

• 基础研究 •

抗骨增生胶囊加葡立胶囊和基因治疗对家兔退变颈椎间盘 IL-1 β 、TNF- α 含量变化的影响

刘福成, 赵晓勇, 王海涛, 苏江宁, 孙喜龙
(河北省人民医院骨科, 河北 石家庄 050051)

摘要 目的: 研究抗细胞因子的中西药联合应用、基因治疗对兔退变颈椎间盘内细胞因子含量变化的影响。方法: 选用 35 只 4 个月龄新西兰兔, 体质量 2~3 kg, 雌雄不分, 并随机分为正常对照组、模型浅层组、模型全层组、药物治疗浅层组、药物治疗全层组、基因治疗浅层组、基因治疗全层组。建立家兔颈椎动力平衡失调模型, 诱导颈椎间盘退变(正常对照组不作处理)。术后 7 个月, 药物治疗组(浅层、全层)给予抗骨增生胶囊和葡立胶囊(剂量按体质量折算)灌胃, 2 次/d, 连用 1 个月; 基因治疗组则将带有转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 基因的重组质粒 DNA 注入 C₂-C₅ 椎间盘中(每个椎间盘用量为 20 μ l)。8 个月后用双抗夹心 ELISA 法检测各组动物颈椎间盘中 IL-1 β 、TNF- α 抗体含量。结果: 模型组与正常对照组比较, 颈椎间盘中 IL-1 β 、TNF- α 含量均明显升高($P < 0.01$); 中西药治疗和基因治疗组与模型组比较 IL-1 β 、TNF- α 含量明显降低($P < 0.05$)。结论: 退变颈椎间盘组织释放多种细胞因子和炎性介质, 它们可加速颈椎间盘退变。中西药联合应用及基因治疗能对其含量起明显的抑制作用。

关键词 椎间盘; 抗骨增生胶囊; 葡立胶囊(盐酸氨基葡萄糖); 转化生长因子 β ; 细胞因子

Experimental study of the Anti hyperosteo-geny capsule(抗骨增生胶囊) combined with Glucosamine Hydrochloride capsule(葡立胶囊) and gene therapy on influence in the contents of IL-1 β , TNF α of degenerated cervical intervertebral discs in rabbits LIU Fu-cheng, ZHAO Xiaoyong, WANG Hai-tao, SU Jiang-ning, SUN Xi-long. Hebei Province People's Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China

Abstract Objective: To study the anticytokine Chinese herb combined with western drug and gene therapy on influence in the contents of IL-1 β , TNF α of degenerated cervical intervertebral discs in rabbits. **Methods:** Thirty-five four month old New Zealand rabbits (weight 2~3 kg) were randomly divided into seven groups: normal group, model group (shallow layer), model group (whole layer), drug group (shallow layer), drug group (whole layer), gene group (shallow layer), gene group (whole layer). In all groups except for the normal group, the cervical dynamic unbalance model of rabbits were made to induce to intervertebral disc degeneration. Seven months after operation, the drug groups were fed with Anti hyperosteo-geny capsule and Glucosamine Hydrochloride capsule twice a day for 1 month. The gene groups were infused recombinant plasmid DNA of TGF- β_1 in intervertebral discs of C₂-C₅, 20 μ l in each disc. After eight months, the contents of IL-1 β and TNF α of degenerated cervical intervertebral discs of every group were assayed with ELISA. **Results:** The contents of IL-1 β and TNF α in model group were raised, there was significantly difference as compared with control group ($P < 0.05$). The contents of IL-1 β and TNF α in drug group and gene group were decreased, there was significantly difference as compared with model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The degenerated intervertebral disc releases many kinds of cytokine and inflammatory factors to accelerate the degeneration. Anti hyperosteo-geny capsule combined with Glucosamine Hydrochloride capsule and gene therapy have inhibition of the contents of IL-1 β and TNF α in degenerated cervical intervertebral disc.

Key words Intervertebral disk; Antihyperosteo-geny capsule; Glucosamine Hydrochloride capsule; Transforming growth factor beta; Cytokines

和炎症介质,它们在颈椎病的发生、发展过程中起重要作用。本文通过建立家兔颈椎动力平衡失调模型来诱导颈椎间盘退变,了解家兔退变颈椎间盘内细胞因子含量,观察抗细胞因子的中西药联合应用、基因治疗对其含量影响,为临床实验研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 动物选择与分组 选用 35 只 4 个月龄新西兰兔,体重 2~3 kg,雌雄不分,随机分为正常对照组、模型浅层组、模型全层组、药物治疗浅层组、药物治疗全层组、基因治疗浅层组、基因治疗全层组,每组 5 只。

