

Modic II 型改变软骨终板中核因子- κ B、白介素 18 和 P 物质的表达及意义

贺 宪^{1,2}, 黄东生², 彭 焰², 梁安靖², 孔 畅¹, 曾 巧¹

(1 广州市番禺区中医院脊柱外科 511400 广州市; 2 中山大学孙逸仙纪念医院脊柱外科 510120 广州市)

【摘要】目的:观察核因子- κ B(NF- κ B)、白介素-18(IL-18)和 P 物质(SP)在 Modic II 型改变软骨终板中的表达情况,并分析其意义。**方法:**收集 2010 年 10 月~2011 年 10 月因单节段腰间盘退变性疾病行椎体间融合术的患者 41 例,男 18 例,女 23 例,年龄 20~70 岁,平均 47.1 $\pm$ 13.7 岁。根据手术节段终板有无 Modic II 型改变,将其分为 Modic II 型改变组(A 组)和无 Modic 改变组(B 组)。同时收集因腰椎爆裂性骨折行前路手术治疗的 5 例年轻患者作为对照组(C 组),男 3 例,女 2 例,年龄 20~29 岁,平均 24.2 $\pm$ 3.7 岁。对术中取出的软骨终板标本行 HE 染色观察软骨终板组织形态学变化,免疫组化法检测 NF- κ B、IL-18 和 SP 表达阳性率及阳性细胞指数。**结果:**HE 染色结果显示,C 组软骨终板无明显退变,A 组退变程度重于 B 组。免疫组化结果显示,A、B、C 组 NF- κ B 阳性细胞指数分别为 55.39 $\pm$ 17.74、36.01 $\pm$ 14.80、4.42 $\pm$ 2.84,IL-18 阳性细胞指数分别为 45.23 $\pm$ 12.95、30.22 $\pm$ 12.01、5.22 $\pm$ 3.46,SP 阳性细胞指数分别为 38.29 $\pm$ 19.26、25.83 $\pm$ 16.52、0.97 $\pm$ 1.32。A、B 组 NF- κ B、IL-18 和 SP 阳性细胞指数均明显高于 C 组($P<0.05$),A 组明显高于 B 组($P<0.05$),NF- κ B 与 IL-18 的表达水平呈高度正相关关系($P<0.05$)。**结论:**Modic II 型改变软骨终板中 NF- κ B、IL-18 和 SP 表达的阳性细胞数显著性升高,可能是 Modic II 型改变引起腰痛的原因之一。

【关键词】Modic II 型改变;腰痛;核因子- κ B;白介素-18;P 物质

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2014.11.12

中图分类号:R681.5,R363 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2014)-11-1025-06

Protein expression levels and the significances of nuclear factor-kappa B, interleukin-18 and substance P in degenerative endplates with type II Modic changes/HE Xian, HUANG Dongsheng, PENG Yan, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(11): 1025-1030

【Abstract】Objectives: To investigate the protein expression levels and significances of nuclear factor-kappa B (NF- κ B), interleukin(IL)-18 and substance P(SP) in degenerative endplates with type II Modic changes (MCs). **Methods:** Forty-one patients who received single level interbody fusion from October 2010 to October 2011(18 males, 23 females) and with a mean age of 47.13 $\pm$ 13.67 years(range, 20-70 years) were included in the study. Patients were divided into 2 groups: group A, type II MCs on magnetic resonance imaging(MRI) and group B, without MCs. In addition, 5 patients(3 males, 2 females) with a mean age of 24.20 $\pm$ 3.70 years with lumbar vertebral fractures were included as control group (group C). Endplate specimens were stained with hematoxylin and eosin(HE) and observed with light microscopy. Concentrations of NF- κ B, IL-18 and SP were detected by immunochemistry. **Results:** Light microscopy showed no obvious degeneration in group C, and the staining of group B was lighter than that of group A. The positive cell index of NF- κ B in group A, B and C was 55.39 $\pm$ 17.74, 36.01 $\pm$ 14.80 and 4.42 $\pm$ 2.84 respectively. That of IL-18 in group A, B and C was 45.23 $\pm$ 12.95, 30.22 $\pm$ 12.01 and 5.22 $\pm$ 3.46 respectively. That of SP in group A, B and C was 38.29 $\pm$ 19.26, 25.83 $\pm$ 16.52 and 0.97 $\pm$ 1.32 respectively. Immunochemistry showed that the positive cell indexes of NF- κ B, IL-18 and SP in group A and B were higher than those in group C ($P<0.05$), and group A was higher than group B($P<0.05$). A positive relationship between the levels of NF- κ B and IL-18 was noted($P<0.05$). **Conclu-**

