

腰椎间盘突出症血瘀证与 TGF-β1-509C/T 基因多态性及腰椎负荷强度的关联研究

许建文, 钟远鸣, 杨 光, 尹利军, 周宾宾, 苏洁寒, 张家立, 伍 亮, 马显生

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(桂科自 0991163); 广西中医学院重点基金项目(ZD2006062)

作者单位: 530023 南宁, 广西中医学院第一附属医院(许建文, 钟远鸣, 杨 光, 尹利军, 周宾宾, 张家立, 伍 亮, 马显生);
530022 南宁, 广西医科大学(苏洁寒)

作者简介: 许建文(1968 -), 男, 医学博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 脊柱疾病的中西医结合防治。E-mail: tdhao@tom.com

[摘要] **目的** 探讨腰椎间盘突出症血瘀证与转化生长因子 β1 (TGF-β1)-509C/T 基因多态性及腰椎负荷强度的关联性。**方法** 筛选符合既定相关标准的广西汉族腰椎间盘突出症患者 120 例, 分为血瘀证组 60 例与非血瘀证组 60 例, 进行 TGF-β1-509C/T 基因多态性检测, 并观测患者的腰椎负荷强度, 分析 TGF-β1-509C/T 基因多态性与腰椎负荷强度的交互作用与腰椎间盘突出症中医证型的关联性。**结果** 经非条件 Logistic 回归 Forward (LR) 法分析显示广西汉族重度腰椎负荷强度者患腰椎间盘突出症血瘀证的风险是轻中度腰椎负荷强度者的 3.977 倍(95% CI: 1.012 ~ 3.801) ($P < 0.05$), TGF-β1 基因-509C/T 多态性与重度腰椎负荷强度的累积暴露发生腰椎间盘突出症血瘀证的风险是其中某单一因素的 5.365 倍(95% CI: 1.086 ~ 2.703) ($P < 0.05$)。**结论** 重度腰椎负荷强度是广西汉族腰椎间盘突出症患者血瘀证的潜在危险因素之一, TGF-β1 基因-509 位点 CT 基因型与重度腰椎负荷的交互作用可增加腰椎间盘突出症血瘀型发生的可能性。

[关键词] 腰椎间盘突出症; 血瘀证; 脊柱负荷; TGF-β1-509C/T 基因多态性
[中图分类号] R 681.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)05-0421-04
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.05.04

Association of transforming growth factor β1-509C/T site gene polymorphism and lumbar burden intensity with blood stasis syndrome of lumbar intervertebral disc protrusion XU Jian-wen, ZHONG Yuan-ming, YANG Guang, et al. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between the blood stasis syndrome and parts of the risk factors of lumbar intervertebral disk protrusion (LIDP) and transforming growth factor β1 (TGF-β1)-509C/T site gene polymorphisms. **Methods** A total of 120 Han ethnic patients from Guangxi Zhuang Autonomous Region were selected according to standard of LIDP, 60 with blood stasis syndrome and the other 60 without, then, their single nucleotide polymorphism (SNP) of TGF-β1-509C/T and lumbar burden intensity were tested, and their relationship with the blood stasis syndrome of LIDP were analyzed. **Results** It was showed by Logistic Regression Forward (LR) analysis that risk of syndrome blood stasis of LIDP in patients with severe lumbar burden was 3.977 times (95% CI: 1.012 ~ 3.801) of that in patients with mild and middle lumbar burden ($P < 0.05$), and the risk further increased 5.365 times (95% CI: 1.086 ~ 2.703) after it's accumulating with TGF-β1-509C/T site gene polymorphisms in Han ethnic group in Guangxi ($P < 0.05$). **Conclusion** Severe lumbar burden may be one of the risk factors of blood stasis syndrome of LIDP in Han ethnic population from Guangxi. Patients with TGF-β1 gene-509 adiponectin CT genotype and combined severe lumbar burden are susceptible to blood stasis syndrome of LIDP.

