

破裂型椎间盘突出动物模型中自身免疫反应的实验研究

刘 成, 寿康全, 付纳新, 李 坚, 黄 晖

(葛洲坝中心医院骨外科 443002 湖北省宜昌市)

【摘要】目的:从动物实验的角度探讨破裂型椎间盘突出动物模型中的自身免疫反应。**方法:**20 只 SD 大鼠分为两组,实验组采用自体髓核移植于坐骨神经旁的方法建立破裂型椎间盘突出动物模型(坐骨神经痛模型);对照组大鼠手术方法同实验组,但不放置髓核。术前及术后 1、2、3 周时采用爬坡实验及后肢机械缩爪阈值测定评估大鼠造模前后后肢运动能力及痛觉过敏的变化。术后 3 周时处死动物应用透射比浊法检测大鼠血清中免疫球蛋白 IgG、IgM 的含量,ELISA 法测定血清中 TNF- α 、IL-6、IL-12 的含量;采用免疫组化染色观察移植髓核中抗原抗体复合物沉积情况;应用 BCA 蛋白定量法观察坐骨神经中磷脂酶 A2(PLA2)的活性。**结果:**所有大鼠模型建立前爬坡试验结果均为 IV 级,造模后对照组爬坡试验仍为 IV 级,实验组在造模后 1、2 及 3 周时爬坡试验均为 III 级。实验组大鼠造模后 1、2、3 周时的后肢机械缩爪阈值分别为 67.2 ± 8.4 、 41.3 ± 5.2 及 40.7 ± 5.3 mmHg,较术前(90.4 ± 5.0 mmHg)及对照组明显降低($P < 0.01$),出现较为明显的痛觉过敏。术后 3 周实验组大鼠血清中 IgG 含量 4.98 ± 0.96 g/L 及 IgM 含量 1.45 ± 0.37 g/L 较对照组(4.31 ± 0.77 g/L 及 0.79 ± 0.35 g/L)明显上升($P < 0.05$);血清中 TNF- α 、IL-6、IL-12 的含量(205.77 ± 46.32 pg/L, 186.4 ± 87.3 pg/L, 69.23 ± 27.46 pg/L)较对照组(11.01 ± 2.53 pg/L, 85.0 ± 13.2 pg/L, 21.65 ± 11.93 pg/L)均明显升高($P < 0.05$)。实验组大鼠移植髓核中出现抗原抗体复合物阳性沉积,阳性率为 80%,明显高于对照组($P < 0.01$);其坐骨神经中 PLA2 活性为 0.0766 ± 0.0039 μ mol/(min·L),较对照组 0.0006 ± 0.0010 μ mol/(min·L)明显升高($P < 0.05$)。**结论:**破裂型椎间盘突出动物模型中存在着由移植髓核引起的全身及局部异常的自身免疫反应,这可能是导致其疼痛的主要原因。

【关键词】坐骨神经痛模型;自身免疫;抗原抗体复合物;细胞因子

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.01.13

中图分类号:R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2013)-01-0061-05

Experimental study on the abnormal autoimmunity in the model of ruptured lumbar disc herniation/LIU Cheng, SHOU Kangquan, FU Naxin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(1): 61-65

【Abstract】Objectives: To investigate the abnormal autoimmunity in the model of ruptured lumbar disc herniation. **Methods:** 20 SD rats were divided into experimental group and control group, a lumbar disc herniation model without mechanical pressure (sciatica model) was established on Sprague Dawley rat by putting nucleus pulposus near the nerve root. The mechanical withdrawal thresholds of posterior limbs and slope-climbing test were measured at preoperation and 1, 2, 3 weeks after operation. 3 weeks later, the rats were sacrificed, and the immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) in serum were examined by turbidimetry. The presence and distribution of antigen-antibody complexes in nucleus pulposus were examined by immunohistochemical method. And the levels of cytokine TNF- α , IL-6, IL-12 were detected by enzyme linked immunosorbent assay, and the BCA method was used to analyze the activity of PLA2 in the sciatic nerve. **Results:** Before model establishment, all rats had IV grade slope-climbing, after surgery, the rats in experimental group had III grade slope-climbing, while the rats in control group maintained IV grade slope-climbing. After the model establishment, the mechanical withdrawal thresholds of posterior limbs significantly decreased (from 40.7 ± 5.3 mmHg to 90.4 ± 5.0 mmHg, $P < 0.01$), the levels of IgG and IgM in serum elevated significantly

