

## 退变腰椎间盘中白细胞介素 21 的表达及意义

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3000>杨洋<sup>1</sup>, 姚羽<sup>2</sup>, 沈孝天<sup>3</sup>, 刘佳佳<sup>1</sup>, 薛建华<sup>1</sup>

2095-4344.3000

投稿日期: 2020-03-02

送审日期: 2020-03-06

采用日期: 2020-04-18

在线日期: 2020-08-25

中图分类号:

R459.9; R318; R681.5+5

文章编号:

2095-4344(2021)05-00690-05

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

## 文章特点—

- △ 严格收集并筛选临床腰椎间盘退变病例与对照病例;
- △ 同时检测外周血与髓核组织中白细胞介素 21 表达水平, 阐明与腰椎间盘退变疾病的关系;
- △ 统计分析得出患病组织中白细胞介素 21 与其他炎症因子的相关关系。

选取退变腰椎间盘的髓核标本(共 32 例)、未退变腰椎骨折的髓核标本(共 8 例)及所有患者的外周血样本。

- (1) 免疫组化法检测两组髓核组织中细胞因子白细胞介素 21 的表达;
- (2) ELISA 法检测两组髓核组织和外周血中细胞因子白细胞介素 21、白细胞介素 17 和白细胞介素 6 水平。

- (1) 退变髓核组织中的白细胞介素 21 与其相关因子(白细胞介素 17、白细胞介素 6)的表达呈正相关;
- (2) 白细胞介素 21 参与了腰椎间盘退变时发生的炎症反应和自身免疫反应。

## 文题释义:

**椎间盘退变型疾病:** 是由于腰椎间盘和关节突关节的关节软骨及其周围韧带退行性改变引发的以腰腿痛、坐骨神经痛为主要临床表现的一系列疾病的总称, 是腰椎自然老化及其功能逐渐退化所致的一种疾病, 是椎间盘突出症、腰椎管狭窄等脊柱退行性疾病的病理学和病理生理学基础。

**白细胞介素 21:** 是含有四螺旋束细胞因子结构域的 $\gamma$ c家族新成员, 主要由激活的Th17细胞分泌, 且可以促进更多的初始CD4<sup>+</sup>T细胞分化为Th17细胞, 而新分化的Th17细胞更多地分泌白细胞介素 21, 从而形成一个白细胞介素 21 自分泌环, 再促进Th17细胞分泌白细胞介素 17, 从而介导自身免疫炎症反应。

## 摘要

**背景:** Th17细胞的特异性细胞因子白细胞介素 17 在退变的腰椎间盘组织中含量显著升高, 白细胞介素 21 对Th17细胞的分化与增殖起到重要的作用。

**目的:** 探讨白细胞介素 21 在腰椎间盘退变中的作用与意义。

**方法:** 取 40 份髓核组织标本, 其中 32 份取自腰椎间盘退变患者, 8 份取自腰椎骨折患者, 同时取两组患者外周血样本。所有患者均收治于南通大学附属医院脊柱外科并经MRI及临床查体确诊。采用免疫组化法检测两组髓核组织中白细胞介素 21 的表达, ELISA 检测两组髓核组织和外周血中白细胞介素 21、白细胞介素 17 和白细胞介素 6 水平, 并进行Pearson相关分析。

**结果与结论:** 免疫组化结果发现试验组髓核组织中白细胞介素 21 阳性率明显高于对照组( $P < 0.01$ )。ELISA 检测结果发现试验组髓核组织及外周血中白细胞介素 21、白细胞介素 17 和白细胞介素 6 水平均明显高于对照组( $P < 0.01$ )。试验组髓核组织中白细胞介素 21 水平与其相关因子白细胞介素 17、白细胞介素 6 水平呈正相关。结果表明白细胞介素 21 参与了腰椎间盘退变时发生的炎症反应和自身免疫反应。

**关键词:** 腰椎; 椎间盘; 退变; 髓核; 白细胞介素 21; Th17 细胞; 细胞因子; 炎症

## Expression and significance of interleukin-21 in intervertebral disc degeneration

Yang Yang<sup>1</sup>, Yao Yu<sup>2</sup>, Shen Xiaotian<sup>3</sup>, Liu Jiajia<sup>1</sup>, Xue Jianhua<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Trauma Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China; <sup>3</sup>Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Yang Yang, Master, Attending physician, Department of Trauma Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

**Corresponding author:** Yao Yu, Master, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Interleukin-17, as the specific marker of Th17 cells, is highly expressed in degenerative lumbar disc tissue. Interleukin-21 plays an important role in proliferation and differentiation of Th17 cells.

**OBJECTIVE:** To test the expression of interleukin-21 in nucleus pulposus tissue and peripheral blood of patients who accepted the surgery of intervertebral disc degeneration and to analyze the relevant significance.

