

白细胞介素 27 参与了腰椎间盘突出症的病理过程

https://doi.org/10.12307/2022.678

薛华伟^{1,2}, 朱敏^{1,2}, 李玉前^{1,2}

投稿日期: 2021-05-06

采用日期: 2021-06-24

修回日期: 2021-11-22

在线日期: 2021-12-09

中图分类号:

R459.9; R394.2; R542.2

文章编号:

2095-4344(2022)23-03750-06

文献标识码: A

文章快速阅读:

对象:

选择腰椎间盘突出症患者 36 例, 健康志愿者 18 例, 腰椎爆裂性骨折患者 8 例。

观察指标:

(1)ELISA 法检测血液样本白细胞介素 27 与白细胞介素 17 表达情况;
(2)qRT-PCR 与 Western blot 检测髓核样本白细胞介素 27 与白细胞介素 17 表达情况。

结果:

(1)腰椎间盘突出症患者血液样本中白细胞介素 27、白细胞介素 17 表达水平显著高于对照组;
(2)腰椎间盘突出症患者髓核样本中白细胞介素 27、白细胞介素 17 表达水平显著高于腰椎骨折患者;
(3)白细胞介素 27 表达: 轻度疼痛组 > 中度疼痛组 > 重度疼痛组;
(4)白细胞介素 17 表达: 轻度疼痛组 < 中度疼痛组 < 重度疼痛组。

结论:

(1)炎症是腰椎间盘突出症患者疼痛的原因;
(2)白细胞介素 27 参与了腰椎间盘突出症的病理过程。

文题释义:

白细胞介素 27: 是一种新的白细胞介素 12 家族细胞因子, 与白细胞介素 12、白细胞介素 23 和白细胞介素 35 共同组成了白细胞介素 12 细胞因子家族。白细胞介素 27 是由 EB13(与白细胞介素 12 p40 亚基同源)和 p28(与白细胞介素 12 p35 亚基同源)两条链通过二硫键连接构成的异源二聚体, 在结构上与其他成员具有高度的相似性。白细胞介素 27 由活化的抗原呈递细胞即单核巨噬细胞和树突状细胞产生, 通过表达在 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞和内皮细胞上的白细胞介素 27 受体(白细胞介素 27 受体)发挥作用。

腰椎间盘突出症: 椎间盘发生退行性改变, 在外力作用下, 纤维环部分或者全部破裂, 单独或者连同髓核软骨终板向外突出, 刺激压迫脊髓神经和神经根引起的以腰痛为主要症状的一种病变。

摘要

背景: 炎症是腰椎间盘突出症发生的重要机制, Th17 细胞在免疫激活中起着关键作用。白细胞介素 27 可以通过下调白细胞介素 6 和转化生长因子 β 的表达抑制 Th17 细胞分化, 在多种自身免疫性疾病中发挥重要作用, 然而人们对白细胞介素 27 和腰椎间盘突出症之间的关系知之甚少。

目的: 检测腰椎间盘突出症患者血液及髓核中白细胞介素 27 表达情况, 探讨它与腰椎间盘突出症的关系。

方法: 选择腰椎间盘突出症患者 36 例, 健康志愿者 18 例, 急诊手术的腰椎爆裂性骨折患者 8 例。腰椎间盘突出症患者行开窗髓核摘除、腰椎后路椎间融合器融合或经椎间孔椎间融合器融合手术, 术前使用目测类比分法评估患者的疼痛强度。取腰椎间盘突出症患者与健康志愿者血液样本, ELISA 法检测术前外周血清白细胞介素 27、白细胞介素 17 表达情况; 取腰椎间盘突出症患者髓核样本与腰椎爆裂性骨折患者的髓核样本(视为正常髓核样本), qRT-PCR 与 Western blot 测定髓核组织中白细胞介素 27、白细胞介素 17 mRNA 及蛋白的表达情况。

结果与结论: ①腰椎间盘突出症患者血清的白细胞介素 27 表达水平显著高于健康对照组($P < 0.001$); 白细胞介素 17 在腰椎间盘突出症患者血清中的表达水平也明显升高; ②在蛋白水平, 腰椎间盘突出症患者髓核中的白细胞介素 27 及白细胞介素 17 表达水平明显高于正常髓核($P < 0.001$); ③在 mRNA 水平, 腰椎间盘突出症患者髓核中白细胞介素 27 及白细胞介素 17 表达水平明显高于正常髓核($P < 0.001$); ④轻度疼痛患者白细胞介素 27 表达水平高于重度疼痛患者($P < 0.01$); ⑤提示炎症是腰椎间盘突出症患者疼痛的原因, 白细胞介素 27 参与了腰椎间盘突出症的病理过程。

关键词: 白细胞介素 27; 白细胞介素 17; 腰椎间盘突出症; 血液; 髓核; 椎间盘

Interleukin-27 is associated with the pathogenesis of lumbar disc herniation

Xue Huawei^{1,2}, Zhu Min^{1,2}, Li Yuqian^{1,2}

¹Department of Orthopedics, the Third People's Hospital of Nantong, Nantong 226000, Jiangsu Province, China; ²Nantong University School of Medicine, Nantong 226000, Jiangsu Province, China

