基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0186-04

TACE 在自体髓核移植背根节致根性神经痛中的作用机制研究

曹 兴[1],曹国永[1],周 跃[2],龙 毅[1],邓 森[1]

(1. 武警重庆总队医院骨科,重庆 400061;2. 第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

【摘 要】目的:探讨 TACE 在椎间盘突出致坐骨神经痛发病机制中的作用。方法:采用自体髓核移植至 $L_{4,5}$ 神经节,建立根性神经痛的动物模型,应用 Von Frey 针丝及 RTY-Ⅰ型热痛测仪对神经行为的改变进行检测,采用免疫组化法检测 TACE 在神经节及神经根中的表达,采用 RT-PCR 的方法检测 TACE 和 TNF-αmRNA 表达,并分析其与神经行为改变之间的相关性。结果:自体髓核移植可以导致明显的机械刺激痛觉过敏现象,而无明显的热刺激痛觉过敏,TACE 在自体髓核移植术后 4 d 表达开始增强($P<0.05$),术后 1 周表达最强($P<0.01$),术后 3 周逐渐恢复正常,与 TNF-α 的表达及 TACE 的表达之间存在显著相关性。结论:TACE 作为释放活性 TNF-α 的特异性蛋白酶,自体髓核移植至 DRG 后,其蛋白表达升高,TNF-αmRNA、TACEmRNA 表达之间存在线性相关,说明 TACE 可能是抗 TNF-α 治疗的新靶点,在治疗椎间盘突出引起的根性神经痛中具有重要作用。

【关键词】髓核;坐骨神经痛;TNF-α;肿瘤坏死因子 α 转换酶;神经节

【中国图书分类法分类号】Q538;R745.42 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-01

Study of TACE in the mechanism of hyperalgesia derived by auto-transplantation of nucleus pulposus to DRGs

CAO Xing, et al

(*Depatment of Orthopaedic, Chongqing Municipal Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the role of TACE in the mechanism of sciatica due to disc herniation. *Methods*:Autologous nucleus pulposus was applied to the peripheral of the L_4 and L_5 nerve roots and DRGs to construst animal model. Then Von Frey filaments and a thermal testing device (RTX-1 type) were used to quantify behavior test. Immunocytochemistry and RT-PCR were used to detect the expression changes of TNF-αand TACE to analyze their correlation with the nerve behavior change. *Results*: The mRNA expression of TNF-αand TACE increased significantly ($P<0.05$) in DRGs, and nerve roots 4 days after operation, especially 1 week ($P<0.01$) after operation. Three weeks after operation, the expression restored gradually to normal. There was a time correlation between the mRNA expression of TNF-α and TACE. *Conclusion*:TACE causes the shedding of the active TNF-α from cell membrane, and it's a new therapy target to inhibit the action of TNF-α, so the antogonist of TACE may play an important role in the treatment of sciatica.

【Key words】 Nucleus pulpusus; Sciatica; Tumor necrosis factor alpha(TNF-α); Tumor necrosis factor-α converting enzyme; Ganglion

椎间盘突出症引起的坐骨神经痛的病理生理机制尚不是完全清楚,研究表明硬膜外的髓核组织可以引起神经根结构、功能及神经行为的改变,我们的研究表明 TNF-α 在髓核致根性神经痛的发病机制中有重要的作用[1],而肿瘤坏死因子 α 转换酶是释放活性 TNF-α(17 kD)的关键酶,其作用的受体也包括 TNF-α 受体,故研究其在根性神经痛发生机制中的作用可能会带来新的启示。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

健康成年 Wistar 大鼠 45 只,雌雄不拘,体重 200~250 g。随机分为 3 组,A 组:髓核移植组 20 只;B 组:肌肉移植组,20 组;C 组:术前正常对照组,5 只。A 与 B 组按术后 4 d、1 周、2 周、3 周分为 4 个小组,每小组 5 例。

以 3%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,以 L_5 棘突为中心取背部正中纵行切口,依次切开皮肤、皮下组织及腰背筋

