

TNF- α 和 PGP9.5 在椎间盘源性腰痛患者 椎间盘 MRI 高信号区中的表达

任东风,侯树勋,吴文闻,商卫林

(解放军总医院第一附属医院骨科 全军骨科研究所 100037 北京市)

【摘要】目的:探讨肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和蛋白基因产物 9.5(PGP9.5)与腰椎间盘突出 MRI 高信号的关系。**方法:**26 例经椎间盘造影诊断的椎间盘源性腰痛患者,男 16 例,女 10 例,年龄 26~65 岁,疼痛源性椎间盘 MRI T2 像均可见高信号区(HIZ 区),均行手术治疗,取手术切除的椎间盘组织行 TNF- α 和 PGP9.5 免疫组化染色观察,并与 4 例脊柱侧凸患者矫形手术时取出的椎间盘组织进行对比。**结果:**椎间盘源腰痛患者椎间盘 HIZ 区对应部位的椎间盘组织表现为血管化肉芽组织和不同退变程度的髓核,可见大量增生的软骨样细胞和血管内皮细胞,免疫组化染色均可观察到 TNF- α 免疫染色阳性细胞和 PGP9.5 免疫阳性细胞;对照组没有观察到 TNF- α 免疫染色阳性细胞和 PGP9.5 免疫染色阳性细胞。HIZ 区 TNF- α 免疫阳性细胞明显多于 HIZ 区周边纤维环组织和对照组($P<0.05$),PGP9.5 免疫阳性细胞亦明显多于 HIZ 区周边纤维环组织和对照组($P<0.05$)。**结论:**椎间盘源性腰痛患者腰椎间盘突出 MRI 的 HIZ 区中有大量 TNF- α 免疫阳性细胞和 PGP9.5 免疫阳性细胞表达,其可能是 HIZ 作为致痛源性椎间盘特异性影像标志物的基础。

【关键词】椎间盘源性腰痛;高信号区;磁共振成像;肿瘤坏死因子- α ;蛋白基因产物 9.5;免疫组化

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.10.04

中图分类号:R681.5,R445.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-10-0725-04

The express of tumor necrosis factor- α and protein gene product 9.5 in the lumbar disc displayed the high intensity zone on MRI/REN Dongfeng,HOU Shuxun,WU Wenwen,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2009,19(10):725-728

【Abstract】Objective:To observe the association of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and protein gene product 9.5(PGP9.5) with the high intensity zone(HIZ) of the lumbar disc on MRI.**Method:**26 cases with discogenic back pain diagnosed by discography showed high intensity zone (HIZ) on T2 MRI in lumbar intervertebral disc,there were 16 males and 10 females,aged from 26-65 years.All cases underwent surgical treatment and discs were harvested during surgery.Disc samples were immunostained using antibodies to TNF- α and PGP9.5,which were compared with controls requiring surgery for scoliosis ($n=4$).**Result:**The histologic study of the consecutive sagittal slices of the HIZ showed vascularized granulation tissue and degenerated nucleus pulposus,a lot of proliferated small round cells and fibroblasts presented,blood proliferation and inflammatory cells infiltration were also seen.TNF- α and PGP9.5 immunostain positive cells were found in the experimental group and not found in the control group.The number of TNF- α and PGP9.5 immunostain positive cells were significantly higher in HIZ than that in the annulus fibrosus around HIZ and that of the control group ($P<0.05$).**Conclusion:**High TNF- α and PGP9.5 expression in HIZ on MRI in the annulus fibrosus of patients with low back pain may indicate the inflammation mechanism for HIZ as specificity sign of painful disc on MRI.

【Key words】Discogenic low back pain;High intensity zone;MRI;TNF- α ;PGP9.5;Immunohistochemistry

【Author's address】 Department of Orthopaedics,the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese People's Liberation Army,Beijing,100037,China

正常椎间盘仅在纤维环的外层有感觉神经

纤维分布,但在慢性腰痛患者神经纤维可出现在椎间盘髓核和纤维环内层^[1-3]。神经内生长可能是椎间盘源性腰痛潜在的病理神经解剖基础。MRI 作为一种无创的检查手段,已被用于椎间盘疾病的