第一作者简介:男(1971),副主任医师,研究方向:脊柱外科

电话:(0717)6722885 E-mail:jimmy9240@sina.com

($4.98 \pm 0.96 \text{ g/L}$ and $1.45 \pm 0.37 \text{ g/L}$ respectively, $P < 0.05$), meanwhile the levels of cytokine $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 , IL-12 elevated remarkably ($205.77 \pm 46.32 \text{ pg/L}$, $186.4 \pm 87.3 \text{ pg/L}$ and $69.23 \pm 27.46 \text{ pg/L}$, $P < 0.05$). There was positive presence of antigen-antibody complexes in the nucleus pulposus ($P < 0.01$), and obvious inflammatory lesion in the sciatic nerve was observed after model establishment. **Conclusions:** There is abnormal autoimmunity in the sciatica model induced with no mechanical pressure, which may lead to pain.

【Key words】 Sciatica model without mechanical pressure; Abnormal autoimmunity; Antigen-antibody complexes; Cytokine

【Author's address】 The Third Clinical Medical College of Three Gorges University, Gezhouba Dam Central Hospital, Yichang, 443002, China

腰椎间盘突出症(LDH)是骨科常见病和多发病,主要表现为腰痛伴下肢放射痛,即坐骨神经痛,严重影响患者的家庭和劳动能力。过去髓核对神经根造成机械压迫是 LDH 的主要发病机制这一观点曾得到大多数人的认同,但自从动物实验发现当腰椎间盘突出纤维环破裂时,即使没有髓核压迫神经根也会造成后者的损伤以后,人们在越来越多的动物及临床研究中发现髓核引起的 LDH 患者异常的自身免疫反应在其发病机制中有着重要影响^[1]。因而本实验应用大鼠建立一种破裂型腰椎间盘突出动物模型,通过自身免疫相关指标的观察来进一步验证上述观点。

1 材料和方法

1.1 动物分组

健康成年 SD 大鼠 20 只(雄性,10 月龄,体重 250~300g,由湖北省动物实验中心提供)。随机分为两组:对照组($n=10$)和实验组($n=10$)。动物单独饲养、充足食物和水,在 12:12h 昼夜循环条件下饲养。

1.2 主要试剂和仪器

大鼠免疫球蛋白 IgG、IgM 检测试剂盒(浙江伊利康生物技术有限公司);S-P 超敏免疫组化染色试剂盒(大鼠);生物素化羊抗大鼠 IgG;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 12 (IL-12)试剂盒、 IL-6 试剂盒(Bender Medsystems 公司);磷脂酶 A2 (PLA2)检测试剂盒(Cayman Chemical 公司,美国);二喹啉甲酸(BCA)法蛋白定量试剂盒(普利莱基因技术有限公司,中国);Spectra MR 分光光度计(Dynex Technologies, 美国)。全自动生化分析仪(日本 Olympus)。酶联免疫检测仪(E2500 型,美国 Bio-Rad)。SCR20BA 型高速离心机(HITACHI 公司,

日本)。

1.3 大鼠破裂型椎间盘突出动物模型(坐骨神经痛模型)建立

1%氯胺酮 50mg/kg 腹腔麻醉,消毒后距鼠尾根部 1cm 处切下鼠尾并缝合伤口。于鼠尾中取 7~8 个尾椎髓核备用。大鼠俯卧位固定于鼠板上,劈开臀大肌切口(左、右侧均可),显露坐骨神经三根分叉部近端部分,以自体髓核轻轻置于坐骨神经旁,使其接触但并不压迫,用弹性硅胶袖套环绕该段坐骨神经,并以缝线固定于神经周围肌肉层上,以此保证髓核接触坐骨神经而不会脱落。切口冲洗后以 4-0 丝线分 2 层缝合。放回鼠笼饲养。对照组不放置自体髓核,其余手术步骤一致。