Xue Huawei, Master, Associate chief physician, Department of Orthopedics, the Third People's Hospital of Nantong, Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Li Yuqian, Master, Chief physician, Associate professor, Department of Orthopedics, the Third People's Hospital of Nantong, Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Inflammation is an important mechanism underlying lumbar disc herniation. Th17 cells play a key role in immune activation. Interleukin-27 can inhibit Th17 cell differentiation by down-regulating the expression of interleukin-6 and transforming growth factor- β , and plays an important role in a variety of

¹南通市第三人民医院骨科, 江苏省南通市 226000; ²南通大学医学院, 江苏省南通市 226000

第一作者: 薛华伟, 男, 1983 年生, 江苏省东台市人, 汉族, 2015 年南通大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事脊柱外科研究。

通讯作者: 李玉前, 硕士, 主任医师, 副教授, 南通市第三人民医院骨科, 江苏省南通市 226000; 南通大学医学院, 江苏省南通市 226000

https://orcid.org/0000-0002-6197-1578 (李玉前)

基金资助: 南通市卫生和计划生育委员会科研课题(WKZL2018065), 项目负责人: 薛华伟

引用本文: 薛华伟, 朱敏, 李玉前. 白细胞介素 27 参与了腰椎间盘突出症的病理过程 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(23): 3750-3755.



autoimmune diseases. However, little is known about the relationship between interleukin-27 and lumbar disc herniation.

OBJECTIVE: To investigate the levels of interleukin-27 in patients with lumbar disc herniation, and to explore their association with lumbar intervertebral disc herniation.

METHODS: This study enrolled 36 patients with lumbar disc herniation, 18 healthy controls, and 8 patients undergoing emergency surgery for thoracolumbar burst fracture. Patients with lumbar disc herniation received posterior fenestration discectomy, posterior lumbar interbody fusion (PLIF) or transforaminal lumbar interbody fusion. The pain intensity of the patients was scored using a visual analogue scale (VAS) before operation. Serum interleukin-27 and interleukin-17 levels in peripheral blood were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Samples of nucleus pulposus from patients with lumbar disc herniation and those with thoracolumbar burst fractures (considered as normal nucleus pulposus samples) were taken for detection of interleukin-27 and interleukin-17 mRNA and protein using quantitative real-time PCR and western blot assay, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Patients with lumbar disc herniation had significantly higher serum interleukin-27 levels than healthy controls ($P < 0.001$). Interleukin-17 levels were also significantly higher in the patients with lumbar disc herniation. The protein and mRNA expression levels of interleukin-27 and interleukin-17 in the nucleus pulposus were significantly higher in patients with lumbar disc herniation than patients with thoracolumbar burst fractures ($P < 0.001$). The expression of interleukin-27 was significantly higher in patients with mild pain than those with severe pain ($P < 0.01$). To conclude, inflammation is responsible for the pain experienced by patients with lumbar disc herniation, and interleukin-27 is involved in the pathogenesis of lumbar disc herniation.

Key words: interleukin-27; interleukin-17; lumbar disc herniation; blood; nucleus pulposus; intervertebral disc

Funding: the Research project of Nantong Health and Family Planning Commission, No. WKZL2018065 (to XHW)

How to cite this article: XUE HW, ZHU M, LI YQ. Interleukin-27 is associated with the pathogenesis of lumbar disc herniation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2022;26(23):3750-3755.

0 引言 Introduction

腰椎间盘突出症是目前成年人的一种多发病, 男性多于女性, 据报道人群中发病率为 5%~10%, 主要表现为下腰痛或者坐骨神经痛, 严重者出现马尾症状, 甚至会有泌尿功能障碍。随着电子产品的普及、生活方式的改变, 腰椎间盘突出症的发病率还在增加, 随之带来的腰腿痛已经严重影响了人们的工作和生活, 也给社会带来了沉重的经济负担。大多数腰痛与坐骨神经痛, 特别是纤维环破裂和髓核突出的患者, 都与退变有关^[1-2]。据报道, 当脊髓神经根受压迫时, 患者主要表现为麻木, 而不是疼痛, 炎症是腰腿痛的主要原因^[3]。

近些年来, 有关腰椎椎间盘疾病发病机制的研究越来越多地集中在炎症和免疫方面。细胞因子白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 在退变的椎间盘组织中高表达^[4-5]。在疼痛的腰椎间盘突出症患者椎间盘组织中, 白细胞介素 1 表达水平显著升高^[6]。磷脂酶 A2 与腰椎间盘突出症的疼痛有关, 它是前列腺素 E 和白细胞介素生成的限速步骤^[7]。突出的椎间盘髓中前列腺素 E2 升高, 且与疼痛产生相关联^[8]。KARPPINEN 等^[9]的研究已表明, 白细胞介素 6 与坐骨神经痛相关。Th17 淋巴细胞和白细胞介素 17 表达水平的增加引起了腰椎间盘突出症患者的疼痛^[10]。白细胞介素 21 通过自分泌的方式扩增 Th17, 促进白细胞介素 17 的表达, 参与腰椎间盘突出症疼痛的病理过程^[11]。白细胞介素 23 通过白细胞介素 23/Th17 轴参与腰椎间盘突出症的病理过程^[12]。

Th17 细胞是一种新发现的淋巴细胞类型, 其主要效应细胞因子为白细胞介素 17。白细胞介素 17 是一种促炎细胞因子, 最初发现由 Th17 细胞分泌, 在许多炎症和自身免疫相关疾病中发挥重要作用。Th17 淋巴细胞和白细胞介素 17 水平的升高与腰椎间盘突出症患者的疼痛有关^[10]。

