

基础研究

腰椎间盘突出症与 Th 细胞、NK 细胞的相关性研究

曹涌,姚羽,张烽

(南通大学附属医院骨科 226001 江苏省南通市崇川区西寺路 26 号)

【摘要】目的:探讨辅助性 T 细胞 17(T help cell 17,Th17)、自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)在腰椎间盘突出症发生发展中的作用,以求进一步明确神经根痛的病理机制。**方法:**选取南通大学附属医院脊柱外科收治接受手术治疗的腰椎间盘突出症患者 20 例作为观察组(椎间盘突出组),同时选取腰椎骨折需摘除椎间盘的患者 6 例作为对照组(正常髓核组)。运用流式细胞术(Flow Cytometry,FCM),分别测定观察组和对照组患者髓核组织中 CD3、CD4、T 细胞胞内产物白介素-17(IL-17)及 NK 细胞表面因子 CD16CD56 的含量。**结果:**观察组髓核中的 CD4、IL-17 和 CD16CD56 含量分别为 $(3.18\pm 0.15)\%$ 、 $(2.94\pm 0.04)\%$ 、 $(3.24\pm 1.65)\%$,有高表达;而对照组髓核中的 CD4、IL-17 和 CD16CD56 含量分别为 $(0.08\pm 0.02)\%$ 、 0% 、 $(1.73\pm 0.71)\%$,低表达或者不表达,两组间比较差异有显著性(P 值分别为 0.000,0.000,0.003)。观察组与对照组髓核中 CD3 的表达分别为 $(23.42\pm 5.84)\%$ 和 $(26.54\pm 4.17)\%$,两组间差异无显著性($P>0.05$)。**结论:**髓核作为自身抗原可促使 Th 细胞分化成以 IL-17 为主的 Th17 细胞,并诱导 CD16CD56 为表面标志的 NK 细胞的表达,可能参与了腰椎间盘突出症的发生发展。

【关键词】腰椎间盘突出症;Th17 细胞;NK 细胞;细胞因子;白介素-17;流式细胞术

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2013.10.08

中图分类号:R681.5,R392.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2013)-10-0912-04

Correlation of lumbar disc herniation with the Th17 cells, NK cells/CAO Yong, YAO Yu, ZHANG Feng//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(10): 912-915

【Abstract】Objectives: To explore the role of T help cells 17(Th17), natural killer cells(NK) in the development of sciatica and the pathological mechanism of nerve root pain. **Methods:** 20 postoperative patients with lumbar disc herniation and treated in the Spine Centre of Nan Tong University Affiliated Hospital were included as observation group. Control group included 6 patients with lumbar fracture in the same hospital. Flow cytometry (Flow Cytometry, FCM) was used to measure the expression of CD3, CD4, T cell intracellular product Th17 and NK cell surface factor CD16CD56 content in each group. **Results:** The CD4, IL-17 and CD16CD56 content in nucleus pulposus of observation group was $(3.18\pm 0.15)\%$, $(2.94\pm 0.04)\%$, $(3.24\pm 1.65)\%$ respectively with hi expression; while in control group, it was $(0.08\pm 0.02)\%$, 0% , $(1.73\pm 0.71)\%$ respectively, with lower expression or no expression($P=0.000, 0.000, 0.003$). The expression of CD3 in observation group and control group was $(23.42\pm 5.84)\%$ and $(26.54\pm 4.17)\%$, the difference was no statistically significant ($P>0.05$). **Conclusions:** When exposed in the immune system, the Th cells on the surface of the nucleus pulposus may differentiate into Th17 cells, and induce the expression of NK cells with surface mark of CD16CD56.

