

SOX9 在青少年特发性脊柱侧凸患者骨髓间质干细胞的表达及意义

孙 强¹, 邱 勇¹, 刘 臻¹, 吴 洁¹, 陈军浩², 陈蕾蕾², 马薇薇¹

(1 南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科; 2 科研部 210008 江苏省南京市)

【摘要】目的:探讨 SOX9 在青少年特发性脊柱侧凸(AIS)发病机制中的作用。**方法:**30 例 12~18 岁志愿者分为两组, AIS 组 20 例, 同年龄对照组 10 例。分别从髂前上棘处穿刺抽取 10ml 骨髓, 肝素抗凝。采用密度梯度离心法分离骨髓间质干细胞(MSCs), 体外培养并传至 P2 代行表型鉴定, 分别采用 RT-PCR 法、Western blotting 法及免疫荧光法检测两组 MSCs 中 SOX9 的表达情况。**结果:**不论是核酸水平还是蛋白水平, AIS 组患者的 SOX9 表达均高于对照组($P<0.01$)。**结论:**转录因子 SOX9 在 MSCs 水平表达强度的异常可能与 AIS 发病相关。

【关键词】 SOX9; 青少年特发性脊柱侧凸; 骨髓间质干细胞

中图分类号: R682.3, R363.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2006)-03-0215-05

Expression and significance of SOX9 in mesenchymal stem cells from adolescent idiopathic scoliosis/SUN Qiang, QIU Yong, LIU Zhen, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2006, 16(3):215-219

【Abstract】 Objective: To investigate a possible related molecular mechanism between pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis and expression of SOX9 from mesenchymal stem cells(MSCs) level. **Method:** 30 volunteers were divided into two groups: AIS group was 20, and control group was 10. The human bone marrow anticoagulated by calparine was obtained from anterior superior iliac spine, and the MSCs were isolated by density gradient centrifuge from the mononuclear cells, and then were cultivated and serial subcultivated in vitro. P2 generation was analyzed by the flow cytometry to detect the surface antigens, whereafter expressive of SOX9 of MSCs from 2 groups were detected by using RT-PCR, Western blotting and immunofluorescence. **Result:** Expression of SOX9 of MSCs increased obviously in AIS group as compared with control group($P<0.01$), no matter from nucleic acid or protein level. **Conclusion:** The abnormal expression of the transcription factor SOX9 may be related to the molecular mechanism of the pathogenesis of AIS.

【Key words】 SOX9; Adolescent idiopathic scoliosis; Mesenchymal stem cells

【Author's address】 Spine Surgery Department, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing, 210008, China

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)作为脊柱侧凸最常见的形式,病因至今尚未阐明^[1]。目前普遍认为其发病是多因素综合作用的结果^[2,3]。在众多可能的致病因素中生长发育与 AIS 的发生和发展有着肯定的联系^[4]。AIS 患儿体内可能存在以软骨内化骨形式完成的骨纵向生长的活跃。转录因子 SOX9 在骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)聚集前就有表达,是 MSCs 向成软骨方向分化最早的决定因子,启动 SOX9 表达才能启动成软骨过程^[5,6]。而

MSCs 分化为软骨细胞形成软骨雏形则是软骨内化骨进程中至关重要的始动环节。我们推测转录因子 SOX9 与脊柱生长的软骨内化骨分子调控机制可能存在密切关系。为此本实验采用体外培养扩增 AIS 患者以及同年龄正常儿童的 MSCs,通过检测 SOX9 的表达强度,探求 AIS 生长发育异常可能的分子机制。

1 资料和方法

1.1 一般资料

本组共 30 例志愿者,男 8 例,女 22 例;年龄 12~18 岁,平均 14.6 岁。AIS 组 20 例,对照组(C 组)10 例。特发性脊柱侧凸的诊断基于站立正侧

基金项目:江苏省卫生厅资助项目(项目编号: NJGL-2003011)