南通大学附属医院, <sup>1</sup>创伤中心, <sup>2</sup>骨科, 江苏省南通市 226001; <sup>3</sup>南通大学, 江苏省南通市 226001

第一作者: 杨洋, 男, 1985 年生, 江苏省射阳县人, 汉族, 2011 年南通大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事创伤外科及骨科生物力学研究。

通讯作者: 姚羽, 硕士, 副主任医师, 南通大学附属医院骨科, 江苏省南通市 226001

<https://orcid.org/0000-0002-4086-5645> (杨洋)

基金资助: 南通市科技项目 (MS12018057), 项目负责人: 杨洋

引用本文: 杨洋, 姚羽, 沈孝天, 刘佳佳, 薛建华. 退变腰椎间盘中白细胞介素 21 的表达及意义 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(5):690-694.



**METHODS:** In total, 40 samples of nucleus pulposus tissues were obtained, 32 from intervertebral disc degeneration (IDD) and 8 from lumbar fracture (control group). Peripheral blood samples were collected from the same cohort. All patients were confirmed by physical examination and MRI and then admitted to the Spine Centre of Affiliated Hospital of Nantong University. We detected the positive signal of interleukin-21 in nucleus pulposus tissue through immunohistochemical method, and measured the levels of interleukin-21, interleukin-17 and interleukin-6 in the nucleus pulposus and peripheral blood by ELISA. Pearson's correlation analysis was performed thereafter.

**RESULTS AND CONCLUSION:** There were more positive signals of interleukin-21 in the IDD group than the control group. The expression levels of interleukin-21, interleukin-17 and interleukin-6 were significantly higher in the IDD group than the control group as detected by ELISA. The level of interleukin-21 was positively correlated with the expression of interleukin-17 and interleukin-6. These findings indicate that interleukin-21 is involved in inflammatory and autoimmune responses during the development of IDD.

**Key words:** lumbar disc; intervertebral disc; degeneration; nucleus pulposus; interleukin-21; Th17 cell; cytokine; inflammation

**Funding:** the Scientific Research Project of Nantong, No. MS12018057 (to YY)

**How to cite this article:** YANG Y, YAO Y, SHEN XT, LIU JJ, XUE JH. Expression and significance of interleukin-21 in intervertebral disc degeneration. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2021;25(5):690-694.

## 0 引言 Introduction

随着人口老龄化进程的加速发展, 腰痛已成为目前常见病、多发病。相关研究证实腰痛患者中超过 40% 是由椎间盘退变性疾病引起的, 椎间盘退变严重甚至会导致患者神经功能缺损和残疾<sup>[1-10]</sup>, 因此对椎间盘退变性疾病的治疗意义重大。椎间盘退变的发病机制目前尚未完全明了, 其中椎间盘的生物力学结构破坏、浸润炎症反应、自身免疫应答、基质合成降解失衡、髓核细胞凋亡、遗传基因易感等因素均与之密切相关<sup>[11]</sup>。

近年来自身免疫炎症学说受到众多学者的重视。近期有研究发现 Th17 细胞的特异性细胞因子白细胞介素 17 在退变的椎间盘组织中含量明显高于正常椎间盘组织, 提示白细胞介素 17 可能参与椎间盘退变的发病<sup>[11-17]</sup>。白细胞介素 21 是近年来被发现的含有四螺旋束细胞因子结构域的  $\gamma$ c 家族新成员, 主要由激活的 Th17 细胞分泌, 其可以促进更多的初始 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化为 Th17 细胞, 从而形成一个白细胞介素 21 自分泌环, 通过自我放大途径对 Th17 细胞进行扩增, 白细胞介素 21 对 Th17 细胞的分化以及增殖作用已在诸多研究中得到证实, 在银屑病、炎症性肠病、类风湿性关节炎及葡萄膜炎等与 Th17 细胞相关的自身免疫疾病中, 均发现了白细胞介素 21 对 Th17 细胞的显著扩增作用<sup>[18-21]</sup>。白细胞介素 17 在椎间盘退变组织中表达量高, 可以推测可能由白细胞介素 21 表达上升进而促进 Th17 细胞增殖而引起的。因此, 该研究通过检测白细胞介素 21 在退变椎间盘中的表达, 进而阐明白细胞介素 21 与椎间盘退变的关系, 提出可行性的治疗方案, 为椎间盘退变的生物治疗提供实验依据, 为椎间盘退变的临床诊治提供新的途径和思路。

