

基础研究

骨形态发生蛋白-2 与椎间盘细胞 Sox9
和 II 型胶原基因的调控关系赵 勇¹, 王文波¹, 李吉友¹, 卢 宇², 霍 锐³(1 哈尔滨医科大学附属第一医院骨二科 150001; 2 哈尔滨医科大学第四临床医学院外科 150010 哈尔滨市;
3 肇东市人民医院 151100)

【摘要】目的:探讨骨形态发生蛋白-2(BMP-2)对椎间盘细胞 Sox9 和 II 型胶原基因表达的调节作用。**方法:**应用逆转录聚合酶链反应和 Western 印迹检测不同浓度 BMP-2 对培养的人椎间盘细胞中软骨特异性基因 Sox9 和 II 型胶原基因表达的调节作用。**结果:**BMP-2 浓度为 100ng/ml 和 1000ng/ml 时,椎间盘细胞中 Sox9 和 II 型胶原基因 mRNA 表达与 0ng/ml 组(对照组)相比明显增加($P<0.05$);在蛋白水平的检测中,也得到了统一的结果。**结论:**BMP-2 可以按照剂量依赖方式正向调节椎间盘细胞 Sox9 和 II 型胶原基因的表达,提示 BMP-2 可能对退变早期的椎间盘具有修复功能。

【关键词】骨形态发生蛋白-2; Sox 基因; 胶原; 基因表达; 椎间盘

中图分类号: R681.5, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-10-0612-04

The regulation effect of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) on gene expression of Sox9 and collagen type II in the human intervertebral discs/ZHAO Yong, WANG Wenbo, LI Jiyu, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(10): 612-615

【Abstract】Objective: To assess the regulating effects of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) on gene expression of Sox9 and collagen type II in the human intervertebral discs. **Method:** RT-PCR and Western blot were used to investigate the effects of BMP-2 on Sox9 and collagen type II genes in intervertebral discs cells cultures of embryo. **Result:** Exposure to 100ng/ml and 1000ng/ml BMP-2 in serum-free medium caused a significant dose-dependent stimulation of Sox9 and collagen type II mRNA as well as protein levels in intervertebral discs compared to 0ng/ml. **Conclusion:** BMP-2 could cause a dose dependent stimulation on Sox9 and collagen type II gene expression in human discs, and BMP-2 may play an important role in the repair process during early disc degeneration.

【Key words】 Bone morphogenetic protein-2; Sox gene; Collagen; Gene expression; Intervertebral disc

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150001, China

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(项目编号: 30471741)

第一作者简介: 男(1971-), 副主任医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (0451)55622355 E-mail: wangwenbozy@hotmail.com

尽管椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IVDD) 被认为与很多细胞和生化的改变有关, 但我们还没有完全了解它确切的病理过程。在这些因素中最主要的改变包括椎间盘细胞表型的

L5-S1 disk space[J]. Spine, 2001, 26(11): 1205-1208.

7. Vraney RT, Phillips FM, Wetzel T, et al. Peridiscal vascular anatomy of the lower lumbar spine [J]. Spine, 1999, 24(21): 2183-2187.

8. Kleeman TJ, Ahn UM, Clutterbuck WB, et al. Laparoscopic anterior lumbar interbody fusion at L4-L5[J]. Spine, 2002, 27(13): 1390-1395.

9. 郭学利, 赵渝, 时德. 肾静脉以下段下腔静脉的形态特点及其临

床意义[J]. 中国临床解剖学杂志, 2002, 20(6): 438-440.

10. Yao Y, Okada Y, Yamato M, et al. Communicating vein between the left renal vein and left ascending lumbar vein[J]. Radiat Med, 2003, 21(6): 252-257.

(收稿日期: 2005-02-28 修回日期: 2005-07-04)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 彭向峰)

改变和软骨特异性基因产物的减少^[1]。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)是转化生长因子家族成员之一,它可以刺激间充质干细胞分化成多种细胞,也可以在长时间的培养过程中诱导软骨细胞的分化和保持关节软骨细胞的表型。本研究通过检测 BMP-2 对人椎间盘细胞中软骨特异性基因 Sox9 和 II 型胶原基因的调节作用,旨在探索早期阻止和/或逆转椎间盘退变的有效途径。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

椎间盘取自 1 例胎龄为 26 周的引产死亡胎儿(经医院伦理委员会同意);胰蛋白酶、优质胎牛血清、Trizol Reagent(Gibco 公司);II 型胶原酶、重组人 BMP-2(Sigma 公司);Sox9 抗体、II 型胶原抗体(Abcam 公司);引物合成(上海捷倍思基因技术有限公司);考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);DAB 显色试剂盒(Promega 公司)。