1.2 造模方法 造模前拍颈椎正侧位 X 线片。将兔颈背部剪毛及清洁,按 0.2 ml/kg 体重进行速眠新(兽用)肌注麻醉。麻醉满意后,俯卧位固定于手术台上,碘酒、乙醇消毒。取颈背部正中纵向切口,从环枕关节至 T₁ 棘突处,长约 7 cm。切开皮肤并牵向两侧,暴露颈背肌,浅层组切除颈背浅肌群(颈斜方肌、头颈菱形肌),全层组切除颈背浅肌群和深肌群(头夹肌、颈夹肌、头最长肌、颈髂肋肌、头半棘肌),止血满意后,间断缝合皮肤切口。术后放至笼中,任其自由活动。正常对照组不作处理。

造模后 7 个月拍颈椎正、侧位 X 线片,可见正常对照组颈椎未见变化;浅层组颈椎生理曲度变小,侧位片示椎间隙变窄,椎体前缘唇样增生,有骨赘形成,椎间孔变小;全层组颈椎生理曲度消失,侧位片示椎间隙明显变窄,椎体前缘唇样增生明显,可见较多骨赘形成,椎间孔变小。说明成功建立家兔颈椎间盘退变模型。

1.3 重组质粒 DNA 的扩增与提取 重组质粒 DNA(15 μl TGF-β₁cDNA 克隆在 EcoR I 位点)购于上海第二军医大学微生物实验室,质粒快速提取试剂盒、EcoR I 内切酶和 DNA-Marker 购于北京鼎国生物制品有限公司;大肠杆菌 JM109 菌液购于上海生工生物制品有限公司;胰蛋白酶、酵母提取物、琼脂粉购于 Sigma 公司;TGF-β₁ 兔抗兔一抗、IgG 鼠抗兔二抗购于博士德生物制品有限公司。大肠杆菌菌株的复苏与培养,采取划痕接种。感受态菌液制备,从 37 °C 过夜培养的培养皿中,挑取单菌落,转到含有 3 ml 大肠杆菌培养基的试管内,37 °C 振荡过夜培养,再接种到含 100 ml 大肠杆菌培养基的烧瓶中,37 °C 剧烈振荡培养,待 OD₂₆₀ 值达 0.3~0.4 时取出,4 °C 离心(4000 r/min) 10 min,回收细胞,放置 4 °C 冰箱 12~24 h。无菌状态下取新鲜感受态菌液 200 μl 至无菌的 10 ml 玻璃试管中,加质粒 DNA 100 ng,轻轻旋转混匀,在冰上放置 30 min,42 °C 热休克 90 s,不要摇动试管,于试管内加无抗生素的普通大肠杆菌培养基 800 μl,37 °C 摇床(150 r/min)温和振荡 45 min。挑取白色菌落至 5 ml 大肠杆菌液体培养基(含氨苄青霉素)中,37 °C 摇床培养 8~12 h,筛选提取重组质粒 DNA。

质粒 DNA 的鉴定,采用单酶切分析法和琼脂糖凝胶电泳法鉴定重组质粒是否含有目的基因 TGF-β₁。在 UV 分析仪下,结果显示:经过酶切的重组质粒 DNA 样品中,可见一条插入的外源基因 DNA 区带,根据对比参照物 Marker 分子量标准,可初步判断其为目的基因 TGF-β₁ 的插入片断。用紫外分光光度仪分别测出所提取质粒 DNA 溶液的 OD₂₆₀=0.018, OD₂₈₀=0.011,计算提取质粒 DNA 溶液的浓度为

0.128 μg/μl,纯度为 1.636,符合分子生物学实验标准。

1.4 中西药治疗和基因治疗 药物治疗组(浅层、全层)家兔给予抗骨增生胶囊(江苏康缘药业股份有限公司提供)和葡立胶囊(山西中远威药业有限公司提供),分别按 1.1 g/kg 和 0.06 g/kg 体质量,两药研磨混匀,溶于 20 ml 蒸馏水中,调配成糊状后灌胃每日 2 次,连用 1 个月。

基因治疗组(浅层、全层)家兔麻醉后,取颈前部正中纵向切口,切开前中筋膜,将气管、食管拉向一侧,以甲状软骨作定位标志,选取 C₂-C₅ 椎间隙,每个椎间盘注入 20 μl 提取的质粒 DNA,注射深度为 0.5 cm。造模后 8 个月时用耳缘静脉气栓法处死各组动物,切取 C₃-C₅ 椎间盘作标本。

