

基础研究

整合素在人退变椎间盘髓核组织中的表达及意义

夏茂盛, 朱悦

(中国医科大学附属第一医院骨科 110001 辽宁省沈阳市)

【摘要】目的:观察整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 亚基在人退变椎间盘中的表达情况,探讨其在椎间盘退变中的意义。**方法:**术中收集人椎间盘髓核标本 28 个,其中 6 个来自 6 例脊柱骨折患者,设为对照组($n=6$);22 个来自 20 例椎间盘突出症患者,突出 10 个(突出组, $n=10$),脱出 12 个(脱出组, $n=12$)。应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫沉淀技术测定整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 和整合素的配体——胶原蛋白(I 和 II 型)、纤维结合蛋白在三组椎间盘髓核内的表达情况。**结果:**整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 在三组椎间盘髓核内都有表达,整合素 $\alpha 5$ 在脱出组和突出组的表达分别是正常组的 2.2 倍和 1.5 倍,整合素 $\beta 1$ 在脱出组和突出组的表达分别是正常组的 2.5 倍和 1.6 倍,纤维结合蛋白的表达同样有升高的趋势。整合素 $\alpha 1$ 、 αv 、 $\beta 3$ 在三组内的表达无统计学差异。**结论:**在退变的椎间盘髓核内整合素 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 亚基的表达增加,可能与椎间盘退变相关。

【关键词】整合素;髓核;胶原蛋白;纤维结合蛋白

中图分类号:R681.5,R363.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-09-0684-04

The expression of integrin subunits in the human degenerated intervertebral disc/XIA Maosheng,ZHU Yue//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2008,18(9):684~687

【Abstract】 Objective:To observe the expression of $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ integrin subunits in the human degenerated intervertebral disc and discuss its significance for the degeneration of the intervertebral disc.**Method:**The human nucleus pulposus specimens which were collected during operations were divided into 3 groups: normal disc as a control group($n=6$),protrusion group($n=10$) and extrusion group($n=12$).Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunoprecipitation were used to evaluate the expressions of $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 αv 、 $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin subunits messenger ribonucleic acid(mRNA),collagen proteins(type I and II) and fibronectin in the three groups.RT-PCR was also performed to measure the mRNA level of the collagens and fibronectin.**Result:**The $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 αv 、 $\alpha 5$ and $\beta 3$ integrin subunits were all expressed in the normal and herniated nucleus pulposus.The expressions of $\alpha 5$ in extrusion and protrusion groups were 2.2 and 1.5 fold of normal group respectively,the expressions of $\beta 1$ subunits in extrusion and protrusion groups were 2.5 and 1.6 fold of normal group.Likewise,the expression of fibronectin had an increased tendency in the degenerated disc. But $\alpha 1$ 、 αv and $\beta 3$ expressions had no difference among the three groups.**Conclusion:**The expressions of integrin $\alpha 5$ and $\beta 1$ subunits were increased in the nucleus pulposus of degenerated disc,and this may related to the degeneration of the disc.

【Key words】Integrin;Nucleus pulposus;Collagen protein;Fibronectin

【Author's address】 Department of Orthopaedics,the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shengyang,110001,China

整合素是一组细胞表面的黏附分子,是多种基质蛋白的膜受体,其可以参与细胞的信号传导,调控基因表达、细胞周期和细胞凋亡^[1]。有研究表明,整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 在正常人椎间盘组织内表达^[2],在椎间盘内可以起到基质蛋白受体和力学传导器等作用。 $\alpha 1\beta 1$ 亚单位是胶原蛋白在

椎间盘细胞膜上的主要受体,而 $\alpha 5\beta 1$ 亚单位是纤维结合蛋白的膜受体^[3]。但整合素在退变间盘内的表达情况国内尚未见报道。本研究通过聚合酶链式反应技术和免疫印迹技术检测正常和突出椎间盘髓核内整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 的表达,探讨其在椎间盘退变中的意义。

第一作者简介:男(1981-),博士在读,研究方向:脊柱外科

电话:(024)81596456 E-mail:maoshengxia@yahoo.com

通讯作者:朱悦

1 材料与方法

1.1 标本来源

28个标本来自 26 例患者,其中 6 个标本取自 6 例腰椎骨折患者,年龄 16~30 岁,男 3 例,女 3 例,前路手术时取出椎间盘,质量 $31\pm 10\text{g}$,均无退变迹象,纤维环完整,纤维环与髓核分界清晰(正常对照组);22 个标本取自腰椎间盘突出症患者,年龄 28~55 岁,男 11 例,女 9 例,行腰椎间盘突出时获取椎间盘组织,质量 $27\pm 8\text{g}$,依据国际腰椎研究学会的分类标准^[4]分为突出和脱出,其中突出 10 个(突出组),脱出 12 个(脱出组)。标本取出后,将髓核和纤维环组织分离,取髓核组织保存于 -70°C 冰箱。检测时每个髓核标本平均分为两份,一份用于蛋白检测,另一份用于基因检测。