作者介绍:曹 兴(1971-),男,主治医师,研究方向:主要从事脊柱外科的基础和临床研究。

通讯作者:曹国永,男,主治医师,E-mail:cguoyong163.com。

膜,沿棘突两侧剥离骶棘肌并向两侧分开,显露双侧 L_4、L_5 椎板,咬除 L_4、L_5 棘突及右侧椎板、关节突和部分椎弓根,显露右侧硬脊膜及 L_4、L_5 的右侧神经根、神经节。在鼠尾近根部纵行切开皮肤、皮下组织至尾椎骨面,向两侧分离显露 4 个椎间隙,横向切开纤维环取出髓核组织移植到右侧 L_4、L_5 神经节周围,每个神经节周围移植 2 个椎间盘的髓核组织。逐层缝合切口,送动物室正常饲养。

1.2 疼痛相关神经行为的检测

于术前 3 d 分别检测 5 例正常大鼠两侧的机械刺激后肢缩腿反射阈值及热痛缩腿反射的潜伏期,并分别计算出差值,作为正常对照。于术后 2 d、4 d、7 d、11 d、14 d、21 d 等时相点分别对各组动物进行神经行为的检测。

以 Von Frey 针丝检测机械刺激痛觉过敏的改变,记录相应的应变力值,作为痛阈值。每个时相点重复测试 1 次,结果取 2 次试验的均值。根据平均值求出两侧后足机械刺激缩腿反射阈值,按公式:术侧阈值 - 对照侧阈值,进行计算,求出差值,负值表明术侧阈值较低,对机械刺激存在痛觉过敏。

热刺激痛觉过敏的检测:测定时大鼠放于 RTX-1 型热痛测试仪的检测盒内,记录从开始照射到产生收缩的时间。测量 2 次取平均值。根据平均值求出两侧后足热痛缩腿反射潜伏期,按公式:术侧潜伏期 - 对侧潜伏期,进行计算,负值表明术侧阈值较低,对热痛反应存在痛觉过敏。

1.3 免疫组织化学检测 TACE 的表达。

取术后 4 d、1 周、2 周、3 周大鼠 DRG 标本,大鼠在完成痛觉行为检测后按如下方法进行处理:3%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,麻醉成功后,开胸经左心室插管至升主动脉,依次灌注肝素化生理盐水 200 ml,4%的多聚甲醛 500 ml。手术取出 L_5DRG 置于上述固定液中过夜,脱水后,行石蜡包埋,常规切片(片厚 5 μm),行免疫组化染色。

TACE 免疫组织化学染色步骤如下:石蜡切片脱蜡,3%的过氧化氢室温孵育 10 min,蒸馏水冲洗,0.01 mol/L 的 PBS 浸洗 5 min;切片转至 pH 为 6.0 的枸橼酸盐缓冲液中,95℃加热 30 min,冷却至室温,蒸馏水冲洗;0.01 mol/L 的 PBS 冲洗,3 min × 3;5%的正常山羊血清(PBS min 过夜;PBS 冲洗,5 min × 3;滴加适当比例稀释的生物素标记二抗,37℃孵育 1 h;PBS 冲洗,5 min × 3;滴加适当比例稀释的辣根过氧化酶标记链霉素,37℃孵育 30 min;PBS 冲洗,5 min × 3;显色剂显色(DAB),自来水冲洗,37℃烘干,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照试验:以抗体稀释液代替一抗,染色结果阴性。

1.4 RT-PCR 检测 TNF-αmRNA 与 TACE mRNA 在背根神经节中的表达

大鼠 TACE 引物序列:上游引物 5'-GGGCAAGTGCAAGGCTGGGAAATG-3',下游引物 5'-CAGGGAACGGCTTGATAATGCGAACAG-3',扩增长度为485 个 bp。

大鼠 TNF-α 的引物序列:上游引物 5'-CGAGTGACAAGCCCGTAGCC-3',下游引物:5'-GGATGAACACGCCAGTCGCC-3',扩增产物大小 753 bp。