1.5 标本处理 ①采用双抗夹心 ELISA 法测定各组动物 C_{4,5} 椎间盘组织中 IL-1β、TNF-α 含量(兔检测试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提供)。②将各组动物 C_{3,4} 椎间盘标本在 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,脱钙,然后浸泡在 Bouin 液固定,乙醇逐级脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,沿椎间盘冠状面制作石蜡切片,厚度为 4 μm。经铁苏木素及伊红染色后光学显微镜下观察形态学改变。③将切片置于 60 °C 烤箱烘烤 24 h,二甲苯脱蜡,乙醇脱水后滴加 I 10 正常兔血清,封闭 20 min,滴加 I 500 稀释的兔抗兔 TGF-β₁ IgG(第一抗体),置于湿盒内室温放置 3 h,经 PBS 缓冲液洗涤后滴加 I 100 稀释的鼠抗兔 IgG(第二抗体),重新置于湿盒内室温放置 30 min,在经 PBS 洗涤后滴加 I 100 稀释亲合素标记的辣根过氧化物酶,置于湿盒内室温放置 30 min,最后加 BAB 显色剂,用树脂胶封片,镜检。用自动图像分析仪对免疫组织化学结果进行分析,给出 TGF-β₁ 表达阳性面积比。

1.6 数据统计 采用 SPSS 10.0 统计软件处理,全部数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较采用 *t* 检验;多样本均数比较采用双因素方差分析,再采用 LSD *t* 检验进行多个样本均数间的两两比较,*P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

(1) 椎间盘切片病理学观察结果:浅层造模组髓核细胞形态异常,胞浆减少,胞核浓缩;全层造模组髓核细胞稀少,胞核固缩明显,胞浆明显减少。中西药治疗浅层组髓核细胞丰富,胞浆均匀,胞核形态基本正常;中西药治疗全层组髓核细胞多于全层造模组,胞核胞浆有一定恢复。基因治疗浅层组髓核细胞丰富,胞浆均匀,胞核形态接近正常;基因治疗全层组髓核细胞多于全层造模组,胞核胞浆有一定程度恢复,但退变程度重于基因治疗浅层组。

(2) 模型浅层组和模型全层组中 IL-1β 和 TNF-α 含量较正常对照组明显升高。抗骨增生胶囊和葡立胶囊联合应用及基因治疗均能抑制退变颈椎间盘组织中 IL-1β、TNF-α 的含量,有显著性差异(见表 1)。模型浅层组与正常对照组比较,*P*(IL-1β) < 0.01, 0.01 < *P*(TNF-α) < 0.05;模型全层组与正常对照组比较,*P*(IL-1β) < 0.01, *P*(TNF-α) < 0.01;药物治疗浅层组与模型浅层组比较,0.01 < *P*(IL-1β) < 0.05, 0.01 < *P*(TNF-α) < 0.05;药物治疗全层组与模型全层组比较,*P*(IL-1β) < 0.01, 0.01 < *P*(TNF-α) < 0.05;基因治疗浅层组与模型浅层组比较,0.01 < *P*(IL-1β) < 0.05, 0.01 < *P*(TNF-α) < 0.05;基因治疗全层组与模型全层组比较,0.01 < *P*(IL-1β) < 0.05, 0.01 < *P*(TNF-α) < 0.05。

表 1 各组动物颈椎间盘内 IL-1 β 和 TNF α 含量 (n = 5, $\bar{x} \pm s$, pg/g)

Tab. 1 The contents of IL-1 β and TNF α in cervical intervertebral discs (n = 5, $\bar{x} \pm s$, pg/g)

Groups	IL-1 β	t	TNF α	t
Normal	5.164 \pm 1.804		1.552 \pm 0.483	
Model (shallow)	7.379 \pm 3.156	3.848	2.870 \pm 0.735	2.871
Model (whole)	8.437 \pm 3.771	4.736	3.136 \pm 0.752	3.794
Dmg (shallow)	5.968 \pm 2.148	- 3.475	1.590 \pm 0.516	- 2.633
Dmg (whole)	6.212 \pm 2.566	- 3.985	1.844 \pm 0.624	- 3.481
Gene (shallow)	6.169 \pm 2.485	- 2.994	1.821 \pm 0.597	- 3.025
Gene (whole)	7.074 \pm 2.987	- 3.691	2.094 \pm 0.685	- 2.838

(3) 分别与模型浅层、全层组比较,基因治疗浅层、全层组颈椎间盘细胞内 TGF- β_1 表达阳性面积比明显增加,有统计学差异(见表 2)。基因治疗浅层组与模型浅层组比较, $P < 0.01$; 基因治疗全层组与模型全层组比较, $P < 0.01$ 。

