

基础研究

被动吸烟大鼠椎间盘中白介素-1 β 和白介素-1 受体 I 的表达及意义

李左安, 邵增务, 熊小芊, 苏彩凤, 张志才, 王河忠

(华中科技大学同济医学院协和医院骨科 430022 武汉市)

【摘要】目的:观察被动吸烟大鼠椎间盘中白介素-1 β (IL-1 β)和白介素-1 受体 I(IL-1 R I)的表达,探讨被动吸烟诱发椎间盘退变的机制。**方法:**取 4 周龄 SD 大鼠 60 只,随机分为 6 组,第 1 组不予吸烟,10 只;第 2~4 组分别吸烟 2 周、4 周、8 周,第 5、6 组吸烟 8 周后予停止吸烟 4 周、8 周,每组 10 只。在相应时间点处死动物,取 L4/5 椎间盘行 HE 染色和 IL-1 β 及 IL-1 R I 免疫组化染色,观察椎间盘退变情况和 IL-1 β 及 IL-1 R I 的表达情况。**结果:**HE 染色显示,吸烟 2 周时椎间盘无明显退变,吸烟 4 周时椎间盘出现 2~3 级退变,吸烟 8 周时椎间盘出现 3~4 级退变,停止吸烟后 4 周退变无明显修复;停止吸烟后 8 周退变部分修复。免疫组化染色显示,吸烟 2 周组 IL-1 β 及 IL-1 R I 染色阳性细胞率增加,吸烟 4 周组染色阳性细胞率大于 2 周组;吸烟 8 周组达(76 $\pm$ 3.2)%和(46 $\pm$ 2.8)%,停止吸烟后 4 周开始下降,8 周时降至(66 $\pm$ 2.9)%和 38 $\pm$ 2.2%。**结论:**被动吸烟可以诱发大鼠椎间盘退变,且随吸烟时间延长退变加重;其导致退变的机制可能与上调椎间盘内 IL-1 β 和 IL-1 R I 的表达有关。

【关键词】椎间盘退变;被动吸烟;白介素-1 β ; 白介素-1 受体 I;大鼠

中图分类号:R681.5,Q507 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-07-0534-04

Expression of interleukin-1 β ,interleukin-1 receptor I and their significance in the intervertebral disc of passive cigarette-smoking rats/LI Zuoan,SHAO Zengwu,XIONG Xiaoqian,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2008,18(7):534~537

【Abstract】Objective:To observe the expression of interleukin-1 beta(IL-1 β),interleukin-1 receptor I(IL-1 R I) in the intervertebral disc of passive cigarette-smoking rats and investigate the possible mechanism of disc degeneration induced by the passive smoking.**Method:**60 four-week-old rats were used and divided into 6 groups randomly,10 in each group were subjected to passive smoking box to induce intervertebral disc degeneration.Group 1 were used as the control,group 2,3,4 were sacrificed respectively at 2 weeks,4 weeks,8 weeks of passive smoking,group 5,6 were both given passive smoking for 8 weeks,then group 5 were sacrificed 4 week after cessation of smoking,group 6 were 8 weeks after cessation of smoking.L4/5 discs were harved,and the histological changes were observed by HE staining,the expression of IL-1 β and IL-1 R I was examined by immunohistochemical staining.**Result:**HE staining showed that there was no obvious disc degeneration in 2 weeks passive smoking group,grade 2 or 3 disc degeneration in 4 weeks group,grade 3 or 4 disc degeneration in 8 weeks group.Cracks,tears,and misalignment of annulus fibrosus were observed clearly in the intervertebral disc 8 weeks after passive smoking,after 8-week cessation of smoking,the disc degeneration could be repaired to some extent.There were more IL-1 β ,IL-1 R I positive-staining cells 2 weeks after passive smoking,the rate of IL-1 β ,IL-1 R I positive-staining cells was (76 $\pm$ 3.2)% and (46 $\pm$ 2.8)% respectively after 8 weeks of passive smoking.Expression of IL-1 β and IL-1 R I decreased at 4 weeks cessation of smoking,the rate of IL-1 β ,IL-1 R I positive-staining cells were (66 $\pm$ 2.9)% and (38 $\pm$ 2.2)% at 8 weeks,both were conspicuously higher than that of non-smoking group ($P<0.01$).**Conclusion:**Passive smoking could induce irreversible intervertebral disc degeneration,with worse degeneration in longer passive smoking.IL-1 β ,IL-1 R I may be the important factors in the mechanism of disc degeneration.