内参照 β-actin2 条引物序列分别为:上游引物 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3',下游引物 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3',扩增产物大小 300 个 bp。

取出各组不同时相点的神经节,按试剂盒说明书进行 RNA 的提取、逆转录、扩增等。

1.5 图像分析及统计学处理

TNF-α、TNF-R Ⅰ mRNA 在 DRG 的表达强弱用 Image-pro-plus 真彩图像分析软件检测平均光密度值(AOD)。用 SPSS10.0 统计软体包处理数据,所测数据用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和 t 检验进行统计学处理。$P<0.05$ 为有显著性差异,$P<0.01$ 为有非常显著性差异。

2 结 果

2.1 自体髓核组织移植后大鼠疼痛相关神经行为的改变

A 组(自体髓核移植组)术后 4 d 出现机械刺激痛觉超敏,1 周时最明显,与术前相比相差极显著($P<0.01$),2 周时相差显著($P<0.05$),3 周时相差已不明显;B 组没有观察到明显的痛觉超敏现象,各时相点相差不显著。对热刺激过敏的观察,A 组虽然后肢回缩反射潜伏期在髓核移植后 1 周较术前降低,但无统计学意义。其它各组亦未观察到对热刺激的痛觉过敏现象。

2.2 TACE 在神经根、背根节中的免疫组织化学染色结果

TACE 在正常脊神经节仅有少量表达。自体髓核移植后 4 d TACE 的表达明显增强(++),1 周时达高峰,为强阳性(+++),2 周时仍有较高表达(++),3 周时与正常脊神经节相比无显著差异,呈现弱阳性表达,阳性细胞以中、小神经元为主,胞膜及胞浆皆有表达,以胞膜明显,胞核无染色,神经元细胞周围的卫星细胞亦有较强表达,在血管内皮细胞、雪旺细胞上亦有表达(图 1~3)。在自体肌肉移植组没有观察到表达的明显增强,术后 4 d 呈弱阳性表达(+),此后同术前相比表达无增强。

2.3 自体髓核组织移植对 TNF-αmRNA 和 TACEmRNA 表达的影响及与机械刺激痛觉超敏的关系

扩增产物电泳后经扫描分析,自体髓核移植组 TACERNA、TNF-αRNA 的表达产物明显增加(图 3),

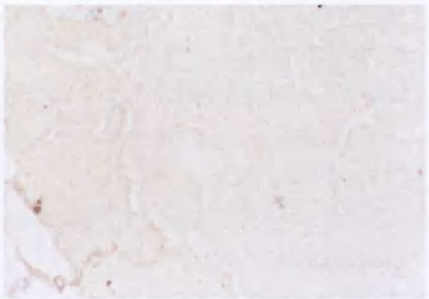


图 1　TACE 在正常 DRG 的表达为弱阳性（SP×200）



图 2　TACE 于自体髓核移植术后 4 d 在神经根的表达增强，可见阳性细胞主要分布于雪旺细胞（SP×400）

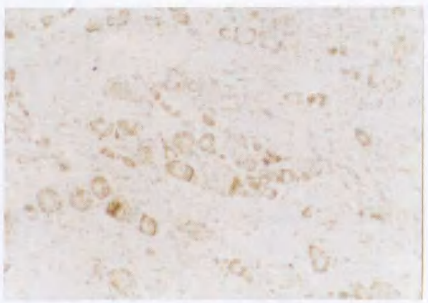
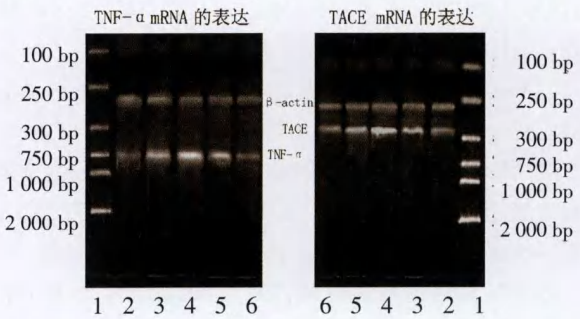