1.4 大鼠行为学观察

观察大鼠有无烦躁、撕咬肢体、运动功能障碍、后肢或足突然自发抬起、反复舔后爪、饮食变化,有无大小便失禁等情况。

1.5 大鼠后肢运动能力及后肢机械缩爪阈值检测

采用爬坡试验^[2]检测大鼠后肢运动能力,采用血压计联合注射器针刺刺激大鼠后爪的方法检测其后肢机械缩爪阈值^[3],用以评估动物痛觉过敏的程度。测定时间为模型建立前一天,模型建立后的 1、2 及 3 周(处死前)。

1.6 大鼠血清免疫球蛋白检测

模型建立后第 21 天将大鼠处死后自心脏采血获得血液约 8ml,以干燥试管采集,离心分离血清,用大鼠透射比浊法试剂盒在全自动生化分析仪上检测血清中 IgG、IgM 含量。

1.7 大鼠血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 、 IL-12 含量检测

同上法采取血样置于 EDTA 抗凝管中,在 15min 内离心,1000r/min,收集上清液封闭于 Ep 管内 -80°C 冰箱保存待检。按酶联免疫吸附法(ELISA)操作方法检测血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 、 IL-12

12 的含量。

1.8 坐骨神经标本切取

大鼠腹腔麻醉后,沿原手术切口分离臀大肌,找到坐骨神经中以硅胶袖套固定的节段,拆除袖套,分离局部肉芽组织,显露移植髓核(对照组大鼠切取尾椎髓核为对照),切取该段坐骨神经,分别置入单独的容器,置于-70℃下保存,麻醉动物经心内注射苯巴比妥钠(100mg/kg)处死。

1.9 观察移植髓核中抗原抗体复合物沉积

采用免疫组化 LSAB(SP)法:标本石蜡包埋,4μm 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;生物素化的羊抗大鼠 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,阳性沉积物存在于大鼠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大鼠 IgG 作为阴性对照。记录各组标本中免疫组化染色抗原抗体复合物(IC)阳性例数。

1.10 坐骨神经中磷脂酶 A2(PLA2)活性测定

组织匀浆的制备:神经组织解冻,在 500μl 的裂解缓冲液中匀浆。裂解液配方:50mM Tris-HCl base [pH7.5],150mM NaCl,6μg 磺酞氟化二苯甲烷,6ng 抑酞酶,6ng 亮肤素,0.6ml 0.1%诺乃洗涤剂 P-40,0.3ml 0.05%去氧胆酸钠,加 ddH₂O 容至 5ml。0℃裂解 30min。1200r/min,2℃下离心 15min。取上清液-20℃保存。用于检测 PLA2 活性和总蛋白含量。按 PLA2 活性检测试剂盒操作说明书测定各标本 PLA2 活性(PLA2 活性=ΔA414/min/10.66mM-1×0.225ml/0.01ml×样本稀释度)。按 BCA 法蛋白定量试剂盒操作说明书测定各标本中蛋白浓度。计算各标本的 PLA2 活性。

1.11 统计方法

采用 SPSS 11.5 统计分析软件,计量资料采取均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本组间比较采用 *t* 检验,计数资料采用确切概率法, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

观察期间大鼠均未出现烦躁、撕咬肢体、后肢或足突然自发抬起、反复舔后爪以及饮食变化、大

小便失禁等异常情况,也未出现明显跛行甚至瘫痪的情况。

实验组大鼠均在术后 48~72h 出现坐骨神经痛的明显症状,特征性症状为下肢出现强直性跖曲、外翻姿势,足趾紧紧内收。无论休息还是行走时,动物不愿意用手术侧后肢负重,常长时间处于抬高姿势。这些变化导致步态的明显异常,使手术侧后肢站立期明显缩短。这种改变在术后第 7 天达到高峰并持续至术后第 21 天处死。

