

· 临床研究 ·

转化生长因子 β_1 及白介素-1 β 对终板软骨细胞的作用*

田峰¹, 崔学生¹, 张帅¹, 石玉泽¹, 金群华^{2 Δ}

(1. 宁夏医科大学, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学附属医院骨科, 银川 750004)

摘要:目的 研究转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 及白介素-1 β (IL-1 β) 在终板软骨细胞中的表达, 探讨椎间盘退变的发病机制。方法 应用免疫组化 SP 染色法检测 TGF- β_1 及 IL-1 β 在 20 例颈椎病及 20 例非颈椎椎体软骨终板中的表达, 并对其阳性表达结果进行比较。结果 颈椎病组 TGF- β_1 及 IL-1 β 的阳性率分别为 (32.907 6 \pm 3.076 4)%、(51.520 7 \pm 2.192 5)%, 与非颈椎椎体终板软骨细胞 TGF- β_1 及 IL-1 β 表达的阳性率 (42.481 6 \pm 2.061 7)%、(33.918 5 \pm 3.320 4)% 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 TGF- β_1 及 IL-1 β 参与了椎间盘退变的形成和发展, 在椎间盘退变的发病中可能起重要的作用。

关键词: 转化生长因子 β_1 ; 椎间盘; 退变; 软骨细胞; 白细胞介素 1 β

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.01.013

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)01-0036-02

Experimental study with transforming growth factor β_1 and interleukin-1 β for Cartilage endplate cells*

Tian Feng¹, Cui Xuesheng¹, Zhang Shuai¹, Shi Yuze¹, Jin Qunhua^{2 Δ}

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1) and interleukin 1 beta (IL-1 β) on human cartilage endplate. To preliminarily probe the action mechanism of TGF- β_1 and IL-1 β in the occurrence and evolution of intervertebral disc degeneration and to provide novel pathway for preventing and curing intervertebral disc degeneration. **Methods** Monitor the expression of TGF- β_1 and IL-1 β of centrum cartilage endplate gathered from November 2009 to June 2010 in our hospital by immunohistochemistry (IHC). The lesion group consists of 20 centrum cartilage endplates resectioned in the anterior surgery of cervical spondylosis and the control group is comprised of 20 centrum cartilage endplates gathered in the anterior surgery of cervical fracture. **Results** The positive rate of TGF- β_1 and IL-1 β in the lesion group was (32.907 6 \pm 3.076 4)% and (51.520 7 \pm 2.192 5)%, respectively; while the positive rate of TGF- β_1 and IL-1 β in the control group was (42.481 6 \pm 2.061 7)% and (33.918 5 \pm 3.320 4)%, respectively. The overall positive expression of TGF- β_1 in the control group was significantly higher than that in the lesion group, whereas the overall positive expression of IL-1 β in the lesion group was significantly higher than that in the control group, and both of the differences were distinct enough to have a statistical implication ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression TGF- β_1 and IL-1 β existed in degenerated human cartilage endplate, and the expression of TGF- β_1 and IL-1 β in the lesion group was lower and higher than their counterparts in the control group, respectively. The positive stain of TGF- β_1 and IL-1 β were mainly located in the cytoplasm and cytomembrane of cartilage cells, and also appeared in the nucleus. The qualitative and quantitative results of expression of TGF- β_1 and IL-1 β obtained by IHC and western blot are in good accordance, thus providing reference for research and clinical work.

Key words: transforming growth factor beta 1; intervertebral disc; degeneration; cartilage cell; interleukin-1 beta

软骨终板为位于椎体和椎间盘之间的薄层透明软骨, 由软骨细胞和细胞外基质构成, 是髓核与外界交换营养及代谢终产物的主要途径^[1]。软骨终板对维持椎体的正常形态以及对椎间盘应力缓冲保护等方面起着重要作用。研究表明椎体软骨终板的损伤可导致椎间盘退变的发生^[2]。软骨细胞是软骨终板中惟一的细胞类型, 其功能状态直接影响软骨终板的功能。细胞因子在影响细胞分化方面起着重要的作用, 其中转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β_1) 及白介素-1 β (interleukin 1 beta, IL-1 β) 的研究作用较多。