第一作者简介:男(1972-),副主任医师,研究方向:腰痛的基础与临床研究

电话:(010)66867350 E-mail:stonedance@126.com

诊断。高磁场 MRI T2 矢状位像上纤维环后部高信号区(high-intensity zone, HIZ)已被用来提示致痛性椎间盘。HIZ 代表纤维环的炎症、纤维环撕裂和/或血管肉芽组织^[3-6]。我们拟通过免疫组化染色观察椎间盘源性腰痛患者手术切除包括 HIZ 部位组织的肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和蛋白基因产物 9.5 (protein gene product 9.5, PGP9.5) 的表达, 以进一步明确 HIZ 作为致痛性椎间盘特异性影像标志物的炎性机制基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

26 例腰痛患者, 男 16 例, 女 10 例; 年龄 26~65 岁, 平均 47.5 岁。其中腰椎间盘突出症 18 例, 腰椎管狭窄症 8 例。病程 14 周~22 年, 平均 4.13 年。采用德国 Siemens 公司生产的 1.5T 超导型磁共振成像仪行腰椎 MRI 检查, 矢状面层厚 3mm, 横断面层厚 4mm。HIZ 的评定标准^[3]: 局限于纤维环内的高亮度信号, 与髓核相隔离, 比髓核的信号略高。在腰椎 MRI T2 像矢状面像上所有患者均有椎间盘后外侧纤维环上出现 HIZ (图 1、2), L5/S1 14 个, L4/5 10 个, L3/4 2 个。

每例患者术前均行 L3/4、L4/5 和 L5/S1 3 个腰椎间盘造影, 在推注造影剂时, 患者诉说疼痛相似于平时的腰痛或准确复制了平时的腰痛或牵涉痛, 则为一致性疼痛; 否则为非一致性疼痛, 无痛和非一致性疼痛为椎间盘造影阴性。26 例患者腰椎间盘造影均复制出一一致性疼痛。造影阳性节段与 HIZ 节段一致。所有病例均行 PLIF 手术。手术



图 1 腰椎矢状位 MRI T2 像上可见 L4/5 椎间盘后方高信号区(HIZ) 图 2 椎间盘造影后 CT 扫描显示纤维环撕裂

节段为复制出一一致性疼痛的节段。术中根据腰椎 MRI T2 的矢状面和横断面图像定位 HIZ 部位, 使切除的椎间盘标本包含 HIZ, 还包括后纵韧带、纤维环和部分髓核, 大小约 5×6mm。

4 例脊柱侧凸患者作为对照, 年龄 10~18 岁, 平均 14 岁。术前 MRI 显示椎间盘正常, 在行矫形手术时需切除椎间盘, 取 L3/4 和 L4/5 节段椎间盘组织。

1.2 免疫组化染色和观察方法

标本切取后, 立即用 10% 甲醛固定。常规石蜡包埋, 间隔 250 μ m 轴状位连续切片, 片厚 4 μ m。每个标本分别间隔取 3 个切片作 HE 染色形态学检查和 TNF- α 及 PGP9.5 免疫组化染色。

切片脱蜡、水化(二甲苯脱蜡后, 按 100%、95%、80%、70% 乙醇逐级脱水), PBS 洗 2 次各 10min, 3% H_2O_2 滴加在 TMA 上, 室温下静置 10min, PBS 洗 2~3 次各 5min, 抗原修复(微波处理进行抗原修复), PBS 洗 2~3 次各 5min, 滴加 1% BSA 封闭液, 室温 20 min。甩去多余液体。滴加 PGP9.5 抗体 50 μ l (1:400, 鼠抗 PGP9.5 单克隆抗体, 福建 Maixin 公司) 或滴加 TNF- α 抗体 50 μ l (1:400, 鼠抗 TNF- α 抗体单克隆抗体, 福建 Maixin 公司), 室温静置 1h, PBS 洗 3 次各 5min, 1:200 生物素标记的羊抗小鼠 IgG 40~50 μ l 用于 PGP9.5 抗体或 TNF- α 抗体处理切片, 室温静置 30min; PBS 洗 3 次各 5min; DAB 显色 5~10min, 在显微镜下掌握染色程度, PBS 冲洗 10min, 苏木精复染 2min, 脱水, 封片。设阴性对照, 不加特异性一抗。阳性产物均成棕黄色颗粒状。高倍镜($\times 400$)下, 采用目镜网格测微器(5/25)随机观察 5 个不同视野, 按照每一视野 0.015625mm² 的面积计算每平方毫米组织中的 TNF- α 和 PGP9.5。