第一作者简介:男(1975-),博士研究生,研究方向:脊柱外科

电话: (025)83304616 E-mail: scoliosis30@hotmail.com

位全脊柱 X 线片及详细的临床检查,且均行全脊髓 MRI 检查,排除可能存在的中枢神经系统病变。侧凸 Cobb 角 $40^{\circ}\sim 75^{\circ}$,平均 54.5° 。侧凸节段在 T1~L4,其中胸右弯 15 例,胸椎双主弯 3 例,胸腰双主弯 2 例。对照组由同一名脊柱外科医师负责体格检查,排除脊柱侧凸以及生长发育障碍和其它慢性疾病,其中股骨干骨折 3 例,骨盆骨折、耻骨联合分离 1 例,臀肌挛缩症 2 例,腰椎间盘突出症 2 例,股骨上段骨囊肿 1 例,股骨干骨折术后 1 例。所有研究对象均排除血液系统疾病、恶性肿瘤、严重的器质性内分泌疾病、神经系统疾病和骨代谢疾病。无菌条件下髂前上棘处穿刺抽取 10ml 骨髓,肝素抗凝。

1.2 主要仪器和试剂

低糖 DMEM 培养基(含青霉素、链霉素各 100IU/ml)(Hyclone 公司),胎牛血清(PAA 公司),0.25%胰蛋白酶(Hyclone 公司),Ficoll-Paque 分离液(1.077×10^3 g/L,Amersham 公司),Trizol Reagent(Invitrogen 公司),琼脂糖(Promega 公司),荧光标记小鼠抗人抗体 CD45-FITC、CD29-FITC、CD44-FITC、CD14-PE、CD34-PE、CD105-PE、HLA-DR-PE(BD 公司),一抗为兔抗人 SOX9 抗体(Abcam 公司),二抗为标记 FITC 和不标记 FITC 的羊抗兔抗体(RD 公司),蛋白抽提液(Pierce 公司),PVDF 膜(美国 Roche 公司),FACS Calibur 型流式细胞仪(Becton Dickinson 公司),CK40 相差显微镜(Olympus 公司),Megafuge 1.0R 冷冻离心机(Heraeus 公司),PTC-200 型 PCR 仪(MJ 公司),RT-PCR 试剂盒(BD 公司),激光扫描共聚焦显微镜(BIO-RAD 公司生产,型号: MRC-1024ES 系统,其中显微镜为德国 ZEISS 公司 S-100 型显微镜)。

1.3 MSCs 的体外分离和培养

将 10ml 抗凝骨髓分装入 15ml 离心管中, PBS 洗涤 3 次。Ficoll 与骨髓以 4:6 的比例混合。2500r/min 离心 30min。将白膜层吸至另一离心管中, PBS 洗涤 2 次,反复吹打制成单个细胞。分装入 5ml 低糖 DMEM 培养体系中(胎牛血清 10%)。培养瓶置入 37°C 、5% CO_2 饱和湿度的条件下培养。接种后 24h 和 72h 各换液 1 次,以后每隔 2~3d 换液 1 次。待原代单个核细胞铺满瓶底后用 0.25%胰酶消化,按 1:3 比例传至 P2 代,培养条件同原代。

1.4 MSCs 的表型鉴定

待 P2 代单个核细胞铺满瓶底后,用 0.25%胰酶消化,相差显微镜下记数板记数。取 1×10^6 个细胞, FACS Calibur 型流式细胞仪行表型鉴定。选用荧光标记小鼠抗人抗体 CD45-FITC、CD29-FITC、CD44-FITC、CD14-PE、CD34-PE、CD105-PE、HLA-DR-PE。

1.5 MSCs 总 RNA 的抽提

取 1×10^6 个新鲜 P2 代 MSCs, 1ml Trizol 孵育 5min($15^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$)。加 0.2ml 氯仿,孵育 3min。 4°C 下 10000r/min 离心 15min。取上层水相,加 0.5ml 异丙醇,孵育 10min($15^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$),摇匀。 4°C 下 10000~12000r/min 离心 10min,见 RNA 沉淀。加 75%酒精 1ml 震荡混匀, 4°C 下 7000r/min 离心 5min,重复两次。风干酒精,去离子水重悬 RNA 沉淀, 比色法测定样本 OD260/OD280 值, 计算总 RNA 浓度。

