

颈椎黄韧带叠压症兔黄韧带 TGF- β 1 的表达^{*}

吴 彬 孟纯阳 王海滨 贾存岭 赵益峰 贾代良

(济宁医学院附属医院,山东 济宁 272029)

摘 要 **目的** 研究颈椎黄韧带叠压兔黄韧带中转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1,TGF- β 1) 的表达变化。**方法** 48 只新西兰大白兔,随机分为模型组和对照组,每组 24 只动物。模型组通过颈椎前路穿刺破坏纤维环及抽吸颈 5/6 髓核组织建立兔颈椎黄韧带叠压动物模型,术后 4、8、12 周 3 个时间点处死动物取材,切取颈 5/6 后方黄韧带组织,制作石蜡切片并做免疫组织化学检查及图像分析。**结果** 模型组黄韧带纤维排列紊乱,玻璃样变性,TGF- β 1 表达升高,与对照组相比差异有显著统计学意义($P<0.05$),其中术后 4 周组变化最为明显,术后 8、12 周 TGF- β 1 的表达较术后 4 周降低,差异无统计学意义。**结论** TGF- β 1 在颈椎黄韧带叠压兔黄韧带中的表达增加,加速了黄韧带的退变。

关键词 TGF- β 1;颈椎黄韧带叠压;动物模型

中图分类号:R686.5 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2013)12-393-04

Experimental research of TGF- β 1 expressed in folding compression of cervical ligamentum flavum animal models

WU Bin, MENG Cun-yang, WANG Hai-bin, et al

(The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To study TGF- β 1 expressed in folding compression of cervical ligamentum flavum animal models. **Methods** Forty-eight mature New Zealand white rabbits (3000 ± 250 g) were divided into two groups randomly, with 24 rats in control group and 24 rats in model group. The folding compression of cervical ligamentum flavum animal models were made by destroyed annulus fibrosus and absorbed nucleus pulposus. Eight rabbits in each group were killed four weeks, eight weeks and twelve weeks after operation. The ligamentum flavum of C5/6 were collected, embedded in paraffin and cut into slices. The slices were treated by immunohistochemistry and the image analysis. **Results** Fibers derangement and hyaline degeneration in ligamentum flavum was found in model group. The expression of TGF- β 1 in model group was higher than control group, and the difference was significant($P<0.05$). After operation for 8 and 12 weeks in the model group the expression of TGF- β 1 was decreased than those of 4 weeks. But there was no significant difference in statistics. **Conclusion** Expression of TGF- β 1 increased in folding compression of cervical ligamentum flavum animal models and accelerate the degeneration of the ligamentum flavum.

Key words: TGF- β 1; folding compression of cervical ligamentum flavum; animal models

颈椎病患者病因与颈椎间盘退变、关节突增生及黄韧带肥厚密切相关^[1-2],其中黄韧带肥厚在颈椎病的发病中起了重要的作用^[3-4]。在此过程中,黄韧带发生了何种组织学改变及细胞因子的变化,文献鲜见报道。本文通过手术破坏新西兰大白兔颈 5/6 椎间稳定结构,引起后方黄韧带退变增生,在颈椎后伸时增生的黄韧带突入椎管,造成对脊髓

的压迫,建立兔颈椎黄韧带叠压模型,观察黄韧带形态学、生物化学方面的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 3 月龄新西兰大白兔 48 只,雌雄不限,普通级,质量(3000 ± 250)g,合格证号:SCXK(鲁)20110013,由山东农业科学院畜牧兽医研究所提供。

^{*} [基金项目]济宁医学院青年基金项目(编号:20090511)

1.1.2 主要试剂及仪器 胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司,免疫组化 TGF- β 1 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 颈椎叠压症动物建模 48 只新西兰大白兔随机分为 2 组,每组 24 只动物,模型组通过颈椎前路穿刺破坏纤维环及抽吸颈 5/6 髓核组织的办法建立黄韧带叠压动物模型。10% 水合氯醛 (300mg/kg) 腹腔注射麻醉,动物取仰卧位,以颈 5 为中心取前路纵切口长约 3cm,逐层切开,钝性分离,显露颈 5/6 椎间盘,针刺法破坏纤维环并抽吸髓核组织,彻底止血后缝合深筋膜及皮肤,术中注意观察呼吸、心率的变化,术后分笼喂养,肌注青霉素 1 周, 4×10^5 u/d, 对照组动物不作处理。术后让动物自由活动颈部。