## 1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 病例-对照研究。

1.2 时间及地点 2017 年 6 月至 2019 年 5 月在南通大学附属医院完成。

1.3 对象

(1) 试验组: 选取 2017 年 6 月至 2019 年 5 月南通大学附属医院脊柱外科收治接受手术治疗的椎间盘退变患者 32 例, 其中男 19 例, 女 13 例; 平均年龄 (61.2±6.8) 岁 (46-70 岁); 平均病史 (16.5±6.6) 个月 (5-30 个月); 病变部位: L<sub>4/5</sub>

椎间隙 13 例, L<sub>5</sub>/S<sub>1</sub> 椎间隙 16 例, L<sub>4/5</sub> 合并 L<sub>5</sub>/S<sub>1</sub> 双节段 3 例。纳入标准: ①经临床检查及相关病史确诊为椎间盘退变且有明确手术指征; ② MRI 检查示 T2 加权像髓核呈不均匀的中等或低信号, 椎间盘高度明显下降, Pfirrmann 分级 III 级以上者<sup>[9]</sup>。排除标准: ①脊柱先天畸形、滑脱、肿瘤、结核及免疫系统疾病等; ②术前 6 周行硬膜外或关节突关节药物注射治疗者; ③既往有腰椎手术史者; ④其他可能影响神经功能的疾病, 如糖尿病、多发性周围神经炎等; ⑤有严重感染、免疫抑制以及其他严重疾病的患者; ⑥怀孕及哺乳期妇女。

(2) 对照组: 选取 2017 年 6 月至 2019 年 5 月南通大学附属医院脊柱外科收治因外伤致胸腰椎骨折患者 8 例, 其中男 5 例, 女 3 例; 平均年龄 (36.6±6.0) 岁 (27-43 岁); 其中 T<sub>12</sub>/L<sub>1</sub> 椎间隙 4 例, L<sub>1/2</sub> 椎间隙 3 例, L<sub>2/3</sub> 椎间隙 1 例。纳入标准: ①既往无腰腿痛及椎管手术史; ②术前检查证实不存在与实验相关免疫性疾病; ③术前 CT 检查未发现椎间盘存在退变及突出等改变, MRI 检查见 T2 加权像髓核信号为高信号; ④术中未见腰椎骨折处椎间盘脱出游离等肉眼可见的病理表现。排除标准: ①排除有严重感染、免疫抑制以及其他严重疾病的患者; ②怀孕及哺乳期妇女。

根据国务院《医疗机构管理条例》规定, 术前征得所有患者及家属同意并报院伦理委员会批准。

1.4 实验试剂 兔抗人白细胞介素 21 免疫组化单克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司); 鼠抗兔辣根过氧化物酶标记抗体 (美国 Santacruz 公司); HRP-Polymer anti-Mouse/Rabbit IHC Kit 试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司); 96 孔人白细胞介素 21、白细胞介素 17、白细胞介素 6 定量 ELISA 试剂盒 (美国 RapidBio Lab 公司)。

1.5 方法

1.5.1 标本采集

(1) 髓核标本的采集: 试验组标本 (共 32 份) 由手术经验丰富医师行后外侧椎板间开窗髓核摘除术或后路减压椎间融合器植入植骨融合内固定术时获取髓核标本。对照组标本 (共 8 份) 取自后路内固定减压椎间植骨术, 术中取出椎间盘组织后仔细剔除标本中的纤维环及终板, 保留髓核组织。

(2) 外周血清标本的采集: 试验组及对照组患者确诊入院后未经输液等治疗前用抗凝管采集患者外周血 5 mL, 常温下静置, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层淡黄色血清, 编

号后置于 -80 °C 冰箱中保存待用。

1.5.2 苏木精 - 伊红染色 40 g/L 多聚甲醛固定髓核组织，梯度乙醇脱水，石蜡包埋，标本切片厚 4 μm，电热恒温干燥箱过夜，二甲苯脱蜡，冲洗，苏木精染色，PBS 清洗，伊红染色，PBS 清洗，脱水，封固，光学显微镜观察并标记。

1.5.3 白细胞介素 21 的免疫组织化学染色 石蜡标本切片 4 μm，37 °C 烤箱过夜，梯度乙醇、二甲苯脱蜡水化，PBS 冲洗，高温高压修复 2 min，组织封闭室温封闭 2 h，一抗 4 °C 孵育过夜，隔天 PBS 清洗 3 遍，二抗温箱孵育 2 h，冲洗、甩片，苏木精衬染，树胶封固，光学显微镜观察白细胞介素 21 的表达。