1.6 RT-PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳

采用 BD 公司的 Titanium™ 一步法, RT-PCR 试剂盒在 MJ-200 型 PCR 仪上进行 RT-PCR 反应。SOX9 上游引物序列: 5'-ACTGGGAACAAC-CCGTCTAC-3', 下游引物序列: 5'-CGATTCTC-CATCATCCTCCAC-3'。扩增产物为 376bp。RT-PCR 反应条件为: 50°C 1h, 94°C 5min, 94°C 45s, 58°C 1min, 72°C 1min, 再循环 24 次(从第 3 步始), 72°C 延伸 10min, 12°C 结束。将 PCR 扩增产物在浓度为 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, TBE 缓冲液终浓度为 0.5 $\times$ 。采用 Smartview 2001 生物电泳图像分析系统对电泳条带灰度值进行半定量分析。

1.7 免疫荧光染色及激光扫描共聚焦显微镜扫描

取 1×10^5 个新鲜 P2 代 MSCs 细胞甩片、4%多聚甲醛固定 10min, 大量 PBS 清洗。PBS 加吐温(体积比 0.05%)清洗玻片。加封闭液 20 μl 孵育 2h。甩去封闭液, 玻片干燥后加入稀释好的一抗 20 μl , 孵育 2h。PBS 加吐温清洗玻片。干燥后加入荧光二抗 20 μl , 孵育 1~1.5h。在激光扫描共聚焦显微镜下观察。激光光源: Kr/Ar UV; 激光器功率: 15mW; 图像尺寸为: 512 $\times$ 512 像素; 扫描模式为: XY、XZ; 标尺为 10/50 μm ; 图像为 40 $\times$ 油镜下所见, 放大 400 倍。FITC 标记的绿色荧光的激发波长为 488nm, 发射波长的检测滤镜为

522/30nm。

1.8 Western blotting 检测

收集培养瓶中新鲜 P2 代 MSCs, PBS 洗 2 次, 按 500 μ l/10cm 加 M-PER 蛋白抽提液裂解细胞, 冰上静置 10min, 10000r/min 离心 10min, 取上清, Lowry assay 法测量总蛋白浓度并使其均一化。加入 loading buffer, 沸水浴 10min。SDS-PAGE 分离, 浓缩胶层电压 100V, 分离胶层电压 150V。电泳完毕后, 胶经常规电转印转 PVDF 膜, 4 $^{\circ}$ C 下截面电流 120mA, 12h。转印后, 滤膜封闭、洗涤, 结合一抗 (1:500), 洗膜, 结合二抗, 洗膜, 压片, X 线显影。

1.9 统计学处理

各组电泳条带灰度值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用单因素方差分析法行两组间 SOX9 表达强度的比较分析。全部数据处理采用 SPSS 13 统计软件。设定 $P<0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 一般结果

AIS 组及 C 组 MSCs 分离培养、传代均成功。

2.2 P2 代 MSCs 表型鉴定结果

两组 MSCs 的 CD45-FITC、CD14-PE、CD34-PE、HLA-DR-PE 检测均为阴性, CD29-FITC、CD44-FITC、CD105-PE 检测均为阳性。检测结果与文献报道一致^[7](图 1)。

2.3 RT-PCR 反应及电泳检测结果

两组 MSCs 抽提的总 RNA 经比色法测定 OD260/OD280 比值均在 1.8~2.0 范围内。AIS 组 MSCs SOX9 mRNA 表达强度为 3.11 ± 0.38 , 明显强于正常对照组 (0.93 ± 0.16) ($P<0.01$) (图 2)。

2.4 免疫荧光染色及激光扫描共聚焦显微镜检测结果

两组 MSCs 中 SOX9 分子的细胞定位情况相同。转录因子 SOX9 存在且定位于 MSCs 核内 (图 3、4, 后插页 II)。

2.5 Western blotting 检测结果

转录因子 SOX9 的分子量为 48KDa, AIS 组 MSCs 中 SOX9 的表达强度为 4.97 ± 0.53 , 明显强于正常对照组 (1.04 ± 0.11) ($P<0.01$) (图 5)。