第一作者简介:男(1981-),硕士研究生,研究方向:骨与关节疾病

通讯作者:邵增务

电话:(027)85351686 E-mail:szwj@medmail.com.cn

[Key words] Intervertebral disc degeneration; Passive cigarette smoking; Interleukin-1 β ; Interleukin-1 receptor I; Rat

[Author's address] Department of Orthopaedics, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China

有文献报道吸烟与椎间盘退变的发生有一定联系,并认为吸烟可能通过生物化学机制引起椎间盘退变^[1-4],但是吸烟导致椎间盘退变的机制尚待进一步阐明。白介素-1 β (IL-1 β)是椎间盘退变进程中起重要作用的炎性因子,不仅可直接启动椎间盘细胞凋亡的细胞内过程,还能促进其他与椎间盘退变有关的细胞因子及酶的分泌;白介素-1受体 I(IL-1 R I)是 IL-1 β 发挥大部分生物学效应的途径。本研究拟建立大鼠被动吸烟致椎间盘退变模型,通过观察该模型中 IL-1 β 和 IL-1 R I 表达的变化情况,探讨吸烟诱发椎间盘退变的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

选取 60 只 4 周龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠(购自华中科技大学同济医学院动物中心),随机分为 6 组,第 1 组为非吸烟组,10 只;第 2 到 6 组为吸烟组,第 2 组吸烟 2 周,第 3 组吸烟 4 周,第 4 组吸烟 8 周,第 5 组吸烟 8 周后停止吸烟 4 周,第 6 组吸烟 8 周后停止吸烟 8 周,每组 10 只。

1.2 动物模型构建

自制封闭性硬质纸箱,大小为 70×50×35cm。吸烟组所有大鼠均在同一个吸烟箱内,每次点 3 支香烟,每天 12 次,每次间隔 1.5h,共计 36 支/d,点燃香烟后关闭箱子,10min 后打开箱子透气(预实验通过高效液相色谱仪检测大鼠被动吸烟 10min 后血液中的尼古丁浓度稳定在 52~173ng/ml,平均 105ng/ml)。非吸烟组远离吸烟区(血液中尼古丁浓度为 2.1~6.6ng/ml,平均 3.8ng/ml)。

1.3 取材及初步处理

各组到达预定时间后采用颈椎脱臼法处死大鼠,尖刀片及眼科剪仔细剥离椎间盘组织,均取 L4/5 椎间盘,10%甲醛固定,20% EDTA 脱钙后石蜡包埋,行椎间盘横向切片,片厚 4 μ m。每个椎间盘切片后随机取 15 张切片备用。

1.4 组织学检查

每个 L4/5 椎间盘取 5 张切片,HE 染色,光镜

下观察。根据 Nishimura 等^[5]椎间盘纤维环退变程度的分级:1 级,纤维环中纤维轻微扭曲,可以见到纤维环的轻度撕裂;2 级,纤维环纤维中等度扭曲,并可见到纤维环撕裂;3 级,纤维环纤维重度扭曲,可见纤维轻微反折畸形;4 级,出现纤维环纤维严重反向折叠轮廓,纤维环撕裂;5 级,椎间盘纤维环撕裂,轮廓模糊不清。

1.5 免疫组织化学检查

每个 L4/5 椎间盘随机取 10 张切片,采用免疫组化 S-P 法检测 IL-1 β 和 IL-1 R I 的表达(各 5 张),具体操作按说明书进行。每张切片常规脱蜡至水,微波修复抗原,3%过氧化氢处理 10min 以抑制内源性过氧化物酶活性,滴加一抗(分别采用博士德公司兔抗鼠 IL-1 β 及 IL-1 R I 多克隆抗体,1:80 稀释),4℃孵育过夜,用生物素标记的二抗处理 15min,DAB 显色,自来水冲洗终止反应,苏木精复染,脱水,透明,封片。用 PBS 代替一抗做阴性对照。每张切片随机观察 5 个高倍视野,HMISA-2000 分析仪照相,细胞浆中出现棕色颗粒为 IL-1 β 阳性表达,细胞膜上出现棕色颗粒为 IL-1 R I 阳性表达。计算 IL-1 β 和 IL-1 R I 染色的阳性细胞率(阳性细胞率=阳性细胞总数/细胞总数×100%)。

