

基础研究

椎间盘髓核细胞中 Sox9 与 II 型胶原
基因表达的关系赵 哲¹, 王文波¹, 李吉友¹, 刘 洋¹, 李雪松¹, 马淑茜²

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院骨科; 2 哈尔滨市第一医院外科 150001 哈尔滨市)

【摘要】目的:探讨椎间盘髓核组织中 Sox9 基因表达的变化及其与 II 型胶原基因表达的关系。**方法:**将 30 个椎间盘组织按 Thompson 分期分为 I~IV 期, 应用 RT-PCR、Western blot 和免疫组化方法检测各期间盘组织中 Sox9、II 型胶原基因的 mRNA 和蛋白表达;应用 SPSS 10.0 统计学软件, 采用单因素方差分析、*t* 检验和 Pearson 相关性检验分析两者的相互关系。**结果:**椎间盘髓核组织中 Sox9 mRNA 的表达量在总体上低于 II 型胶原, Sox9 蛋白表达位于细胞核中而 II 型胶原主要位于细胞间质内, Sox9 在 Thompson I 期椎间盘的细胞核内表达很强而在 IV 期则很弱甚至缺失;从 Thompson I~IV 期两种基因的 mRNA 和蛋白表达水平均逐渐降低, 各分期间有显著性差异($P<0.05$)。Thompson I~IV 期标本中 II 型胶原与 Sox9 表达量的下降趋势相近。**结论:**Sox9 和 II 型胶原基因表达水平与 Thompson 分期密切相关, 随椎间盘退变程度加重表达逐渐降低, 且两者下降趋势相近。

【关键词】椎间盘;髓核;Sox9;II 型胶原;基因表达

中图分类号:Q786,R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2007)-05-0384-05

Correlation in gene expression between Sox9 and collagen type II in human intervertebral disc nucleus pulposus cells/ZHAO Zhe, WANG Wenbo, LI Jiyu, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(5):384~387

【Abstract】Objective:To investigate gene regulation mechanism in the intervertebral disc by studying the correlation between the expression of Sox9 gene and collagen type II gene.**Method:**30 human intervertebral discs taken from surgery were classified into four grades according to Thompson grading system. The expression of Sox9 and collagen type II genes were detected with reverse transcriptional PCR (RT-PCR), Western blot and immunohistochemistry, and correlative extent between the two markers was also evaluated. By SPSS 10.0, ANOVA, *t* test and Person correlation test were chosen to test the results.**Result:**The expression of Sox9 mRNA in the total amount was less than that of collagen type II. Sox9 was seen localized in NP cell nucleus while collagen type II localized in the matrix. Sox9 had a high expression in the cells of the Thompson grade I nucleus pulposus, but had a weak or absent expression in cells of Thompson grade IV. The expression in both mRNA and protein level for the two markers showed a steping down tendency in the samples from Thompson I to Thompson IV ($P<0.05$). Pairwise analysis showed a similar tendency between the expression of Sox9 and collagen type II.**Conclusion:**The expression of Sox9 and collagen type II in the NP cell of human discs is associated with the Thompson grade closely, and the more severe the degeneration of the disc, the closer the tendency of the two matters.

【Key words】Intervertebral disc; Nucleus pulposus; Sox9; Collagen type II; Gene expression

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

基金项目:国家自然科学基金(项目编号:30471741);黑龙江省研究生创新基金

第一作者简介:男(1971-), 博士研究生, 主治医师, 研究方向:脊柱外科

电话:(0451)53641918-5902 E-mail:zhzh7595@yahoo.com.cn

腰椎间盘退变的过程与细胞外基质的成份变化有着密切的关系。II 型胶原成分降低是导致椎间盘细胞外基质结构发生变化的主要原因, II 型胶原的丧失和 I 型胶原的增加是退变椎间盘主要的生物学改变^[1]。Sox9 基因是性别决定的重要基

因,也是促进软骨细胞分化和维持软骨细胞表型的调控基因^[2],它对Ⅱ型胶原基因的调控作用显著^[3]。本研究旨在分析椎间盘髓核组织中两种基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达及其相互关系。