所有大鼠模型建立前爬坡试验结果均为 IV 级,模型建立后,对照组爬坡试验均为 IV 级,实验组在模型建立后 1、2 及 3 周爬坡试验均为 III 级。

建模前两组大鼠后肢机械缩爪阈值差异无明显统计学意义($P > 0.05$),建模后实验组各时相点后肢机械缩爪阈值明显降低,与建模前及对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 1)。

实验组大鼠外周血免疫球蛋白 IgG、IgM 含量均较对照组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);大鼠血清 Th1 型细胞因子(TNF-α、IL-6、IL-12)含量较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);实验组大鼠移植髓核段坐骨神经中 PLA2 含量较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。对照组大鼠髓核中无抗原抗体复合物沉积(图 1),实验组有 8 只大鼠出现抗原抗体复合物沉积(图 2),与对照组相比有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 大鼠后肢机械刺激缩爪阈值各时相点比较

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

Table 1 Comparison of posterior limb's mechanical threshold between pre-operation and post-operation of all groups

	对照组(n=10) Control group	实验组(n=10) Experimental group
建模前 Pre-operation	90.7±8.8	90.4±5.0
建模后 1 周 1 week after operation	92.2±2.4	67.2±8.4 ^{①②}
建模后 2 周 2 week after operation	92.3±4.9	41.3±5.2 ^{①②}
建模后 3 周 3 week after operation	91.6±3.8	40.7±5.3 ^{①②}

注:①与建模前 1d 相比 $P < 0.01$;②与对照组相比 $P < 0.01$

Note: ①Compared with pre-operation, $P < 0.01$; ②Compared with control group, $P < 0.01$

表 2 大鼠外周血 IgG、IgM、TNF- α 、IL-6、IL-12 及坐骨神经中 PLA2 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the level of the IgG, IgM, TNF- α , IL-6, IL-12 in the peripheral blood, and the level of PLA2 in the sciatics of all groups

	对照组 (n=10) Control group	实验组 (n=10) Experimental group
IgG (g/L)	4.31 $\pm$ 0.77	4.98 $\pm$ 0.96 ^①
IgM (g/L)	0.79 $\pm$ 0.35	1.45 $\pm$ 0.37 ^①
TNF- α (pg/L)	11.01 $\pm$ 2.53	205.77 $\pm$ 46.32 ^②
IL-6 (pg/L)	85.0 $\pm$ 13.2	186.4 $\pm$ 87.3 ^①
IL-12 (pg/L)	21.65 $\pm$ 11.93	69.23 $\pm$ 27.46 ^①
PLA2 (μ mol/min·L)	0.0006 $\pm$ 0.0010	0.0766 $\pm$ 0.0039 ^①

注:与对照组相比,① $P < 0.05$; ② $P < 0.01$

Note: Compared with control group, ① $P < 0.05$; ② $P < 0.01$

3 讨论

3.1 非机械压迫性破裂型椎间盘突出模型建立依据

Naylor^[3]认为,胚胎时期即被纤维环包裹的髓核极有可能成为不能被自身免疫系统识别的“非己”成分,一旦暴露于免疫系统,即可导致免疫应答形成,在抗原部位(髓核及周围组织)引发自身免疫反应,从而引发坐骨神经痛等临床症状。随后这一理论已在动物实验上被证实^[4]。

由于在临床上 LDH 多以下肢放射性疼痛等坐骨神经痛为主要表现,本课题将大鼠自身髓核移植到坐骨神经旁,形成接触而不压迫,以此来探讨自体髓核暴露于坐骨神经后是否会引发同样的自身免疫异常。通过观察发现造模后大鼠出现了

明显的步态异常,患肢站立期缩短,后肢机械缩爪阈值较前明显降低等异常现象,提示该模型成功地模拟了临床上 LDH 临床表现中的痛觉过敏等现象,是一种很好的非机械压迫性破裂型椎间盘突出动物模型。