基金项目:中山大学临床医学研究“5010”计划项目(2007020)

第一作者简介:男(1978-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱外科

电话:(020)66679134 E-mail:hexianhx@163.com

通讯作者:黄东生 huangdongsheng666@yahoo.com.cn

sions: The early results of interbody fusion are better than simple discectomy for single segmental LDH when type II MCs occur in lumbar endplates, the protein expression levels of NF- κ B, IL-18 and SP in cartilage endplates will increase. Elevated levels of NF- κ B, IL-18 and SP may be the cause of low back pain in patients with degenerative endplates with type II MCs.

【Key words】 Modic II changes; Low back pain; Nuclear factor- κ B; Interleukin-18; Substance P

【Author's address】 Department of Orthopedics, Panyu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, 511400, China

1988年 Modic 等^[1,2]正式提出 Modic 改变,之后学者们对其进行了深入的研究。尽管 Modic 改变与腰痛的相关性仍有争议,但大多数学者认为 Modic 改变与腰痛有关。Modic 改变引起腰痛的原因目前仍不太清楚,有学者^[3]认为炎性因子和神经纤维长入终板可能是 Modic 改变引起腰痛的主要原因,但因样本量小,所得结论有待进一步验证。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种重要的核转录因子,它作为信号转导途径中的枢纽,与炎症的发生、发展有着密切联系^[4]。白介素 18(interleukin-18, IL-18)为最近研究发现的一种强有力的新型白介素家族炎性因子,参与许多疾病如类风湿性关节炎、骨性关节炎的发病^[5]。P 物质(substance P, SP)是一种最重要的疼痛感受器的神经递质,具有扩张血管、传递疼痛信息及直接致痛的作用^[6]。NF- κ B、IL-18 和 SP 在退变的椎间盘髓核组织中呈高表达,并被认为是引起椎间盘源性腰痛的重要原因之一。在 Modic 改变各型中,II 型改变发生率最高,那么 Modic II 型改变引起腰痛的原因是否与 NF- κ B、IL-18 和 SP 有关呢?本研究拟应用免疫组织化学方法检测有 Modic II 型改变的软骨终板中 NF- κ B、IL-18 和 SP 的表达水平,为 Modic II 型改变与腰痛的相关性提供病理学依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与仪器

兔抗人源性 NF- κ B 多克隆抗体、兔抗人源性 IL-18 多克隆抗体、鼠抗人源性 SP 单克隆抗体(由武汉博士德生物工程有限公司提供);第二代通用型二步法检测试剂盒(广州化学试剂厂);倒置显微镜(BX60, OLYMPUS 公司);Leica 显微镜(DFC300, Leica 公司);电热恒温培育箱(长沙市医疗器械有限公司)。

1.2 研究对象

病例组:来源于 2010 年 10 月~2011 年 10 月

在我院脊柱外科因腰椎间盘突出行椎体间融合术的患者。纳入标准:(1)腰痛程度大于腿痛程度;(2)单节段病变;(3)如病变节段有 Modic 改变只能为 Modic II 型改变(即终板及终板下骨质在 MRI T1 加权像上呈高信号, T2 加权像上呈等信号或轻度高信号),且在终板前中后均有分布。排除标准:(1)多节段病变;(2)既往有腰椎手术史;(3)合并腰椎肿瘤、结核、感染;(4)合并腰椎滑脱、腰椎严重的先天性异常、严重的脊柱侧凸。共有 41 例患者纳入本研究。按照手术节段有无 Modic II 型改变分为 Modic II 型改变组(A 组, 图 1a)和无 Modic 改变组(B 组, 图 1b)。两组患者基本情况见表 1, 两组病例数、男女构成比、病程、病变节段等比较差异无统计学意义。