表 2 模型组和基因治疗组颈椎间盘细胞内 TGF- β_1 表达阳性面积比($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The comparison on the percentage of positive TGF- β_1 expression area in cervical intervertebral disc cells between model groups and gene treatment groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	阳性面积比 (%) Percentage of positive area (%)	t
Model (shallow)	1.2 \pm 0.45	
Gene (shallow)	3.0 \pm 0.71	- 4.811
Model (whole)	0.4 \pm 0.55	
Gene (whole)	2.0 \pm 0.84	- 4.025

3 讨论

3.1 细胞因子在颈椎间盘退变中的作用 本实验检测发现家兔退变颈椎间盘内 IL-1 β 、TNF- α 含量明显升高,它们可损害神经根,诱发痛觉过敏,促进炎症反应和颈椎间盘内蛋白多糖(PG)、胶原的降解,促进颈椎间盘退变, Wehling 等^[1]和 Kang 等^[2]的研究也有相似的结论。

3.2 抗骨增生胶囊及葡立胶囊抗炎作用的机制探讨 抗骨增生胶囊由狗脊、骨碎补、鸡血藤、莱菔子、牛膝、女贞子、肉苁蓉、熟地黄、淫羊藿等成分组成。熟地黄、肉苁蓉和莱菔子三者结合可兴奋垂体-肾上腺皮质系统,有抗炎和增强免疫功能;淫羊藿和女贞子可提高机体免疫功能,改善微循环;骨碎

补和牛膝可活血止痛,抑制单核细胞、巨噬细胞产生 IL-1 α 、IL-1 β 、TNF α 等;鸡血藤舒筋活络,改善微循环,对免疫系统具有双向调节作用。

葡立胶囊的有效成分为盐酸氨基葡萄糖,可选择性地作用于关节软骨,抑制 IL-1 β 等炎性介质,使 PG 合成增加,并防止超氧化自由基的产生,延缓骨性关节炎的病理过程和疾病的进展。而颈椎间盘具有关节软骨类似的特征,盐酸氨基葡萄糖可使退变颈椎间盘内 IL-1 β 等炎性介质的含量明显降低,增加 PG 合成,减轻痛觉过敏和 IL-1 β 等对神经根损害作用,从而延缓椎间盘退变进程。

本实验抗骨增生胶囊和葡立胶囊联用减少了炎症介质的合成,从而起到延缓颈椎间盘退变的作用。

3.3 TGF- β_1 抗炎作用的机制探讨 转化生长因子 β 是一多效能因子,它可抑制大多数 T、B 细胞系在体外的增殖和分化,拮抗 IL-1 β 、TNF- α 和干扰素 γ (IFN- γ) 等细胞因子的效应;抑制 IL-1 β 和 IL-2 受体的表达;阻止巨噬细胞产生 IL-1、TNF- α 、NO 及过氧化物;抑制中性粒细胞和 T 细胞粘附于内皮细胞,从而限制了炎症细胞补充到损伤部位。本实验说明 TGF- β_1 可通过抑制炎症介质的合成延缓颈椎间盘退变的作用。

参考文献

- 1 Wehling P, Cleveland SJ, Heining K, et al. Neurophysiologic changes in lumbar nerve root inflammation in the rat after treatment with cytokine inhibitors. Spine, 1996, 21: 931-935.
- 2 Kang JD, Georgescu HI, McIntyre Lark L, et al. Herniated cervical and lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinase, nitric oxide, interleukin 6 and prostaglandin E₂. Spine, 1996, 21: 271-278.

(收稿日期: 2005-03-01 本文编辑: 连智华)

书 讯

《中西医结合骨科外固定治疗学》一书,近日由人民卫生出版社出版发行。全书 129.5 万字,文中配有 800 幅讲解图片。该书由中国中医研究院骨伤科研究所与天津、河北等 14 家医院和研究所有关专家及中青年科学工作者撰写而成,中国中医研究院孟和研究员担任主编,卫生部原副部长胡熙明为该书作序。该书对中西医结合骨科外固定治疗学的发展历程、理论和具体疗法都有讲述。该书以 3/5 的篇幅讲解各部位骨折、肢体畸形与退行性骨关节疾病的发病机制、类型、程度、疗法选择,以及骨折愈合方面的最新科研信息,并列举典型病例,对治疗过程中发生的临床现象进行分析、讨论,把成功的经验和失败的教训均写在书中,与读者共同交流探讨。

本书精装本定价 106 元,标准书号为 ISBN 7 117 06901 5/R·6902。邮购地址:中国中医研究院骨伤科研究所 王德龙 邮政编码:100700 免邮资,含包装、挂号费书价 110 元,款到发书。