1.2 实验步骤

1.2.1 椎间盘细胞的分离和培养 在严格无菌操作下,引产后 2h 内取出椎间盘作为实验材料。将取下的椎间盘用 D-Hanks 液洗净,将纤维环及纤维环与髓核的交界区用眼科剪剪碎至组织块小于 1mm³,用 0.25% 的胰蛋白酶溶液于 37℃ 消化 30min,随后用 0.2% II 型胶原酶消化 4h,200 目滤网过滤去除组织残留碎块。用 1640 培养基加 10% 胎牛血清完全培养液终止消化,冲洗 3 次,低速离心 5min。计数后,将细胞分别接种于底面积为 50cm² 的培养瓶中,在 37℃,体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱(SANYO)中开始原代培养。

原代培养细胞达到 90% 融合时,加入少量 0.02% 乙二胺四乙酸二钠,镜下见胞质回缩,细胞间隙增大时,吸去消化液,加入少许培养液,用吸管吹打瓶壁细胞,使之脱落形成细胞悬液。计数后将悬液按 1:2 分装入培养瓶中继续培养。细胞传至第三代且培养细胞达到 90% 融合时,计数后将其转至六孔培养板,每孔内约有 2.5×10⁵ 个细胞,并换用含 1% 胎牛血清的 1640 完全培养液,加入浓度分别为 0ng/ml (对照组)、10ng/ml、100ng/ml、1000ng/ml 的 BMP-2,每个浓度三复孔,逐日于倒置相差显微镜下观察细胞生长状态,在第 2 天更

换含有相同浓度 BMP-2 的培养液,共同孵育 4d,收集细胞。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 按照 Gibco 公司 Trizol 一步法说明提取各组收集细胞的总 RNA,紫外分光光度仪测纯度与浓度。取 2μg 总 RNA 用 AMV 逆转录酶进行反转录,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)分别扩增 Sox9 和 II 型胶原,并同时扩增磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)用来作为内参照,引物由上海捷倍思基因技术有限公司合成。Sox9 引物序列为:5'-TCTCAGGCTTTGCGATTT-3' (上游),5'-TGCTCGGGCACTTATTGG-3' (下游),PCR 反应条件为:94℃ 30s, 52℃ 45s, 72℃ 45s, 30 个循环。扩增片段为 304bp; II 型胶原引物序列为 5'-GCTCGCACCTGCAGAGACCTG-3' (上游),5'-GTCCACACCGAATTCCTGCTCG-3' (下游),PCR 反应条件为:94℃ 30s, 52℃ 45s, 72℃ 45s, 30 个循环。扩增片段为 603bp; GAPDH 引物序列为 5'-CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA-3' (上游),5'-ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA-3' (下游),PCR 反应条件为:94℃ 30s, 52℃ 45s, 72℃ 45s, 30 个循环。扩增片段为 450bp。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察、拍照。采用 Kodak EDAS120 凝胶图像分析系统进行 PCR 产物条带扫描及半定量分析,以目的基因与内参的比值进行统计分析,Sox9 与 GAPDH 吸光度比值表示其 mRNA 相对的表达水平,比值越大,其表达程度越高。

1.2.3 Western 印迹检测 将收集的各组细胞,加入细胞裂解液使细胞裂解完全,12000 转/min 离心 10min,取上清 100μl,分别加入 20μl 6×十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,沸水浴变性 10min,变性后分别经 10% 和 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移至硝酸纤维素膜上,封闭液封闭 30min。37℃ 依次加入一抗(Anti-Sox9, 1:500 和 Anti-II 型胶原, 1:500)、二抗(Anti-rabbit IgG)进行杂交,DAB 显色。采用数字凝胶成像仪 Chemi Imager 4000 对条带进行扫描及分析。

1.3 统计学分析

数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 9.0 统计软件对数据进行 *t* 检验, *P* < 0.05 具有统计

学意义。

2 结果

2.1 Sox9 及 II 型胶原 mRNA 的测量结果

见图 1、2 及表 1。Sox9 10ng/ml 组与对照组相比无显著性差异, 100ng/ml 和 1000ng/ml 组与对照组相比 mRNA 表达增加, 差异具有显著性意义; II 型胶原 10ng/ml、100ng/ml 和 1000ng/ml 组

与对照组相比 mRNA 表达增加, 差异具有显著性意义。

2.2 Sox9 及 II 型胶原蛋白的表达结果

BMP-2 处理后椎间盘细胞 Sox9 蛋白表达量 100ng/ml 和 1000ng/ml 组较对照组分别增高 30% 和 50%; II 型胶原蛋白表达量 100ng/ml 和 1000ng/ml 组较对照组分别增高 40% 和 60% (图 3)。