1 材料与方法

1.1 标本采集

本组中共获取腰椎间盘组织标本 30 个,所有标本的取材均经医院伦理委员会同意。将所有椎间盘按 Thompson 分期^[4]共分四期:①Ⅰ期,6 个,取自胎龄 6~7 个月的引产胎儿,节段均为 L4/5;②Ⅱ期,8 个,取自因外伤或急性脑出血死亡的捐献者,年龄 15~32 岁,平均 24 岁,L4/5 6 个,L5/S1 2 个;③Ⅲ期,9 个,其中 5 个取自因外伤或急性脑出血死亡的捐献者,年龄 36~50 岁,平均 42 岁,L4/5 3 个,L5/S1 2 个;另 4 个取自椎间盘突出症髓核摘除术患者,年龄 45~56 岁,平均 52 岁,L4/5 3 个,L5/S1 1 个;④Ⅳ期,7 个,均取自椎间盘突出症髓核摘除术患者,年龄 62~72 岁,平均 66 岁,L4/5 5 个,L5/S1 2 个。将所获得标本在显微镜下分离为髓核与纤维环,每例髓核组织分成 3 份(分别用于 mRNA、蛋白表达检测及免疫组化染色),迅速置于液氮中,转入-80℃冰箱备用。

1.2 Sox9 与Ⅱ型胶原 mRNA 表达检测

Trizol 法提取椎间盘髓核组织总 RNA,取 2μl 总 RNA 用两步法 RT 试剂盒(invitrogen)进行反转录,PCR 扩增Ⅱ型胶原和 Sox9 为 30 循环,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为 24 个循环。PCR 反应条件为:94℃ 30s,52℃ 45s,72℃ 45s。取每例标本 Sox9、Ⅱ型胶原 mRNA 扩增产物 10μl 经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察、拍照。采用 Quantity one(Bio-Rad)凝胶图像分析系统进行定量分析目的基因的表达水平。实验中所有引物均遵循引物设计原则,应用 Primer 5.0 专业软件设计完成,经 Blast 比对^[5]为特异性引物(表 1)。

1.3 Sox9 与Ⅱ型胶原蛋白表达测定

应用组织裂解液分别提取不同分期椎间盘髓核组织总蛋白。按照蛋白定量试剂盒的说明测定组织提取液的蛋白浓度。每例标本取总蛋白 50μg,经 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移至硝酸纤维素膜上,封闭后,加一抗(鼠抗人Ⅱ型胶原单克隆抗体,Labvision 公司,1:500 和兔抗人 Sox9

表 1 引物序列与扩增长度

mRNA	引物	序列	片段长度 (bp)
GAPDH	上游	CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA	450
	下游	ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA	
Ⅱ型胶原	上游	GCTCGCACCTGCAGAGACCTG	603
	下游	GTCCACACCGAATTCCTGCTCG	
Sox9	上游	TCCTCAGGCTTTGCGATTT	304
	下游	TGCTCGGCACTTATTGG	

多克隆抗体,Santa cruze 公司,1:500)及二抗进行杂交,DAB 显色。拍照后应用 Quantityone 软件分析结果。

1.4 免疫组化分析

横向切取 6μm 厚的髓核组织冰冻切片。经 4%丙酮固定 10min,3%过氧化氢孵育 5~10min,室温孵育 10min;滴加 1:200 一抗稀释液(抗体同上),4℃孵育过夜;滴加二抗工作液,室温孵育 30min;滴加辣根酶标记工作液,室温孵育 10~30min;显色,复染封片,显微镜下观察阳性表达区域并照相。细胞核中出现棕黄色颗粒为 Sox9 阳性表达;细胞间质内出现棕黄色条状物为Ⅱ型胶原阳性表达,按着色强度判断表达高低,分为 0~+4 级^[6]。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计学软件,采用单因素方差分析、t 检验和 Pearson 相关性检验, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

所有标本中均有 Sox9 和Ⅱ型胶原 mRNA 表达(图 1、2,封三),并且 Sox9 mRNA 的表达水平总体上低于Ⅱ型胶原。用 Quantity one 凝胶分析系统将目的条带与 GAPDH 的比值进行统计学分析,显示两种基因的表达量从 Thompson I~Ⅳ期逐渐降低,不同分期间有显著性差异($P<0.05$);采用 Pearson 相关性检验 Thompson I~Ⅳ期标本中 Sox9 与Ⅱ型胶原 mRNA 表达相关性分析,显示两者下降水平呈现正相关。Thompson I~Ⅳ期中Ⅱ型胶原与 Sox9 蛋白表达呈现逐渐下降,各期间差异有显著性(表 2, $P<0.05$);Sox9 与Ⅱ型胶原蛋白表达的下程度有相似性。

免疫组化显示 Thompson I~Ⅳ期椎间盘髓核细胞中均有 Sox9 与Ⅱ型胶原蛋白表达,前者的

表达位于细胞核内,而后者则在细胞间质中。Sox9 在 I 期核内表达很强,为+3,到IV期很弱甚至缺失,为+1 或 0; II 型胶原蛋白表达位于细胞间质中,呈现条带状,表达强度也随退变程度的增加而明显减低, I 期中表达强度为+4, IV 期为+1(图 3~10,封三)。

