

硬膜外腔植入髓核对大鼠脊髓背根神经节 TNF- α 和 IL-1 表达的影响*

张挺杰¹ 倪家骧¹ 张春雷¹ 李娟红¹ 于翠萍¹

摘要 目的:观察硬膜外腔植入异体髓核对大鼠 L6-S1 脊髓背根神经节细胞 TNF- α 和 IL-1 表达的影响, 以期为椎间盘源性疼痛发病机制提供细胞生物学基础。方法:雄性 SD 大鼠(体重 260—280g)随机分为 4 组:脂肪+生理盐水组(FS 组)、脂肪+胶原酶组(FE)、髓核+生理盐水组(NS)、髓核+胶原酶组(NE 组), 每组 6 只。术后第 15 天取 L6-S1 脊髓背根神经节, 采用免疫组织化学染色方法观察髓核对背根神经节细胞炎性介质 TNF- α 和 IL-1 表达的影响。结果:术后 15 天 FE 组大鼠与 FS 组相比, 背根神经节细胞 TNF- α 表达差异没有显著性意义($P>0.05$); NS 组与 FE 组相比背根神经节细胞 TNF- α 表达显著增加 ($P<0.05$); NE 组与 NS 组相比背根神经节细胞 TNF- α 表达显著降低 ($P<0.05$), 接近于 FS 组水平($P>0.05$)。IL-1 在各组大鼠背根神经节中未染色。结论:硬膜外腔植入异体髓核可引起背根神经节细胞 TNF- α 表达增加。

关键词 髓核; 背根神经节; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1

中图分类号: R681.5, R49 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-1242(2007)-10-0897-02

Effect of nucleus pulposus allografted into epidural space on the expressions of TNF- α and IL-1 in rat's dorsal root ganglion neurons/ZHANG Tingjie, NI Jiexiang, ZHANG Chunlei, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(10): 897—898

Abstract Objective: To observe the effect of nucleus pulposus allografted into the epidural space on the expressions of TNF- α and IL-1 in rat's DRG neurons, so as to provide theoretical evidence for discogenic pain. **Method:** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups with 6 rats in each: fat + nature saline group(FS group), fat+collagenase group (FE group), nucleus pulposus + nature saline group(NS group), and nucleus pulposus+collagenase group (NE group). The allografted fat and nucleus pulposus were provided by other 8 male SD rats. 15 days after surgery, the L6-S1 DRGs were separated, and the expressions of TNF- α and IL-1 in DRGs were detected by using immunohistochemistry method. **Result:** 15 days after surgery, the expressions of TNF- α in DRGs in NS group was stronger than FE group ($P<0.05$); but the expressions of TNF- α in NE group was less than NS without significant difference compared with FS group ($P>0.05$). **Conclusion:** Nucleus pulposus allografted into the epidural space can increase the TNF- α expressions in rat's DRG.

Author's address Dept. of Pain Medicine, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing, 100053

Key words nucleus pulposus; dorsal root ganglion; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1

椎间盘突出可引发根性神经痛, 其发生机制主要包括椎间盘直接压迫神经根和继发的免疫炎症反应导致神经根炎, 目前认为, 后者在椎间盘原发性疼痛中发挥更为重要的作用。本研究通过硬膜外腔植入异体髓核, 观察脊髓背根神经节细胞炎性细胞因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 IL-1 的表达, 为椎间盘原发性疼痛的机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠(由北京大学医学部实验动物科学部提供)32 只, 体重 260—280g, 随机分为 4 组: 脂肪+生理盐水组(FS 组)、脂肪+胶原酶组(FE 组)、髓核+生理盐水组(NS 组)和髓核+胶原酶组

(NE 组), 每组 6 只。另外 8 只雄性 SD 大鼠用来提供异体脂肪和髓核组织。

1.2 动物模型的制作

动物按 400mg/kg 体重 100g/L 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 做背侧中线 40—50mm 纵行切口, 暴露 L6-S1 棘突, 钝性分离两旁骶脊肌, 切除 S1 棘突, 清晰暴露 L6-S1 两侧关节突关节和椎孔, 用显微钳钝性分离硬膜暴露硬膜外腔, 根据实验分组, 分别于硬膜外腔植入异体脂肪(约 3—4mg)+生理盐水(20 μ l), 异体脂肪(约 3—4mg)+胶原酶(20 μ l, 125

* 基金项目: 北京市科技计划项目(Y0204003040631)

¹ 首都医科大学宣武医院疼痛诊疗科, 100053

作者简介: 张挺杰, 男, 医学博士后, 副主任医师

收稿日期: 2007-01-04

万 U/ml), 异体髓核(约 3—4mg)+生理盐水(20 μ l), 异体髓核(约 3—4mg)+胶原酶(20 μ l, 125 万 U/ml), 然后逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤。所有植入物在放入硬膜外腔前搅拌至糊状, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 3h。