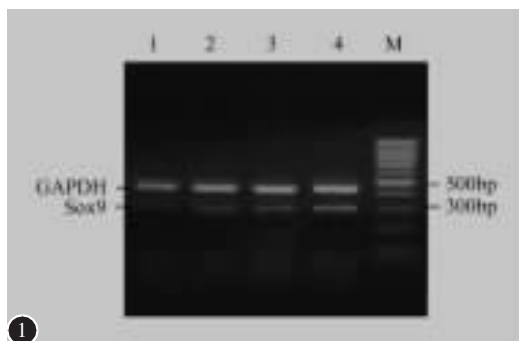


图 1 各组椎间盘细胞 Sox9 mRNA 凝胶电泳表达情况 (1 对照组, 2 10ng/ml 组, 3 100ng/ml 组, 4 1000ng/ml 组, M Mark)

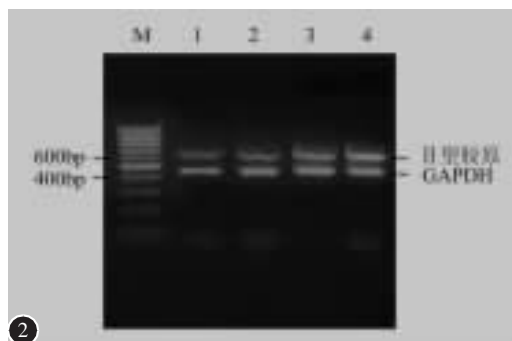


图 2 各组椎间盘细胞 II 型胶原 mRNA 凝胶电泳表达情况 (1 对

表 1 各组 Sox9 及 II 型胶原 mRNA 测量结果

($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组	Sox9	II 型胶原
对照组	0.135±0.004	1.278±0.060
10ng/ml BMP-2 组	0.141±0.002	1.422±0.063 ^①
100ng/ml BMP-2 组	0.149±0.004 ^①	1.745±0.087 ^②
1000ng/ml BMP-2 组	0.163±0.004 ^②	1.823±0.026 ^②

注: 与对照组相比, ① $P<0.05$; ② $P<0.01$

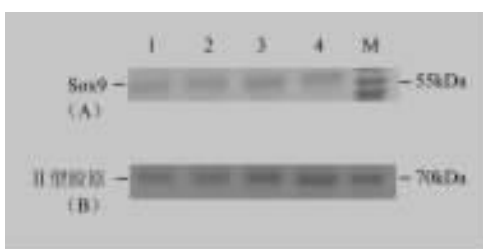


图 3 各组椎间盘细胞 Sox9 及 II 型胶原蛋白凝胶电泳表达情况 (A Sox9 蛋白表达, B II 型胶原蛋白表达, 1 对照组, 2 10ng/ml 组, 3 100ng/ml 组, 4 1000ng/ml 组, M Mark)

3 讨论

由椎间盘退变引起的一系列脊柱退行性变及继发病变在临床上十分多见, 无论是非手术治疗还是手术治疗效果均不能令人们十分满意^[2]。因此, 进一步探索椎间盘退变的分子生物学机制, 从

而早期阻止和/或逆转间盘退变, 促使椎间盘组织再生具有重要的意义。

以前, 关于人椎间盘组织的研究多集中在细胞外基质对椎间盘细胞活动的影响, 本实验将 Sox9 和 II 型胶原基因在椎间盘细胞中的共同表达作为研究对象。Sox9 基因是 Sox 基因家族成员之一。人类 Sox9 基因定位于染色体 17q24.3~q25.1 区段内, 1994 年 Foster 等^[3]将从三个独立文库中分离得到的 cDNA 克隆序列组装出它的复合转录单位, 其长度为 3935bp。Sox9 基因是软骨细胞的一个主要的转录调节因子, 它是 II 型胶原及蛋白聚糖基因表达的一个特异性促进因子^[4]。Sox9 基因在软骨发育、成熟过程中对维持软骨细胞的表型及增强 II 型胶原基因表达和促进 II 型胶原合成增加的作用已十分明确, 而同样以软骨样细胞为主的椎间盘组织中也存在 Sox9 基因的表达及调控, 而且这种调控很可能是从胚胎时期就已开始且不断发挥作用^[5]。

在椎间盘组织中软骨细胞具有合成、分泌细胞外大分子物质、II 型胶原和蛋白聚糖的功能, 它是椎间盘组织代谢活动的细胞成分, 与基质成分的合成和破坏密切相关, 椎间盘一旦发生退变, 很难自行修复^[6]。近年来, 有学者^[7]发现原代培养的