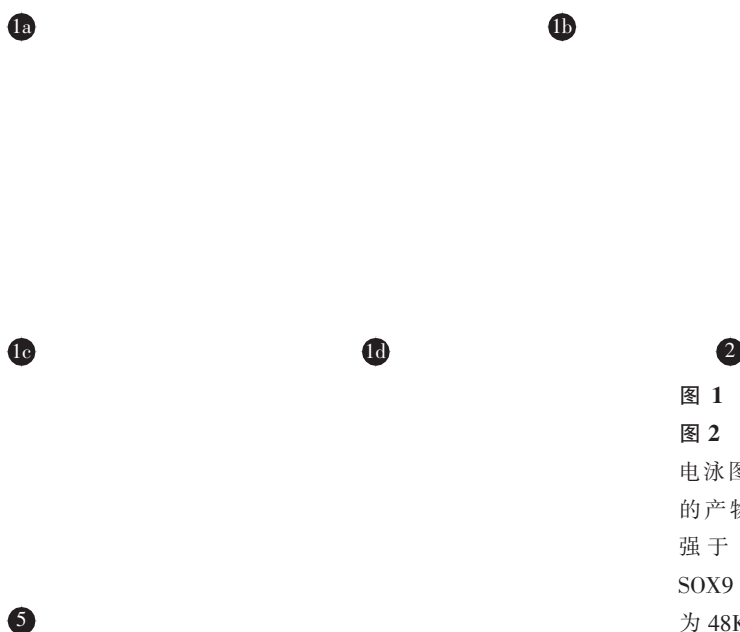


图 1 a、b、c、d MSCs 表型鉴定结果

图 2 AIS 组及 C 组 SOX9 mRNA 表达电泳图 (SOX9 的产物为 376bp, β -actin 的产物为 200bp, AIS 组电泳条带明显强于 C 组) 图 5 AIS 组及 C 组 SOX9 蛋白水平的表达 (SOX9 的分子量为 48KDa, AIS 组表达明显强于 C 组)

3 讨论

AIS 是一种复杂的脊柱三维畸形,好发于青春发育期(12~18 岁),是青少年脊柱畸形最常见的形式,发病率约 3% 左右^[2]。目前 AIS 的治疗虽已取得较大进展,但病因及发病机理尚未阐明^[1]。遗传因素、生长发育不对称、结缔组织发育异常、神经-平衡系统功能障碍、神经内分泌系统异常、血小板微小结构等方向的研究是当前的热点。在众多可能的致病因素中脊柱的生长发育与 AIS 的发生及发展有着肯定的联系^[4]。这主要有以下几点理由:首先,生长发育是 AIS 发病的必要条件;其次,AIS 畸形的出现及进展均在青春发育的高峰期;再次,生长发育停止后,畸形进展减缓。

临床上 AIS 患儿身材瘦高以及四肢纤细修长的现象已引起越来越多学者对 AIS 生长发育异常的关注。Cheung 等^[8]在对中国香港地区 598 例 AIS 患儿的大体形态学资料分析后发现,在青春发育前期(Pubertal I 期),AIS 女性患儿的身高要矮于对照组。一旦青春发育启动(Pubertal II~V 期),相当于实足年龄 12~15 岁,其矫正身高、臂长均显著高于对照组。在 Pubertal II~IV 期,其矫正坐高也显著高于对照组。Ylikoski^[9]通过对 1500 例芬兰 AIS 女孩的研究发现,她们的矫正身长要显著高于 11~15 岁健康女孩的平均身长。其中 11~13 岁身高甚至无需矫正都要高于同年龄对照组。而发育成熟后她们的身长优势与对照组相比不复存在。Guo 等^[10]对 AIS 患儿脊柱的形态学资料进行了研究,他们采用全脊柱 MRI 测量方法,对 83 例 AIS 患儿及 22 例正常对照组儿童进行比较发现,AIS 患儿脊椎前柱相对生长过度导致椎体较椎弓长。

AIS 患儿存在以身高、臂长、坐高、椎体高度等形态学指标增加为特征的生长发育异常,说明 AIS 患儿可能存在以软骨内化骨增强为特征的骨纵向生长发育的活跃。Dickson^[11]在总结 AIS 的临床病理特征后提出脊柱前后柱生长不平衡假说。他认为青春期的脊柱前柱生长快于后柱为侧凸发生的始动因素,脊柱前柱相对过长于后柱,可导致脊柱旋转侧移造成侧凸。