对照组(C 组)为同时期因腰椎爆裂性骨折行前路手术治疗的 5 例患者,男 3 例,女 2 例;年龄 20~29 岁,平均 24.2 ± 3.7 岁;L3/4 3 例, L1/2、L4/5 各 1 例。所有患者受伤前均无腰腿痛,术前腰椎 MRI 示腰椎间盘无明显退变、终板无异常改变(图 1c)。

1.3 标本的采集与处理

根据术前影像学定位,术中采用终板刮匙将椎间盘连同软骨终板一起取出,修整后将软骨终板及邻近组织用 10%福尔马林液固定 24h, EDTA 脱钙 2 周后石蜡包埋,超薄切片机 4 μ m 厚切片,行 HE 染色和免疫组化检测。

1.4 检测方法

采用二步法免疫组织化学染色:常规石蜡切片在 TO 型生物制片透明剂中脱蜡,经各级乙醇脱水,蒸馏水洗;3%双氧水室温下 15min 将内源性过氧化物酶灭活,蒸馏水洗 3min $\times$ 3 次;将切片浸入已煮沸的 0.01M 柠檬酸盐缓冲液(pH 值 6.0)中,微波炉中-低档继续加热 20min 后断电,保温 8min,待冷却后用 PBS 洗 3min $\times$ 3 次;滴加一抗(NF- κ B、IL-18 或 SP)工作液,4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜, PBS 洗 3min $\times$ 3 次;滴加 Sunpol-HIII(二抗)工作

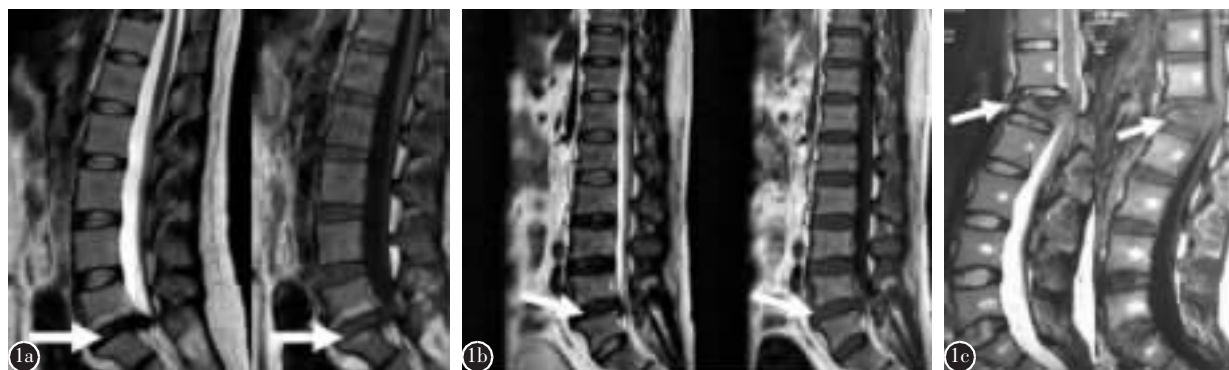


图 1 a MRI 示 L5/S1 上下终板 T1、T2 像均为高信号(箭头所示) b MRI 示 L5/S1 上下终板 T1、T2 像均为等信号 c MRI 示 L1 椎体下终板 T1、T2 像均为等信号, L1/2 椎间盘无明显退变

Figure 1 a The inferior and Superior endplate at L5/S1 level showed high signal intensity(SI) on MRI T1WI and T2WI in group A (arrows) b The inferior and Superior endplate at L5/S1 level showed mild SI on MRI T1WI and T2WI in group B c The inferior endplate at L1/2 level showed mild SI on MRI T1WI and T2WI in group C, No significant degeneration was found at L1/2 intervertebral disc

表 1 两组患者一般情况比较

Table 1 Comparison of the basic information between group A and group B

	A组 ^① Group A	B组 Group B
性别比(男/女) Sex(male/female)	8/12	10/1121
平均年龄(岁) Average age(year)	48.35±10.84	46.67±12.40
平均病程(月) Average course(month)	18.21±7.91	16.57±8.12
病变节段 Segment		
L4/5	12	9
L5/S1	8	12

注:①与 B 组比较 $P>0.05$.