本文采用免疫组织化学染色检测退变椎间盘和正常椎间盘中两种因子的表达, 探讨该因子与椎间盘退变的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病变组 20 例, 为本院 2009 年 11 月至 2010 年 6 月颈椎病行前路手术切除的终板, 其中男 13 例, 女 7 例; 年龄 40~68 岁, 平均 54 岁。对照组 20 例取自颈椎骨折前路

手术治疗所取得椎体软骨终板标本, 术前排除颈椎退行性病变, 其中男 12 例, 女 8 例; 年龄 26~49 岁, 平均 34 岁。诊断标准参考 1992 年第 2 届颈椎病专题座谈会纪要^[3]。

1.2 组织学检查 椎体软骨终板标本编号后置于 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定, 24 h 后放于 10% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 脱钙液 (10 g EDTA 用 100 mL 10% 中性甲醛配制) 中 4 $^{\circ}$ C 脱钙处理 14 d, 梯度乙醇脱水后石蜡包埋, 石蜡切片, 厚度 3 μ m, 苏木素伊红染色 (HE 染色) 了解软骨终板的组织形态学变化。

1.3 免疫组织化学染色 采用 SP 法免疫组织化学染色, 兔抗人 TGF- β_1 多克隆抗体及 IL-1 β 多克隆抗体试剂盒购自 ABCAM 公司。烤片 68 $^{\circ}$ C 过夜, 二甲苯脱蜡 20 min, 梯度乙醇至水; 柠檬酸高温高压抗原修复 2 min, 降至室温后磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 5 min \times 3 次, 3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min, 滴加封闭用正常山羊血清工作液室温孵育 15 min, 弃去后滴加一抗, 室温孵育 3 h, PBS 液冲洗 5 min \times 3 次, 滴加生物素化二抗

* 基金项目: 宁夏科技攻关基金资助项目 (2008)。 Δ 通讯作者, Tel: (0951) 4091488; E-mail: jinqunhua@sina.com。

工作液室温孵育 20 min, PBS 液冲洗 5 min \times 3 次, 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液室温孵育 40 min, PBS 液冲洗 5 min \times 3 次, DAB 显色 3 min, 自来水冲洗后, 苏木素复染, 常规脱水、透明、干燥、封片。显微镜下观察 TGF- β_1 及 IL-1 β 的表达情况。

1.4 判断方法 TGF- β_1 及 IL-1 β 阳性产物定位于细胞质, 呈棕黄染色, 偶见少量胞核着色。取阳性细胞清晰的组织切片, 随机取镜下 5 个视野($\times 40$), 计算 5 个视野下 TGF- β_1 及 IL-1 β 阳性细胞数和细胞总数, 计算平均阳性细胞数。

1.5 统计学处理 所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色结果 HE 染色中对照组(彩插 I 图 1)软骨细胞排列整齐, 体积较病变组大, 病变组(彩插 I 图 2)软骨终板内软骨细胞有一定数量的减少, 体积也较对照组中明显变小, 有些细胞表现出细胞核着色稍浅。

2.2 免疫组织化学结果 在免疫组织化学的检测中, 病变组中 TGF- β_1 低表达(彩插 I 图 3), IL-1 β 高表达(彩插 I 图 5); 对照组中 TGF- β_1 高表达(彩插 I 图 4), IL-1 β 低表达(彩插 I 图 6); 病变组 TGF- β_1 的阳性率低于对照组中的阳性率($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 TGF- β_1 在正常及退变椎体软骨终板的表达($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	TGF- β_1	IL-1 β
对照组	20	42.481 6 \pm 2.061 7	33.918 5 \pm 3.320 4
病变组	20	32.907 6 \pm 3.076 4*	51.520 7 \pm 2.192 5*

*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨 论

软骨终板为位于椎间盘和椎体之间的薄层透明软骨, 由软骨细胞和细胞外基质构成, 是髓核与外界交换营养及代谢终产物的主要途径。软骨终板对维持椎体的正常形态以及对椎间盘应力缓冲保护等方面起着重要作用。有文献报道 25% 的小于 40 岁的个体, 50% 超过 50 岁的个体, 85% 超过 60 岁的个体都有某种程度的椎间盘退变。表明退变与年龄有一定的关系。