1.2.2 颈 5/6 黄韧带标本处理 建模后 4、8、12 周分别空气栓塞法处死对照组、模型组各 8 只动物,锋利刀片切取颈 5/6 黄韧带组织,置于 4% 多聚甲醛中固定 24h, 10% EDTA 中脱钙 72h,流水冲洗 24h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋备用。石蜡包埋后进行连续切片备用,片厚 5 μ m,进行苏木精-伊红染色,用日本奥林帕斯 BX51 显微镜进行观察,免疫组化法检测 TGF- β 1,一抗为 TGF- β 1 抗体(武汉博士德生物工程有限公司),二抗为 DAB 显色剂 ZLI-9032(北京中杉金桥生物技术有限公司),使用高温高压抗原修复,37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 2h,用 DAB 显色,阳性颗粒呈棕黄色。

1.3 统计学方法

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计分析软件进行统计学处理。

2 结果

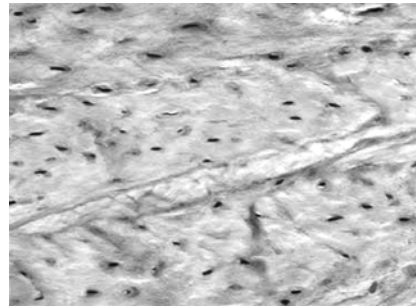
2.1 颈 5/6 黄韧带组织学变化

颈 5/6 黄韧带组织进行苏木精-伊红染色,对照组颈 5/6 黄韧带纤维环排列规则,细胞排列与分层的纤维环方向一致,纤维环的细胞呈梭形,其细胞核呈长茄形。模型组整个纤维环变得粗糙,排列紊乱,玻璃样变性及色素沉着,纤维环中可见圆形的纤维软骨细胞,纤维环之间形成裂隙,术后 12 周时最为明显,见图 1。

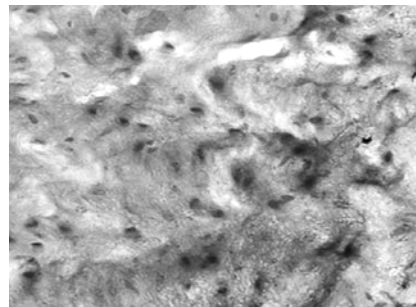
2.2 颈 5/6 黄韧带 TGF- β 1 表达的变化

用 SABC 免疫组织化学方法标记黄韧带中的 TGF- β 1,阳性颗粒呈棕褐色,定位于基质中,呈网束状。

模型制作后 4、8、12 周,模型组黄韧带 TGF- β 1 的阳性染色面积较对照组明显增加,两组比较具有显著性学意义 ($P < 0.01$); 术后 8 周及 12 周组黄韧带 TGF- β 1 的阳性面积较术后 4 周组减少,两两比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2、表 1。

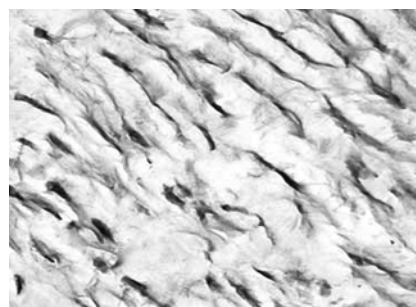


A. 对照组黄韧带(术后 12 周)(HE $\times 200$)

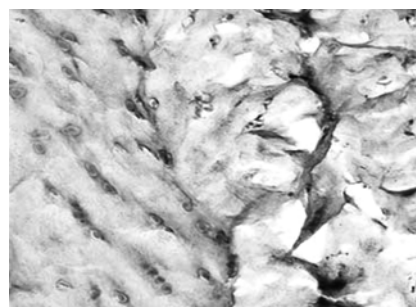


B. 模型组黄韧带(术后 12 周)(HE $\times 200$)

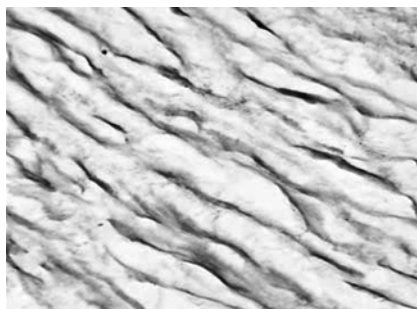
图 1 两组颈 5/6 黄韧带组织学变化



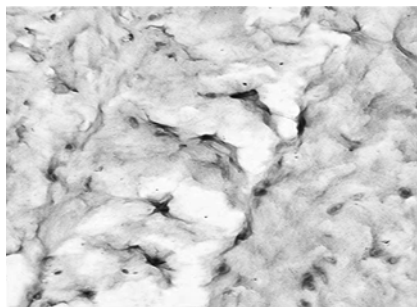
A. 对照组术后 4 周黄韧带 TGF- β 1 的表达(SABC $\times 200$)



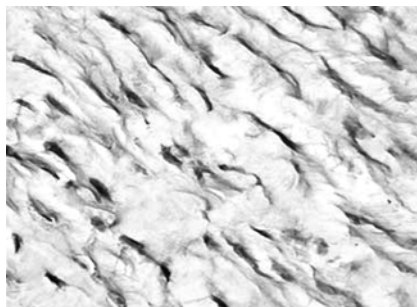
B. 模型组术后 4 周黄韧带 TGF- β 1 的表达(SABC $\times 200$)



