

尼古丁对大鼠椎间盘内细胞因子表达的影响及意义

李左安,张旭鸣(福建省立医院/福建医科大学省立临床医学院,福州 350001)

【摘要】 目的 观察尼古丁对大鼠椎间盘内细胞因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-1 受体(IL-1R I)表达的意义。**方法** 两个被动吸烟箱各放 30 只 S-D 大鼠,分别以不同的吸烟量持续被动吸烟制作动物模型,于第 2、4、8 周处死大鼠,以免疫组化观察 IL-1 β 、IL-1R I 的表达情况,以不吸烟组为对照组。**结果** 低吸烟量组 IL-1 β 、IL-1R I 免疫组化阳性细胞率持续上升,在第 8 周分别达到(52.00 \pm 3.91)%、(31.00 \pm 2.29)%;同样,高吸烟组分别达到(76.00 \pm 3.24)%、(46.00 \pm 2.79)%,明显高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 持续被动吸烟的情况下,大鼠椎间盘内 IL-1 β 、IL-1R I 的表达与吸烟的时间和量呈正相关性,IL-1 β 、IL-1R I 表达的异常升高可能与大鼠椎间盘退变有关。

【关键词】 细胞因子白介素-1 β ; 白介素-1 受体; 被动吸烟; 免疫组化

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.19.033 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)19-2564-02

Influencing of nicotine on the expression of IL-1 β and IL-1R I in intervertebral disc of rats LI Zuo-an, ZHANG Xu-ming (Department of Orthopaedics, Fujian Provincial Hospital/Fujian Medical University Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influencing of nicotine on the expression of interleukin (IL)1 β (IL-1 β) and IL-1 receptor I (IL-1R I) in intervertebral discs of rats. **Methods** Cigarette-smoking rats models with tow different quantity of cigarettes were established and the expression levels of IL-1 β and IL-1R I were detected on the 2, 4 and 8 weeks after model construction, and the results were compared with non-smoking rats. **Results** The positive rates of IL-1 β and IL-1R I were (76.00 \pm 3.24)% and (46.00 \pm 2.79)% in high cigarettes quantity cigarettes group, and those were (52.00 \pm 3.91)% and (31.00 \pm 2.29)% respectively in low cigarettes quantity group after 8 weeks of passive smoking, both of which were significantly higher than non-smoking group ($P < 0.01$). **Conclusion** Passive-smoking could inducing the expression of IL-1 β and IL-1R I in intervertebral discs of rats, which might be related with time of smoking and quantity of cigarettes. The high expression of IL-1 β and IL-1R I could be related with the degeneration of intervertebral disc in rats.

【Key words】 IL-1 β ; IL-1R I; passive smoking; immunohistochemistry

被动吸烟已被证实能引起椎间盘退变,细胞因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-1 受体(IL-1R I)在椎间盘退变过程中起着相当重要的作用^[1];但不同吸烟量(或血液中不同的尼古丁浓度)及不同吸烟时间对椎间盘内 IL-1 β 、IL-1R I 的表达有无异同,目前尚少见文献报道。本实验在不同吸烟条件下观察退变的椎间盘中 IL-1 β 、IL-1R I 的表达有无量效及时效关系,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验模型的制作及分组 对照组 10 只,为不吸烟组;模型的制作按吸烟量的不同分两种情况,A 组:吸烟量为每 1.5 小时 1 支香烟,每天 12 次;B 组:吸烟量为每 1.5 小时 3 支香烟,每天 12 次。两被动吸烟箱内都有 30 只 S-D 大鼠(由同济医学院提供),在持续吸烟 2、4、8 周后各以颈椎脱臼法处死 10 只大鼠,被动吸烟箱大小均为:70 cm \times 50 cm \times 35 cm;不同时间通过高效液相色谱仪多次检测,A 组大鼠在被动吸烟 10 min 后血液中的尼古丁浓度稳定在 30~119 ng/mL,平均 69 ng/mL;B 组大鼠在被动吸烟 10 min 后血液中的尼古丁浓度稳定在 52~173 ng/mL,平均 105 ng/mL;未吸烟组血液中尼古丁的浓度是 2.1~6.6 ng/mL,平均 3.8 ng/mL,采用单因素方差分析, $P < 0.01$,各个组别的浓度均差异有统计学意义。