3.2 Th1 细胞因子在腰椎间盘突出症发病机制中的作用

由于细胞因子参与了自身免疫反应,尤其是在 T 细胞介导的自身免疫性疾病中起重要作用。根据 Naylor 提出的自身免疫学说理论,在突出的椎间盘组织中以 Th1 优势状态为主。Park 等^[5]对 40 例腰椎间盘突出症患者进行研究,采用 ELISA 法检测突出椎间盘组织中 Th1 型细胞因子 INF- γ 、IL-12 和 Th2 型细胞因子 IL-4 的表达,发现在破裂组中 INF- γ 、IL-12 的表达明显高于未破裂组;而后者突出椎间盘组织中 IL-4 的含量高于破裂组患者。

本实验结果显示该模型外周血中 TNF- α 、IL-12 较对照组明显升高,验证了由于作为自身免疫抗原的髓核组织暴露给机体的免疫系统后,激活了自身免疫反应,使得 Th1 型细胞因子 (TNF- α 、IL-12、IL-6) 高度表达,促进了 Th1 细胞分化,Th1/Th2 产生漂移,处于 Th1 优势应答状态,引起过度自身免疫性炎症的发生,对坐骨神经造成病理损害,引发一系列临床症状。

3.3 外周血免疫球蛋白 IgG 和 IgM 水平

目前许多研究均证实 LDH 患者或动物模型的髓核/血清中有高于正常水平的 IgG、IgM 存在。

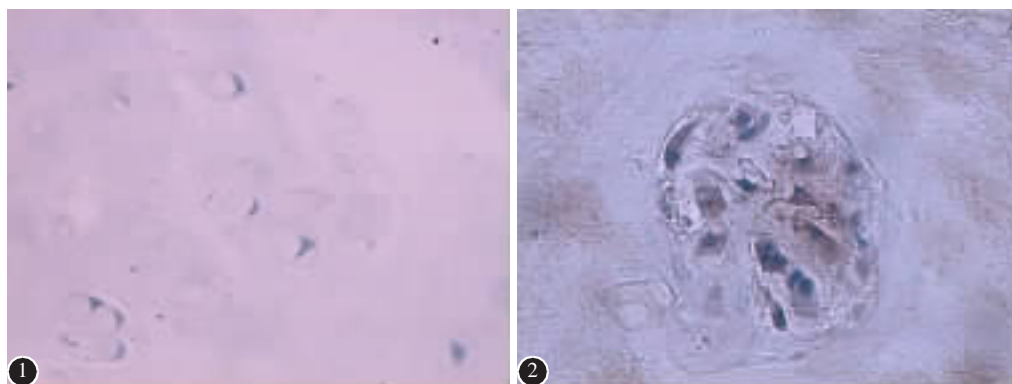


图 1 对照组尾椎髓核免疫组化染色示软骨陷窝中无免疫复合物沉积 ($\times 400$) 图 2 实验组移植髓核免疫组化染色示软骨陷窝中有棕褐色免疫复合物沉积 ($\times 400$)

Figure 1 Immunohistochemistry of control group ($\times 400$), there was no antigen-antibody complexes expressed in cartilage lacuna Figure 2 Immunohistochemistry of experimental group ($\times 400$), there was positive antigen-antibody complexes expressed in cartilage lacuna

Spiliopoulou等^[6]研究发现 LDH 患者血清和脑脊液 IgG 和 IgM 均较正常人增高。事实上,作为椎间盘组织的自身抗体,IgG 和 IgM 在血清中含量的升高正是说明了 LDH 机体中存在着异常的自身体液免疫反应。

本研究结果显示坐骨神经痛模型中血浆球蛋白 IgG、IgM 较正常组明显升高,与上述文献报道一致。笔者推测,由于椎间盘组织中的 I、II 型胶原以及糖蛋白等是潜在的自身抗原,它可激发机体由迟发超敏反应性 T 淋巴细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应,导致椎间盘的早期退变,在 T、B 淋巴细胞和椎间盘抗原的不断作用下,进而产生体液免疫反应,表现为血清中免疫球蛋白的升高。