白细胞介素 27 是 2002 年 6 月美国 DNAX 研究所的 PFLANZ 等^[13]发现并命名的一种新的白细胞介素 12 家族细胞因子, 与白细胞介素 12、白细胞介素 23 和白细胞介素 35 共同组成了白细胞介素 12 细胞因子家族。白细胞介素 27 由 EB13(与白细胞介素 12 p40 亚基同源)和 p28(与白细胞介素 12p35 亚基同源)两条链通过二硫键连接构成的异源二聚体,

在结构上与其他成员具有高度的相似性。白细胞介素 27 由活化的抗原提呈细胞即单核巨噬细胞和树突状细胞产生, 通过表达在 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞和内皮细胞上的白细胞介素 27 受体发挥作用^[14]。白细胞介素 27 通过下调白细胞介素 6 和转化生长因子 β 的表达抑制 Th17 细胞分化, 导致白细胞介素 17 表达减少^[15], 白细胞介素 27 还通过下调转录因子 GATA-3 表达抑制 Th2 细胞分化^[16]。

白细胞介素 27 在多种自身免疫性疾病的病理过程中起重要作用, 比如说类风湿性关节炎、多发性硬化、结肠炎(包括克罗恩病与溃疡性结肠炎)、系统性红斑狼疮、牛皮癣、1 型糖尿病^[17-22]。白细胞介素 27 作为重要的免疫调节剂, 参与了多种自身免疫性疾病的病理过程, 然而它在腰椎间盘突出症中的功能及相关机制尚不清楚。此次研究目的是探讨腰椎间盘突出症患者的白细胞介素 27 表达情况, 并探索它与腰椎间盘突出症的相关关系。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 免疫学实验, 样本均数间的比较先做正态性与方差齐性检验, 如果条件满足用 t 检验, 如果条件不满足用 t' 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 12 月至 2020 年 6 月在南通市第三人民医院完成。

1.3 对象 选择 2017 年 12 月至 2019 年 12 月南通市第三人民医院脊柱外科收治的腰椎间盘突出症患者 36 例, 健康成年志愿者 18 例。腰椎间盘突出症患者要求为单节段, 有典型下腰痛或坐骨神经痛, 直腿抬高实验阳性, 典型 MRI 和 CT 表现, 没有钙化征象。

患者与健康志愿者的排除标准: ①有骨关节炎、峡部裂、腰椎滑脱、慢性炎症性疾病、代谢疾病、自身免疫性疾病史、肿瘤、高血压或糖尿病病史者; ②曾服用或正在服用免疫抑制药物者; ③有腰椎退变性疾病手术史者。所有药物, 包括非类固醇抗炎药和激素, 在血液样本收集和手术前 2 周全部停用。

选择 8 例急诊减压手术的腰椎爆裂性骨折患者，术中取髓核作为正常髓核对照。这些患者既往没有腰痛或坐骨神经痛病史，经 MRI 证实椎间盘无退变，未受到外伤破坏，无免疫系统疾病史，无急性或慢性炎症、代谢性疾病或者肿瘤病史。所有患者和健康对照者均签署知情书。此次研究通过南通市第三人民医院伦理委员会同意。患者特征见表 1。

表 1 | 患者特征
Table 1 | Patient characteristics

| 指标 | 腰椎间盘突出症组 | 对照组 | |
|--------|---------------------------------|-------------|--------------------|
| | | 血液对照 | 髓核对照 |
| n | 36 | 18 | 8 |
| 男/女(n) | 16/20 | 10/8 | 6/2 |
| 年龄(岁) | 52.0(24-79) | 32.9(19-50) | 36.6(24-56) |
| 节段(n) | | | |
| | L _{3/4} 3 | | L _{1/2} 4 |
| | L _{4/5} 18 | | L _{2/3} 2 |
| | L _{5/S₁} 15 | | L _{3/4} 2 |

表注：血液对照为健康志愿者，髓核对照为腰椎爆裂性骨折患者

在手术当天清晨，使用目测类比评分记录疼痛强度，将腰椎间盘突出症患者分为轻度疼痛(1-3分)、中度疼痛(4-6分)、重度疼痛(7-10分)；同时抽取腰椎间盘突出症患者 5 mL 的空腹血，使用肝素钠抗凝管保存；抽取健康志愿者 5 mL 的空腹血液作为对照。血液样本经过离心后取上清，放置在一个无菌的低温储藏管内。腰椎间盘突出症患者接受后路开窗髓核摘除术，或行腰椎后路椎间植骨融合术、经椎间孔腰椎椎体间植骨融合术。髓核摘除后，标本放置在一个无菌的低温储藏管内。所有标本 -80 °C 保存。

1.4 实验试剂和仪器 人白细胞介素 27 定量 ELISA 试剂盒 (Abcam 公司)；人白细胞介素 17 定量 ELISA 试剂盒 (Abcam 公司)；白细胞介素 27/ 白细胞介素 17 兔抗人多克隆抗体 (Abcam 公司)；ACTIN(Sangong Biotech)；酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司)；反转录试剂盒 (TOYOBO 公司)；全自动蛋白质核酸定量仪 (Eppendorff 公司)；荧光倒置显微镜 (德国 LEICA 公司)；实时荧光定量 PCR 系统 (ABI 公司)；qRT-PCR 仪 (MJ RESEARCH 公司)；Western Blotting 装置 (BIO-RAD 公司) 等。