[Key words] Lumbar intervertebral disk protrusion; Blood stasis syndrome; Spinal burden; Transforming growth factor-β1-509C/T; Gene polymorphisms

腰椎间盘突出症(lumbar intervertebral disk protrusion, LIDP)是骨科常见病,腰腿痛反复发作是其
主要临床特点,中医通常将其归为腰腿痛、痹证范畴,目前在发病机理方面仍有很多未知数。本文对

转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)-509C/T 基因多态性及腰椎负荷强度与广西汉族 LIDP 血瘀证的关联性进行探讨,为深入研究本病防治措施提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机抽取 2008-01 ~ 2009-12 在我院骨科临床确诊为腰椎间盘突出症并中医辨证为血

瘀证的患者 60 例作为观察组,均为无血缘关系的中国广西地区汉族人,对照组来自同期在骨科就诊并民族、性别、年龄及家族史等因素与观察组相匹配的腰椎间盘突出症非血瘀证患者 60 例,两组年龄、性别及家族史等一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 两组患者一般资料比较 [$(\bar{x} \pm s)$, $n(\%)$]

组 别	例数	性别(男/女)	年龄(岁)	家族史	BMI(kg/m ²)	SI ≥ 100 /d·y
血瘀证组	60	32/28	40.65 $\pm$ 9.88	15(25.0)	23.9 $\pm$ 0.9	24(40.0)
非血瘀证组	60	32/28	39.72 $\pm$ 10.51	15(25.0)	23.7 $\pm$ 1.1	23(38.3)
t/χ^2	-	0.000	0.499	0.000	1.090	0.035
P	-	1.000	0.618	1.000	0.278	0.852

1.2 病例诊断及中医辨证标准 西医诊断标准参照胡有谷^[1]主编的《腰椎间盘突出症》(2005.9)及胥少汀^[2]主编的《实用骨科学》(2005.4);中医辨证参照国家卫生部及中医药管理局相关行业标准^[3,4],中医辨证为血瘀证者归入血瘀证组,中医辨证为寒湿证、肝肾亏虚证及湿热证者归入非血瘀证组。

1.3 病例选择及纳入标准 (1)临床确诊为腰椎间盘突出症的患者;(2)年龄 19 ~ 58 岁;(3)无可查亲缘关系,向上追溯三代均为汉族的个体;(4)临床资料完整;(5)患者知情同意,自愿参加调查,在医学理论学方面无争议。

1.4 病例排除标准 (1)合并有肝肾疾病、心脑血管疾病、呼吸系统疾病、精神疾病、血液病、糖尿病、自身免疫性疾病、肿瘤等;(2)体质指数(BMI) < 18.5 kg/m² 或 > 28.0 kg/m²; (3)吸烟指数(SI) > 300 支/d·y 者;(4)临床相关资料不完整者。

1.5 临床指标观测方法

1.5.1 SI 按平均每天吸烟数目乘以吸烟年限评价,参考 Battie 等^[5]方法划分为不吸烟和吸烟两个等级,不吸烟指从未吸过烟和 SI < 100 的个体,吸烟指吸过烟而且 SI ≥ 100 的个体。具体计算方法为 SI = 支/d·y。由三位经过培训的课题调查员通过问卷调查后提出分类意见。

1.5.2 BMI 采用国际通用方法,超重、肥胖判定标准根据国际生命科学会中国办事处中国肥胖问题工作组对中国成人体质指数分类的推荐意见中建议标准^[6]分为过轻、超重、肥胖及正常体重四个等级。其中 BMI < 18.5 为体重过轻,BMI > 24 为超重,BMI > 28 为肥胖,BMI 18.6 ~ 23.9 为正常体重,具体计算方法为[BMI = 体重(kg)/身高²(m²)]。由三位

经过培训的课题调查员测量研究对象的身高、体重并将计算结果同以上相应数据进行比较归类。

1.5.3 腰椎负荷强度^[7] 根据瑞典斯德哥尔摩肌肉骨骼疾病研究中心的体力负荷评估问卷进行判断,包括坐位作业(Sitting)、弯腰扭腰(Bending/twisting)、全身振动(Whole body vibration)、提举重物(Lifting)及重体力作业(Heavy work)等,分为轻度(Low)、中度(Middle)和重度(High)腰椎负荷三个等级。由三位经过培训的课题调查员通过问卷调查并提出分类意见。