椎间盘细胞在形态学上与体内正常椎间盘细胞基本一致,随着细胞的传代,细胞出现去分化,表现为类软骨细胞及脊索细胞转化为成纤维样细胞外观,这与体内椎间盘退变的细胞变化相似,由此提出该培养系统可作为模拟体内椎间盘退变的模型。本研究也证实了这种形态学方面的变化。在此基础上,我们试图利用细胞因子对椎间盘细胞中软骨特异性基因 Sox9 和 II 型胶原基因的调节作用的研究,探索早期对椎间盘退变进行生物治疗的有效途径。

我们之所以选用纤维环和纤维环与髓核交界区的椎间盘细胞是因为在初期的培养实验中,来自于椎间盘髓核区的脊索细胞原代培养时类似类软骨细胞,传代培养时没有明显增殖并逐渐死亡。人的脊索细胞在 4 到 10 岁后便不再存在,所以它不能代表正常成年人的髓核细胞,在我们的实验中没有选择脊索细胞。选择 BMP-2 是因为它在刺激其它类型的细胞外基质合成方面非常有效。另外,它还是美国联邦医药管理局 (Federal Drug Administration, FDA) 批准的可以在临床脊柱外科中应用的极少数的细胞因子之一^[8]。在我们的实验中, BMP-2 100ng/ml 和 1000ng/ml 处理组的椎间盘细胞中 Sox9 和 II 型胶原基因的 mRNA 表达均有一个特殊的增强过程。Western 免疫印迹对蛋白水平的检测结果也显示出与 mRNA 表达结果的一致性,提示 BMP-2 可以按剂量依赖方式正向调节软骨细胞特异性基因 Sox9 和 II 型胶原基因的表达,从而促进 Sox9 和 II 型胶原的合成。这些发现符合重组人 BMP-2(rhBMP-2)对关节软骨细胞的作用,同时也进一步确立了椎间盘细胞和关节软骨细胞的相似性^[9]。本研究结果提示,可以利用 BMP-2 对椎间盘细胞中软骨特异性基因 Sox9 和 II 型胶原基因的正向调节作用来增强软骨特异性基因在椎间盘组织中的表达及其产物合成的增加,促使退变的椎间盘恢复软骨细胞表型,完成其自身修复,从而从分子水平上早期阻止和/或逆转椎间盘退变。

由此我们设想,对磁共振检查发现的早期椎间盘退变患者,可否通过局部注射 BMP-2 来进行治疗?当然,这在目前仍然存在一些问题,如椎间

盘组织对于生长因子刺激所产生的反应及椎间盘重建能否维持,能否恢复椎间盘生物力学特性; BMP-2 可否诱导椎间盘细胞中软骨细胞的表型,而软骨细胞的表型与基质的钙化又有一定的联系,是否过度的 BMP-2 可以导致椎间盘组织的钙化等等。另外,对于 Sox9 基因与椎间盘退变的关系还有待更进一步明确,如在退变的椎间盘组织内 Sox9 基因较正常的椎间盘是否降低,其基因表达是否降低?在椎间盘退变过程中,是否存在 Sox9 基因的突变?或者即使没有 Sox9 基因编码序列上的突变,也可能存在调控方面的缺陷;向退变椎间盘细胞内转染 Sox9 基因后,退变的椎间盘是否会有逆转的表现等等,这些问题都有待于在今后的相关研究中进行探讨。

4 参考文献

1. Paul R, Haydon RC, Cheng H, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease [J]. Spine, 2003, 28(8):755-763.
2. 金大地, 杨德鸿. 基因疗法治疗脊柱疾病——现状与展望[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2001, 11(1):9-11.
3. Foster JW, Dominguez-Steglich M, Guioli S, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene[J]. Nature, 1994, 372(6506):525-530.
4. Bi W, Deng JM, Zhang Z, et al. Sox9 is required for cartilage formation[J]. Nature Genet, 1999, 22(5):85-89.
5. Sive JJ, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerated intervertebral discs[J]. Mol Pathol, 2002, 55(2):91-97.
6. 詹子睿, 邵增务. 腰椎间盘突出性变基因治疗的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2002, 12(3):227-229.
7. 陈岩, 胡有谷, 吕振华. 转化生长因子- β 对椎间盘细胞 II 型胶原基因表达的调节作用[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(9):703-706.
8. Wallach CJ, Gilbertson LG, Kang JD. Gene therapy applications for intervertebral disc degeneration [J]. Spine, 2003, 28 (Suppl 15):S93-S98.
9. Tim YS, Su KK, Li J, et al. The effect of bone morphogenetic protein-2 on rat intervertebral disc cells in vitro [J]. Spine, 2003, 28(16):1773-1780.

(收稿日期:2004-11-01 修回日期:2005-07-06)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 彭向峰)