1.5 方法

1.5.1 ELISA 法检测血清白细胞介素 27、白细胞介素 17 表达 将稀释的单克隆抗体加入 96 孔聚苯乙烯板反应孔中，4 °C 孵育过夜。将反应孔中液体倒出，用洗涤缓冲液冲洗聚苯乙烯板 5 次。在室温下用封闭液孵育 1 h 之后，加入稀释检测样本于反应孔中 (包括空白对照、阳性对照、阴性对照)。加入稀释的酶标抗体，在室温下孵育 1 h。洗涤 5 次，加入底物溶液，在室温下反应 30 min，加硫酸终止反应。读出各吸光度值，绘制出标准曲线，得出白细胞介素 27、白细胞介素 17 质量浓度。

1.5.2 qRT-PCR 检测髓核组织中白细胞介素 27、白细胞介素 17 mRNA 表达

(1) 提取组织 RNA：取 100 mg 髓核组织加入 1.5 mL 离心管中。加 TRIzol，匀浆，静置 5 min。再加入 0.2 mL 氯仿，

上下颠倒振荡 15 s，静置 2 min。4 °C，12 000 r/min 离心 15 min，取上清。将 0.5 mL 异丙醇加入管中，轻轻混匀，在室温下静置 10 min。4 °C，12 000 r/min 离心 10 min，弃上清。将 1 mL 体积分数 75% 乙醇加入管中，轻轻洗涤，4 °C，离心，弃上清。晾干，然后加入 30 μL DEPC 水溶解，65 °C 促溶 15 min。紫外分光光度计定量后，PCR 检测转录。

(2)qRT-PCR 检测：①反转录反应 (RT)：取总 RNA 5 μL，DEPC 处理过的水 6 μL，oligodT 1 μL。70 °C 变性 5 min。立即冰浴 1 min，离心 3-5 s。再加入反转录酶缓冲液，dNTP，RNase 抑制剂，70 °C 反应 5 min。立即冰浴加反转录酶，42 °C 反应 1 h，70 °C 10 min，反应终止，-20 °C 保存备用。② PCR 反应：取 RT 产物 cDNA 2 μL，加入 10×Taq 酶缓冲液 2 μL，上游引物 (10 mmol/L) 1 μL，下游引物 (10 mmol/L) 1 μL，25 mmol/L dNTP 1.5 μL，Taq DNA 聚合酶 0.25 μL，MgCl₂ 1.5 μL，ddH₂O 补足体积 25 μL。PCR 扩增条件：94 °C，5 min；94 °C，45 s；58 °C，45 s；72 °C，45 s；20 个循环，然后 72 °C 延伸 10 min，结束反应，-20 °C 保存备用。③在 PCR 反应曲线窗口中设定基线值与阈值，读取 Ct 值。计算各基因相对表达量，各组之间表达的相对差异用 actin 衡量。

1.5.3 Western blot 法检测髓核组织中白细胞介素 27、白细胞介素 17 蛋白表达

(1) 蛋白提取：从 -80 °C 冰箱取出髓核组织，称质量后放入离心管。加裂解液，复温 30 min。将髓核组织碾磨碎，冰浴静置，离心，取上清。测浓度，分装，-80 °C 储存待用。

(2)SDS-PAGE 凝胶电泳：蛋白定量后，按蛋白量 /2×SDS 上样缓冲液 /DTT 比例为 4/5/1 处理蛋白。沸水煮 15 min，充分变性，离心，取上清。制备 8% 聚丙烯酰胺分离胶和聚丙烯酰胺浓缩胶。玻璃平板夹层中注入分离胶垂，凝胶约 11 cm 高，加入正丁醇 1 cm 厚。恒温箱 37 °C 15 min，4 °C 过夜。倒去正丁醇，用 ddH₂O 冲洗，滤纸吸水，在夹层顶部慢慢加入积层胶，然后插入 Telfon 梳子，在室温下聚合 30 min。将凝胶板固定于电泳装置的缓冲液室，放入电泳槽中，用 1×SDS 电极缓冲液完全浸润。拔出梳子，加样孔用 1×SDS 电泳电极缓冲液冲洗，然后加样。通电源，60 V 电泳至蛋白跑到分离胶，之后改为 80 V 直到电泳结束，分离蛋白。关电源，稍作整理后，取凝胶，除浓缩胶，放在转移液中以备检测。

(3) 转膜：①转印夹层组装：阴极 -Scotch-Brite(海绵垫) 垫 - 与凝胶等大的滤纸 - 凝胶 - 预先在转移液中平衡过的 PVDF 膜 - 滤纸 -Scotch-Brite 垫 - 阳极。②把转印夹层放入转移槽，然后加入转移液，将转移槽按正确的极性方向放入电转膜仪中，然后接电源；冷却、用 350 mA 电转 120 min；关电源，取转印膜，用丽春红染色 1 min，用 ddH₂O 脱色 2 min。

(4) 蛋白质免疫检测：PVDF 膜放在 TBST 中，80 °C，1 h，浸洗膜 3 次，在室温下封闭 2 h；把封闭液倒出，膜浸洗 3 次。一抗稀释后，孵育转印膜，4 °C 过夜；用 TBST 洗膜 5 次；二抗稀释后，孵育转印膜，室温下 2 h；用 TBST 洗膜 6 次；滴