【Key words】 Lumbar disc herniation; Th17 cells; NK cells, Cytokine; IL-17; Flow cytometry

【Author's address】 Orthopedics Department, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, 226001, China

腰椎间盘突出症(lumbar disc herniation, LDH)是人类常见病,占腰腿痛患者的 60%以上。传统的机械性压迫学说并不能满意解释所有的临床和病理现象,近年来研究证实,髓核组织的自身

免疫性是引起炎症反应的重要原因^[1],然而其产生的病理机制尚未完全清楚。最近研究发现一类不同于辅助 T 细胞 1(Th1)和 Th2 的细胞亚群,此亚群细胞产生白介素-17(IL-17)、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)而不产生干扰素 γ (IFN- γ)和 IL-4,被称为 Th17 细胞亚群^[2,3],在自身免疫和促炎反应方面具有重要作用。本实验通过研究髓核

第一作者简介:男(1971-),副主任医师,医学硕士,研究方向:骨科

电话:(0513)81161401 E-mail:yaoyu1122@sina.com

组织是否能诱导 Th17 细胞、NK 细胞的表达,进一步探讨探讨髓核的自身免疫反应在腰椎间盘突出症中的作用及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取南通大学附属医院脊柱外科 2010~2011 年收治确诊并手术的腰椎间盘突出症患者 20 例作为观察组(椎间盘突出组),其中男 11 例,女 9 例,年龄 31~66 岁,平均 49 岁;平均病程 8 个月。所有患者查肝肾功能、电解质、血沉等均正常,并排除急慢性感染、变态反应性疾病及自身免疫性疾病。且均经患者临床症状、体征,CT 及 MRI 检查结果等确诊,部分术中见髓核突破后纵韧带,大部突入椎管,纤维环破裂,质软,较易整块钳出;部分病例后纵韧带完整,纤维环破裂,髓核部分突出,需分次钳出。取得标本后仔细剔除纤维环及终板等杂质,取得纯粹髓核组织(注意保留髓核表面粘液样组织),装入瓶中待用。

同时选取腰椎(L1~L5)骨折的年轻患者 6 例作为对照组(正常髓核组),男 4 例,女 2 例,平均年龄 35 岁(30~38 岁),术前亦排除其他过敏及免疫性疾病。取其术中摘除的髓核组织待用。

1.2 实验试剂

(1) 荧光标记单克隆抗体:Per-cp anti-human CD4 (eBioscience 公司),Pe anti-human IL-17 (eBioscience 公司),Pe-cp anti-human CD3,CD19,CD16CD56(Becton Dickinson 公司)。(2) 刺激剂:PMA(佛波脂)(eBioscience 公司),工作浓度:25ng/ml;细胞培养:每 100 μ l 反应体系加 2.5 μ l 工作液;Ionomycin (离子霉素)(eBioscience 公司),工作浓度:1 μ g/ml;细胞培养:每 100 μ l 反应体系加 2 μ l 工作液。(3) 阻断剂:BFA(Brefeldin A)(eBioscience 公司);工作浓度:10 μ g/ml;细胞培养:每 100 μ l 反应体系加 2 μ l 工作液。

1.3 实验方法

1.3.1 髓核制备匀浆 将髓核组织放入匀浆器,加入 PBS 缓冲液(0.1M,PH=7)后匀浆,200 孔双层滤网过滤,滤出液放入流式管,1000 转/分钟的速率离心 10min,弃上清,再次加入 PBS 液吹匀后离心 10min,弃上清。分管,标记。

1.3.2 CD3、CD19、CD16CD56 的测定 匀浆后取一半加入 PBS 液使细胞重悬,取重悬液加入 Pe-

cp anti-human CD3,CD19,CD16CD56 单克隆抗体室温孵育 20min,PBS 清洗 2 次后细胞悬浮于 PBS 液,用流式细胞仪测定 NK 细胞因子的表达情况,并记录数据。

1.3.3 CD4、IL-17 的测定 剩余一半标本加入 RMPI-1640 培养液吹匀,依次加入刺激剂 PMA、Ionomycin 及阻断剂 BFA,放入 37 $^{\circ}$ C、7%CO₂ 孵育箱培养 4h 分别装入相应试管,离心,PBS 洗涤 2 次,分别加入 Per anti-human CD4 单克隆抗体及 Pe anti-human IL-17 单克隆抗体胞内因子染色 30min,再次清洗后,细胞悬浮于 PBS 液,用流式细胞仪测定 IL-17 因子的表达情况,并记录数据。