图 3　TACE 在自体髓核移植术后 1 周 DRG 中的表达明显增强，中小神经元表达强于大神经元，另外卫星细胞亦可见有较强表达（SP×200）



1 道为 DNA marker；2 道为正常对照；3、4、5、6 道分别为 NP 移植术后 4、7、14、21 d，300 bp 处为内参照 β-actin 扩增产物

图 4　TNF-α 与 TACEmRNA 在 DRG 中的表达，可见术后 1 周时表达最为强烈，3 周时已趋于正常

表 1　DRG 中 TNF-αmRNA 相对表达量（TNF-α/β-actin，$\bar{x}\pm s$）

	术前	术后 4 d	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周
髓核移植组	1.023 7 ± 0.012 8	1.065 0 ± 0.016 0	1.153 0 ± 0.013 2$^{\triangle\star}$	1.078 7 ± 0.011 3	1.033 5 ± 0.010 3
肌肉移植组	1.023 7 ± 0.012 8	1.039 3 ± 0.012 7	1.042 1 ± 0.014 3	1.040 5 ± 0.013 2	1.037 4 ± 0.017 5

注：同术前相比$^{\triangle}P<0.01$；同肌肉移植组相比$^{\star}P<0.01$

表 2　DRG 中 TACEmRNA 相对表达量（TACE-α/β-actin，$\bar{x}\pm s$）

	术前	术后 4 d	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周
髓核移植组	1.025 ± 0.014 1	1.094 5 ± 0.024 1	1.205 2 ± 0.013 1$^{\triangle\star}$	1.116 5 ± 0.024 4	1.049 5 ± 0.021 2
肌肉移植组	1.025 ± 0.014 1	1.030 2 ± 0.021 9	1.048 4 ± 0.015 4	1.038 8 ± 0.011 2	1.029 8 ± 0.011 6

注：同术前相比$^{\triangle}P<0.01$；同自体肌肉移植组相比$^{\star}P<0.01$

以 1 周时最为明显，同术前及肌肉移植组相比，$P<0.01$。术后 2 周逐渐降低，术后 3 周时同对照组相差不显著（$P>0.05$）。自体肌肉移植组的 TNF-α 表达产物同术前对照组相比无显著差异。

2.4　自体髓核移植所致 DRG TNF-αmRNA 表达与 TACE mRNA 表达的关系

自体髓核移植组 TNF-αmRNA 表达变化与 TACE mRNA 表达变化结果见下表。TNF-αmRNA 表达与 TACE mRNA 表达呈显著正相关，直线回归方程为：y=0.33+0.68x，相关系数 R=0.988，$P<0.05$。

3　讨　论

TNF-α 在体内有两种形式：其一为全长的Ⅱ型膜结合形式（26 kD），其二为可溶形式，即在某种蛋白分解酶的作用下从细胞表面释放的活性 C-末端部分（17 kD）。肿瘤坏死因子-α 转换酶是近年发现的 1 个胞膜蛋白脱落酶，其可以裂解释放活性 TNF-α

表 3 TNF-αmRNA 表达与 TACE mRNA 表达相关性分析

	术前	术后 4 d	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周
TNF-α mRNA	1.023 7 ± 0.012 8	1.065 0 ± 0.016 0	1.153 0 ± 0.013 2	1.078 7 ± 0.011 3	1.033 5 ± 0.010 3
TACE mRNA	1.025 0 ± 0.014 1	1.094 5 ± 0.024 1	1.205 2 ± 0.013 1	1.116 5 ± 0.024 4	1.049 5 ± 0.021 2