1.3 异体脂肪和髓核的采集和植入

大鼠深麻后处死, 取腹膜外脂肪和尾椎间盘髓核, 根据实验分组分别植入大鼠硬膜外腔。

1.4 标本制备

4 组实验组大鼠术后 15 天, 在水合氯醛腹腔注射深度麻醉后, 开胸暴露心脏, 在心尖处剪一小口, 用灌注针穿刺入主动脉, 同时剪开右心耳引流。先用 200ml 生理盐水灌注冲洗, 然后用 4% 多聚甲醛缓冲液 200ml 灌注固定。手术解剖右侧 L6-S1 椎间孔, 取出背根神经节放入 4% 多聚甲醛缓冲液固定。

1.5 指标检测

标本石蜡包埋, 顺序切片, 厚度为 5 μ m, 采用免疫组织化学方法测定背根神经节 TNF- α 和 IL-1 表达, 黄褐色为阳性表达。

1.6 主要试剂

大鼠抗 IL-1 β 抗体 (503503, BioLegend); 兔抗 TNF- α 多克隆抗体 (BA0131, 武汉博士德生物工程有限公司)。

1.7 图像分析

所有切片在显微镜下拍照, 采用 Axioplan 2 imaging 系统 (ZEISS, 德国), Axiocam 数码相机分辨率 1200 万 (3900 \times 1590) 像素进行图像分析。分析过程: ①输图; ②图像增强: 阴影校正和对比度增强, 选择测量区域; ③图像分隔: 设定阳性辉度阈值, 计算机自动识别, 最后画面整理; ④结果分析: 根据阳性面积占整个测量面积百分比, 计算出阳性率。

1.8 统计学分析

计量资料表示为均数 \pm 标准差, 采用 SPSS11.0 软件进行统计分析。组间比较单因素 ANOVA 方差分析, 运用 GLM 过程, $P < 0.05$ 差异有显著性意义。

2 结果

2.1 背根神经节 TNF- α 表达

术后 15 天 FE 组大鼠与 FS 组相比, 背根神经节细胞 TNF- α 表达差异无显著性 ($P > 0.05$); NS 组与 FE 组相比背根神经节细胞 TNF- α 表达显著增加 ($P < 0.05$), 阳性染色多见于大、中体积细胞; NE 组与 NS 组相比背根神经节细胞 TNF- α 表达显著降低 ($P < 0.05$), 接近 FS 组水平 ($P > 0.05$)。FS 组 7% \pm 5%; FE 组 5% \pm 3%; NS 组 36% \pm 13%; NE 组 11% \pm 6% (图 1, 见前置彩色插页 8)。

2.2 背根神经节 IL-1 表达

各组大鼠背根神经节 IL-1 未见阳性染色 (图 2, 见前置彩色插页 8)。

3 讨论

目前认为, 腰椎间盘突出对神经根的机械性压迫不是引起根性疼痛和功能异常的唯一原因^[1]。动物实验显示, 髓核植入硬膜外腔可产生神经根炎, 导致神经传导速度的降低、轴索水肿和神经膜细胞的变化及痛觉过敏^[2-3]。

背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 是躯体初级感觉神经元细胞体的聚集处, 是伤害性感受处理的初级中枢, 由大小不同、电生理特征各异的大、中和小神经元组成。一般来说, 直径较大的神经元主要是非伤害性感受的 A δ 和 A β 纤维, 而直径较小的神经元则为伤害性感受的 A δ 和 C 类纤维^[4-5]。

但髓核引发的神经根炎症是否会造成背根神经节细胞内部的炎症变化未见报道。TNF- α 和 IL-1 是两种重要的炎性细胞因子, 参与多种组织的损伤和免疫炎症反应。Onda A 等^[6]研究显示, 抗 TNF- α 抗体可部分逆转髓核诱发的背根神经节细胞伤害性放电。Olmaker K 等^[7]研究发现, TNF- α 参与了髓核引发的脊神经根结构和功能变化。Hiroshi T 等^[8]运用放射免疫法和酶联免疫吸附法发现, 在人的椎间盘突出周围组织中 IL-1、IL-6 和 TNF- α 含量增加。

本研究通过把异体髓核组织植入大鼠硬膜外腔, 观察其对脊髓背根神经节细胞 TNF- α 和 IL-1 表达的影响, 旨在探讨髓核引发根性神经痛的机制。结果发现, 术后 15 天, 异体髓核植入硬膜外腔可引起大鼠相应背根神经节 TNF- α 表达增加, 而脂肪植入却没有这种变化, 说明髓核物质是导致背根神经节 TNF- α 表达增加的物质; 同时, 为了验证髓核中的胶原蛋白在引发 TNF- α 表达中的作用, 我们在髓核植入前用胶原酶对其进行孵化处理, 发现髓核引发的 TNF- α 表达效应消失, 提示髓核中的胶原蛋白是造成背根神经节 TNF- α 表达增加的物质基础。目前在临床上开展了微创介入方法治疗腰椎间盘突出症, 胶原酶溶盘术取得了很好的效果。本研究结果对该项技术的临床应用提供了理论支持。关于 IL-1 在各组大鼠背根神经节中未染色可能存在两种情况: ①IL-1 不适于免疫组化分析; ②IL-1 没有参与髓核引发的背根神经节细胞内部病理生理变化过程, 还有待于进一步研究。

(下转 903 页)