1.2 取材及初步处理 各组到达造模时间后采用颈椎脱臼法处死大鼠,尖刀片及眼科剪仔细剥离椎间盘组织,取腰 4~5 椎

间盘,10%甲醛固定,20%乙二胺四乙酸脱钙后,石蜡包埋,并行 HE 染色。

1.3 免疫组化 运用免疫组化 S-P 法检测 IL-1 β 和 IL-1RI 的表达,具体操作按说明书进行。每例石蜡标本以 4 μ m 厚切片,切片常规脱蜡至水,微波修复抗原,3%过氧化氢处理 10 min 以抑制内源性过氧化物酶活性,滴加一抗(分别采用博士德公司兔抗鼠 IL-1 β 及 IL-1RI 多克隆抗体,1:80 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,生物素标记的二抗处理 15 min,DAB 显色,自来水冲洗终止反应,苏木精复染,脱水,透明,封片。用 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.4 结果判定 HMISA-2000 分析仪照相,每张切片随机观察 5 个高倍视野,计算 IL-1 β 和 IL-1RI 染色的阳性细胞率。

1.5 统计学处理 采用统计软件 SPSS13.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。大鼠椎间盘内 IL-1 β 和 IL-1RI 免疫组化阳性细胞率的比较采用 t 检验。而不同浓度组之间进行比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA),组间两两比较采用 SNK 法。

2 结 果

A、B 两组在被动吸烟 8 周后椎间盘纤维环出现不同程度的退变,从 HE 染色可见:A 组纤维环结构紊乱,局部出现小范围撕裂现象;而 B 组椎间盘纤维环出现较大范围的撕裂、缺失,结构紊乱。按照 Miyamoto 等^[2]椎间盘退变的程度分级,

第 8 周时 A 组见 80% 为 2 级退变, 20% 为 1 级退变; 第 8 周时 B 组见 66.7% 椎间盘产生 3 级退变, 33.3% 为 4 级退变。

A、B 组的 IL-1 β 和 IL-1RI 免疫组化阳性细胞率随着被动吸烟时间的延长而增加, $P < 0.01$; 在不同吸烟量(即不同的血液尼古丁浓度)作用下, B 组的 IL-1 β 和 IL-1RI 免疫组化阳性细胞率在 2、4、8 周均比 A 组高($P < 0.01$), 见表 1、2。

表 1 IL-1 β 免疫组化阳性细胞率($\bar{x} \pm s, \%$)

时间	对照组	A 组	B 组
2 周	7.00 \pm 1.86	11.00 \pm 2.83 ^a	26.00 \pm 1.91 ^{ab}
4 周	6.90 \pm 1.65	28.00 \pm 2.33 ^a	53.00 \pm 2.86 ^{ab}
8 周	7.15 \pm 1.93	52.00 \pm 3.91 ^a	76.00 \pm 3.24 ^{ab}

注:^a与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 A 组比较,^b $P < 0.01$ 。

表 2 IL-1RI 免疫组化阳性细胞率($\bar{x} \pm s, \%$)

时间	对照组	A 组	B 组
2 周	0.00	9.00 \pm 1.92 ^a	15.00 \pm 1.82 ^{ab}
4 周	0.00	15.00 \pm 2.26 ^a	27.00 \pm 2.43 ^{ab}
8 周	0.00	31.00 \pm 2.29 ^a	46.00 \pm 2.79 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 A 组比较,^b $P < 0.01$ 。

3 讨 论

自从吸烟诱导椎间盘退变模型成功建立以来,椎间盘退变的机制研究又进入一个高潮^[1]。以往对椎间盘退变机制的研究多以生物力学因素为主,近年来生物化学因素在椎间盘退变机制中的作用成为研究的热点。

本实验成功的复制了大鼠被动吸烟致椎间盘退变模型,通过 HE 染色观察到椎间盘撕裂等退变现象,从 A、B 两组的椎间盘退变程度分级结果来看,椎间盘退变程度与被动吸烟的量成正比,与被动吸烟的时间成正比。尼古丁可能减少椎间盘周围的血管芽,也使椎间盘组织周围的血管网收缩,减少血流,引起椎间盘组织的营养物质和代谢产物的交换困难;到髓核组织的氧分压降低,促使椎间盘组织从有氧代谢转变为无氧代谢为主的过程;导致组织退变,以及抑制蛋白多糖和胶原的合成。