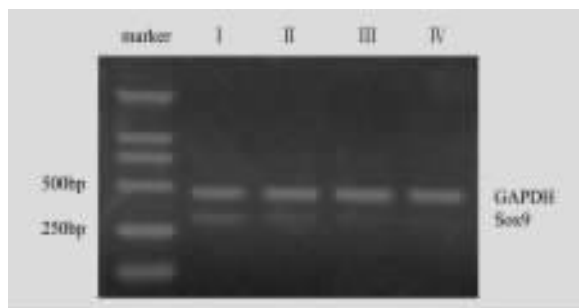


图 1 Thompson I~IV 期椎间盘髓核中 Sox9 表达逐渐降低(marker 为 DL2000, GAPDH 为 450bp, Sox9 为 304bp)

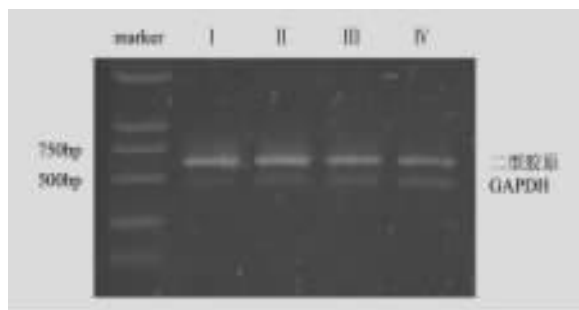


图 2 Thompson I~IV 期椎间盘髓核中 II 型胶原表达逐渐降低 (marker 为 DL2000, GAPDH 为 450bp, II 型胶原为 603bp)

表 2 不同 Thompson 分期椎间盘中 Sox9 与 II 型胶原的 mRNA 和蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

	n	Sox 9		II 型胶原	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
I 期	6	0.61±0.02	0.23±0.02	1.45±0.01	0.58±0.03
II 期	8	0.54±0.02 ^①	0.19±0.03 ^①	1.26±0.01 ^①	0.53±0.04 ^①
III 期	9	0.47±0.01 ^②	0.16±0.01 ^②	1.08±0.03 ^②	0.48±0.02 ^②
IV 期	7	0.23±0.02 ^③	0.08±0.02 ^③	0.54±0.02 ^③	0.24±0.02 ^③

注:①与 Thompson I 期比较 $P<0.05$;②与 Thompson I、II 期比较 $P<0.05$;③与 Thompson I、II、III 期比较 $P<0.05$

3 讨论

椎间盘退变机制一直是骨科工作者致力研究的课题。在椎间盘退变的过程中会有多种细胞因子或炎症介质参与,这些因子共同作用导致组成椎间盘基质成分的 II 型胶原与蛋白聚糖等发生质

和量的改变,并最终引起椎间盘结构和生理功能的变化^[1]。最近的研究发现,Sox9 基因是与椎间盘退变密切相关的因子,它能增加椎间盘基质中 II 型胶原和蛋白聚糖的合成,理论上可延缓椎间盘退变的发展^[7]。

Paul 等^[8]在体外实验中发现 Sox9 腺病毒载体能够增加细胞内 Sox9 与 II 型胶原的表达。同时在纤维环穿刺法制备的兔椎间盘退变的病理模型中注射重组腺病毒载体,发现注射 Sox9 腺病毒的椎间盘与注射病毒对照组相比仍能维持更好的软骨细胞表型。因此,探讨如何在分子水平延缓椎间盘髓核细胞的老化是治疗椎间盘退变的关键所在。

在本研究中发现,Thompson I 期(6~7 个月引产胎儿)椎间盘髓核细胞中 Sox9 与 II 型胶原的 mRNA 和蛋白均有较高表达,随着椎间盘退变加重,Sox9 与 II 型胶原 mRNA 的表达水平逐渐减低,并且两者下降的幅度非常近似;同 Thompson I 期比较,III 与 IV 期的椎间盘中 Sox9 mRNA 表达分别降低了 22.3% 和 62.6%, II 型胶原 mRNA 表达水平分别下降了 25.4% 与 64.8%,与蛋白表达吻合。因此椎间盘退变的发展与两种基因有着密切的关系,尤其在椎间盘成熟到退变的阶段。我们推断随着年龄的增长和椎间盘内构成的变化,作为促进软骨细胞分化和维持软骨细胞表型的重要基因 Sox9,其 mRNA 和蛋白的表达均明显受到抑制,从而使其对于 II 型胶原的启动和增强机制受到阻截,胶原的合成和代谢发生紊乱,细胞外基质的结构和成分发生变化,最终导致椎间盘退变的发生。实验中发现,在退变的椎间盘髓核组织中细胞数明显减少,形态更趋向于增生肥大的软骨细胞。这些变化必将严重影响细胞外基质的更新速度,一些酸性的代谢产物无法排出,使椎间盘内形成了一个低氧、低 pH 值、相对无血供的环境,更加速了剩余髓核细胞的老化直至死亡的过程。这种恶性循环使椎间盘退变的演变过程加快并变得不可逆。