1.6 统计学方法

应用 SAS 8.02 软件对各组间 IL-1 β 和 IL-1 R I 阳性细胞率采用单因素方差分析, $P<0.05$ 具有统计学差异, $P<0.01$ 具有显著统计学差异,单因素方差分析的组间两两比较采用 SNK 法。

2 结果

所有大鼠在实验期间全部存活。

2.1 组织学检查结果

非吸烟组大鼠椎间盘组织结构清晰,层次感好(图 1a,后插页 I)。吸烟 2 周组大鼠椎间盘未见明显变化,镜下组织形态大致同非吸烟组。吸烟 4 周组椎间盘 80% 出现 2 级退变,纤维环结构紊乱,大部分椎间盘纤维环的纤维出现中度扭曲,少部分出现重度扭曲现象,局部出现纤维环撕裂情况,前纤维环局部缺失;20% 为 3 级退变。吸烟 8

周组椎间盘 66% 出现 3 级退变, 纤维环中纤维出现重度扭曲以及反转畸形; 33% 为 4 级退变, 出现重度扭曲, 严重的纤维反向折叠, 纤维环撕裂, 局部纤维缺失(图 1b, 后插页 I)。被动吸烟后再停止吸烟 4 周组的大鼠椎间盘仍为 3~4 退变, 与被动吸烟 8 周组对比未见明显修复。停止吸烟 8 周后可见纤维环退变断裂处有不同程度的基质填充, 但纤维环组织结构仍较紊乱, 未完全恢复至正常形态(图 1c, 后插页 I)。

2.2 免疫组化结果

IL-1 β 免疫组化染色: 非吸烟组棕色颗粒少见(图 2a, 后插页 I); 吸烟 2 周组可见棕色颗粒零星分布; 吸烟 4 周组棕色颗粒散在分布; 吸烟 8 周组棕色颗粒呈现较为密集的分布(图 2b, 后插页 I); 停止吸烟 4 周组棕色颗粒仍较多; 停止吸烟 8 周组棕色颗粒散在分布, 较吸烟 8 周明显减少(图 2c, 后插页 I)。IL-1 RI 免疫组化: 非吸烟组未见棕色颗粒存在(3a, 后插页 I); 吸烟 2 周组见有少量棕色颗粒存在; 吸烟 4 周组有少量棕色颗粒零星分布; 吸烟 8 周组有散在棕色颗粒分布(3b, 后插页 I); 停止吸烟 4 周组有棕色颗粒零星分布; 停止吸烟 8 周组见有少量棕色颗粒零星分布(3c, 后插页 I)。

各组 IL-1 β 和 IL-1 RI 的阳性细胞表达率见表 1。随着被动吸烟时间的延长, IL-1 RI 及 IL-1 β 在大鼠椎间盘中的表达也上调; 尤以 IL-1 β 为明显, 各时间点之间比较均有统计学意义, 尤其是前三个时间点之间。

表 1 非吸烟组与吸烟及停止吸烟不同时间组大鼠椎间盘中 IL-1 β 和 IL-1 RI 免疫组化阳性细胞率 (%)

	IL-1 β	IL-1 RI
非吸烟组	7.0 $\pm$ 1.9	0
吸烟 2 周组	26 $\pm$ 1.9 ^①	15 $\pm$ 1.8 ^①
吸烟 4 周组	53 $\pm$ 2.9 ^{①②}	27 $\pm$ 2.4 ^{①②}
吸烟 8 周组	76 $\pm$ 3.2 ^{①②③}	46 $\pm$ 2.8 ^{①②③}
停止吸烟 4 周组	70 $\pm$ 3.4 ^{①②③④}	43 $\pm$ 2.6 ^{①②③④}
停止吸烟 8 周组	66 $\pm$ 2.9 ^{①②③④⑤}	38 $\pm$ 2.2 ^{①②③④⑤}