1.3 统计学处理

记录各组数据, 以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示, 进行组间方差分析。在 SPSS 11.0 软件上进行, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

组织学观察显示, 椎间盘源性腰痛患者 HIZ 对应部位椎间盘组织表现为血管化肉芽组织和不同退变程度的髓核, HIZ 区出现大量增生的软骨样细胞和血管内皮细胞(图 3)。对照组为正常椎间盘组织染色。

椎间盘源性腰痛患者切除的椎间盘组织中均可观察到 TNF- α 免疫染色阳性细胞(图 4), 对照组没有观察到 TNF- α 免疫染色阳性细胞(图 5)。在 HIZ 区表达大量的 TNF- α 免疫阳性细胞, 主要是软骨样细胞, 而 HIZ 区周围纤维环中 TNF- α 免疫阳性细胞表达较少(图 6)。HIZ 区 TNF- α 免疫阳性细胞明显多于 HIZ 区周边纤维环组织 (表 1)。

椎间盘源性腰痛患者切除的椎间盘组织中均可观察到 PGP9.5 免疫染色阳性细胞(图 7), 对照组没有观察到 PGP9.5 免疫染色阳性细胞(图 8)。在 HIZ 有大量的 PGP9.5 免疫阳性细胞, 而在 HIZ 周围纤维环 PGP9.5 免疫阳性细胞较少 (图 9), HIZ 的 PGP9.5 免疫阳性细胞明显多于 HIZ 周边纤维环组织(表 1)。

3 讨论

Aprill 和 Bogduk^[4]首先注意到纤维环放射状

表 1 椎间盘源腰痛患者 MRI 高信号腰椎间盘不同区域中 TNF- α 和 PGP9.5 阳性细胞密度 ($\bar{x} \pm s$)

	TNF- α 密度均值 (TNF- α /mm ²)	PGP9.5 密度均值 (PGP9.5/mm ²)
HIZ 区	649.6 $\pm$ 98.6	635.8 $\pm$ 77.5
HIZ 区周围	321.8 $\pm$ 109.4 ^①	233.5 $\pm$ 89.7 ^①

注: ①与 HIZ 区比较 $P < 0.05$

撕裂在高磁场 MRI T2 矢状位像上表现为纤维环后部的高信号区, 周围被低信号密度区包围, 信号强度与髓核信号接近或稍高。在椎间盘造影中出现一致疼痛和 MRI 上的 HIZ 有关。他们认为 HIZ 可能是有价值的疼痛破裂椎间盘的标志, 代表达拉斯椎间盘造影分级系统 4 级破裂^[4-5]。Lee 等^[6]认为, HIZ 代表继发于纤维环的炎症。彭宝淦等^[3]的研究发现, 对应于 HIZ 部位的椎间盘组织表现为沿着纤维环裂隙形成的不同程度的血管化肉芽组织, 有成熟的瘢痕化胶原组织, 也有新鲜的血管、肉芽组织。本研究结果与彭宝淦等的研究发现相

