C and E, $P < 0.05$

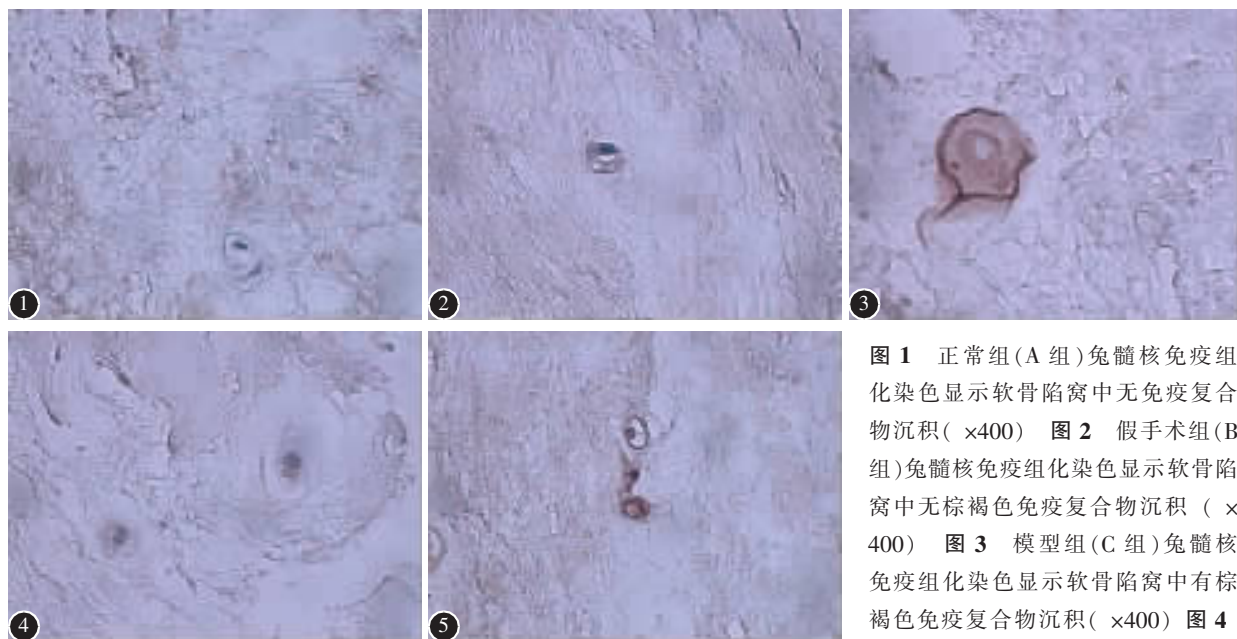


图 1 正常组(A组)兔髓核免疫组化染色显示软骨陷窝中无免疫复合物沉积($\times 400$) 图 2 假手术组(B组)兔髓核免疫组化染色显示软骨陷窝中无棕褐色免疫复合物沉积($\times 400$) 图 3 模型组(C组)兔髓核免疫组化染色显示软骨陷窝中有棕褐色免疫复合物沉积($\times 400$) 图 4 臭氧组(D组)兔髓核免疫组化染色

显示软骨陷窝中免疫复合物沉积阳性表达明显减少($\times 400$) 图 5 纯氧组(E组)兔髓核免疫组化染色显示软骨陷窝中免疫复合物阳性表达,与 C 组无明显差别($\times 400$)

Figure 1 Immunohistochemistry of normal group, there were no postive antigen-antibody complexes in cartilage lacuna($\times 400$) **Figure 2** Immunohistochemistry of negative group, there were no postive antigen-antibody complexes expressed in cartilage lacuna($\times 400$) **Figure 3** Immunohistochemistry of model group, there were postive antigen-antibody complexes expressed in cartilage lacuna($\times 400$) **Figure 4** Immunohistochemistry of medical ozone group($\times 400$), the expression of antigen-antibody complexes were relatively weaklier in cartilage lacuna **Figure 5** Immunohistochemistry of oxygen group, there were postive antigen-antibody complexes expressed in cartilage lacuna, and there was no difference between oxygen group and model group($\times 400$)