1.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

将髓核组织匀浆后,提取总核糖核酸(RNA)。采用 TaKaRa (TaKaRa Biotechnology, China) 试剂盒,将提取的 RNA 逆转录为 cDNA,再进行 PCR 扩增,引物见表 1。反应条件: 94°C 2min, 94°C 30s, 58°C 45s, 72°C 1min,共 35 个循环。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,经紫外分光仪显像,以图像分析软件进行比较。

1.3 整合素含量测定

将髓核组织匀浆后,以牛血清白蛋白作标准曲线,用 Bradford 法测样品蛋白浓度。然后在蛋白量为 $1000\mu\text{g}$ 的样品内加入 $8\mu\text{g}$ 抗-整合素不同亚型($\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha \nu$ 、 $\beta 1$ 和 $\beta 3$)抗体(Upstate Biotech-

nology), 4°C 孵育 12h。然后向样品中加入 $200\mu\text{l}$ 蛋白 G 琼脂糖小球, 4°C 孵育 2h。 14000r/min 离心 5s) 收集琼脂糖小球,并在沸水中煮 5min,取上清液。将上清液加入准备好的 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中,电泳分离样品后,将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。封闭后,在膜上分别加入兔抗人整合素不同亚型($\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha \nu$ 、 $\beta 1$ 和 $\beta 3$)的特异性一抗(Santa Cruz, CA, USA), 1:800 稀释,孵育 2h。洗膜 1h,再加入羊抗兔的二抗, 1:1000 稀释,孵育 2h,再洗膜 1h。最后将纤维素膜显影到胶片上,结果用 Window AEase™ FC32-bit 软件分析。

1.4 统计学分析

实验结果采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,多样本间方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在正常对照组髓核内,整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha \nu$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 都有表达,各种亚基在不同正常标本中的表达情况差异很小,在 β -actin 基本一致的情况下, $\alpha 5$ 表达最多,其次为 $\beta 3$ 、 $\alpha \nu$ 、 $\beta 1$, $\alpha 1$ 表达最少(图 1)。

整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha \nu$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 在正常、突出和脱出三组内的表达情况见图 2 和表 2。 $\alpha 5$ 亚基在三组内的表达有统计学差异,其在脱出组的表达分别是突出组和正常组的 2.2 倍和 1.5 倍($P < 0.05$),在突出组内的表达是正常组的 1.5 倍($P < 0.05$); $\beta 1$ 亚基在脱出组表达分别是突出组和正常组的 1.6 倍和 1.3 倍($P < 0.05$),在突出组内的表达是正常组的 1.3 倍($P < 0.05$); $\alpha \nu$ 亚基的表达也呈逐渐升高的趋势,但三组间的差异没有统计学意义。 $\alpha 1$ 和 $\beta 3$ 亚基在三组髓核间的 mRNA 水平没有显著性差异。

纤维结合蛋白、I 型和 II 型胶原蛋白在三组内的表达情况见图 3 和表 3。纤维结合蛋白与 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 亚基的表达情况一致,在突出椎间盘髓核内的表达要高于正常椎间盘(1.6 倍),在脱出组内

表 1 RT-PCR 的引物

基因	引物	长度
Integrin $\alpha 1$	上游 GCTTATTGGTTTCGTTAGTTGCC	481 bp
	下游 AGGTTGGAACATCATGGGTCACGTTTT	
Integrin $\alpha 5$	上游 TCTGCCTCAATGCTTCTCG	248 bp
	下游 GTTGAGAGCGATGTGAATCG	
Integrin $\alpha \nu$	上游 TTGGAGCTACTGTGAGGTGCGAAAC	395 bp
	下游 ACCATTGAATCCGACAGCCAC	
Integrin $\beta 1$	上游 ACACGTCTCTCTCTGTCG	158 bp
	下游 CAGTTGTTACGGCACTCT	
Integrin $\beta 3$	上游 GTTCCCACTGAGTGAGGCCCGAGTA	444 bp
	下游 AAGCGGGTCACCTGGTCAGTTAGCG	
Collagen I	上游 ACGGCAAGGTGTTGTGCGAT	294 bp
	下游 GCTGGGGAGCAAACCTTTCCT	
Collagen II	上游 CATCCAGGGCTCCAATGAC	221 bp
	下游 AGCAGACCGGCCCTATGTC	
Fibronectin	上游 CCGTGGGCAACTCTGTC	438 bp
	下游 TGCGGCAGTTGTACAG	
β -actin	上游 GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	538 bp
	下游 TCCTTAATGTCACGCACGATTTTC	