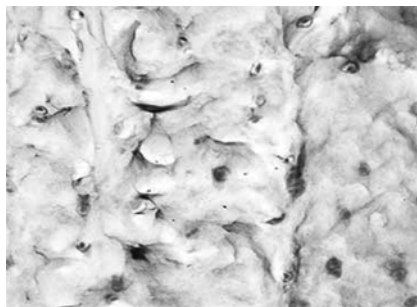
C. 对照组术后 8 周黄韧带 TGF-β1 的表达(SABC ×200)



D. 模型组术后 8 周黄韧带 TGF-β1 的表达(SABC ×200)



E. 对照组术后 12 周黄韧带 TGF-β1 的表达(SABC ×200)



F. 模型组术后 12 周黄韧带 TGF-β1 的表达(SABC ×200)

图 2 两组颈 5/6 黄韧带 TGF-β1 的表达变化

表 1 颈椎黄韧带叠压症 C5/6 黄韧带
TGF-β1 阳性表达面积($\bar{x} \pm s$)

分组	4 周	8 周	12 周	F 值	P
对照组	9.12±1.46	8.79±1.14	8.90±1.34	2.55	>0.05
模型组	14.78±2.04	12.91±2.24	12.65±1.88		
t	6.37	4.63	4.62		
P	<0.01	<0.01	<0.01		

2 讨论

黄韧带连接椎弓板,从上位椎弓板的下缘和内面,连至下位椎弓板的上缘和外面,参与围成椎管的后壁和后外侧壁。黄韧带退变后拉伸增厚,颈椎后伸时黄韧带形成皱褶,突入椎管,压迫脊髓,严重者可致瘫痪,毛宾尧称之为黄韧带叠压症^[5]。临床上对其研究甚少,且文献鲜见报道。本文模拟人颈椎退变的过程,前路破坏椎间盘的稳定性、降低椎间高度,造成后方黄韧带拉伸、退变,增生、肥厚,颈椎后伸时突入椎管内压迫脊髓。在此过程中我们发现 TGF-β1 在模型制作的早期明显增加,而随着时间的延长,未再持续增加,而是稍有下降,可能为颈椎黄韧带退变的早期刺激 TGF-β1 的异常表达,而退变过程中,TGF-β1 可能作为加速退变的因素仍持续表达。

颈椎的稳定平衡主要由 2 部分来维持,一是静力性平衡,包括椎体、椎弓及其突起、椎间盘和相连的韧带结构。二是动力性平衡,主要为颈部肌肉的调节与控制^[6]。上述任何一个环节遭受破坏,均可能引起或诱发颈椎正常结构及平衡功能的丧失,从而导致颈椎不稳定,加速椎间盘及后方黄韧带的退变。本文通过颈椎前侧入路,针刺破坏了纤维环,并抽吸出髓核组织,使颈椎前方稳定性下降,同时椎间高度下降,导致颈椎后方稳定性受到影响,表现为黄韧带退变、增生、肥厚,后期黄韧带突向椎管,压迫脊髓,同时黄韧带本身的形态学发生改变。对照组正常黄韧带纤维排列规则,细胞排列与分层的纤维方向一致,纤维的细胞呈梭形,其细胞核呈长茄形。而模型组整个纤维变得粗糙,排列紊乱,玻璃样变性及色素沉着,纤维之间形成裂隙,术后 12 周时最为明显,并出现了纤维骨化的表现。

TGF-β1 是一种调节细胞生长与分化的超家族分子,几乎参与了哺乳动物所有细胞的病理生理过程,尤其在细胞外基质的产生及调控方面意义重大^[7-8]。正常情况下 TGF-β1 在颈椎黄韧带中少量表达,当黄韧带受到刺激后表达增加,本文证实了这一点。在我们制作的模型中,椎间高度降低,颈椎稳定受到影响,后方的黄韧带生物力学改变,受刺激后发生退变,出现增生、钙化、骨化。TGF-β1 在黄韧带受到刺激的早期即出现大量表达,随着时间的变化,不是持续的增长,而是在保持高水平的过程中略有下降。TGF-β1 表达增加可能为黄韧带退变的首要原因及促成因素。(下转第 399 页)