研究表明椎间盘退变的发生与椎体软骨终板的损伤有很大关系^[2]。许多研究已经证实椎间盘退变是多种环境因素共同作用的结果, 其发病机制大致可归结为: (1) 软骨终板的退变, 椎间盘营养供应减少; (2) 细胞老化, 分泌基质减少; (3) 椎间盘内部降解酶活性的升高, 基质降解增多; (4) 基质疲劳衰竭等。已有证据证明: 椎间盘的退变源于软骨终板的退变^[4], 软骨终板治疗利于退变椎间盘的修复和再生^[5]。而上述机理中最重要的是椎间盘软骨终板的退变^[6]。TGF- β 为一类多功能的蛋白多肽, 由两条肽链经二硫键连接而成, 是一种对多种类型的结缔组织具有复杂生物学效应的生长因子^[7], 主要作用为促进细胞基质合成、调控细胞增殖、调节细胞分化、免疫抑制、损伤修复、抗炎以及趋化等。其为诱导软骨修复的重要生长因子, 在骨形成和修复过程中起重要作用, 可促进软骨细胞和成骨细胞的增殖和分化^[8], 并能诱导软骨和骨基质的合成。TGF- β 对特定靶细胞的作用取决于许多因素, 包括细胞类型、生长条件、分化状态及其他因子的存在, 以及 TGF- β_1 的作用浓度和时间等^[9]。TGF- β 来源广泛, 在细胞分化的所有阶段很多的细胞及组织都会产生 TGF- β , 其中血小板和骨组织中 TGF- β 含量最丰富^[10]。骨组织中 TGF- β 主要由骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞及骨髓细胞等通过自分泌和旁分泌途径合成^[11], 在骨组织中 TGF- β 的浓度是其他组织的 100 倍, 浓度远远高于其他组织。Boyd 等^[12] 实验证明 TGF- β_1 可促进

椎间盘髓核细胞表达合成 I、II 型胶原, 从而延缓甚至逆转腰椎间盘的退变。

IL-1 主要由单核细胞合成, 有 α 、 β 两种类型。IL-1 α 为酸性型, 等电点为 5.0, IL-1 β 为中性型, 等电点为 7.0。其中 IL-1 β 是构成细胞外基质中 IL-1 的主要成份^[13], 是一种强力的致痛性炎症因子, 由单核巨噬细胞成纤维细胞分泌^[14]。有研究表明 IL-1 β 是一种负性调节因子, 可以引起软骨基质的降解, 促进软骨的破坏。

研究证实, 退变的终板软骨细胞中 TGF- β_1 的表达低于正常的软骨细胞, 而 IL-1 β 的表达高于正常的软骨细胞。表明软骨终板发生退变时, 软骨细胞分泌 TGF- β_1 能力下降, 导致细胞合成细胞外基质的能力下降, 有研究显示 TGF- β_1 有双重作用^[15], 与本实验高浓度组抑制增殖结果相同。TGF- β_1 可通过下调 IL-1 α 减少 IL-1 β 引起的软骨基质破坏作用, 刺激胶原和蛋白聚糖核心蛋白的转录, 抑制软骨细胞中基质金属蛋白酶(MMPs) mRNA 水平, 还可诱导合成金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP-1)和 II-IR, 并刺激软骨细胞增生, 实现其对软骨的保护作用; IL-1 β 是一种有效的 MMPs 诱导剂, 能促使 MMPs 产生, 而 MMPs 能溶解基质蛋白而导致终板退变的发展。其次 IL-1 β 可引发蛋白多糖的降解和软骨细胞破坏, 抑制具有软骨特性的蛋白聚糖和 II 型胶原, 促进生成有纤维母细胞特性的 I 型胶原, 从而使软骨细胞变性, 引起软骨缺损导致退变的进一步发展。

综上所述, TGF- β_1 在维持软骨的正常代谢平衡中发挥重要作用, 而 IL-1 β 在软骨的正常代谢平衡中发挥破坏作用。软骨退变机制较为复杂, 各种细胞因子和氧化剂相互作用形成一个退变结果, 具体制约效能及机制研究是今后发展的方向。

参考文献:

- [1] 许理忠, 王拥军, 施杞. 成人颈椎间盘退变机理研究[J]. 辽宁中医杂志, 2002, 29(4): 526-528.
- [2] Holm S, Holm AK, Ekstrom L, et al. Experimental disc degeneration due to endplate injury[J]. J Spinal Disord Tech, 2004, 17(1): 64-71.
- [3] 孙宇, 陈其福. 第 2 届颈椎病专题座谈会纪要[J]. 中华外科杂志, 1993, 31(8): 472-476.
- [4] Peng BG, Hou SX, Shi Q, et al. The relationship between cartilage endplate calcification and disc degeneration: an experimental study[J]. Chin Med J, 2001, 16(3): 308-312.
- [5] Boyd LM, Carter AJ. Injectable biomaterials and vertebral endplate treatment for repair and regeneration of the intervertebral disc[J]. Eur Spine J, 2006, 26(3): 414-421.
- [6] Kang JD, Georgeseu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2[J]. Spine, 1995, 22(19): 2373-2378.
- [7] Hoyland JA, Thomas JT, Donn R, et al. Distribution of type X collagen mRNA in normal and osteoarthritic human cartilage[J]. Bone Miner, 1991, 15(2): 151-163.
- [8] Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, et al. Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(6): 1338-1347.
- [9] Dorai H, Sampath TK. Bone morphogenetic protein-7 modulates genes that maintain the vascular smooth(下转第 39 页)

2 结 果

2.1 NSTEMI 组、UA 组及对照组的血清 cTnI 和血清 hs-CRP 测定值比较 见表 1。

表 1 cTnI、hs-CRP 测定值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cTnI ($\mu\text{g/L}$)	hs-CRP(mg/L)
NSTEMI 组	52	2.98 \pm 0.92	27.52 \pm 20.13
UA 组	34	1.69 \pm 0.75	24.34 \pm 19.16
对照组	40	0.14 \pm 0.02	2.26 \pm 1.89

cTnI 在 NSTEMI 组、UA 组和对照组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),hs-CRP 在 NSTEMI 组与 UA 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 NSTEMI 患者血清 cTnI 升高特点 52 例 NSTEMI 患者血清 cTnI 于入院 4~6 h 开始升高,峰值出现在 12~20 h,6~7 d 后全部恢复正常;这与谭莹等^[2]报道相近。34 例 UA 患者血清 cTnI 有 7 例(20.59%)升高,48~72 h 内恢复正常。

2.3 血清 cTnI 与冠状动脉病变的关系 cTnI 阳性组的重度血管病变例数远大于 cTnI 阴性组,差异有统计学意义($P < 0.01$,cTnI $\geq 1.5 \mu\text{g/L}$ 为阳性,见表 2。

表 2 cTnI 与冠状动脉病变的关系

组别	n	轻度病变(n)	重度病变(n)
cTnI 阳性组	59	12	47
cTnI 阴性组	27	21	6

3 讨 论

急性冠脉综合征是以动脉粥样硬化为病理基础,炎症在动脉粥样硬化发生、发展中起着重要作用已十分肯定^[3]。冠状动脉斑块内部的炎症细胞及其炎性产物对粥样斑块脂质中心的扩大、纤维组织完整性的破坏及细胞外基质的降解,均有深刻的影响,可能是造成斑块不稳定、斑块破裂的促发因素。CRP 是白介素-6(IL-6)作用于肝脏而合成的一种急性时相反应蛋白,目前被认为是与动脉粥样硬化关系最密切的炎性反应标志物,其水平增高可能是动脉粥样硬化斑块或不稳定型斑块破裂后引起的机体炎症反应^[4]。因此,CRP 水平的高低与疾病的炎症反应程度相关^[5]。hs-CRP 可以检测到 CRP 浓度的微量增高,而这种增高在冠心病的危险性的重要性已被证实^[6]。本研究测定了 86 例 NSTEMI 患者的血清 hs-CRP 水平,与对照组比较,NSTEMI 组明显增高,而且随着炎症反应的加重 hs-CRP 水平逐渐上升,大约 48~72 h 达峰值,证实了高水平 hs-CRP 与内皮血管反应性存在较高相关性,使冠状血管易损斑块的不稳定性增加。