1.5.4 其他情况记录 同时记录研究对象的性别、年龄以及家庭民族情况等。

1.5.5 研究因素及数量化等级 见表 2。

表 2 研究因素及数量化等级

研究因素	数量化等级
家族史	0 = 无, 1 = 有
腰椎负荷	1 = 轻中度, 2 = 重度
体质指数	1 = 轻, 2 = 重
吸烟指数	0 = 无或 SI < 100 支/d·y, 1 = 有并 SI ≥ 100 支/d·y
TGF- $\beta 1$ 基因-509C/T	1 = CT 基因型, 2 = CC 基因型, 3 = TT 基因型
应变量(y)	0 = 非血瘀证组, 1 = 血瘀证组

1.6 实验研究方法

1.6.1 主要仪器及试剂 蛋白质与核酸测试仪(BIO-RAD USA);超低温冰箱(MDF-U5410 型,日本三洋公司);荧光定量 PCR 仪(GeneAmp PCR System 2400,PERKIN ELMER 公司 USA);生物安全柜(HF Safe 1200,香港热力发展有限公司);恒温水浴箱(Grant SUB14,Grant Instruments Ltd. ENGLAND);水平电泳仪(DYY-Ⅲ型,北京市六一仪器厂);垂直电

泳仪 (EC 120 Mini Vertical Gel System, Thermo EC USA); 微量加样器 (Autoclavable Nichipet EX, NICHIRYO Japan); 高速离心机 (EBA 12, Hettich Germany); 凝胶成像系统 (UNIVERSAL HOOD II, BIO-RAD USA); 凝胶成像系统分析软件 (The Discovery Series Quantity One® 1-D Analysis Software Version 4.5); 全血基因组 DNA 提取试剂盒 (Bsc06sl, Biospin 公司产品); 各基因片段所需引物 (上海生物工程技术公司产品); 限制性内切酶 (Saul, TSP45I, Fermentas 公司产品); 限制性内切酶 (Ddel, Promega 公司产品)。

1.6.2 标本收集 抽取符合纳入标准的患者外周血作为检测样本,所有研究对象抽血前空腹 10 h,均于早上 7:00~8:00 抽取静脉血标本 2 ml,然后注入含肝素抗凝剂的真空管中混匀,置于 4℃ 冰箱保存待用。

1.6.3 检测指标及方法^[8] 检测 TGF-β1 基因-509 位点,运用聚合酶链反应结合限制片段长度多态酶切 (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms, PCR-RFLP) 技术进行基因多态性检测并对其进行基因分型。基因多态性分析的主要步骤包括:(1)外周血白细胞 DNA 提取过程的操作方法按照试剂的说明书进行,全部受试者均取外周静脉血 2ml,EDTA 抗凝,采用 Biospin 抽提试剂盒提取基因组 DNA,按照既定方法和步骤提取 DNA。(2)聚合酶链反应:①设计引物:参照文献^[9]方法,引物序列如下, F1:5'-GGG GAC ACC ACT TAC AGT G-3'; F2:5'-GGA GGA GGG GGC AAC AGG-3';②聚合酶链反应体系:10×Buffer 1.5 μl, dNTP 0.3 μl, Taq 酶 0.15 μl, 上、下游引物各 0.3 μl,模板 1 μl,加纯净水至 15 μl;③反应条件:94℃ 4 min 预变性,按 94℃ 1 min、58℃ 1 min、72℃ 2 min 循环 30 次后,于 72℃ 延伸 10 min,聚合酶链反