转录因子 SOX9 在软骨分化基因调控研究中的进展和阶段性成果给我们对 AIS 发病分子机制的探讨带来了新的启发。研究表明,SOX9 分子除在胚胎性别决定过程中发挥重要作用外,它还是

软骨分化过程中调控软骨发生的主要转录因子^[12],表达直接受 BMP、PTHrP 等信号的调控。在胚胎发育过程中,所有软骨祖细胞都表达 SOX9 和 II 型胶原,直到软骨细胞肥大化,SOX9 表达才被关闭。在 MSCs 向软骨细胞分化过程中,若 SOX9 失活,可导致软骨分化被遏制。进一步研究证实,SOX9 是通过结合软骨细胞特征分子 II 型胶原、蛋白聚糖的增强子元件激活其表达,从而调控软骨分化的^[13]。此外,Chris 等^[14]通过 SOX9 逆转录病毒感染鸡胚肢芽发现,异位表达 SOX9 可异位诱导间充质细胞聚集和软骨生成。SOX9 是调控 MSCs 软骨分化所必需的转录因子,表达于 MSCs 聚集前,通过诱导 MSCs 聚集和软骨生成,在软骨内化骨进程的始动环节发挥至关重要的作用^[15,16]。

机体内大多数骨,尤其是躯干和四肢骨的形成主要是通过软骨内成骨途径完成的。但不论骨骼的生长是以何种方式进行,其终末细胞——成骨细胞与软骨细胞均来源于 MSCs 的增殖与分化。MSCs 作为中胚层起源的原始细胞,不仅具有很强的自我更新能力,而且体外分离培养时遗传背景稳定,传 2~3 代后也不会丧失正常的核型和端粒酶活性^[15],同时细胞经扩增可满足分子生物学检测的需要。我们推测转录因子 SOX9 的表达与调控脊柱生长发育的软骨内化骨分子机制间可能存在相关性。为此我们设计本实验力求从 MSCs 水平揭示 AIS 生长发育异常的机制。

本实验结果显示,AIS 组 MSCs 中 SOX9 的核酸表达强度及蛋白表达水平均显著高于对照组。这说明无论是在转录水平还是在转录后的翻译水平,AIS 患儿 SOX9 的表达均要强于同年龄无脊柱侧凸的青少年。我们认为,在青春期骨骼生长发育时,在脊柱椎体及四肢长管骨的生长板部位,一方面 AIS 组相对高表达的转录因子 SOX9 首先可加快骨髓中游走的 MSCs 向成骨部位聚集、浓缩,同时聚集的 MSCs 也可表达更多的 SOX9 来促进这一进程,这对于骨骼的软骨内成骨进程来说是一种上调作用。另一方面局部微环境中优势表达的 SOX9 可促使 MSCs 向软骨细胞分化,使其分化为各级软骨祖细胞,直至增殖型软骨细胞以形成软骨雏形。Bell 等^[16]研究证实,由于 SOX9 可调控增殖型软骨细胞的主要标志 II 型胶原的表达,因而认为 SOX9 是间充质细胞向成软骨方向分化

最早的决定因子,启动 SOX9 表达才能启动成软骨过程。当然这一过程主要是依靠 SOX9 结合软骨细胞特征性分子 II 型胶原、蛋白聚糖的增强子元件激活它们的表达而实现。上述生物学行为对于 AIS 患儿软骨内成骨进程的早期阶段来说又是一种上调作用。随后大部分增殖软骨细胞逐渐成熟为肥大软骨细胞,继之深层基质部分钙化、血管侵入、软骨细胞凋亡并由成骨细胞取代,骨基质代替软骨基质,逐步发育为成熟骨骼。以上发生在始动阶段的两方面上调效应综合作用的结果无疑加速了 AIS 患儿软骨内化骨的进程,导致 AIS 患儿在大体形态学(身高、坐高、臂长等)上表现出生长发育异常。