Note: ①Compared with group B, $P>0.05$

液,室温下孵育 30min。PBS 洗 2min×3 次;使用 DAB 显色试剂盒(AR1022),1ml 蒸馏水滴加 1 滴 A、1 滴 B、1 滴 C,混匀,呈色 3~5min,自来水终止反应;用自来水冲洗 10min,苏木素轻度复染、脱水、透明、封片;显微镜下观察软骨终板的组织形态学特征。免疫组化染色后依照 Pelletier 等^[7]的评定方法,每张切片随机挑选 5 个高倍视野(200 倍),计数阳性细胞数及细胞总数,胞核或胞浆染成棕黄色或棕褐色的为阳性细胞。阳性细胞指数=阳性细胞数/细胞总数×100。阴性对照以 TBS 代替一抗,余步骤相同。阳性细胞指数大于 3 表示该切片染色阳性,阳性率=阳性切片数/总切片数×100%。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计学软件包进行处理,组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用偏相关性分析,数据采用均数±标准差, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨终板的组织形态学特征

C 组基质染色呈紫红色,软骨终板结构良好,软骨陷窝存在,基质内含有大量成束状排列的胶原纤维,软骨细胞排列有序,分布均匀,体积较大,数量较多(图 2a)。B 组基质染色变浅,呈淡红色,软骨终板结构欠清晰,基质内胶原纤维排列欠规则,软骨细胞排列不整齐,分布不均,部分细胞体积变小,数量减少(图 2b)。A 组基质染色进一步变浅呈浅红色,软骨终板结构严重紊乱,并出现细微的裂缝,基质内胶原纤维排列紊乱,数量减少,软骨细胞排列紊乱,分布不均,体积变小,数量明显减少(图 2c)。

2.2 NF-κB、IL-18、SP 在软骨终板中的表达情况

NF-κB 阳性产物定位于细胞核,IL-18、SP 阳性产物定位于细胞浆。三组各因子的表达情况表 2、3 和图 3~5。NF-κB、IL-18 阳性细胞在 A、B 组中较多,C 组中较少。A、B 组染色阳性率明显高于 C 组 ($P<0.05$),但 A、B 组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。A、B 组的阳性细胞指数明显高于 C 组 ($P<0.05$),A 组亦明显高于 B 组 ($P<0.05$)。偏相关性分析表明 NF-κB 与 IL-18 表达水平呈高度正



图 2 3 组软骨终板 HE 染色情况 (×100) a C 组软骨终板结构良好, 软骨细胞排列有序, 分布均匀, 数量较多 b B 组软骨终板结构欠清晰, 软骨细胞排列不整齐, 分布不均, 数量减少 c A 组软骨终板结构严重紊乱, 软骨细胞排列紊乱, 分布不均, 数量明显减少

Figure 2 HE staining results among the three groups(×100) a Few degeneration occur in endplates in group b degeneration was seen in endplates in group B c Serious degeneration was seen in endplates in group A

相关($r=0.895, P<0.05$)。在 A、B 组可见大量 SP 阳性细胞, 但 C 组阳性细胞少见, A、B 组染色阳性率明显高于 C 组($P<0.05$), 但 A、B 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。A 组和 B 组的阳性细胞指数明显高于 C 组 ($P<0.05$), A 组也明显高于 B 组 ($P<0.05$)。

3 讨论

Modic 改变被正式提出已有 20 余年, 但其引起腰痛的原因仍然不清楚。1986 年 Crock 等^[8]曾提出“椎间盘内部破裂(internal disc disruption, IDD)”理论, 他们认为椎间盘反复的损伤可能促使髓核内部产生炎性物质, 这些炎性物质通过椎体终板扩散可以引起局部的炎症反应, 形成多种炎症因子如白介素 6(interleukin-6, IL-6)、白介素 8 (interleukin -8, IL -8) 和前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 等, 从而引起腰痛。后来 Ohtori 等^[3]的研究发现, 在有 Modic 改变的软骨终板中, 肿瘤坏死因子 α 和蛋白基因产物 9.5 的表达水平明显高于无 Modic 改变的终板, 且在 Modic I 型改变软骨终板中的含量亦明显高于在 II 型改变软骨终板中的含量。因此该作者推测 Modic 改变引起腰痛的原因可能与软骨终板中炎症因子的上调和神经纤维的长入有关, 但因其样本量少, 所得结论有待于进一步验证。