突出髓核的机械压迫作用,因此,我们采用 16 号穿刺针进行固定深度(5mm)纤维环穿刺,通过穿刺后外侧纤维环建立新西兰白兔椎间盘退变动物模型,结果显示模型建造后动物出现手术侧后肢活动减少,并在爬行前进时明显偏离手术侧的神经根激惹现象,行走疼痛学评分较正常组明显升高,免疫组化染色显示髓核中有免疫复合物的沉积,相邻节段神经根炎性始动因子 PLA2 的含量较正常组明显升高,这与 Masuda 等^[5]的研究结果一致,证实模型建立成功。

本课题组在前期实验^[3]中证实,髓核作为自身抗原,一旦暴露给机体免疫系统,由于后者无法识别,视为异己,将引起自身免疫反应,引起神经根免疫性炎症,从而导致临床症状。但上述研究结果是基于椎间盘(髓核)组织直接移植于神经根旁,其位置位于纤维环外,类似于椎间盘突出所引起的病理过程,而临床上椎间盘退变(IDD)的发病过程与其仍有一定差别。本研究采用纤维环切开,而髓核仍在原位,更加接近临床真实情况。结果显示,在手术造模后,动物外周血液免疫的代表产物——免疫球蛋白 IgG、IgM 的含量明显高于正常组及假手术组,且髓核中免疫复合物(IC)的沉积 IOD 值亦远高于正常组及假手术组,提示髓核中的自身抗原(蛋白多糖)刺激机体产生自身抗体,诱发补体的级联反应,形成抗原抗体复合物;而在细胞免疫方面,动物外周血中 Th1 型细胞因子(IL-1、IL-6、TNF- α)的水平较正常组及假手术组明显升高,这与诸多学者的研究结果类似,即正常椎间盘中不含或含量很低的细胞因子,而在椎间盘退变时,椎间盘内 IL-1、IL-6、TNF- α 等细胞因子含量明显增高,刺激神经根和脊神经,导致腰痛和神经根性放射痛^[6]。作为这种免疫性炎症的损害对象,神经根的水肿及脱髓鞘反应将生成更多的炎性因子,形成级联瀑布效应,而 PLA2 被认为是这一链式反应中的限速酶^[7]。因此,PLA2 的水平既是局部神经组织炎症的特殊标志,也是反映椎间盘发生退变的重要指征。本研究中,模型组的神经根 PLA2 水平远高于正常组及假手术组,提示 PLA2 水平的高表达与椎间盘退变模型局部的免疫性炎症有密切联系。

有学者认为^[8]臭氧注射治疗椎间盘退变引起的腰痛是通过氧化椎间盘引起机械回缩而达到临床治疗效果的,据此臭氧的临床效果应当于椎间

盘基本回缩且不再压迫神经根后方能显现(亦即术后 1~2 个月),而这与患者腰痛等临床症状在臭氧注射后短时间内缓解甚至消失等临床现象相矛盾。因此,我们认为,臭氧注射在机械减压之外,应当还有更重要的机理。Bocci 等^[9]研究认为,臭氧在一定浓度(30~45ug/ml)下具有免疫激活和调节的作用。有学者将小鼠暴露于 0.8ppm 臭氧 2 周,发现其对绵羊红细胞的原发性抗体反应受到一定程度抑制^[10]。适当浓度的臭氧具有刺激多种免疫调节性细胞因子的产生、抑制人体淋巴细胞过度增殖的功能,因此臭氧已被用于治疗溃疡性结肠炎、克隆病等自身免疫性疾病。在本研究中,臭氧组动物外周血的免疫球蛋白 IgG、IgM 水平明显低于模型组和纯氧组,提示臭氧能够抑制髓核作为抗原所引发的自身免疫应答,降低自身抗体水平;在外周血 Th1 型细胞因子(IL-1、IL-6、TNF- α)的检测中,臭氧组远低于模型组及纯氧组。我们分析,臭氧作用机体后,可能抑制 Th1 细胞分化,使得本已发生异常的 Th1/Th2 状态重新漂移,恢复其应有的 Th2 优势应答状态,从而阻断其引发的自身免疫性炎症,达到临床治疗效果。在抗原抗体复合物的沉积上,臭氧组的 IOD 值明显低于模型组及纯氧组,提示在注射臭氧以后,通过对自身体液免疫的抑制作用使得针对髓核抗原的自身抗体生成减少,由于缺乏相应的自身抗体,免疫复合物的表达阳性率因而也相应减少,从而抑制了自身免疫性炎症的产生和发展。而抑制自身免疫反应的最终结果为缓解神经根炎症反应。本研究结果显示,臭氧组神经根 PLA2 的含量明显低于模型组及纯氧组,提示臭氧注射能够抑制机体的过度免疫应答,从而减轻神经根的病理损害,缓解神经根水肿,空泡变性等炎性反应,达到临床治疗效果,最终臭氧组自由行走疼痛学评分远低于模型组与纯氧组。说明臭氧可通过抑制自身免疫应答的作用机制达到缓解临床神经根性疼痛的疗效。