Ganey 等^[9]研究发现,女孩在青春发育期,脊柱前后柱的生长存在不同的骨化机制。前柱的生长主要是生长板以软骨内化骨形式进行并持续到 16~18 岁。而后柱的软骨内化骨在 10 岁时就已完成。随后后柱主要以膜内化骨的形式环行生长。据此我们得出结论:在青春发育期,AIS 患儿软骨内化骨的异常发生于脊柱,主要表现为椎体高度的增加,前柱相对过长于后柱,前后柱出现生长发育不平衡。这一结论与 Guo 等^[10]报道的 AIS 患者脊柱形态学变化一致,这无疑为 Dickson 的脊柱前后柱生长不平衡假说提供了有力的分子生物学证据。

以往大多数学者对 AIS 生长发育规律的研究仅限于大体形态学测量方面,尚未见有从细胞分子生物学水平揭示 AIS 生长发育异常的报道。本实验从 MSCs 成软骨分化的分子机制入手,推测转录因子 SOX9 与调控脊柱生长发育的软骨内化骨分子机制间可能存在相关性。初步结论基本可以解释 AIS 患儿脊柱前柱过度生长以及身长相对过长的可能原因。但骨骼的生长是极其复杂的过程,存在众多相互影响的调控通路(如 BMPs、IHH 等),转录因子 SOX9 对 MSCs 成软骨分化的调控只是 BMPs 信号通路中的一个环节,而且 BMPs 信号通路也只是与软骨内成骨相关的众多信号通路中的一个。因此,本研究所揭示的分子生物学证据可能在 AIS 复杂的致病机理中所起的作用微不足道,但这项研究无疑会给更深层次的 AIS 病因学研究带来新的思路 and 启发。

4 参考文献

1. Heidari B, Fitzpatrick D, Synnott K, et al. Modelling of annulus fibrosus imbalance as an aetiological factor in adolescent idiopathic scoliosis[J]. Clin Biomech, 2004, 19(3): 217-224.
2. 邱勇, 朱丽华, 宋知非, 等. 脊柱侧凸的临床病因学分类研究[J]. 中华骨科杂志, 2000, 20(5): 265-268.
3. Ahn UM, Ahn NU, Nallamshetty L, et al. The etiology of adolescent idiopathic scoliosis[J]. Am J Orthop, 2002, 31(7): 387-395.
4. Goto M, Kawakami N, Azegami H, et al. Buckling and bone modeling as factors in the development of idiopathic scoliosis[J]. Spine, 2003, 28(4): 364-370.
5. Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, et al. The sry-related gene sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos[J]. Nat Genet, 1995, 9(1): 15-20.
6. Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, et al. Sox9 directly regulates the type II collagen gene[J]. Nat Genet, 1997, 16(2): 174-178.
7. Pittenger MF, Mackay AM, Jaiswal SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
8. Cheung CSK, Lee WTK, Tse YK, et al. Abnormal peri-pubertal anthropometric measurements and growth pattern in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 598 patients[J]. Spine, 2003, 28(18): 2152-2157.
9. Ylikoski M. Height of girls with adolescent idiopathic scoliosis[J]. Eur Spine J, 2003, 12(3): 288-291.
10. Guo X, Chau WW, Chan YL, et al. Relative anterior spinal overgrowth in adolescent idiopathic scoliosis: results of disproportionate endochondral-membranous bone growth[J]. J Bone Joint Surg, 2003, 85B(7): 1026-1031.
11. Dickson RA, Lawton JO, Archer IA, et al. The pathogenesis of idiopathic scoliosis: biplanar spinal asymmetry[J]. J Bone Joint Surg (Br), 1984, 66(1): 8-15.
12. Bi W, Deng JM, Zhang Z, et al. SOX9 is required for cartilage formation[J]. Nat Genet, 1999, 22(1): 85-89.
13. Jussi TIS. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis[J]. PNAS, 2002, 99(7): 4397-4402.
14. Healy C, Uwanogho D, Sharpe PT. Regulation and role of Sox9 in cartilage formation[J]. Dev Dyn, 1999, 215(1): 69-78.
15. Liljenqvist UR, Link TM, Halm HF. Morphometric analysis of thoracic and lumbar vertebrae in idiopathic scoliosis[J]. Spine, 2000, 25(10): 1247-53.
16. Ganey TM, Ogden JA. Development and maturation of the axial skeleton. In: Weinstein SL, ed. The Pediatric Spine: Principles and Practice [M]. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. 3-54.

(收稿日期: 2005-08-01 修回日期: 2005-09-23)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)