1.4 数据处理与统计学检验

原始数据输入 SPSS 13.0 统计软件包,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验采用对照比较的 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 髓核中 CD4(+)细胞及 IL-17 因子的表达

观察组髓核中 CD4(+)细胞及 IL-17 因子的表达较对照组有显著增高($P < 0.05$),对照组髓核中 CD4 值仅为(0.08 $\pm$ 0.02)%,而且对照组髓核中流式检测均未见 IL-4、IL-17 因子表达,观察组与对照组比较均有统计学意义(表 1)。

2.2 髓核中 CD3(+)细胞及 NK 细胞因子的表达

观察组髓核中 CD3(+)细胞的表达较正常髓核无显著增高($P > 0.05$),但是观察组髓核中 CD19 及 CD16CD56 的表达均较正常髓核中高,结果均有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 1 髓核中 CD4(+)细胞及 IL-17 因子的表达(%)

Table 1 The expression of CD4(+) and IL-17 in NP

	CD4	IL-4	IL-17
观察组 Observe group	3.18 $\pm$ 0.15 ^①	2.92 $\pm$ 0.17 ^①	2.94 $\pm$ 0.04 ^①
对照组 Control group	0.08 $\pm$ 0.02	—	—

注:①与对照组比较 $P < 0.001$

Note: ①Compared with control group, $P < 0.001$

3 讨论

近年来,腰椎间盘突出症的自身免疫学说为越来越多的学者所接受,并且有了很多研究结果的支持。在正常状态下,髓核作为一种隐蔽的自身抗原存在于椎间盘的核心,一旦当椎间盘发生创

表 2 髓核中 CD3(+)细胞及 NK 细胞的表达(%)

Table 2 The expression of CD3(+) and NK in NP

	CD3	CD19	CD16CD56
观察组 Observe group	23.42±5.84	10.60±5.32 ^①	3.24±1.65 ^①
对照组 Control group	26.54±4.17	2.56±1.07	1.73±0.71

注:①与对照组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with control group, $P<0.05$

伤或病损后,髓核与机体免疫机制发生密切接触,髓核基质中的一些成分便成为自身抗原,机体在这种持续的抗原刺激下,免疫反应因此而产生。

利用流式细胞技术(FCM)与细胞内细胞因子(intracellular cytokine, ICK)染色技术相结合来比较各组间细胞因子的表达,是一种优越于 ELISA 法的单细胞研究细胞因子的方法^[4]。本实验我们通过运用 FCM 检测椎间盘突出组和正常对照组患者髓核中的 CD4、IL-17 含量,结果发现,突出组髓核中的 CD4 有高表达,而正常组髓核中的 CD4 低表达或者不表达。之前的研究^[5]已表明,正常髓核被纤维环包绕,与免疫系统隔绝,无 CD4(+)T 细胞的浸润,即无 Th 亚型细胞的表达。此时 Th0 分化为 Th1 和 Th2 的能力非常弱,我们所能检测到的 IFN- γ 和 IL-4 也微乎其微,机体中 Th1/Th2 细胞处于相对平衡的状态。当腰椎发生退变,突出的椎间盘组织特别是髓核的表面有大量的新血管形成,增加了自身抗原接触并进入血液循环的机会,当髓核暴露之后,髓核中的某些成分作为自身抗原激活了静息 T 细胞,促使 T 细胞分化。幼稚 T 细胞在 IL-12 的刺激作用下分化为 Th1 细胞,在 IL-4 的作用下分化为 Th2 细胞,并表达转录因子 GATA-3^[6]。Th1/Th2 细胞的相对平衡状态被打破,此即为“Th1/Th2 平衡漂移”^[7]。一旦 Th1/Th2 之间的平衡状态被打破,很可能造成人体细胞因子网络的动态平衡被破坏,进而引起炎症的产生和发展。