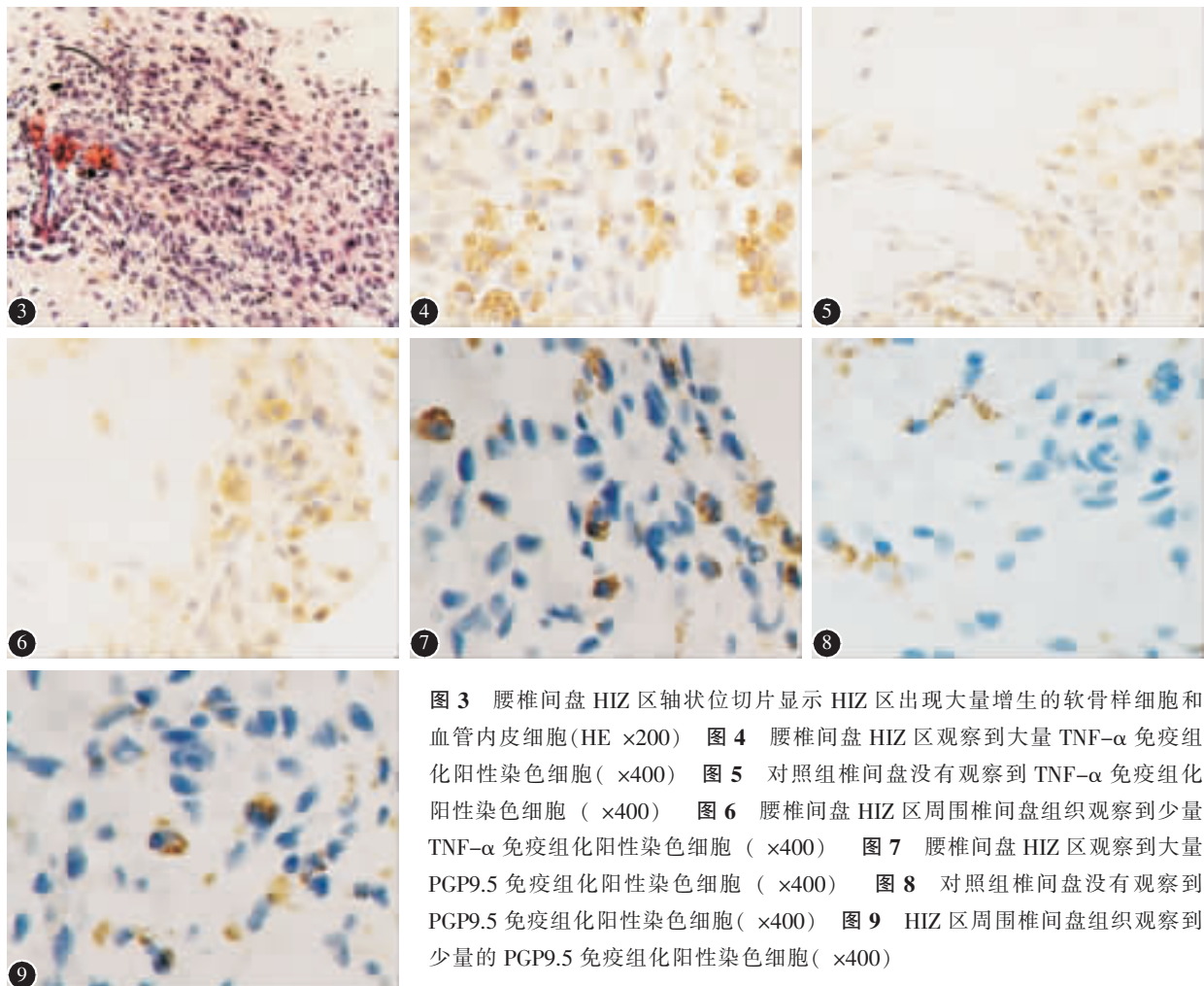


图 3 腰椎间盘 HIZ 区轴状位切片显示 HIZ 区出现大量增生的软骨样细胞和血管内皮细胞(HE $\times 200$) 图 4 腰椎间盘 HIZ 区观察到大量 TNF- α 免疫组化阳性染色细胞 ($\times 400$) 图 5 对照组椎间盘没有观察到 TNF- α 免疫组化阳性染色细胞 ($\times 400$) 图 6 腰椎间盘 HIZ 区周围椎间盘组织观察到少量 TNF- α 免疫组化阳性染色细胞 ($\times 400$) 图 7 腰椎间盘 HIZ 区观察到大量 PGP9.5 免疫组化阳性染色细胞 ($\times 400$) 图 8 对照组椎间盘没有观察到 PGP9.5 免疫组化阳性染色细胞 ($\times 400$) 图 9 HIZ 区周围椎间盘组织观察到少量的 PGP9.5 免疫组化阳性染色细胞 ($\times 400$)

似, HIZ 对应部位椎间盘组织表现为血管化肉芽组织和不同退变程度的髓核, HIZ 区出现大量增生的软骨样细胞和血管内皮细胞, 这可能是椎间盘纤维环出现裂隙后反复修复的结果。