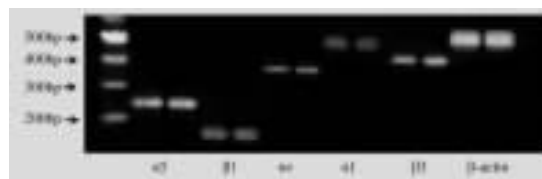


图 1 整合素 $\alpha 5$ 、 $\beta 3$ 、 $\alpha \nu$ 、 $\beta 1$ 、 $\alpha 1$ 亚基 mRNA 在正常髓核组织内的表达

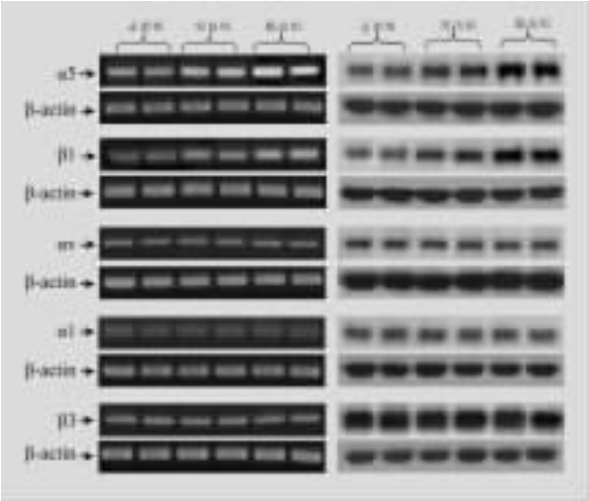


图 2 整合素 $\alpha 5$ 、 $\beta 3$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\alpha 1$ 亚基在三组椎间盘髓核内的表达 (右侧为蛋白免疫印记结果,左侧为 PCR 结果)

表 2 3 组椎间盘髓核内整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 亚基的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

	表达水平	正常组 (n=6)	突出组 (n=10)	脱出组 (n=12)
$\alpha 5/\beta$ -actin	基因	1.178 $\pm$ 0.008	1.775 $\pm$ 0.009 ^①	2.574 $\pm$ 0.017 ^②
	蛋白	0.527 $\pm$ 0.005	0.783 $\pm$ 0.010 ^①	1.280 $\pm$ 0.016 ^②
$\beta 1/\beta$ -actin	基因	0.777 $\pm$ 0.007	1.033 $\pm$ 0.022 ^①	1.300 $\pm$ 0.014 ^②
	蛋白	0.433 $\pm$ 0.006	0.693 $\pm$ 0.015 ^①	1.100 $\pm$ 0.014 ^②
$\alpha v/\beta$ -actin	基因	0.783 $\pm$ 0.008	0.793 $\pm$ 0.031	0.798 $\pm$ 0.051
	蛋白	0.357 $\pm$ 0.012	0.367 $\pm$ 0.004	0.378 $\pm$ 0.003
$\alpha 1/\beta$ -actin	基因	0.243 $\pm$ 0.009	0.240 $\pm$ 0.006	0.243 $\pm$ 0.010
	蛋白	0.433 $\pm$ 0.004	0.443 $\pm$ 0.009	0.430 $\pm$ 0.010
$\beta 3/\beta$ -actin	基因	0.633 $\pm$ 0.009	0.650 $\pm$ 0.009	0.650 $\pm$ 0.012
	蛋白	1.473 $\pm$ 0.015	1.427 $\pm$ 0.019	1.400 $\pm$ 0.006

注:数据为各亚基与 β -actin 灰度值的比值,①与正常组比较 $P<0.05$,②与正常组和突出组比较 $P<0.05$

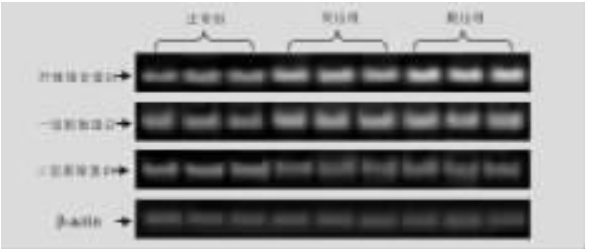


图 3 I、II 型胶原蛋白和纤维结合蛋白的表达情况

表 3 3 组椎间盘髓核内胶原蛋白 (I 和 II 型)、纤维结合蛋白在基因水平的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