1.5.4 ELISA 法检测髓核及血清中白细胞介素 21、白细胞介素 17 和白细胞介素 6 的表达水平 两组患者等量髓核组织匀浆及血清制备，样本稀释 5 倍，设置标准品孔和样本孔，标准品孔逐个加不同浓度的标准品 50 μL，样本孔加待测样本 10 μL 与样本稀释液 40 μL，标准品孔和样本孔中每孔加入 HRP 标记的检测抗体 100 μL，37 °C 恒温箱中放置 1 h，反复洗涤 5 次，每孔加入底物 A、B 各 50 μL，37 °C 避光孵育 15 min，每孔加终止液 50 μL，在 15 min 内于 450 nm 波长下测定每孔吸光度值，反复测量 3 次。

1.6 主要观察指标 ①苏木精 - 伊红染色观察腰椎间盘突出髓核组织学形态；②免疫组化染色观察腰椎间盘突出髓核组织白细胞介素 21 的表达；③ ELISA 法检测髓核组织和外周血中白细胞介素 21、白细胞介素 17 及白细胞介素 6 水平；④退变髓核组织中白细胞介素 21、白细胞介素 17 和白细胞介素 6 表达水平的相关性。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，样本均数间先行方差齐性检验和正态分布检验，符合条件后采用 student t 检验分析，白细胞介素 21、白细胞介素 17 和白细胞介素 6 相关性分析采用 Pearson 相关检验评估。

## 2 结果 Results

2.1 参与者数量分析 按意向性处理，参加试验 40 例患者均进入结果分析。

2.2 两组基线资料比较 见表 1。

表 1 | 两组基线资料比较

Table 1 | Comparison of baseline data between two groups

项目	试验组 (n=32)	对照组 (n=8)	P 值
性别			0.11
男性	19	5	
女性	13	3	
年龄 ( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	61.2 ± 6.8	36.6 ± 6.0	< 0.01
病变节段			0.09
T <sub>12</sub> /L <sub>1</sub>	0	4	
L <sub>1/2</sub>	0	3	
L <sub>2/3</sub>	0	1	
L <sub>4/5</sub>	13	0	
L <sub>5</sub> /S <sub>1</sub>	16	0	
L <sub>4/5</sub> 合并 L <sub>5</sub> /S <sub>1</sub>	3	0	

2.3 试验流程图 见图 1。

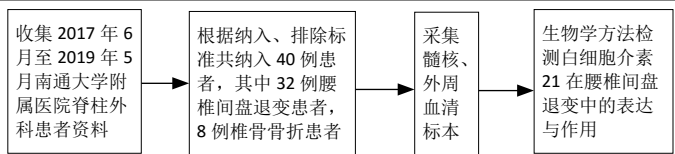


图 1 | 试验流程图

Figure 1 | Trial flow chart

2.4 腰椎间盘突出髓核组织苏木精 - 伊红染色观察结果 对照组可见数量较多的髓核细胞呈卵圆形，胞膜完整，核呈蓝紫色，多孤立存在于软骨陷窝中，少见多核巨细胞及细胞团；周围胶原纤维相互平行排列构成网状结构，未见囊泡状空腔和裂隙，见图 2A, C。试验组可见巨大的胞质空泡化髓核细胞，数量较少，分布不均，核呈深蓝色；周围胶原纤维排列不规则，见“蛇行”裂隙和囊泡状空腔生成，可见纤维软骨细胞呈“巢状”增殖，细胞外基质存在玻璃样变性，可见多处异位骨化及血管浸润，见图 2B, D。

2.5 腰椎间盘突出髓核组织白细胞介素 21 免疫组化染色观察结果 所有髓核组织切片均进行免疫组化染色，试验组细胞浆包含黄褐色颗粒的阳性细胞数目明显高于对照组，见图 3。试验组白细胞介素 21 阳性表达率为 (12.1 ± 4.4)%，显著高于对照组 (2.8 ± 2.0)%，差异有显著性意义 (P < 0.01)，见图 4。

2.6 ELISA 法检测髓核组织中白细胞介素 21、白细胞介素 17 及白细胞介素 6 水平 试验组髓核组织中白细胞介素 21、白细胞介素 17 和白细胞介素 6 水平均显著高于对照组，差异均有显著性意义 (P < 0.01)，见表 2。

表 2 | 两组髓核组织中白细胞介素 21、白细胞介素 17 及白细胞介素 6 水平 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

Table 2 | The expression levels of interleukin-21, interleukin-17 and interleukin-6 in nucleus pulpous tissues

组别	白细胞介素 21	白细胞介素 17	白细胞介素 6
试验组 (n=32)	216.19 ± 42.64 <sup>a</sup>	37.45 ± 8.99 <sup>a</sup>	50.60 ± 11.56 <sup>a</sup>
对照组 (n=8)	79.63 ± 17.44	18.98 ± 3.29	14.08 ± 4.55