由此可见,臭氧注射能够抑制机体中异常的自身免疫状态,下调机体对髓核自身抗原的过度免疫应答,缓解神经根的炎性水肿及病理损害,这可能是其治疗椎间盘退变引起的腰痛的作用机理之一。

4 参考文献

1. 陈淦,薛立,徐华. 经皮穿刺臭氧溶解术治疗腰椎间盘突出症

- 65例分析[J]. 福建医药杂志, 2012, 34(6): 113-114.
2. 黄晖, 寿康全, 李坚, 等. 臭氧治疗对破裂型腰椎间盘突出症患者自身体液免疫的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(11): 935-937.
3. 刘成, 寿康全, 付纳新, 等. 破裂型椎间盘突出动物模型中自身免疫反应的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23(1): 61-65.
4. 苏启超, 耿海涛, 韩才, 等. 医用臭氧治疗腰椎间盘突出症患者的疗效与椎间盘及突出物 CT 值的关系[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2009, 19(1): 74-75.
5. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild: reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration[J]. Spine, 2005, 30(1): 5-14.
6. Ozakay AC, Cavanaugh JM, Asik L, et al. Dorsal root sensitivity to interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor in rats[J]. Eur Spine, 2002, 11(5): 467-475.
7. Saal JS, Franson RC, Dobrow R, et al. High levels of inflammatory phospholipase A2 activity in lumbar disc herniation[J]. Spine, 1990, 15(2): 674-678.
8. 赵辉, 倪才方, 唐天驷. 经皮穿刺臭氧注射术治疗腰椎间盘突出症的进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(7): 545-547.
9. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine[J]. Br J Biomedical Sci, 1999, 56(4): 270-279.
10. Larini A, Bocci V. Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells[J]. Toxicol In Vitro, 2005, 19(1): 55-61.
- (收稿日期:2014-04-08 末次修回日期:2014-07-22)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 卢庆霞)

消息

脊柱内镜高峰论坛暨脊柱微创及导航新技术研讨班通知

由中国医疗保健国际交流促进会骨科专业委员会脊柱内镜学组、中国医师协会骨科医师分会脊柱工作委员会脊柱微创工作组、上海市医学会骨科分会脊柱微创学组、《中国骨与关节杂志》编辑部 and 第二军医大学附属长海医院骨科脊柱外科共同举办的“脊柱内镜高峰论坛暨脊柱微创及导航新技术研讨班”拟于 2014 年 10 月 10~12 日在上海长海医院举行。

大会议题:脊柱微创外科及导航技术的新理论、新技术及基础研究新进展;新型脊柱微创手术器械 workshop 及模拟操作;经皮内镜手术录像解析;应用解剖尸体操作等。本次研讨班注册代表将授予国家级继续教育 I 类学分 7 分。

通讯地址:上海市杨浦区长海路 168 号长海医院骨科脊柱外科, 邮编:200433。联系人:刘彦斌(13585813870)、李军(15221957706)。

2014 年 10 月 10 日 11:00~24:00 锦雪苑宾馆注册报到。现场注册:1000 元/人, 网上注册 800 元/人;会议+模拟操作培训:1500 元/人;会议+模拟操作培训+尸体标本操作:3500 元/人。食宿统一安排, 费用自理。

会议动态请关注上海脊柱微创网:www.shanghai-spine.com。

大会邮箱:spine_shanghai@163.com。