	正常组 (n=6)	突出组 (n=10)	脱出组 (n=12)
纤维结合蛋白	1.533 $\pm$ 0.044	2.400 $\pm$ 0.029 ^①	3.233 $\pm$ 0.044 ^②
I 型胶原蛋白	1.800 $\pm$ 0.029	2.150 $\pm$ 0.014 ^①	2.260 $\pm$ 0.013 ^①
II 型胶原蛋白	1.397 $\pm$ 0.040	1.103 $\pm$ 0.009 ^①	1.082 $\pm$ 0.017 ^①

注:①与正常组比较 $P<0.05$,②与正常组和突出组比较 $P<0.05$

的表达要高于另外两组(2.1 和 1.3 倍)。I 型胶原蛋白在突出椎间盘髓核内的表达同样高于正常椎间盘,但其在脱出组和突出组内的表达没有统计学差异。而 II 型胶原蛋白的表达却表现出了相反的趋势,其在突出椎间盘髓核内 mRNA 的表达低于正常间盘,但在脱出组和突出组的表达没有统计学差异。整合素 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 亚基在三组内蛋白含量的比较与其基因表达趋势一致。整合素 $\alpha 5$ 在脱出髓核内的蛋白含量最高,分别是另两组的 2.4 倍和 1.6 倍,在突出组是正常组的 1.5 倍 ($P<0.05$)。同样整合素 $\beta 1$ 在脱出组内的含量是另两组的 2.5 倍和 1.6 倍,在突出组是正常组的 1.6 倍 ($P<0.05$)。但 αv 、 $\alpha 1$ 、 $\beta 3$ 亚基的蛋白水平在正常、突出和脱出三组内并没有统计学差异。

3 讨论

椎间盘退变是一个复杂的过程,多种因素参与了椎间盘退变的过程。有学者认为椎间盘的退变是由于过度的机械应力作用于椎间盘,造成椎间盘结构的破坏,引起一连串有细胞参与的应答反应,进而造成椎间盘结构进一步破裂^[5]。因此,对于椎间盘的力学作用如何影响椎间盘细胞的生物学性状是目前研究的热点。整合素可以介导力的传递,将所感应的力学信号传递至细胞内,实现力-化学转变^[6]。很多学者相信椎间盘内细胞和细胞基质的相互作用是影响退变的关键因素。而整合素恰是胞外基质蛋白在细胞膜上的受体,是胞外基质蛋白作用于细胞的关键点^[7]。有文献证明整合素在正常椎间盘内有表达^[2],并且证明其是胞外基质蛋白与细胞间相互作用的位点^[3]。在本研究中,我们检测了整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 在正常和退变椎间盘髓核内的表达,发现 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 在突出椎间盘髓核内表达增加,即在退变过程中某种因素增加了 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 的表达,而这两个受体亚基表达的增加必然会影响基质蛋白对椎间盘细胞的作用,从而影响了椎间盘退变的进程。

有研究表明,随着椎间盘由突出向脱出的发展,椎间盘退变的程度也越来越严重^[8]。即随着椎间盘退变进程的发展,整合素 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 亚基在髓核内的表达也随之增加。那么是何种因素造成了这样的结果呢?纤维结合蛋白的膜受体是 $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ ^[7,9],胶原蛋白的受体是 $\alpha 1\beta 1$, $\alpha v\beta 1$ ^[7]。本研究结果发现,纤维结合蛋白和其受体 $\alpha 5$ 和

$\beta 1$ 亚基有同样的增加趋势。同样在软骨退变过程中,纤维结合蛋白和整合素 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 也都有升高的趋势,并证明纤维结合蛋白碎片可以增加其受体 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 亚基的表达^[10,11]。由此可以推测,纤维结合蛋白在椎间盘内可能也有增加 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 亚基的作用,当然这需要进一步的实验证明。另外纤维结合蛋白的另外两个受体 αv 、 $\beta 3$ 并没有变化,胶原蛋白的受体 $\alpha 1$ 亚基也没有变化,这可能与椎间盘内受体的特异性有关。

当然,有很多其他因素可以影响整合素表达,如缺氧环境就是整合素表达变化的重要原因之一。Risbud 等^[12]发现在缺氧的环境下培养髓核细胞可以增强细胞 MAPK 的活性,增加整合素亚基的表达。同样压力也可以影响整合素的表达,当椎间盘细胞在体外加压培养后,某些整合素亚基的表达出现下降趋势^[13,14]。但以上实验都是在体外细胞培养的环境下进行的,由于体内环境与体外细胞培养环境有很大区别,体内可能多种因素共同作用于椎间盘造成其退变的结局。因此,退变椎间盘内整合素表达的变化可能是这些因素共同作用的结果。