表注：与对照组比较，<sup>a</sup>P < 0.01

2.7 ELISA 法检测外周血中白细胞介素 21、白细胞介素 17 及白细胞介素 6 水平 试验组外周血中白细胞介素 21、白细胞介素 17 和白细胞介素 6 水平均显著高于对照组，差异均有显著性意义 (P < 0.01)，见表 3。

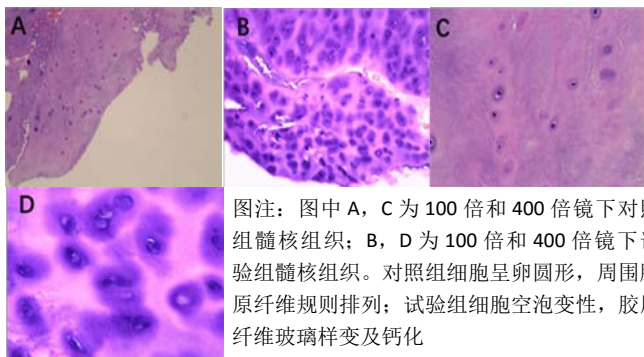
表 3 | 两组外周血中白细胞介素 21、白细胞介素 17 及白细胞介素 6 水平 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

Table 3 | The expression levels of interleukin-21, interleukin-17 and interleukin-6 in peripheral blood samples

组别	白细胞介素 21	白细胞介素 17	白细胞介素 6
试验组 (n=32)	142.15 ± 23.39 <sup>a</sup>	29.27 ± 6.18 <sup>a</sup>	18.97 ± 4.15 <sup>a</sup>
对照组 (n=8)	61.14 ± 12.99	11.96 ± 2.98	6.64 ± 1.93

表注：与对照组比较，<sup>a</sup>P < 0.01

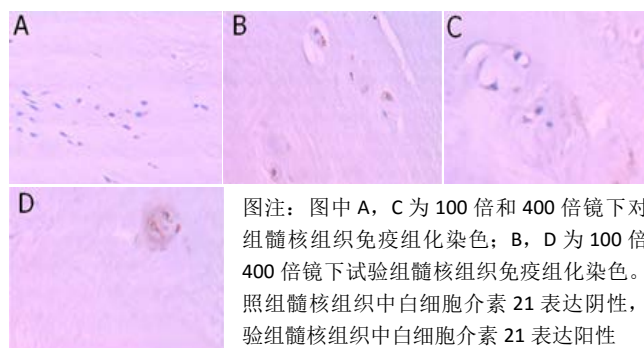
2.8 退变髓核组织中白细胞介素 21、白细胞介素 17 和白细胞介素 6 表达水平的相关性 3 种因子的表达量两两之间呈正相关关系 (白细胞介素 21 与白细胞介素 17 之间  $r=0.610$ ,  $P < 0.001$ ; 白细胞介素 21 与白细胞介素 6 之间  $r=0.664$ ,  $P < 0.001$ ; 白细胞介素 17 和白细胞介素 6 之间  $r=0.579$ ,  $P < 0.001$ )，见图 5。



图注：图中 A, C 为 100 倍和 400 倍镜下对照组髓核组织；B, D 为 100 倍和 400 倍镜下试验组髓核组织。对照组细胞呈卵圆形，周围胶原纤维规则排列；试验组细胞空泡变性，胶原纤维玻璃样变及钙化

图 2 | 腰椎间盘髓核组织苏木精 - 伊红染色

Figure 2 | Hematoxylin-eosin staining of nucleus pulposus tissues



图注：图中 A, C 为 100 倍和 400 倍镜下对照组髓核组织免疫组化染色；B, D 为 100 倍和 400 倍镜下试验组髓核组织免疫组化染色。对照组髓核组织中白细胞介素 21 表达阴性，试验组髓核组织中白细胞介素 21 表达阳性

图 3 | 腰椎间盘髓核组织白细胞介素 21 免疫组化染色

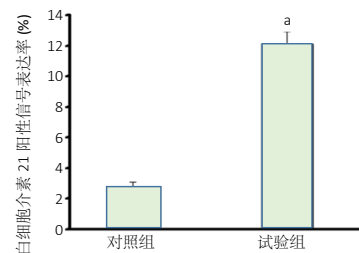
Figure 3 | Interleukin-21 immunohistochemical staining of nucleus pulposus tissues

### 3 讨论 Discussion

椎间盘由软骨板、纤维环及髓核组成，在脊柱活动中起连接稳定、增加活动度及缓冲震荡的作用<sup>[22]</sup>，反复的不均匀机械应力导致椎间盘外周纤维环裂隙状撕裂，进而破坏椎间盘内部结构，影响椎间盘稳定，处于“免疫赦免”状态的髓核与外周免疫系统接触引起自身免疫炎症反应，最终导致腰椎间盘突出症、腰椎管狭窄等一系列退行性脊柱疾病。