cTnI 在心肌损伤生化指标中有很高的特异性和灵敏度,

可以早期预测 NSTEMI 患者的急性心脏事件的发生,雷华芝和李玉珊^[7]报道,血清 cTnI 预测心脏事件的灵敏度为 86%,特异性为 60%。一旦心肌细胞膜受损时,心肌 cTnI 通过细胞膜进入血循环,在短时间内即可检测到血清 cTnI,并随着心肌损伤加重,血清 cTnI 浓度逐渐增高,表明损伤的心肌细胞尚未完全恢复,因此,cTnI 是长期存在心肌损伤的特异性标志物^[8]。本文中的结果已证实,NSTEMI 患者中血清 cTnI 4~6 h 开始升高,12~20 h 达到高峰,持续 6~7 d 左右恢复正常。

经冠状动脉造影证实,cTnI 浓度越高、持续时间越长的 NSTEMI 患者,冠状动脉病变程度越重;而血清 hs-CRP 水平的高低与冠状动脉狭窄程度无相关性,与沈敏和李兰荪^[9]报道相符合。因此,hs-CRP 和 cTnI 联合测定可以较敏感地检测到微小心肌损伤,对 NSTEMI 患者早期诊断和冠状动脉病变的严重程度及不稳定病变的评估有一定价值。

参考文献:

[1] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志,2007,35(4):295-304.

[2] 谭莹,程多智,张吉才,等. 血栓前体蛋白和心肌肌钙蛋白 I 在急性冠脉综合征早期诊断中的价值[J]. 中国老年学杂志,2007,27(15):1510-1511.

[3] Auer I,Berent R,Lassnig E,et al. C-reactive protein in and coronary artery disease[J]. Jap Heart T,2002,43(6):607-619.

[4] 崔元勇. 急性冠状动脉综合征患者血浆干扰素 γ 、白细胞介素 10 和 C 反应蛋白水平的变化[J]. 中国动脉硬化杂志,2010,18(9):741-743.

[5] 高长斌,张蕾,石琳琳,等. C 反应蛋白与急性冠脉综合征的临床研究[J]. 中国实验诊断学,2003,7(3):217-218.

[6] Blake GJ,Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes[J]. J Am Coll Cardiol,2003,41(1):37-42.

[7] 雷华芝,李玉珊. 心脏肌钙蛋白 I 对老年不稳定型心绞痛患者危险分层的判断价值[J]. 中国老年学杂志,2005,10(25):1246-1247.

[8] 郭伟,潘柏中. 心肌肌钙蛋白-心肌损伤的确定生化标志物[J]. 上海医学检验杂志,2000,15(1):55-57.

[9] 沈敏,李兰荪. 不稳定型心绞痛患者炎性细胞因子的测定及其意义[J]. 中国老年学杂志,2003,5(2):287-288.

(收稿日期:2011-06-16 修回日期:2011-08-22)

(上接第 37 页)

muscle cell phenotype in culture[J]. J Bone Joint Surg Am,2001,1(1):70-78.

[10] Yamada Y,Hosoi T,Makimoto F,et al. Transforming growth factor beta-1 gene polymorphism and bone mineral density in Japanese adolescents[J]. Am J Med,1999,106(4):477-479.

[11] Centrella M,Horowitz MC,Wozey JM,et al. Transforming growth factor-beta gene family members and bone[J]. Endocr Rev,1994,15(1):27-39.

[12] Boyd LM,Chen J,Kraus VB,et al. Conditioned medium differentially regulates matrix protein gene expression in cells of the intervertebral disc[J]. Spine,2004,29(20):

2217-2221.

[13] Pelletier JP,McCullum R,Cloutier JM,et al. Synthesis of metalloproteinases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process [J]. J Rheumatol Suppl,1995,43(1):109-114.

[14] Takahashi H,Suguro T,Dkazima Y,et al. Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine[J]. Spine,1996,21(2):218-224.

[15] 赵绵松,李小霞,张愚. 骨关节炎发病机制中的软骨免疫机制[J]. 中华风湿病学杂志,2005,9(7):434-436.

(收稿日期:2011-07-09 修回日期:2011-08-22)