整合素 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 表达的增加可能会促进椎间盘退变的进程。作为髓核细胞上的重要膜受体,整合素 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 亚基表达的变化必然会影响椎间盘的退变过程。首先,有研究表明在退变椎间盘内纤维结合蛋白碎片的含量明显增加^[15],纤维结合蛋白碎片在椎间盘细胞上的主要受体就是整合素 $\alpha 5\beta 1$,因而 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 两亚基表达的增加可能会增强纤维结合蛋白碎片促进椎间盘退变的作用。其次, $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 亚基与细胞内多种信使蛋白相互影响,如 EPK、MAPK、PKC 等^[16]。 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 表达的增加必然会影响细胞信号传导过程,从而影响椎间盘退变。当然,多种其它因素也可以与整合素相联系,如压力、缺氧等^[6,12]。整合素在力学信号转化为化学信号的过程中发挥重要作用,而压力正是椎间盘退变的重要因素之一。我们推测 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 两亚基表达增加有可能会增强压力对椎间盘的影响,从而加速其退变的进程。

在退变椎间盘髓核内整合素 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 亚基表达增加,但是何种因素造成了整合素表达的变化,这种变化又会产生何种影响,有待于进一步研究。但整合素是椎间盘内重要的基质蛋白受体,对于整合素的研究必然是一个重要的研究方向。

4 参考文献

1. Hynes RO. Integrins;bidirectional,allosteric signaling machines [J].Cell,2002,110(6):673-687.
2. Dana LN, William JR, Lori AS. Integrin expression in cells of the intervertebral disc[J].J Anat,2004,204:515-520.
3. Gilchrist CL,Chen J,Richardson WJ, et al. Functional integrin subunits regulating cell-matrix interactions in the intervertebral disc[J].J Orthop Res,2007,25(6):829-840.
4. Hanley EN Jr,Delamarter RB,McCulloch JA,et al.Surgical Indication and Techniques;International Society for the Study of the Lumbar Spine;The Lumbar Spine [M].2nd ed.Saunders: 1996.492-524.
5. Adams MA,Roughley PJ.What is intervertebral disc degeneration,and what causes it[J]?Spine,2006,31(18):2151-2161.
6. Liu B,Qu MJ,Qin KR,et al.Role of cyclic strain frequency in regulating the alignment of vascular smooth muscle cells in vitro[J].Biophys J,2008,94(4):1497-1507.
7. Uitto VJ, Larjava H. Extracellular matrix molecules and their receptors;an overview with special emphasis on periodontal tissues[J].Crit Rev Oral Biol Med,1991,2(3):323-354.
8. Arai Y,Yasuma T,Shitoto K,et al.Immunohistological study of intervertebral disc herniation of lumbar spine[J].J Orthop Sci, 2000,5(3):229-231.
9. Plow EF,Haas TA,Zhang L,et al. Ligand binding to integrins [J].J Biol Chem,2000,275(29):21785-21788.
10. Takahashi I,Onodera K, Sasano Y, et al. Effect of stretching on gene expression of beta1 integrin and focal adhesion kinase and on chondrogenesis through cell-extracellular matrix interactions[J].Eur J Cell Biol,2003,82(4):182-192.
11. Kim SJ,Kim EJ,Kim YH,et al. The modulation of integrin expression by the extracellular matrix in articular chondrocytes[J].Yonsei Med J,2003,44(3):493-501.
12. Risbud MV,Guttapalli A,Albert TJ,et al. Hypoxia activates MAPK activity in rat nucleus pulposus cells;regulation of integrin expression and cell survival [J].Spine,2005,30(22): 2503-2509.
13. 于胜吉,邱贵兴,Yang B,等.机械负荷调节猪腰椎间盘细胞表达 $\alpha 5\beta 1$ 整合素的体外研究[J].中华骨科杂志[J],2006,26(6): 415-420.
14. 于胜吉,邱贵兴,Yang B,等.整合素 $\alpha 5$ 和肌动蛋白在周期性压力下椎间盘细胞中的表达[J].中华外科杂志,2005,43(24): 1605-1608.
15. Oegema TR,Johnson SL,Aguiar DJ,et al. Fibronectin and its fragments increase with degeneration in the human intervertebral disc[J].Spine,2000,25(21):2742-2747.
16. Li Z,Zhang G,Feil R,et al.Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin $\alpha IIb \beta 3$ [J].Blood, 2006,107(3):965-972.

(收稿日期:2008-06-10 修回日期:2008-07-31)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)