目前对椎间盘退变引起的退行性脊柱疾病的治疗方案主要为手术治疗，其中减压椎间融合术、椎板间开窗髓核摘除术及人工腰椎间盘置换术已成为经典手术治疗方法，然而减压椎间融合术后的椎间融合器后移、脊柱活动度减少及邻近节段负荷增加极易导致退变等并发症，椎板间开窗髓核摘除术具有腰椎不稳和高复发率的弊端，人工腰椎间盘置换术后纵向骨化自发融合易导致活动受限等不良预后<sup>[22-26]</sup>。随着分子生物学的发展以及椎间盘退变相关分子学的深入研究，研究者对椎间盘退变的治疗已转向维持椎间盘内环境稳定和逆转退化的过程<sup>[27-32]</sup>。如何延缓甚至逆转椎间盘退变成为治疗退行性脊柱疾病的新思路，椎间盘源性干细胞移植、生长因子局部注射及转基因细胞导入等治疗方案在实验动物模型中取得令人瞩目的成果。

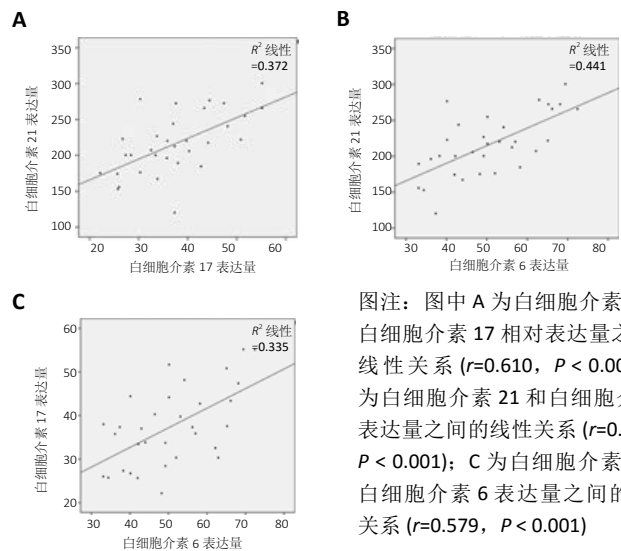
目前已证实白细胞介素 21 参与了 Th17 细胞的分化与扩增过程，近期研究显示 Th17 细胞的特异性效应因子白细胞介素 17 在退变椎间盘组织中一方面能够通过募集并活化大量淋巴细胞和巨噬细胞，加重椎间盘组织炎症细胞浸润；另



图注：与对照组比较，<sup>a</sup> $P < 0.01$

图 4 | 两组髓核组织中白细胞介素 21 阳性表达率

Figure 4 | The positive rate of interleukin-21 in nucleus pulposus tissues



图注：图中 A 为白细胞介素 21 和白细胞介素 17 相对表达量之间的线性关系 ( $r=0.610$ ,  $P < 0.001$ ); B 为白细胞介素 21 和白细胞介素 6 表达量之间的线性关系 ( $r=0.664$ ,  $P < 0.001$ ); C 为白细胞介素 17 和白细胞介素 6 表达量之间的线性关系 ( $r=0.579$ ,  $P < 0.001$ )

图 5 | 退变髓核组织中白细胞介素 21、白细胞介素 17 和白细胞介素 6 表达水平的相关性

Figure 5 | Correlation between expression of interleukin-21, interleukin-17 and interleukin-6 in nucleus pulposus tissues

一方面参与放大炎症反应，显著增加炎症因子分泌，加速椎间盘退变。因此该研究通过检测退变椎间盘组织髓核内白细胞介素 21 及其相关因子白细胞介素 6 和白细胞介素 17 的表达并分析三者之间的相互关系，探讨白细胞介素 21 在椎间盘退变自身免疫炎症机制中可能发挥的作用，尝试从分子生物学角度延缓椎间盘退变，为生物治疗提供新的途径和思路。

该研究选取经 MRI 影像诊断和术中组织观察后确诊为椎间盘退变患者为试验组，同时收集年龄在 45 岁以下结合 MRI 观察椎间盘无明显退变的腰椎爆裂性骨折患者为对照组。通过免疫组织化学染色发现白细胞介素 21 在退变髓核组织中免疫反应阳性率明显高于对照组；用 ELISA 法再次证实退变腰椎间盘髓核组织中白细胞介素 21、白细胞介素 6 与白细胞介素 17 的表达与正常对照组相比显著提高，证明 Th17 细胞在椎间盘退变过程中发挥重要作用，同时分析发现三者之间互成正相关性，提示三者可能在椎间盘退变中存在协同作用。