NF- κ B 是一种重要的核转录因子, 它作为信号转导途径中的枢纽, 与炎症的发生、发展有着密切联系。静息状态时细胞质中的 NF- κ B 由 NF- κ Bp65/p50 二聚体与其抑制蛋白 I κ B α 结合形成三聚体, 在外来信号的刺激下, 通过特异的激酶使

表 2 各组 NF- κ B、IL-18 和 SP 免疫组化切片染色阳性率 (%)

Table 2 Immunohistochemistry positive rate of NF- κ B, IL-18 and SP among the three groups

	A组 (n=20) ^{①②} Group A	B组 (n=21) ^① Group B	C组 (n=5) Group C
NF- κ B	100(20/20)	100(21/21)	40(2/5)
IL-18	100(20/20)	100(21/21)	60(3/5)
SP	95(19/20)	85(18/21)	0(0/5)

注: ①与 C 组比较 $P<0.05$; ②与 B 组比较 $P>0.05$

Note: ①Compared with group C, $P<0.05$; ②Compared with group B, $P>0.05$

表 3 各组 NF- κ B、IL-18 和 SP 免疫组化阳性细胞指数比较

Table 3 Immunohistochemistry positive cells index of NF- κ B, IL-18 and SP among the three groups

	A组 (n=20) ^{①②} Group A	B组 (n=21) ^① Group B	C组 (n=5) Group C
NF- κ B	55.39±17.74	36.01±14.80	4.42±2.84
IL-18	45.23±12.95	30.22±12.01	5.22±3.46
SP	38.29±19.26	25.83±16.52	0.97±1.32

注: ①与 C 组比较 $P<0.05$; ②与 B 组比较 $P>0.05$

Note: ①Compared with group C, $P<0.05$; ②Compared with group B, $P>0.05$

I κ B α 磷酸化, 从而引起 I κ B α 降解, 游离的 p50/p65 二聚体移位到细胞核, 结合到靶基因启动子区域的 κ B 位点, 调节靶基因 (如炎症介质、粘附分子) 的表达^[9]。IL-18 为近年来研究发现的一种强有力的新型 IL 家族炎性因子, 参与多种疾病如骨性关节炎、类风湿性关节炎的发病^[10]。IL-18 可以通过诱导 PGE2 的生成, 刺激软骨细胞产生一氧化氮合酶, 诱导 IL-6 等的表达, 氨基葡萄糖释