加 Luminol Ecl Reagent, 将 PVDF 膜倒扣 PARAFilm 膜上室温 2 min; 暗室中进行曝光, 显影和定影; 扫描图像并分析, 测定灰度值。相同条件下实验重复 3 次。

1.6 主要观察指标 ELISA 法检测腰椎间盘突出症患者与健康志愿者血清中白细胞介素 27 及白细胞介素 17 的表达情况; 腰椎间盘突出症患者及腰椎爆裂性骨折患者取髓核, 通过 qRT-PCR 与 Western blot 检测髓核组织中白细胞介素 27 及白细胞介素 17 的 mRNA 和蛋白表达情况; 另外使用 qRT-PCR 检测不同疼痛强度腰椎间盘突出症患者髓核组织白细胞介素 27 与白细胞介素 17 mRNA 的表达情况。

1.7 统计学分析 所有的样本数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本均数间的比较先做正态性与方差齐性检验, 如果条件满足用 t 检验, 如果条件不满足用 t' 检验。所有检测结果使用 SPSS 22.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 参与者数量分析 纳入 36 例腰椎间盘突出症患者, 8 例腰椎爆裂性骨折患者和 18 例健康志愿者, 实验数据全部进入最终结果分析, 无脱落。

2.2 试验流程图 见图 1。

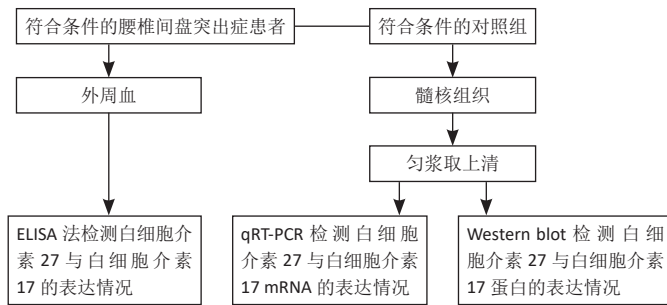
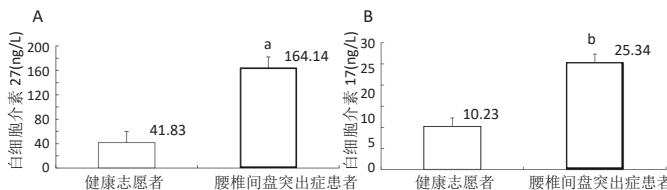


图 1 | 试验流程图
Figure 1 | Trial flow chart

2.3 ELISA 法检测血清白细胞介素 27 与白细胞介素 17 的表达情况 通过 ELISA 检测, 腰椎间盘突出症患者血清白细胞介素 27 及白细胞介素 17 的质量浓度显著高于健康志愿者 ($t=9.8016, 8.1226, P < 0.001$), 见图 2。

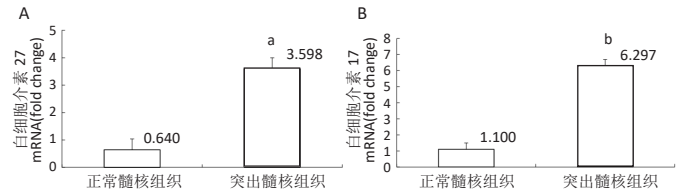


图注: 图 A 示腰椎间盘突出症患者血清白细胞介素 27 表达水平显著高于健康志愿者 ($t=9.8016, P < 0.001$); 图 B 示腰椎间盘突出症患者血清白细胞介素 17 表达水平显著高于健康志愿者 ($t=8.1226, P < 0.001$)

图 2 | ELISA 法检测血清白细胞介素 27 与白细胞介素 17 的表达情况
Figure 2 | ELISA detection of serum interleukin-27 and interleukin-17 levels

2.4 qRT-PCR 检测髓核组织白细胞介素 27 与白细胞介素 17 mRNA 的表达情况 与正常髓核组织相比, 腰椎间盘突出症

患者髓核组织中白细胞介素 27、白细胞介素 17 mRNA 表达明显升高 ($t=6.1356, 4.8935, P < 0.001$), 见图 3。根据目测类比分, 将腰椎间盘突出症患者分为轻度疼痛 (1-3 分)、中度疼痛 (4-6 分) 及重度疼痛 (7-10 分), 不同疼痛程度患者髓核组织中白细胞介素 27 与白细胞介素 17 表达情况, 见表 2。



图注: 图 A 示突出的髓核组织中白细胞介素 27 mRNA 表达水平显著高于正常髓核组织 ($t=6.1356, P < 0.001$); 图 B 示突出的髓核组织中白细胞介素 17 mRNA 水平明显高于正常髓核组织 ($t=4.8935, P < 0.001$)