该研究同时还检测了椎间盘退变患者及腰椎骨折患者外周血中白细胞介素 6、白细胞介素 17 和白细胞介素 21 水平，发现均显著高于对照组。由于髓核组织与外周免疫系统接触，炎症肉芽组织伴新生血管向内长入椎间盘内部，原先完全封闭的髓核中出现丰富的微血管<sup>[28]</sup>，血管屏障破坏后髓核中高表达的炎症因子如白细胞介素 6、白细胞介素 17 及白细胞介



素 21 等随新生血管进入外周血液循环,引起外周血中的表达水平也相应增高,所以血清中白细胞介素 6、白细胞介素 17 及白细胞介素 21 的高水平表达间接反映出白细胞介素 21 及其相关细胞因子可能参与退变椎间盘中髓核自身免疫炎症反应。

该试验结果经分析得出在退变的髓核组织中白细胞介素 6、白细胞介素 21 与白细胞介素 17 存在正相关关系,说明在退变椎间盘中存在白细胞介素 6 对 Th17 细胞的诱导起始作用和白细胞介素 21 自分泌环对 Th17 细胞的扩增作用。退变的髓核组织中白细胞介素 6 和白细胞介素 21 之间的正相关性则可能存在两种机制:一方面白细胞介素 6 诱导 Th17 细胞分化继而高表达白细胞介素 21,另一方面白细胞介素 21 促进 Th2 细胞增殖并分泌白细胞介素 6。

然而白细胞介素 21 在椎间盘退变发生机制中的具体作用尚需进一步深入研究,可以通过培养 Th17 细胞,敲降或过表达白细胞介素 21,随后与椎间盘细胞共培养,检测椎间盘细胞凋亡与细胞外基质水平,阐明白细胞介素 21-Th17-椎间盘退变之间的联系,同时可以在体内进行白细胞介素 21/ 白细胞介素 21 受体基因敲除动物实验模型进一步探索白细胞介素 21 在椎间盘退变过程中的作用机制。

**作者贡献:** 杨洋、姚羽负责试验设计,姚羽、沈孝天负责手术操作及试验实施,杨洋、姚羽负责试验评估,薛建华、刘佳佳负责资料收集。

**经费支持:** 该文章接受了“南通市科技项目(MS12018057)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该临床研究的实施符合《赫尔辛基宣言》和南通大学附属医院对研究的相关伦理要求(伦理批件号:2016-073,审批时间2016-03-08)。

**知情同意问题:** 参与试验的患者及其家属为自愿参加,对试验过程完全知情同意,在充分了解治疗方案的前提下签署了“知情同意书”。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过南通大学生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] LUOMA K, RIIHIMAKI H, LUUKKONEN R, et al. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. *Spine*.2000;25(4):487-492.
- [2] LAWSON LY, HARFE BD. Developmental mechanisms of intervertebral disc and vertebral column formation. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*.2017;6(6):e283-e296.
- [3] CAPOOR MN, RUZICKA F, MACHACKOVA T, et al. Prevalence of propionibacterium acnes in intervertebral discs of patients undergoing lumbar microdiscectomy:A Prospective Cross-Sectional Study. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161676.
- [4] SOLLE JF, BIHIN B, KIRSCHVINK N, et al. Prevalence of age-related changes in ovine lumbar intervertebral discs during computed tomography and magnetic resonance imaging. *Comp Med*.2016;66(4):300-307.
- [5] LV X, LIU Y, ZHOU S, et al. Correlations between the feature of sagittal spinopelvic alignment and facet joint degeneration:a retrospective study. *BMC Musculoskelet Disord*.2016;17(1):341.