注: ①与非吸烟组比较 $P<0.01$; ②吸烟 2 周比较 $P<0.01$; ③与吸烟 4 周组比较 $P<0.01$; ④与吸烟 8 周组比较 $P<0.01$; ⑤与停止吸烟 4 周比较 $P<0.01$

3 讨论

3.1 吸烟与椎间盘退变的关系

全球吸烟的绝对人数仍然较庞大, 吸烟对椎间盘退变的影响及其发生机制需要更深入的研究。Nemoto 等^[1-4]研究认为被动吸烟可引起椎间盘退变。在 Nemoto 等的实验中大鼠血中尼古丁浓度为 32~127ng/ml(平均 72ng/ml), 被动吸烟 8 周后, 28% 的椎间盘纤维环出现 1 级退变, 72% 的椎间盘纤维环出现 2 级退变, 同时 Nemoto 等发现被动吸烟 8 周后停止被动吸烟 4 周时即可见到纤维环的修复。Uei 等^[2]在构建大鼠椎间盘被动吸烟模型时发现, 被动吸烟 7 周后纤维环和髓核出现组织学改变, 胶原基因显著下调, 没有发现基质金属蛋白酶-3(MMP-3)表达的明显上升。Ogawa 等^[3]则发现, 大鼠被动吸烟 4 周后核心蛋白上调, MMP-1 的组织抑制因子 4 在被动吸烟 4 周后开始上调; 压力反应蛋白、热休克蛋白 70 在纤维环和髓核中的表达量相近, 酪氨酸磷酸酶基因在纤维环中的表达强于髓核。这是由于被动吸烟刺激髓核和纤维环, 并诱导压力反应基因如热休克蛋白 70 和酪氨酸磷酸酶。Oda 等^[4]的实验发现, 8 周后吸烟组大鼠椎间盘中的 IL-1 β 水平明显高于对照组。

本研究参考 Nemoto 等^[1-4]的方法成功建立了大鼠被动吸烟椎间盘退变模型。实验发现, 从不同时段椎间盘纤维环退变不同程度的比例上看, 吸烟时间越长, 退变的程度就越重, 椎间盘退变的程度与吸烟的时间呈正相关。Nemoto 等^[1]发现被动吸烟 8 周后再停止吸烟 4 周就出现椎间盘的部分修复, 而本实验中停止吸烟 4 周时未见椎间盘纤维环有明显的基质填充; 停止被动吸烟 8 周时发现有关基质填充纤维环撕裂部分, 即纤维环出现部分修复。其原因可能是纤维环修复所需的时间可能与退变程度相关, 退变程度越重, 修复所需时间越长。本试验中大鼠血中尼古丁浓度和同期椎间盘纤维环退变程度均强于 Nemoto 等^[1]研究的 32~127ng/ml, 平均 72ng/ml。停止吸烟 8 周后可见椎间盘撕裂处有基质填充, 提示椎间盘撕裂后有一定的自主可修复性, 但是只有部分修复, 难于完全修复, 可能原因是细胞数量太少, 不能降解并替换损伤的胶原等组织, 破裂不能像骨组织那样可以重建^[6]。

3.2 吸烟诱导椎间盘退变的机制

吸烟诱导椎间盘退变可能与以下几种因素有关: ①收缩血管直接减少椎间盘周边的血供, 进而

影响椎间盘内的细胞代谢,以及尼古丁对椎间盘组织的直接作用^[4];②吸烟影响椎间盘内营养代谢物质的运输,有研究表明被动吸烟 20~30min 后溶质运输效率明显降低,代谢产物乳酸聚集,无氧环境下的细胞反映硫酸盐 ^{35}S 、甲基葡萄糖 ^3H 和氧的摄取率下降。由于吸烟影响溶质运输率,营养物质不能进入椎间盘,代谢物质不能排出。随着吸烟时间的积累,将导致椎间盘营养不足,细胞功能不良,酶的降解促进椎间盘的退变^[7];③减少蛋白多糖和胶原的合成^[8]。被动吸烟过程中烟气中的各种化学成分如:一氧化碳、尼古丁等生物碱、胺类、腈类、醇类、酚类、烷烃、烯烃、羰基化合物、氮氧化物等对椎间盘组织细胞的毒性作用也不可忽视^[9]。另外,损伤的椎间盘也表现出分解代谢因子的增加,如 MMPs^[10]。