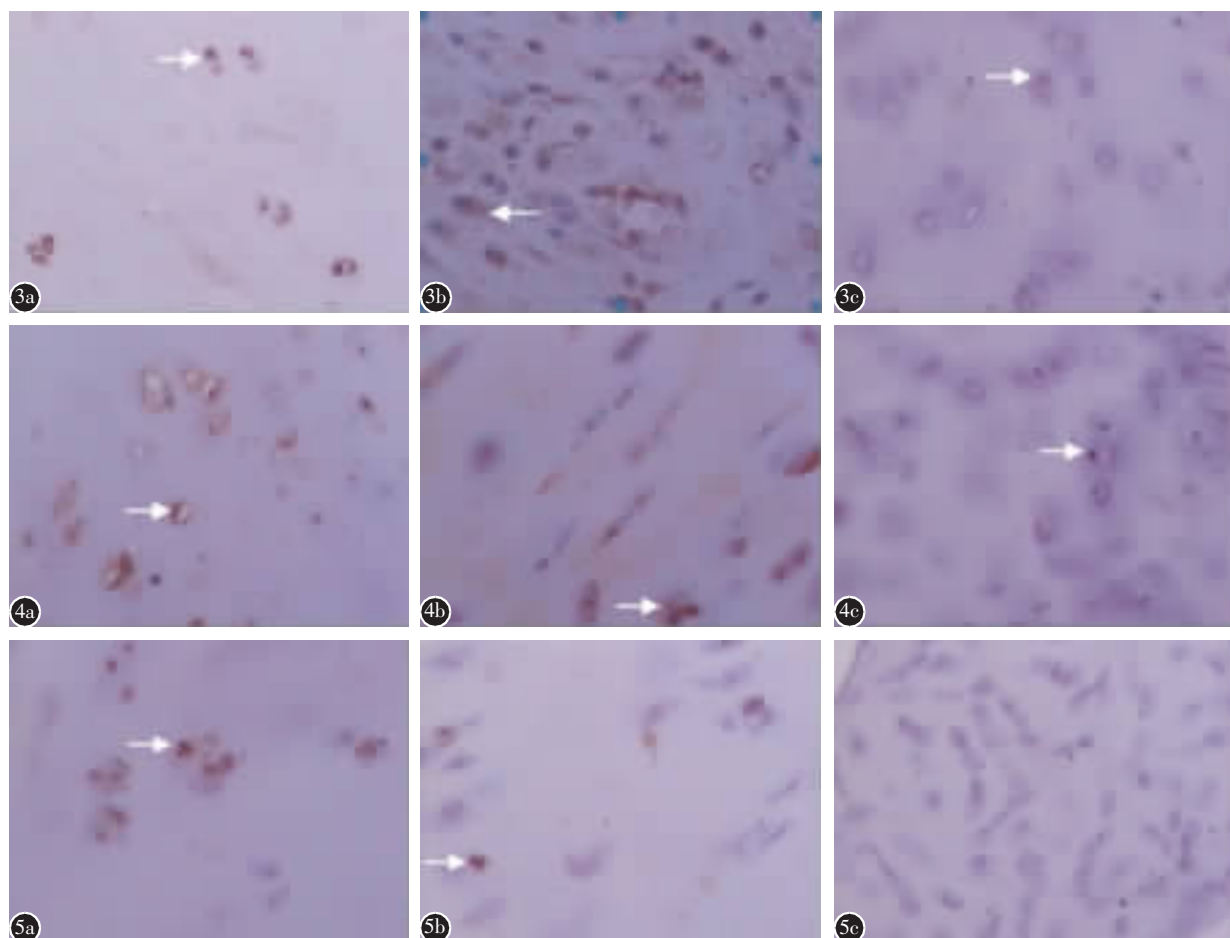


图 3 3 组 NF- κ B 免疫组化染色情况, 胞核染色棕黄色或棕褐色为阳性($\times 200$) **a** A 组可见到较多的阳性细胞 **b** B 组阳性细胞减少 **c** C 组阳性细胞数明显减少 **图 4** 3 组 IL-18 免疫组化染色情况, 胞浆染色棕黄色或棕褐色为阳性($\times 200$) **a** A 组可见到较多的阳性细胞 **b** B 组阳性细胞减少 **c** C 组阳性细胞数明显减少 **图 5** 3 组 SP 免疫组化染色情况, 胞浆染色棕黄色或棕褐色为阳性($\times 200$) **a** A 组可见到较多的阳性细胞 **b** B 组阳性细胞明显减少 **c** C 组几乎未见到阳性细胞

Figure 3 The results of immunohistochemical staining of NF- κ B among the three groups. The cells with brown or tan nucleus were positive cells($\times 200$) **a** More NF- κ B immunoreactive cells(arrows) were seen in group A **b** The number of positive cells decreased in group B **c** Few NF- κ B immunoreactive cells were found in group C **Figure 4** The results of immunohistochemical staining of IL-18 among the three groups. The cells with brown or tan cytoplasm were positive cells($\times 200$) **a** More IL-18 immunoreactive cells(arrows) were seen in group A **b** The number of positive cells decreased in group B **c** Few IL-18 immunoreactive cells were found in group C **Figure 5** The results of immunohistochemical staining of SP among the three groups ($\times 200$) **a** More SP immunoreactive cells (arrows) were seen in group A **b** The number of positive cells decreased in group B **c** No SP immunoreactive cells were found in group C

放增加,使软骨病变恶化^[11]。

本组病例中 C 组软骨终板无明显退变, A 组退变程度重于 B 组, 这表明 Modic II 型改变是终板退变到一定程度的结果。本实验中 A 组 NF- κ B、IL-18 的表达水平明显高于 B 组和 C 组, 提示当终板发生 Modic II 型改变时, NF- κ B 处于激活状态, IL-18 表达水平明显增加。这一结果与