- [6] TANG P, ZHU P, JI WP. The NLRP3/Caspase-1/Interleukin-1 $\beta$  Axis Is Active in Human Lumbar Cartilaginous Endplate Degeneration. *Clin Orthop Relat Res*.2016;474(8):1827-1829.
- [7] WANG YX, WANG JO, KAPLAR Z. Increased low back pain prevalence in females than in males after menopause age:evidences based on synthetic literature review. *Quant Imaging Med Surg*.2016;6(2):199-206.
- [8] SHAO J, YU M, JIANG L, et al. Differences in calcification and osteogenic potential of herniated discs according to the severity of degeneration based on Pfirrmann grade:a cross-sectional study. *BMC Musculoskelet Disord*.2016;17:191.
- [9] WU X, LIU W, DUAN Z, et al. The Involvement of Protease Nexin-1 (PN1) in the Pathogenesis of Intervertebral Disc (IVD) Degeneration. *Sci Rep*. 2016;6:30563.
- [10] GRANT MP, EPURE LM, Bokhari R, et al. Human cartilaginous endplate degeneration is induced by calcium and the extracellular calcium-sensing receptor in the intervertebral disc. *Eur Cell Mater*.2016;32:137-151.
- [11] ANITUA E, PADILLA S. Biologic therapies to enhance intervertebral disc repair. *Regen Med*.2018;13(1):55-72.
- [12] 赵才勇, 何东, 刘淼, 等. 腰椎间盘表面弥散系数与肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-6 的相关性研究 [J]. 功能与分子医学影像学 (电子版), 2016,5(3):34-37.
- [13] 张潇潇, 姜宏, 张志刚, 等. 肿瘤坏死因子与腰椎间盘退变的相关性研究进展 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017,25(12):79-82.
- [14] 王亮, 张照宏. 趋化因子 CXCL10(IP-10)、MMP-1 及 TNF- $\alpha$  与腰椎间盘突出的相关性研究 [J]. 山东医学高等专科学校学报, 2015,37(6):445-447.
- [15] 安志辉, 丁文元, 张剑刚, 等. 退变性腰椎侧凸 TNF- $\alpha$  基因多态性和蛋白表达水平的相关研究 [J]. 中国骨与关节杂志, 2012,1(4):381-387.
- [16] 朱书涛, 刘洋, 张明辉, 等. 去卵巢大鼠骨组织中肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  及白细胞介素 6 水平与骨质疏松的关系 [J]. 中国组织工程研究, 2016,20(15):2206-2211.
- [17] 孙中仪, 田纪伟. 白细胞介素与椎间盘退变的研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2014,22(3):249-252.
- [18] BATISTA MD, TINCATI C, MILUSH JM, et al. CD57 expression and cytokine production by T cells in lesional and unaffected skin from patients with psoriasis. *PLoS One*. 2013;8(2):e52144.
- [19] MACDONALD TT, BELL I, MONTELEONE G. The opposing roles of IL-21 and TGF $\beta$ 1 in chronic inflammatory bowel disease. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(4):1061-1066.
- [20] NIU X, HE D, DENG S, et al. Regulatory immune responses induced by IL-1 receptor antagonist in rheumatoid arthritis. *Mol Immunol*. 2011;49(1-2):290-296.
- [21] LAN L, YONGFENG X, JIANGYONG W, et al. Upregulated IL-21 and IL-21 receptor expression is involved in experimental autoimmune uveitis (EAU). *Molecular Vision*.2009;15:2938-2944.
- [22] HAEFELI M, KALBERER F, SAEGESSER D, et al. The course of macroscopic degeneration in the human lumbar intervertebral disc. *Spine*. 2006;31(14):1522-1531.
- [23] PHILLIPS FM, SLOSAR PJ, YOUSSEF JA, et al. Lumbar spine fusion for chronic low back pain due to degenerative disc disease:a systematic review. *Spine*.2013;38(7):E409-422.
- [24] KIMURA H, SHIKATA J, ODATE S, et al. Risk factors for cage repropulsion after posterior lumbar interbody fusion: analysis of 1070 cases. *Spine*.2012;37(13):1164-1169.
- [25] ZIGLER JE, DELAMARTER RB. Five-year results of the prospective, randomized, multicenter, Food and Drug Administration investigational device exemption study of the ProDisc-L total disc replacement versus circumferential arthrodesis for the treatment of single-level degenerative disc disease. *J Neurosurg Spine*.2012;17(6):493-501.
- [26] LAWRENCE BD, HILIBRAND AS, BRODT ED, et al. Predicting the risk of adjacent segment pathology in the cervical spine: a systematic review. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(22 Suppl):S52-64.
- [27] BASSO M, CAVAGNARO L, ZANIRATO A, et al. What is the clinical evidence on regenerative medicine in intervertebral disc degeneration. *Musculoskeletal Surg*. 2017;101(2):93-104.
- [28] PENG B, WU W, HOU S, et al. The pathogenesis of discogenic low back pain. *J Bone Joint Surg Br*.2005;87(1):62-67.
- [29] YANG SH, WU CC, SHIH TT, et al. In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation. *Spine*.2008;33(18):1951-1957.
- [30] STRASSBURG S, RICHARDSON SM, FREEMONT AJ, et al. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. *Regenerative medicine*.2010;5(5):701-711.
- [31] JIA Z, YANG P, WU Y, et al. Comparison of biological characteristics of nucleus pulposus mesenchymal stem cells derived from non-degenerative and degenerative human nucleus pulposus. *Exp Ther Med*.2017;13(6):3574-3580.
- [32] HUDSON KD, ALIMI M, GRUNERT P, et al. Recent advances in biological therapies for disc degeneration: tissue engineering of the annulus fibrosus, nucleus pulposus and whole intervertebral discs. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(5):872-879.