本研究结果显示,被动吸烟的时和量与大鼠椎间盘中的 IL-1 β 和 IL-1RI 免疫组化阳性细胞率存在时效量效关系,都呈正相关性。IL-1 家族在各种与椎间盘退变有关的生物化学因素中处于非常重要的地位,调节诸多与椎间盘退变相关的生物化学因素;且 IL-1 β 本身就是诱导椎间盘退变的因素,也被用作椎间盘退变模型的处理因素^[6-10]。

本研究发现,持续被动吸烟后,IL-1 β 、IL-1RI 的表达持续上升,各期与对照组比较明显升高。因此吸烟诱导的椎间盘退变的发病机制可能与 IL-1 β 、IL-1RI 密切相关;吸烟的时间和量与椎间盘内 IL-1 β 、IL-1RI 的表达呈正相关性,也就是说存在时效和量效关系。大鼠被动吸烟致椎间盘退变模型的成功,提示人类吸烟也很可能是导致椎间盘退变的原因,本实验

用大鼠模拟人体吸烟环境成功建立大鼠被动吸烟椎间盘退变模型,应提高医学工作者的警惕;目前椎间盘退变的治疗尚无很好的办法,预防椎间盘退变便成为医学工作者必须倡导的工作,世界上吸烟人口数目庞大,戒烟应该成为一种吸烟者预防或延缓椎间盘退变的可能有效的手段。IL-1 β 、IL-1RI 可能是治疗椎间盘退变的重要靶点。

参考文献

- [1] 熊小芊,杨述华,邵增务,等. 烟酰胺对椎间盘聚集蛋白聚糖的调控作用[J]. 中国中医骨伤科杂志,2005,13(5):1-4.
- [2] Miyamoto S, Yonenobu K, Ono K. Experimental cervical spondylosis in the mouse[J]. Spine(Phila Pa 1976),1991,16(10 Suppl):495-500.
- [3] Oda H, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model[J]. J Orthop Sci, 2004, 9(2):135-141.
- [4] Iwahashi M, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al. Mechanism of intervertebral disc degeneration caused by nicotine in rabbits to explicate intervertebral disc disorders caused by smoking[J]. Spine(Phila Pa 1976),2002,27(13):1396-1401.
- [5] Uematsu Y, Matuzaki H, Iwahashi M. Effects of nicotine on the intervertebral disc: an experimental study in rabbits[J]. J Orthop Sci, 2001, 6(2):177-182.
- [6] Jimbo K, Park JS, Yokosuka K, et al. Positive feedback loop of interleukin-1beta upregulating production of inflammatory mediators in human intervertebral disc cells in vitro[J]. J Neurosurg Spine, 2005, 2(5):589-595.
- [7] Wallace JL. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005, 100(Suppl 1):5-9.
- [8] Tsuzaki M, Guyton G, Garrett W, et al. IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells[J]. J Orthop Res, 2003, 21(2):256-264.
- [9] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(4):R732-R745.
- [10] Aida Y, Maeno M, Suzuki N, et al. The effect of IL-1beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes[J]. Life Sci, 2005, 77(25):3210-3221.

(收稿日期:2013-01-25 修回日期:2013-05-22)

(上接第 2563 页)

心房颤动 112 例疗效及安全性观察[J]. 中国基层医药, 2008, 15(5):854.

- [4] 刘敏,陈弹,蒋廷波,等. 心电图和心脏超声心动图对心尖肥厚型心肌病诊断价值的相关性分析[J]. 新医学, 2010, 41(12):791-794.
- [5] 祁薇,沈晓洁,周兢,等. 超声心动图和心电图对心尖肥厚型心肌病的诊断价值[J]. 实用医学影像杂志, 2009, 10(3):188-190.
- [6] 马秀华. 超声心动图在诊断心尖肥厚型心肌病中的应用[J]. 中国社区医师:医学专业, 2008, 10(10):89.

- [7] 韩瑞琳,龚宇龙,杨法. 8 例心尖肥厚型心肌病的心电图与超声分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2006, 5(2):169.
- [8] 郭继鸿. 胺碘酮的现代观点[J]. 临床心电图学杂志, 2007, 16(2):143-151.
- [9] 张鸿修,黄体钢. 实用冠心病学[M]. 4 版. 天津:天津科技翻译出版公司, 2004:872.
- [10] 邵剑明,徐敏敏,陶谦民. 胺碘酮在慢性心力衰竭合并心律失常中的应用探讨[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(6):460.

(收稿日期:2013-03-12 修回日期:2013-05-12)