图 3 | qRT-PCR 检测髓核组织白细胞介素 27 与白细胞介素 17 mRNA 的表达情况

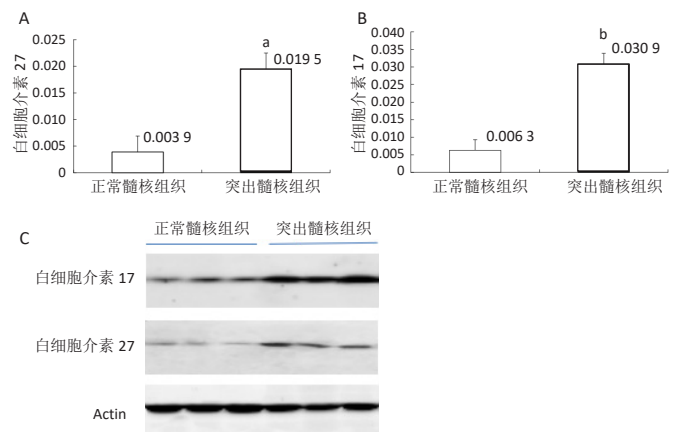
Figure 3 | qRT-PCR detection of interleukin-27 and interleukin-17 mRNA expression in nucleus pulposus

表 2 | 白细胞介素 27 与白细胞介素 17 在不同疼痛程度腰椎间盘突出症患者中的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 | Expression of interleukin-27 and interleukin-17 in lumbar disc herniation patients with different pain levels

| 指标 | 腰椎间盘突出症组 | | | 对照组 (n=8) |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 轻度疼痛 (n=5) | 中度疼痛 (n=18) | 重度疼痛 (n=13) | |
| 白细胞介素 27 mRNA | 5.384±0.788 | 3.895±1.001 | 2.502±0.919 | 0.640±0.404 |
| 白细胞介素 17 mRNA | 2.128±1.116 | 5.668±2.144 | 8.773±2.067 | 1.100±0.529 |

2.5 Western blot 检测髓核组织白细胞介素 27 与白细胞介素 17 蛋白的表达情况 根据 Western blot 的数据, 与正常髓核组织相比, 腰椎间盘突出症患者组髓核中白细胞介素 27、白细胞介素 17 蛋白的表达水平明显更高 ($t=7.3745, t=7.1507, P < 0.001$), 见图 4。



图注: 图 A 示突出的髓核组织中白细胞介素 27 蛋白表达水平显著高于正常髓核组织 ($t=7.3745, P < 0.001$); 图 B 示突出的髓核组织中白细胞介素 17 蛋白表达水平明显高于正常髓核组织 ($t=7.1507, P < 0.001$); 图 C 为突出髓核组织与正常髓核组织中白细胞介素 27、白细胞介素 17 蛋白的 Western blot 分析结果

图 4 | Western blot 检测髓核组织白细胞介素 27 与白细胞介素 17 蛋白的表达情况

Figure 4 | Western blot detection of interleukin-27 and interleukin-17 protein expression in nucleus pulposus

3 讨论 Discussion

在此次研究中,通过检测腰椎间盘突出症患者和健康对照组外周血及椎间盘组织样本,分析白细胞介素 27、白细胞介素 17 在腰椎间盘突出症中的作用。此次研究结果显示,腰椎间盘突出症患者的白细胞介素 27 表达水平高于健康对照组,说明白细胞介素 27 有可能参与了腰椎间盘突出症的发病机制。

机械压迫、脊柱不稳定和免疫激活是腰椎间盘突出症发生的 3 个传统机制^[10],但是前 2 个机制不能完全解释整个发病机制。MACNAB^[23]指出炎症是引起疼痛的主要因素,髓核的突出导致了生化和免疫学因素介导的炎症,它决定神经根病的病理生理学^[24]。在过去的几十年中,越来越多的注意力集中于炎症和免疫激活在腰椎间盘突出疾病发病机制中的作用,事实证明,自身免疫因素在椎间盘疾病相关的炎症和疼痛中发挥着重要作用^[10, 25-29]。

白细胞介素 27 是 p28 和 Epstein-Barr 病毒诱导基因 3(EBI3) 亚基的异二聚体,它的主要产生者是活化的抗原呈递细胞,包括树突状细胞和巨噬细胞^[30],通过白细胞介素 27 受体复合物(白细胞介素 27 受体 α WSX-1 和 gp130 亚基的异二聚体)发挥作用^[31],多种细胞(包括活化的 B 细胞、活化的内皮细胞、树突状细胞、巨噬细胞、肥大细胞、单核细胞、T 细胞、自然杀伤细胞)表达白细胞介素 27 受体^[32-34]。Th17 细胞及其效应因子白细胞介素 17 已被证明在椎间盘突出症患者中明显增高,髓核组织中 Th17 与白细胞介素 17 的增加引起了腰椎间盘突出症患者的疼痛,并且与疼痛程度呈正相关^[10]。Th17 细胞产生白细胞介素 17,诱导炎症细胞因子如白细胞介素 6、粒细胞集落刺激因子、前列腺素 E2 等的产生,从而增强炎症反应^[35],而白细胞介素 27 可以通过下调白细胞介素 6 和转化生长因子 β 的表达抑制 Th17 细胞分化,导致白细胞介素 17 表达减少^[15]。