我们同时发现,突出组髓核中的 IL-17 有高表达,而正常组髓核中的 IL-17 低表达或者不表达。Th17 细胞亚群是一类不同于 Th1 和 Th2 的细胞亚群^[2,3],具有独立的分化和发育调节机制,在自身免疫和促炎反应方面具有重要作用。IL-23 可诱导 T 细胞表达 IL-17,而 IL-23 受体仅在激活后的 T 细胞表达,因此,正常髓核中 T 细胞未被激活,不能够诱导幼稚 T 细胞向 Th17 细胞分

化^[8]。突出组 T 细胞被激活,诱导幼稚 T 细胞表达 IL-17。IL-17 通过 MAP 激酶 ERK 的介导,释放细胞因子 IL-6,并诱导 VEGF 的表达。并可以和其他细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 等相互作用,产生协同效应,加重炎症反应。

IL-6 和 IL-23 可单独诱导产生少量的 IL-17 并使向 Th17 分化大为增强^[9]。TGF- β 与 IL-6 联合诱导表达转录因子 ROR γ t,该因子是 Th17 细胞分化的一个关键的调节因子,ROR γ t 通过与一个未知的配体结合调节其活性,阻断 ROR γ t 可以减轻自身免疫疾病的病情^[10]。ROR γ t 和 Th17 分化需要转录因子信号转导蛋白和 STAT3,STAT3 由 IL-6 和 IL-23 激活。STAT3、STAT4 和其他 Th17 细胞分化发育所必需转录因子,如 TGF- β 下游的 Smad-2 或 Smad-3,都可能是有治疗意义的靶点。这也为我们将来腰椎间盘突出症的临床治疗提供了一个新的思路。

同时 IL-12、IL-27 (属 IL-12 家族)、IFN- γ 、IL-4 可抑制 Th17 细胞分化,然而 IL-17 不具有或者只有微弱抑制 Th1 和 Th2 分化的作用,因此典型的 Th1 和 Th2 细胞与 Th17 细胞相比占据优势^[11],这与实验中 CD4 高表达的细胞数值高于 Th17 细胞也是相符的。

在本实验中我们还发现,突出组髓核中的 CD19、CD16CD56 有高表达,而正常组髓核中的 CD19、CD16CD56 低表达或者不表达。以 CD16CD56 为表面标志的 NK 细胞是天然免疫的主要效应细胞。NK 和 T 淋巴细胞来源于共同的造血干细胞,有共同的表面标志和细胞内蛋白的表达,尤其是 CD8(+)T 细胞^[12]。从功能上来看,NK 细胞有 2 个特性^[13]:(1)NK 细胞具有细胞毒毒性。NK 细胞释放穿孔素和颗粒酶溶解 MHC-I 分子表达变化的肿瘤细胞和病毒感染细胞。(2)NK 细胞能够产生大量的细胞因子。IFN- γ 就主要来源于 NK 细胞。同时,NK 细胞也可以直接诱导和调节获得性免疫响应。NK 细胞在免疫应答过程中所发挥的调节功能有赖于抗原提呈细胞摄取抗原后所产生的细胞因子和趋化因子的种类。抗原提呈细胞来源的多种细胞因子(如 IL-12、IL-15、IL-18 和 IL-23 等)和活化的 T 细胞来源的 IL-2、IL-4 和 IL-10 均可通过其受体对 NK 细胞的表型和功能产生影响,调节 NK 细胞的发育和成熟。Th1 细胞因子(IL-12、IL-23)可诱导 NK 细胞分泌 IFN- γ ,并且 IL-12 可促进 NK 细胞的杀伤活性和

增殖,而 Th2 细胞因子(IL-4、IL-10)IL-4 和 IL-10 均可通过其受体对 NK 细胞的表型和功能产生影响,调节 NK 细胞的发育和成熟。Th1 细胞因子(IL-12、IL-23)可诱导 NK 细胞分泌 IFN- γ ,并且 IL-12 可促进 NK 细胞的杀伤活性和增殖,而 Th2 细胞因子(IL-4、IL-10)则抑制 NK 细胞的功能^[14]。