IL-1 家族信号系统参与调控与椎间盘退变相关的多种生物化学因子,在椎间盘退变的发生过程中具有重要意义^[11-15],如 IL-1 α 能增加 MMPs 的生成而引起椎间盘基质中蛋白多糖的降解。IL-1 β 的作用有:①激活一些 MMP 酶原;②增加 MMP-3 的表达;③增加 IL-6 的分泌;④增加 NO 的产生;⑤抑制蛋白多糖的聚集;⑥促进 PGE2、PLA2 分泌;⑦抑制 TIMPs。以上 7 点均与椎间盘退变过程直接相关。因此 IL-1 β 也被作为椎间盘退变相关研究的干预因素^[16]。本研究发现,随着被动吸烟时间的延长,IL-1R I 及 IL-1 β 在大鼠椎间盘中的表达也上调,尤以 IL-1 β 为明显,各时间点之间比较均有统计学意义,尤其是前三个时间点之间。说明 IL-1R I 及 IL-1 β 可能在被动吸烟诱导大鼠椎间盘退变的过程中发挥重要作用。

4 参考文献

- Nemoto Y, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al. Histological changes in intervertebral discs after smoking and cessation: experimental study using a rat passive smoking model [J]. J Orthop Sci, 2006, 11(2): 191-197.
- Uei H, Matsuzaki H, Oda H, et al. Gene expression changes in an early stage of intervertebral disc degeneration induced by passive cigarette smoking [J]. Spine, 2006, 31(5): 510-514.
- Ogawa T, Matsuzaki H, Uei H, et al. Alteration of gene expression in intervertebral disc degeneration of passive cigarette-smoking rats: separate quantitation in separated nucleus pulposus and annulus fibrosus [J]. Pathobiology, 2005, 72(3): 146-151.
- Oda H, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model [J]. J Orthop Sci, 2004, 9(2): 135-141.
- Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus: an experimental study [J]. Spine, 1998, 23(14): 1531-1539.
- Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: Involvement of the extracellular matrix [J]. Spine, 2004, 29(23): 2691-2699.
- An HS, Silveri CP, Simpson MJ, et al. Comparison of smoking habits between patients with surgically confirmed herniated lumbar and cervical disc disease and controls [J]. J Spinal Disord, 1994, 7(5): 369-373.
- Uematsu Y, Matsuzaki H, Iwahashi M. Effects of nicotine on the intervertebral disc: an experimental study in rabbits [J]. J Orthop Sci, 2001, 6(2): 177-182.
- 李丁梅. 烟草中的化学成分及临床研究 [J]. 职业与健康, 2006, 22(11): 816-817.
- Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2 [J]. Spine, 1996, 21(3): 271-277.
- Jimbo K, Park J S, Yokosuka K, et al. Positive feedback loop of interleukin-1 β upregulating production of inflammatory mediators in human intervertebral disc cells in vitro [J]. J Neurosurg Spine, 2005, 2(5): 589-595.
- Wallace JL. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005, 100(Suppl 1): 5-9.
- Tsuzaki M, Guyton G, Garrett W, et al. IL-1 β induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 β and IL-6 in human tendon cells [J]. J Orthop Res, 2003, 21(2): 256-264.
- Le MC, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(4): 732-745.
- Aida Y, Maeno M, Suzuki N, et al. The effect of IL-1 β on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes [J]. Life Sci, 2005, 77(25): 3210-3221.
- 熊晓芊, 杨述华, 邵增务, 等. 烟酰胺对椎间盘聚集蛋白聚糖的调控作用 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2005, 13(5): 1-4.
- Le MC, Freemont AJ, Hoyland JA. A preliminary in vitro study into the use of IL-1Ra gene therapy for the inhibition of intervertebral disc degeneration [J]. Int J Exp Pathol, 2006, 87(1): 17-28.

(收稿日期: 2007-08-24 修回日期: 2008-06-12)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)