已有研究显示,白细胞介素 27 在多种自身性免疫性疾病病理过程中发挥重要的作用^[17-22]。此次研究显示,与健康对照组相比,腰椎间盘突出症患者血清白细胞介素 27 和白细胞介素 17 表达水平增高,这意味着白细胞介素 27 有可能与腰椎间盘突出症的病理机制有关。作者下一步检测了髓核内白细胞介素 27 和白细胞介素 17 的表达情况,白细胞介素 27 和白细胞介素 17 表达均高于对照组,进一步证实了作者的观点,白细胞介素 27 可能参与了腰椎间盘突出症的病理过程。作者依据目测类比分,将腰椎间盘突出症患者分为轻度、中度、重度疼痛,结果发现,严重疼痛组的白细胞介素 17 表达水平高,白细胞介素 27 表达水平低;而轻度疼痛组的白细胞介素 17 表达水平低,白细胞介素 27 表达水平高,可能因为白细胞介素 27 可以通过某种途径抑制 Th17 细胞分化,导致白细胞介素 17 表达减少。在 SASAGURI 等^[36]的实验中,缺乏白细胞介素 27 或其受体 WSX-1 的小鼠自发地表现为慢性疼痛过敏,白细胞介素 27 的加入逆转了白细胞介素 27 缺陷小鼠的热敏感和机械敏感行为。据研究显示,

白细胞介素 27 可以通过下调白细胞介素 6 和转化生长因子 β 的表达抑制 Th17 细胞分化,导致白细胞介素 17 的表达减少^[15]。白细胞介素 27 能否抑制腰椎间盘突出症患者 Th17 主导的炎症从而缓解疼痛呢?

此项研究的结果是令人欣慰的,然而应该指出的是,此次研究有几个局限性:首先,研究所列入的样本量相对较小;另一方面,没有新鲜的尸体,所以没有完全正常的髓核标本,将需要急诊减压手术的腰椎骨折患者获取的髓核组织用作正常髓核对照;此外,炎症是一个复杂的过程,炎症细胞、细胞因子相互作用,相互影响,白细胞介素 27 对 Th1 型免疫反应有双重调节作用^[37-44],此次研究只是复杂炎症过程中的一部分,仍需要进一步深入研究。

结论:总而言之,此次结果表明,炎症是腰椎间盘突出症患者腰腿痛的重要原因,白细胞介素 27 表达参与了腰椎间盘突出症的病理过程,在腰椎间盘突出症的病理机制中发挥作用。这将来有可能会被用作新的医疗策略来缓解椎间盘源性疾病引起的腰腿疼痛。

致谢:感谢南通市第三人民医院肝病实验室提供的帮助。

作者贡献:所有作者均参与了文章的构思,第一作者完成初稿,通讯作者审核。

经费支持:该文章接受了“南通市卫生和计划生育委员会科研课题(WKZL2018065)”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:此次研究通过南通市第三人民医院伦理委员会批准。

知情同意问题:参与实验的患病个体及其家属为自愿参加,均对实验过程完全知情同意,在充分了解实验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:文章统计学方法已通过南通大学医学院统计学专家审核。

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] GILBERTSON L, AHN SH, TENG PN, et al. The effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2, recombinant human bone morphogenetic protein-12, and adenoviral bone morphogenetic protein-12 on matrix synthesis in human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells. *Spine J*. 2008;8(3):449-456.
- [2] SCHWARZER AC, APRILL CN, DERBY R, et al. The prevalence and clinical features of internal disc disruption in patients with chronic low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(17):1878-1883.