应后检测,取 8 μL 聚合酶链反应扩增产物点样,于 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳,检测扩增结果,并读取各个个体基因型;④聚合酶链反应限制性片段多态性分析 (PCR-PELP) 的 Saul 反应体系:PCR reaction mixture 10μl, 10×Buffer 2 μl, Saul 0.15 μl,加纯净水至 15 μl;⑤酶切反应条件:加石蜡油 1 滴将体系密封,防止挥发,37℃ 酶切过夜;⑥电泳条件:以 30 g/L 琼脂糖凝胶对酶切产物进行检测。电泳缓冲液为 1×TBE,选择电泳电压 100 V,电流 50 mA,电泳 3 h 后在凝胶电泳成像分析系统上照相。(3)基因型判断:若 TGF 基因存在 G509→T 碱基替换,则产生限制性内切酶 Saul 的酶切位点(酶切序列为 5'...CC▲T NAG G...3'),该 TGF 基因聚合酶链反应扩增产物经 Saul 酶消化,电泳后根据消化片段大小即可检出转化生长因子 β1 基因-509 位点的 3 种基因型,包括转化生长因子 β1 基因-509CC 纯合子,可被酶完全消化为 429、26 bp 2 条片段;转化生长因子 β1 基因-509CT 杂合子,可出现 455、429、26 bp 3 条片段;转化生长因子 β1 基因-509TT 纯合子,无酶切位点,电泳后只出现 455 bp 1 条片段。

1.7 统计学方法 基因型与等位基因频率采用频率计数法计算,研究对象基因型与等位基因频率的比较均采用χ² 检验,两组均数比较采用 t 检验,比值比 (OR) 计算采用 Logistic 回归分析。所有数据均应用 SPSS 13.0 For Windows 统计软件包进行统计学处理,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

用非条件 Logistic 回归 Forward (LR) 法分析腰椎间盘突出症血瘀证潜在的危险因素,按 α=0.05 检验水准,筛选出 TGF-β1-509(1)、腰椎负荷强度和 TGF-β1 基因-509+腰椎负荷等 3 个因素与 LIDP 血瘀证的发生有统计学意义 (P<0.05),各危险因素的参数估计值及相对危险度的估计值见表 3。

表 3 LIDP 血瘀证型相关危险因素 Logistic 回归分析结果

危险因素	<i>b</i>	Wald(χ ²)	<i>P</i>	<i>OR</i>	<i>OR</i> 95% <i>CI</i>
TGF-β1 基因-509		2.545	0.179		
TGF-β1-509(1)	1.576	6.132	0.027	4.836	3.251~5.993
TGF-β1-509(2)	0.433	0.648	0.421	1.542	0.421~2.222
家族史 (%)	0.052	0.016	0.901	1.053	0.419~2.523
体质指数 (kg/m ²)	0.265	0.383	0.536	1.303	0.564~3.013
吸烟指数 SI≥100/d·y (%)	0.338	0.780	0.377	1.402	0.141~13.915
腰椎负荷强度	0.673	3.977	0.046	1.960	1.012~3.801
TGF-β1 基因-509+腰椎负荷	0.593	5.365	0.021	1.809	1.086~2.703

3 讨论

3.1 转化生长因子 $\beta 1$ 是转化生长因子 β 的 3 个亚型之一,是由二硫键连成的同源二聚体。成熟转化生长因子 $\beta 1$ 含 112 个氨基酸,性质稳定。编码转化生长因子 $\beta 1$ 的基因位于第 19 号染色体长臂上,含 7 个外显子和 6 个内含子。研究报道转化生长因子 $\beta 1$ 存在多个基因的多态性情况,如转化生长因子 $\beta 1$ -509C/T、-800G/A 等,这些多态性可影响转化生长因子 $\beta 1$ 的转录和表达,进而影响与转化生长因子 $\beta 1$ 相关疾病的发生、发展和转归^[8,9]。国内外学者调查研究显示,重体力作业、搬举和过度用力、弯腰和扭转、全身振动及静态作业姿势等是椎间盘退变的主要危险因素,经常处于负重状态的人,负荷越重,腰椎间盘突出危险性就越大^[10,11]。但相同劳动强度和工作性质的人群中 LIDP 的发生率也存在个体差异,说明 LIDP 应该是传统危险因素与基因交互作用的结果^[12]。