- [6] 余宇燕,庄惠生,沙玫,等. 荧光法测定食品包装材料中的双酚 A[J]. 分析测试学报,2006,25(5):99-101.
- [7] 唐舒雅,庄惠生. 荧光法测定水中双酚 A 残留的研究[J]. 工业水处理,2006,26(3):74-76.
- [8] 孙仕萍,马志东,张文德. 单扫示波极谱法测定食品包装材料中双酚 A 的研究[J]. 分析科学学报,2005,18(6):490-492.
- [9] 李江,李容,李永强,等. BPA 在 Na-MMT-CMC/GCE 修饰电极上的电化学反应与检测[J]. 分析测试学报,2008,27(7):766-68.
- [10] 张岩,庄惠生. 聚酸性蓝 62 膜修饰电极对双酚 A 的电催化氧化及其应用[J]. 分析科学学报,2013,29(1):49-52.
- [11] 匡云飞,邹建陵,李薇. 双酚 A 在壳聚糖石墨烯复合膜电化学传感器上的电化学反应及测定[J]. 分析实验室,2013,32(3):56-61.
- [12] Yin HS,Zhou YL,Ai SY, et al. Electrochemical behavior of bisphenol A at glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles, silk fibroin, and PAMAM dendrimers[J]. Microchim Acta,2010,170(1):99-105.
- [13] Yin HS,Zhou YL,Cui L, et al. Electrochemical oxidation be-

havior of bisphenol A at surfactant/layered double hydroxide modified glassy carbon electrode and its determination[J]. J Solid State Electrochem,2011,15(1):167-173.

- [14] Fan H,Li Y,Wu D,et al. Electrochemical bisphenol A sensor based on N-doped graphene sheets[J]. Anal Chim Acta,2012,711(28):24-28.
- [15] 何晓英,宋桃,樊光银,等. 双酚 A 在纳米金-离子液体复合修饰电极上的电化学反应及测定[J]. 分析测试学报,2011,30(5):42-46.
- [16] Cui YH,Li XY,Chen G. Electrochemical degradation of bisphenol A on different anodes[J]. Water Res,2009,43(7):1968-1976.
- [17] Tu XM,Yan LS,Luo XB. Electroanalysis of bisphenol A at a multiwalled carbon nanotubes-gold nanoparticles modified glassy carbon electrode[J]. Electroanalysis,2009,21(22):2491-2494.

(收稿日期 2013-09-01)

(上接第 395 页)

脊柱稳定结构对维持脊柱的正常形态和生理功能意义重大^[9-11]。本实验破坏了颈椎前方静力平衡结构,这种平衡的失调导致后方黄韧带的受力改变,从而导致了黄韧带退变、增生、突向椎管,形态学表现为黄韧带纤维层次结构不清,玻璃样变性,后期出现纤维骨化,在生物化学方面表现为黄韧带中 TGF- β 1 表达增加。

综上,前方椎间高度的降低及稳定性改变会导致后方黄韧带退变、拉伸、突向椎管,形成黄韧带叠压,引起 TGF- β 1 的表达增加,这可能是引起黄韧带退变的主要因素之一,但由于黄韧带退变的机制较为复杂,我们研究的时间较短,是否还有其他细胞因子的参与,需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Jiang SD,Jiang LS,Dai LY. Degenerative cervical spondylolisthesis;a systematic review[J]. Int Orthop,2011,35(6):869-875.
- [2] Ng HW,Teo EC,Lee KK,et al. Finite element analysis of cervical spinal instability under physiologic loading[J]. Spinal Disord Tech,2003,16(1):55-65.
- [3] Ratliff J,Voorhies R. Increased MRI signal intensity in association with myelopathy and cervical instability: case report

and review of the literature[J]. Surg Neurol,2000,53(1):8-13.

- [4] 贾连顺. 颈椎病研究的现状进展和展望[J]. 中国矫形外科杂志,2001,11(8):733-734.
- [5] 毛宾尧,应忠追,胡裕桐,等. 颈椎黄韧带叠压症[J]. 中国矫形外科杂志,2001,8(10):949-952.
- [6] Hoogendoorn RJ,Wuisman PI,SmitTH,et al. Experimental intervertebral disc degeneration induced by chondroitinase ABC in the goat[J]. Spine,2007,32(17):1816-1825.
- [7] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis[J]. J Pathol 2008,214(2):199-210.
- [8] Gorelik L,Flavell RA. Transforming growth factor beta in T-cell biology[J]. Nat Rev Immunol,2002,2(1):46-53.
- [9] Smith LJ,Nerurkar NL,Choi KS,et al. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. [J] Dis Model Mech,2011,4(1):31-41.
- [10] Yoon JY,Chang H,Park KB,et al. Effect of the number of involved spinal cord segments on gait function in patients with cervical spondylotic myelopathy[J]. Asian Spine,2012,6(4):233-240.
- [11] Kotani Y,Takahata M,Abumi K,et al. Cervical myelopathy resulting from combined ossification of the ligamentum flavum and posterior longitudinal ligament: report of two cases and literature review[J]. Spine,2013,13(1):e1-e6.

(收稿日期 2013-10-22)