- [3] DE SOUZA GRAVA AL, FERRARI LF, DEFINO HL. Cytokine inhibition and time-related influence of inflammatory stimuli on the hyperalgesia induced by the nucleus pulposus. *Eur Spine J*. 2012;21(3):537-545.
- [4] KIM HJ, YEOM JS, KOH YG, et al. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- α and IL-1. *J Orthop Res*. 2014;32(4):551-556.
- [5] WEILER C, NERLICH AG, BACHMEIER BE, et al. Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(1):44-53; discussion 54.
- [6] KEPLER CK, MARKOVA DZ, DIBRA F, et al. Expression and relationship of proinflammatory chemokine RANTES/CCL5 and cytokine IL-1 β in painful human intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013;38(11):873-880.
- [7] SAAL JS, FRANSON RC, DOBROW R, et al. High levels of inflammatory phospholipase A2 activity in lumbar disc herniations. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1990;15(7):674-678.
- [8] O'DONNELL JL, O'DONNELL AL. Prostaglandin E2 content in herniated lumbar disc disease. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1996;21(14):1653-1655; discussion 1655-1656.
- [9] KARPPINEN J, DAAVITILA I, NOPONEN N, et al. Is the interleukin-6 haplotype a prognostic factor for sciatica? *Eur J Pain*. 2008;12(8):1018-1025.
- [10] CHENG L, FAN W, LIU B, et al. Th17 lymphocyte levels are higher in patients with ruptured than non-ruptured lumbar discs, and are correlated with pain intensity. *Injury*. 2013;44(12):1805-1810.
- [11] XUE H, YAO Y, WANG X, et al. Interleukin-21 Is Associated with the Pathogenesis of Lumbar Disc Herniation. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2015;14(5):509-518.
- [12] JIANG H, DENG Y, WANG T, et al. Interleukin-23 may contribute to the pathogenesis of lumbar disc herniation through the IL-23/IL-17 pathway. *J Orthop Surg Res*. 2016;11:12.
- [13] PFLANZ S, TIMANS JC, CHEUNG J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity*. 2002;16:779-790.
- [14] MEKA RR, VENKATESHA SH, DUDICS S, et al. IL-27-induced modulation of autoimmunity and its therapeutic potential. *Autoimmun Rev*. 2015;14(12):1131-1141.
- [15] HUBER M, STEINWALD V, GURALNIK A, et al. IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. *Int Immunol*. 2008;20:223-234.
- [16] LUCAS S, GHILARDI N, LI J, et al. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and-independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:15047-15052.
- [17] FUJIMOTO H, HIRASE T, MIYAZAKI Y, et al. IL-27 inhibits hyperglycemia and pancreatic islet inflammation induced by streptozotocin in mice. *Am J Pathol*. 2011;179:2327-2336.
- [18] TANIDA S, YOSHITOMI H, ISHIKAWA M, et al. IL-27-producing CD14(+) cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration. *Cytokine*. 2011;55:237-244.
- [19] TANG SC, FAN XH, PAN QM, et al. Decreased expression of IL-27 and its correlation with Th1 and Th17 cells in progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2015;348:174-180.
- [20] SASAOKA T, ITO M, YAMASHITA J, et al. Treatment with IL-27 attenuates experimental colitis through the suppression of the development of IL-17-producing T helper cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300:G568-576.
- [21] XIA LP, LI BF, SHEN H, et al. Interleukin-27 and interleukin-23 in patients with systemic lupus erythematosus: possible role in lupus nephritis. *Scand J Rheumatol*. 2015;44:200-205.
- [22] TOJO G, FUJIMURA T, KAMBAYASHI Y, et al. Systemic Lupus Erythematosus Accompanied by Psoriasis Induces IL-27-Producing Cells in Both Affected Areas of the Skin. *Case Rep Dermatol*. 2012;4(2):181-185.
- [23] MACNAB I. Cervical spondylosis. *Clin Orthop Relat Res*. 1975;(109):69-77.
- [24] DI MARTINO A, MERLINI L, FALDINI C. Autoimmunity in intervertebral disc herniation: from bench to bedside. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(12):1461-1470.
- [25] SATOH K, KONNO S, NISHIYAMA K, et al. Presence and distribution of antigen-antibody complexes in the herniated nucleus pulposus. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24(19):1980-1984.
- [26] ARAI Y, YASUMA T, SHITOTO K, et al. Immunohistological study of intervertebral disc herniation of lumbar spine. *J Orthop Sci*. 2000;5(3):229-231.
- [27] GEISS A, LARSSON K, RYDEVIK B, et al. Autoimmune properties of nucleus pulposus: an experimental study in pigs. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(2):168-173.
- [28] MURAI K, SAKAI D, NAKAMURA Y, et al. Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation. *Eur Cell Mater*. 2010;19:13-21.
- [29] NAYLOR A, HAPPEY F, TURNER RL, et al. Enzymic and immunological activity in the intervertebral disk. *Orthop Clin North Am*. 1975;6(1):51-58.
- [30] JAFARZADEH A, NEMATI M, CHAUHAN P, et al. Interleukin-27 Functional Duality Balances Leishmania Infectivity and Pathogenesis. *Front Immunol*. 2020;11:1573.
- [31] JONES GW, HILL DG, CARDUS A, et al. IL-27: a double agent in the IL-6 family. *Clin Exp Immunol*. 2018;193(1):37-46.
- [32] YOSHIDA H, HUNTER CA. The immunobiology of interleukin-27. *Ann Rev Immunol*. 2015;33:417-443.
- [33] HALL A, SILVER J, HUNTER C. The immunobiology of IL-27. *Adv Immunol*. 2012;115:1-44.
- [34] HUNTER CA, KASTELEIN R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. *Immunity*. 2012;37:960-969.
- [35] KORN T, OUKKA M, KUCHROV V, et al. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol*. 2007;19(6):362-371.
- [36] SASAGURI T, TAGUCHI T, MURATA Y, et al. Interleukin-27 controls basal pain threshold in physiological and pathological conditions. *Sci Rep*. 2018;8:11022.
- [37] OWAKI T, ASAKAWA M, KAMIYA S, et al. IL-27 suppresses CD28-mediated [correction of medicated] IL-2 production through suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol*. 2006;176:2773-2780.
- [38] 冯勇军, 王明婧, 曾春蓉, 等. 变应性鼻炎患者血清 Th 细胞亚群及相关细胞因子水平变化 [J]. *山东医药*, 2016,56(9):69-70.
- [39] 陈毅斐, 高亚东, 胡家豪, 等. 白细胞介素 27 在自身免疫性疾病中的功能调控 [J]. *医学综述*, 2017,23(22):4376-4381.
- [40] 李阳, 夏丽坤. 白细胞介素 -27 的生物学功能及其抗病毒作用的研究进展 [J]. *国际免疫学杂志*, 2015,38(2):195-198.
- [41] 单敏敏, 李长安, 崔红生. 哮喘宁颗粒对哮喘大鼠 Th1/Th2 平衡和 STAT1 通路调节作用的研究 [J]. *中国医药导报*, 2019,16(10):11-15.
- [42] 任媛媛, 王贵强. 白细胞介素 27 在抗病毒免疫中的作用及临床应用前景 [J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2011,38(6):425-428.
- [43] 冯硕, 崔德成. 自拟通窍止咳汤治疗儿童上气道咳嗽综合征疗效观察 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2020,29(11):1215-1218.
- [44] 杨景英, 陈学利, 吴文钦, 等. 白细胞介素 -12 家族与感染性疾病相关研究进展 [J]. *临床检验杂志*, 2014,32(6):443-446.

(责任编辑: GD, ZN, ZJP)