3.2 中医的证是指疾病发生发展过程中机体功能、代谢、形态结构等方面发生一系列复杂变化的综合表现,也是多种因素共同发生作用的结果;随着生命科学的快速发展和多学科交叉及联合等研究方法的开展,证实质的研究已经步入崭新的时代并取得了丰硕成果。血瘀证是 LIDP 常见的中医证型,但目前鲜见 LIDP 中医证型与脊柱负荷及基因交互作用方面相关报道。笔者既往研究结果提示转化生长因子 $\beta 1$ 基因-509C/T 多态性与广西壮族 LIDP 血瘀证相关,并探讨了广西壮族 LIDP 血瘀证与 TGF- $\beta 1$ -509C/T 基因多态性及部分危险因素的关联性^[13]。本文探讨 LIDP 血瘀证与 TGF- $\beta 1$ -509C/T 基因多态性及腰椎负荷强度的关联性,研究结果显示从事重度腰椎负荷强度工作的广西地区汉族人患 LIDP 血瘀证的风险是轻中度腰椎负荷强度者的 3.977 倍 (95% CI:1.012 ~ 3.801) ($P < 0.05$),TGF- $\beta 1$ -509C/T 基因多态性与重度腰椎负荷强度的累积暴露发生 LIDP 血瘀证的风险是其中某单一因素的 5.365 倍 (95% CI:1.086 ~ 2.703) ($P < 0.05$),说明腰椎负荷强度可能是广西汉族 LIDP 血瘀证的潜在危险因素

之一,携带 TGF- $\beta 1$ 基因-CT 基因型的广西汉族人若长期从事坐位、持续弯腰、扭腰及重体力作业等重度腰椎负荷强度方面工作,则其患腰椎间盘突出症血瘀型的风险更大。

参考文献

- 1 胡有谷,主编. 腰椎间盘突出症[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社,2005:361-374.
- 2 胥少汀,葛宝丰,徐印坎,主编. 实用骨科学[M]. 第 3 版. 北京:人民军医出版社,2005:1697-1699.
- 3 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京:中华人民共和国卫生部颁发,2002:145-146.
- 4 中华人民共和国. 中医病证诊断疗效标准·中医骨伤科病证诊断疗效标准·腰椎间盘突出症的诊断依据、证候分类、疗效评定[S]. 北京:中华人民共和国国家中医药管理局颁发,1994:6.
- 5 Battie MC, Videman T, Gill K, et al. 1991 Volvo award in clinical sciences. Smoking and lumbar intervertebral disc degeneration: a MRI study of identical twins[J]. Spine, 1991, 16(9): 1015-1021.
- 6 陈春明. 中国成人体质量指数分类的推荐意见简介[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(5): 349-350.
- 7 Wiktorin C, Hjelm EW, Winkel J, et al. Reproducibility of questionnaire for assessment of physical load during work and leisure time[J]. J Occup Environ Health, 1996, 38: 190-201.
- 8 Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, et al. Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene and osteoporosis[J]. Bone, 2003, 32(3): 297-310.
- 9 Holla L I, Fassmann A, Benes P, et al. 5 Polymorphism in the transforming growth factor-beta1 gene (TGF-beta 1) in adult periodontitis[J]. J Clin Periodontol, 2002, 29(4): 336-341.
- 10 NIOSH. Musculoskeletal disorders and workplace factors: a critical review of epidemiologic evidence for work-related musculoskeletal disorders of the neck, upper extremity and low back[R]. Cincinnati, 1997.
- 11 宋滔,钟贵良,刘爱忠,等. 腰椎间盘突出症危险因素的病例对照研究[J]. 中国医学工程, 2008, 16(3): 200-203.
- 12 Solovieva S, Lohiniva J, Leino-Arjas P. COL9A3 gene polymorphism and obesity in intervertebral disc degenerative of the lumbar spine: evidence of gene-environment interaction[J]. Spine, 2002, 27(23): 6577-6580.
- 13 许建文,谢伟星,钟远鸣,等. 广西壮族人群转化生长因子 $\beta 1$ 基因多态性与腰椎间盘突出症血瘀证的关联性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(33): 2219-2223.

[收稿日期 2010-02-23][本文编辑 谭毅 刘京虹]