(17 kD), 1997 年由 Black 和 Moss 等[2,3]2 个独立的小组同时分离、纯化这种蛋白质并且克隆了该酶的 cDNA 序列。它是 1 个膜锚定的锌离子金属蛋白酶,为 ADAM 家族成员之一,又名 ADAM17,是第一个被鉴定出来的跨膜蛋白的脱落酶。TACE 是释放活性 TNF-α 的特异性蛋白酶,具有高度的底物选择性[4],参予了与 TNF-α 相关的一些疾病,如扩张性心肌病、Alzheimer 病、类风湿性关节炎等[5,6]。周围神经慢性压迫损伤时,TACE 的表达升高,主要分布于血管内皮细胞及雪旺细胞,在脊神经节中以大直径神经元为主,偶见于小直径神经元[7]。

而 TACE 在腰椎间盘突出症的作用,目前尚无相关研究报道。我们的研究发现在自体髓核移植至神经根、神经节所致痛觉过敏的动物模型中,TACE 的表达同 TNF-α 的表达在时间与空间分布上有一定的共性,通过 mRNA 表达强度的半定量分析,结果表明 TACE 与 TNF-α 之间存在明显的线性相关,提示二者之间有密切的关系。研究表明 TACE 可以通过活化 TNF-α 参予了自体髓核移植所致的病理过程,如神经根轴突髓鞘的降解、神经节的炎性水肿,并且与疼痛行为的产生有密切的联系。且 TACE 还具有多个底物如 p75 TNF 受体、L-选择素及淀粉样前蛋白、生长激素结合蛋白(Growth hormone binding protein,GHBP)、Ⅱ型 IL-1 受体及 p55TNF 受体等,但这些底物的裂解需要较高的 TACE 浓度和反应时间[4]。

针对 TACE 来治疗与 TNF-α 相关的疾病,可能较单一针对 TNF-α 有更好的效果。有研究证实抑制 TNF-α 的产生可以减轻痛觉过敏的程度,故我们推测通过控制活性 TNF-α 的产生同样可以达到减轻痛觉过敏的效果。现在正在研制中的 TACE 竞争性抑制剂,多基于氧肟酸结构的化学合成物,并且是 MMP 和 TACE 的双重抑制剂,Stimpson 等[8]用 GW3333(为一种 TACE/MMP 双重抑制剂)治疗肱聚糖引起的踝关节炎及佐剂性关节炎时,结果显示疗效同使用 TNF-α 单抗相差无几,长期疗效甚至优于 TNF-α 单抗,结果令人鼓舞。作为一个新的治疗靶点,进一步研究并设计特异的 TACE 抑制剂,用于治疗椎间盘源性腰腿痛,特别是针对由非机械压迫因素引起的的根性神经痛,可能具有重要的临床意义。

参 考 文 献

[1] 曹国永,周 跃,潘 勇,等. TNF-α 及 TNF-R Ⅰ对自体髓核移植背根节所致痛觉过敏的调控研究[J]. 颈腰痛杂志,2005,26(5):327-331.

[2] Black R A,Rauch C T,Kozlosky C J,et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells[J]. Nature,1997,385(6618):729-733.

[3] Moss M L,Jin S L,Milla M E,et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha[J]. Nature,1997,385(6618):733-736.

[4] Mohan M J,Seaton T,Mitchell J,et al. The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme(TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity[J]. Biochemistry,2002,41(30): 9462-9469.

[5] Satoh M,Nakamura M,Saitoh H,et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme and tumor necrosis factor-alpha in human dilated cardiomyopathy[J]. Circulation,1999,99:3260-3265.

[6] Skovronsky D M,Fath S,Lee V M,et al. Neuronal localization of the TNFalpha converting enzyme(TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques[J]. J Neurobiol,2001,49:40-46.

[7] Ji R R,Zhang X,Nisson S,et al. Central and peripheral response to galanin induced by inflammation[J].Neuroscience,1995,68(4):563-576.

[8] Stimpson S A,Warner J,Becherer J D. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha(TNF-alpha) production and arthritis in the rat by GW3333, a dual inhibitor of TNF-alpha-converting enzyme and matrix metalloproteinases[J]. J Pharmacol Exp Ther,2001,298(3):900-908.

(责任编辑:关蕴良)