但椎间盘髓核细胞内 Sox9 与 II 型胶原的表达关系与其他退变性疾病中其表达关系并不一致。Aigner 等^[9]的实验发现在严重骨关节炎的软骨细胞中 Sox9 并不是正向而是反向调控 II 型胶原的表达。其他软骨因子如 Sox5 和 Sox6 等,可能协同参与调控 II 型胶原的表达^[10];有些细胞因子可通过抑制或增强 Sox9 的功能而使后者不能有效

地调控Ⅱ型胶原的表达,如 IL-1^[11] 能抑制、而 BMP-2 可增强 Sox9 的表达^[12]。在本课题组前期的体外研究中发现,BMP-2 能通过调控椎间盘髓核细胞中 Sox9 进而增加Ⅱ型胶原和蛋白聚糖的表达水平^[13]。因此,椎间盘退变的调控机制远没有研究清楚,还有哪些因子共同影响着椎间盘退变,将是今后研究的方向。

4 参考文献

1. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, gene and degeneration[J]. J Clin Invest, 1996, 98(4): 996-1003.
2. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, 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.
3. Li Y, Tew SR, Russell AM, et al. Transduction of pass aged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of Sox9[J]. Tissue Eng, 2004, 10(3): 575-584.
4. Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, et al. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc[J]. Spine, 1990, 15(5): 411-445.
5. 丁六松, 张宇伟. BLAST 序列比对与生物医学文献检索[J]. 情报杂志, 2003, 4(): 74-75.
6. Sive JI, Baird P, Jeziorsk M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs [J]. J Clin Pathol Mol Pathol, 2002, 55(2): 91-97.
7. Helen E, James N, Jane A, et al. The Sox9 transcription factor in the human disc: decreased immunolocalization with age and disc degeneration[J]. Spine, 2005, 30(6): 625-630.
8. Paul R, Haydon RC, Cheng HW, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease [J]. Spine, 2003, 28(8): 755-763.
9. Aigner T, Gebhard PM, Schmid E, et al. Sox9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes[J]. Matrix Biol, 2003, 22(4): 363-372.
10. Ikeda T, Kawaguchi H, Kamekura S, et al. Distinct roles of Sox5, Sox6 and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation[J]. J Bone Miner Metab, 2005, 23(5): 337-340.
11. Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha [J]. J Biol Chem, 2000, 275(5): 3687-3692.
12. Yoon ST, Kim K, 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.
13. 赵勇, 王文波, 李吉有, 等. 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 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(10): 612-615.

(收稿日期: 2006-08-22 修回日期: 2006-01-15)

(英文编审 陆 宁)

(本文编辑 彭向峰)

消息

第七期“脊柱外科新进展”学习班通知

近年来, 脊柱外科领域发展迅速, 新概念、新技术层出不穷。为了让更多的医务人员了解近年来脊柱外科最新理论和技术, 更好地为患者服务, 经国家卫生部继续教育委员会批准, 由上海交通大学医学院附属瑞金医院和上海市伤骨科研究所共同主办的国家级医学继续教育项目(项目编号: 2007-04-07-030)第七期“脊柱外科新进展”学习班将于 2007 年 10 月 8 日~12 日在上海举行。

学习班将邀请国内外知名脊柱外科专家教授授课。作为职务续聘及职称晋升的必备条件之一, 参加学习者经考试合格可取得国家级Ⅰ类学分 13 分。现将有关事项通知如下。

地点: 上海市瑞金二路 197 号瑞金医院。

费用: 600 元/人(含注册费、教材资料费、学分证书费), 食宿统一安排, 费用自理。

联系方式: 瑞金医院继续教育办公室 沈以刚; 地址: 上海市瑞金二路 197 号, 邮编: 200025; 电话: 021-64370045 转 662955; E-mail 地址: r662955@yahoo.com.cn。

主要授课内容: (1) 腰椎滑脱症的诊治新进展; (2) 椎间盘源性下腰痛的诊治进展; (3) 胸腰椎骨折的诊断和治疗; (4) 经皮椎体强化技术; (5) 颈椎病手术治疗策略; (6) 非融合及半坚强固定技术治疗腰椎疾患; (7) 前路脊柱手术进展; (8) 下颈椎骨折脱位的治疗策略选择; (9) 计算机导航技术在脊柱外科中的应用; (10) 脊柱肿瘤的外科治疗; (11) 青少年特发性侧凸的手术治疗。