目前认为椎间盘源性腰痛的病理机制主要包括机械和化学机制。神经末梢或伤害感受器受到刺激是疼痛产生的神经病理基础。有害的化学物质如 TNF- α 、IL-1、IL-6、NO 和磷脂酶 A2, 已经在突出的椎间盘和退变椎间盘中发现, 这些促炎介质接触纤维环外 1/3 部分神经末梢是腰痛产生的重要原因^[9]。椎间盘髓核细胞可分泌促炎因子, 如 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 等。TNF- α 在腰腿痛症状的发生中起重要作用, 特别是椎间盘突出症患者。髓核细胞分泌的 TNF- α 可激发神经根的病理改变, 包括神经水肿、脱髓鞘、激活巨噬细胞等, 引起神经根性疼痛^[7,8]。我们的研究发现, 在 HIZ 区软骨样细胞表达大量的 TNF- α 免疫阳性细胞, 而在周围纤维环和正常椎间盘中表达很少量的 TNF- α 免疫阳性细胞。椎间盘源性腰痛患者疼痛源性椎间盘组织中均观察到 TNF- α 免疫染色阳性细胞, 说明退变椎间盘细胞可产生 TNF- α 。HIZ 区表达大量的 TNF- α 免疫阳性细胞, 说明 HIZ 区的炎症反应可能参与椎间盘源性腰痛的产生。

正常椎间盘仅仅纤维环的外层分布感觉神经纤维, 而慢性腰痛患者的神经纤维出现在椎间盘髓核和纤维环内层。神经纤维如何内生长到椎间盘内, 是近年来的一个研究热点。神经内生长可能是椎间盘源性腰痛潜在的致病机制。椎间盘内的压力降低和蛋白多糖内容物减少, 均可促使神经血管内生长^[9-11]。

PGP9.5 是一种神经元特异蛋白, 标准的免疫组化技术显示 PGP9.5 染色阳性反应表达在中枢神经和外周神经系统的神经元和神经纤维上^[11]。我们的研究发现, 在椎间盘 HIZ 区表达大量的 PGP9.5 免疫阳性细胞, 而在 HIZ 区周围椎间盘组织中表达量较少。说明在 HIZ 区出现神经内生长, HIZ 区的炎症反应可能刺激这些神经纤维引起腰痛。这可能也是炎症引起腰痛的一个重要机制。在 HIZ 区炎症是否引起神经内生长, 将是今

后一个研究重点。

4 参考文献

1. Johnson WEB, Evans H, Menage J, et al. Immunohistochemical detection of Schwann cells within innervated and vascularized human intervertebral discs[J]. Spine, 2001, 26(23): 2550-2557.
2. Freemont AJ, Watkins A, Maitre CL, et al. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc[J]. J Pathol, 2002, 197(11): 286-292.
3. Peng BG, Wu WW, Hou SX, et al. The pathogenesis of discogenic low back pain[J]. J Bone Joint Surg Br, 2005, 87(1): 62-67.
4. Aprill C, Bogduk N. High-intensity zone: a diagnostic sign of painful lumbar disc on magnetic resonance imaging [J]. Brit J Rad, 1992, 773(65): 361-369.
5. Lam KS, Carlin D, Mulholland RC. Lumbar disc high-intensity zone: the value and significance of provocative discography in the determination of the discogenic pain source [J]. J Eur Spine, 2000, 9(1): 36-41.
6. Lee KS, Doh JW, Bae HG, et al. Diagnostic criteria for the clinical syndrome of internal disc disruption: are they reliable [J]? Br J Neurosurg, 2003, (11), 17: 19-23.
7. Seguin CA, Pilliar RM, Roughley PJ, et al. Tumor necrosis factor- α modulates matrix production and catabolism in nucleus pulposus tissue[J]. Spine, 2005, 30(17): 1940-1948.
8. Weiler C, Nerlich AG, Bachmeier BE, et al. Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls[J]. Spine, 2005, 30(1): 44-53.
9. Yasuchika A, Seiji O, Hidetoshi I. Disc inflammation potentially promotes axonal regeneration of dorsal root ganglion neurons innervating lumbar intervertebral disc in rats[J]. Spine, 2007, 29(23): 2621-2626.
10. Yasuchika A, Koji A, Howard A, et al. Nerve fiber ingrowth into scar tissue formed following nucleus pulposus extrusion in the rabbit annular-puncture disc degeneration model: effects of depth of puncture[J]. Spine, 2007, 31(21): 774-780.
11. Leslie TA, Emson PC, Dowd PM, et al. Nerve growth factor contributes to the up-regulation of growth-associated protein 43 and preprotachykinin A messenger RNAs in primary sensory neurons following peripheral inflammation [J]. Neuroscience, 1995, 67(35): 753-761.

(收稿日期: 2009-07-15 修回日期: 2009-09-07)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)