总之,椎间盘突出的髓核与机体的免疫机制相接触,髓核基质中的一些成分便成为自身抗原,诱导静息 Th 细胞分化,刺激 B 细胞增殖并产生抗体,机体在这种持续的抗原刺激下,免疫反应因此而产生。促进了椎间盘的退变和腰腿痛的发展,如何纠正通过改变调节 Th17 细胞和 NK 细胞的增殖分化的上位细胞因子和调控 Th17 细胞、NK 细胞分泌的效应细胞因子可能为将是今后免疫治疗的一个方向。

4 参考文献

1. Takenaka Y, Kahan A, Amor B. Experimental autoimmune spondylodiscitis in rats[J]. J Rheumatol, 1986, 13(2): 397-400.
2. Harrington LE, Halton RD, Mangan PR, et al. Interleukin-17 producing CD4+effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and lineages[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1123-1132.
3. Park H, Li ZX, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4+T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1133-1141.
4. Pietro PL, Tracy HL, Peter JM. Flow cytometric measurement of intra-cellular cytokines[J]. J Immunol Methods, 2000, 243(1-2): 107-124.
5. 姚羽, 张烽. 大鼠髓核自身免疫反应的研究[J]. 江苏医药, 2009, 35(8): 931-933.
6. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(12): 933-944.
7. Castellino F, Germain RN. Cooperation between CD4+ and CD8+T cells: when, and how[J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24(1): 519-540.
8. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17[J]. J Biol Chem, 2003, 278(3): 1910-1914.
9. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells[J]. Nat Immunol, 2007, 8(9): 942-949.
10. Bemhardt SL, Gjertsen MK, Trachsel S, et al. Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: A dose escalating phase I/II study [J]. Br J Cancer, 2006, 95(11): 1474-1482.
11. Nakae S, Iwakura Y, Suto H, et al. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17[J]. J Leukoc Biol, 2007, 81(5): 1258-1268.
12. Moretta L, Bottino C, Pende D, et al. Human natural killer cells: their origin, receptors and function[J]. Eur J Immunol, 2002, 32(5): 1205-1211.
13. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, et al. New aspects of natural-killer cell surveillance and therapy of cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1): 850-861.
14. 范艳莹, 吴长有. Th2 细胞因子和抗 IL-12R β 1 mAb 抑制由 IL-23 诱导 PBMC IFN- γ 的产生[J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(3): 195-199.

(收稿日期:2012-12-26 末次修回日期:2013-06-08)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)

消息

2013年上海微创脊柱外科国际论坛暨 上海瑞金医院微创脊柱外科高级学习班通知

由中华医学会骨科分会微创学组、中国医师学会骨科分会脊柱外科工作委员会、上海医学会骨科分会微创学组主办,上海交通大学医学院附属瑞金医院骨科承办的 2013 年上海微创脊柱外科国际论坛暨国家级医学继续教育项目上海瑞金医院“微创脊柱外科的临床应用”高级学习班,将于 2013 年 10 月 18~19 日在上海举行。

本论坛依托瑞金医院百年传统和学术传承,搭建脊柱外科新概念和新技术的高端交流平台,广邀国内外脊柱外科名家,包括来自欧洲、美国、澳大利亚、日本、韩国、新加坡等国的国际专家,以微创脊柱外科技术为重点,同时对脊柱外科的热点问题和最新技术进行专题讨论。参与学员可获得国家级医学教育 I 类学分 10 分。

会议地址:瑞金医院。注册费:800 元/人,食宿统一安排,费用自理。联系方式:上海市瑞金二路 197 号,上海瑞金医院 骨科,邮编:200025。联系人:江自洁。电话:(021)64370045-666083。传真:(021)54660217。E-mail:shrjspine@163.com。