Ohtori 等^[3]的研究结果相符, 提示 Modic II 型改变的实质与炎症反应有关, 炎症因子的高表达可能是 Modic II 型改变的致痛原因之一。我们还发现 NF- κ B、IL-18 两者的表达水平具有正相关关系, 这提示 NF- κ B/IL-18 炎症信号通路在 Modic II 型改变的发病中发挥着重要的作用, 抑制 NF- κ B 炎症信号通路可能是防治 Modic 改变的一条重要

途径。

SP 是一种神经源性多肽,它是最重要的伤害性感受器的神经递质,不仅具有传递疼痛信息的作用,而且还具有直接致痛的作用。研究发现 SP 在退变椎间盘中表达水平明显高于正常椎间盘,并被证实与椎间盘源性腰痛有密切关系^[3]。本研究未发现 SP 免疫阳性神经纤维,仅发现 SP 在软骨细胞中表达,但是,我们认为这不是因为软骨组织不存在 SP 阳性神经纤维,而是由于在组织的处理过程中和在神经纤维中 SP 的不稳定性造成的^[12]。本研究中 A 组的 SP 表达水平明显高于 B 组和 C 组,C 组很少有 SP 的表达。据此,我们推测终板发生 Modic II 型改变时,软骨细胞 SP 表达水平增高可能是 Modic II 型改变导致腰痛的原因之一,但其具体的致痛机理仍需进一步研究。

综上所述,当终板发生 Modic II 型改变时,炎症相关因子 NF- κ B、IL-18 和疼痛相关因子 SP 表达水平增高,这可能是 Modic II 型改变引起腰痛的原因之一,研发以上二类因子的抑制剂对治疗终板 II 型 Modic 退变有益。因 II 型 Modic 改变最常见,占有 Modic 改变的 80%,本研究收集的病例均为 II 型 Modic 改变。为了更全面地了解 Modic 改变,在未来的研究中,应纳入 I 型和 III 型改变病例。

4 参考文献

1. Modic MT, Steinberg PM, Ross JS, et al. Degenerative disk disease: assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging[J]. Radiology, 1988, 166(1): 193-199.
2. Modic MT, Masaryk TJ, Ross JS, et al. Imaging of degenerative disk disease[J]. Radiology, 1988, 168(1): 177-186.
3. Ohtori S, Inoue G, Ito T, et al. Tumor necrosis factor-immunoreactive cells and PGP 9.5-immunoreactive nerve fibers in vertebral endplates of patients with discogenic low back pain and Modic type 1 or type 2 changes on MRI[J]. Spine, 2006, 31(9): 1026-1031.
4. 郭静,勾向博,张文丽,等. 骨关节炎患者膝关节软骨和滑膜中 P38MAPK、NF- κ B 的表达及意义 [J]. 河北联合大学学报, 2013, 15(6): 749-751.
5. Volin MV, Koch AE. Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. J Interferon Cytokine Res, 2011, 31(10): 745-751.
6. 舒剑臣,唐小穗. P 物质、白介素 6 与腰椎间盘突出症所致腿腿痛的相关性研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2013, 28(9): 825-827.
7. Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors[J]. J Rheumatol, 1999, 26(23): 2002-2014.
8. Crock HV. Internal disc disruption: a challenge to disc prolapse fifty years on[J]. Spine, 1986, 11(6): 650-653.
9. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B play a key role in inflammatory process[J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 7-11.
10. 李旭光,上官改珍,徐燕,等. IL-18 和 IL-8 在类风湿性关节炎患者血清中的表达及其与抗 CCP 相关性的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(8): 865-867.
11. 黄志明,赵俊延,齐新文,等. IL-32 和 IL-18 在人膝关节炎发病中的表达及意义[J]. 中国医学工程, 2014, 22(4): 22-23.
12. Ashton IK, Ashton BA, Gibon SJ, et al. Morphological basis for back pain: the demonstration of nerve fibers and neuropeptides in the lumbar facet joint capsule but not in ligamentum flavum[J]. J Orthop Res, 1992, 10(1): 72-78.

(收稿日期:2014-06-17 修回日期:2014-08-14)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)