3.4 髓核中抗原抗体复合物的沉积

正常椎间盘组织中有少量 IgG 沉积,但无免疫复合物沉积。Sato 等^[7]采用免疫组织化学方法在突出椎间盘组织标本中发现了抗原抗体复合物沉积。国内刘志伟等^[8]对 31 例 LDH 患者突出的髓核组织进行免疫组化染色发现,其中所有的标本都可以发现抗原抗体免疫复合物的强阳性沉积,其中脱垂游离型标本中这种现象更为明显。同样的研究结果也出现在李青等^[9]的报道中。

本课题组以往实验也证明了免疫复合物沉积于自身抗原集中的部位(软骨陷窝中)^[10],而且笔者推测这种沉积也与临床分型呈正相关,即髓核暴露的越充分,其中免疫复合物的沉积就越明显。

如上文所述,髓核作为机体未曾识别的抗原,激活了免疫系统,引发了一系列异常的自身免疫反应,最终导致移植髓核接触段的坐骨神经出现了明显的病理损害和炎症反应,主要体现在 PLA2 的活性上。这提示作为自身免疫反应的终末产物以及炎症反应的触发因子,PLA2 的大量表达将髓核引发的自身免疫反应转化为具有明显病理损害的炎症反应,引起坐骨神经的水肿,脱髓鞘化以及神经细胞的凋亡,进而造成临床上患者下肢放射性疼痛的临床表现,这可能是 LDH 发病机制中的重要因素。

综上所述,LDH 的发病机制和过程中不仅仅是突出髓核对脊髓和神经根的单纯机械压迫,由髓核引发的自身免疫反应以及由此导致的炎性变化才可能是该病的主要发病机制,这为今后在临床上如何治疗该病提供了较为清晰的治疗思路。此外,虽然坐骨神经是由腰神经根组成,但由于其具有髓鞘包绕等周围神经的特点,故而本研究结果尚不能完全解释 LDH 中髓核对椎管内脊神经根的影响,故而这也是今后研究的方向。

4 参考文献

1. 布林,钟环,姜汉国,等. NGF、BDNF 基因修饰的 BMSCs 静脉注射治疗脊髓损伤[J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(24): 1900-1902.
2. 陆志东,金群华,陈志荣,等. 大鼠非压迫性髓核突出模型的建立[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(19, 20): 1361-1363
3. Naylor A. Enzymic and immunological activity in the intervertebral disc[J]. Orthop Clin N Am, 1975, 6: 51.
4. Geiss A, Larsson K, Rydevik B, et al. Autoimmune properties of nucleus pulposus: an experimental study in pigs[J]. Spine, 2007, 32(2): 168-173.
5. Park JB, Chang H, Kim YS, et al. The pattern of interleukin-12 and T-helper types 1 and 2 cytokine expression in herniated lumbar disc tissue[J]. Spine, 2002, 27(19): 2125-2128.
6. Spiliopoulou I, Kroevessis P, Konstantinou D, et al. IgG and IgM concentration in the prolapsed human intervertebral disc and sciatica etiology[J]. Spine, 1994, 19 (12): 1320-1324.
7. Sato K, Konno S, Nishiyama K, et al. Presence and distribution of antigen antibody complexes in the herniated nucleus pulposus[J]. Spine, 1999, 24 (19): 1980-1984.
8. 刘志伟,洪天禄,孙有声,等. 腰椎间盘突出症突出髓核中抗原抗体复合物测定的临床意义[J]. 实用骨科杂志, 2002, 8(5): 351-356.
9. 李青,史可中,安荣泽,等. 突出腰椎间盘组织免疫复合物的表达及意义[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 9(5): 486-489.
10. 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.

(收稿日期:2012-04-06 修回日期:2012-10-16)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)