

腺相关病毒介导 hBMP-2 体内转染对兔退变椎间盘髓核细胞凋亡的影响

林章雄, 林 然, 叶君健

(福建医科大学附属第一医院骨科 350004 福州市)

【摘要】目的:了解腺相关病毒介导骨形态发生蛋白-2(adeo-associated virus mediated human bone morphogenetic protein-2, AAV-hBMP-2)基因体内转染兔退变椎间盘后对髓核细胞 Fas 与 Caspase-3 蛋白表达及细胞凋亡的影响。**方法:**36 只普通级新西兰大白兔, 采用针刺兔椎间盘的方法制作 L2/3、L3/4、L4/5 椎间盘退变模型。造模 4 周后, 在 MRI 影像学中, 髓核的信号比正常减弱, 证明造模成功, 再随机分为注射 20 μ l AAV-hBMP-2 组(6 $\times 10^6$ pfu, A 组)、AAV 组(6 $\times 10^6$ pfu, B 组)和生理盐水组(C 组), 分别于注射 2 周、4 周及 8 周后对椎间盘进行 MRI 检查, 然后取材, 石蜡包埋, 组织切片应用 SP 免疫组织化学法和 TUNEL 法分别观察 Fas 与 Caspase-3 蛋白表达及髓核细胞凋亡情况, IPP6.0 图像分析系统测定各指标的平均光密度。**结果:**注射后 2 周、4 周及 8 周时 A 组 MRI 髓核信号结果与 B 组、C 组比较有统计学意义($P < 0.05$)。各组 Fas、Caspase-3 及 TUNEL 染色结果随着时间推移逐渐增强, A 组 Fas、Caspase-3 及 TUNEL 的平均光密度明显低于 B 组和 C 组($P < 0.01$), B 组与 C 组间比较无显著性差异($P > 0.05$)。**结论:**体内转染 AAV-hBMP-2 能抑制兔腰椎间盘髓核细胞凋亡。

【关键词】椎间盘退变; 细胞凋亡; Fas; Caspase-3; 兔

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.05.14

中图分类号: R681.531, Q255 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-05-0411-05

The effects of AAV-hBMP-2 transfection to the rabbit degenerated intervertebral discs in vivo on the nucleus pulposus of apoptosis/LIN Zhangxiong, LIN Ran, YE Junjian//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(5): 411-415

【Abstract】 Objective: To study the effect of rabbit degenerated intervertebral disc pulpiform nucleus cells transfected with adeo-associated virus mediated human bone morphogenetic protein-2 (AAV-hBMP-2) in vivo on apoptosis of Fas and Caspase-3 in the nucleus pulposus. **Method:** A total of 36 New Zealand white rabbits in ordinary grade were established a rabbit model of intervertebral discs degeneration in L2/3、L3/4、L4/5 induced by puncturing the anulus fibrosus with defined needle. At four weeks postsurgery, the nucleus signal is lower than the normal in magnetic resonance imaging that proved the model of intervertebral disc degeneration to be successful. Then the rabbits of intervertebral disc degeneration were divided into three groups in random, named A, B and C. Then the groups A, B, C were injected AAV-hBMP-2 (20 μ l, the virus titer is 6 $\times 10^6$ pfu), AAV (20 μ l, the virus titer is 6 $\times 10^6$ pfu) and normal saline (20 μ l) respectively. The analyses of radiology, TUNEL, immunohistochemistry with SP methods and IPP6.0 system were performed to examine the average optical of the apoptotic disc cells at two, four and eight weeks respectively after injection. **Result:** In the magnetic resonance imaging, within the group A, a remarkably highest signal intensity in T2-weighted images of the nucleus pulposus were detected in the three groups ($P < 0.05$). The group A of the average optical of the expression of Fas and Caspase-3 and the apoptotic cells were significantly lowest in the three groups ($P < 0.01$), while there were no differences between the group B and C ($P > 0.05$). **Conclusion:** The AAV-hBMP-2 transfection to the rabbit degenerated intervertebral discs in vivo could suppress apoptosis of degenerated intervertebral discs.

基金项目:福建省自然科学基金计划资助项目(编号: C0710010); 福建省卫生厅青年科研基金资助项目(编号: 2009-2-13)

第一作者简介: 男(1975-), 主治医师, 研究方向: 腰椎创伤与退变研究

电话: (0591) 87982568 E-mail: 185577627@qq.com

通讯作者: 叶君健 E-mail: yejunjian@medmail.com.cn

[Key words] Intervertebral disc degeneration; Apoptosis; Fas; Caspase-3; Rabbit

[Author's address] Department of Orthopaedic, the First Affiliated Hospital to Fujian Medical University, Fuzhou, 350004, China

椎间盘退变是脊柱退变性疾病的主要原因之一,人们一直致力于寻找一种能干预或逆转这个退变过程的方法,以使其生物学功能得到恢复,目前应用生物学手段治疗椎间盘退变的基础性研究已取得了令人鼓舞的成果^[1,2],但其作用机理仍然不清楚。1997 年,Wehling 等^[3]首先提出了转基因逆转椎间盘退变的设想,后来 Levicoff 等^[4]证实腺相关病毒(adeo-associated virus, AAV)介导人骨形态蛋白-2(human bone morphogenetic protein-2, hBMP-2)基因可成功在体内转染兔椎间盘髓核细胞,转染后的椎间盘 MRI 髓核信号明显高于对照组,蛋白多糖合成率增高。本实验采用针刺兔椎间盘方法建立椎间盘退变动物模型^[5-7],应用体内基因转导技术研究 AAV-hBMP-2 基因对兔退变椎间盘髓核细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级新西兰大白兔 36 只(福建医科大学动物中心提供),雌雄各半,平均体重 3.0 ± 0.36 kg, 1 岁龄,并经 MRI 检查确认无脊柱及椎间盘病变。

1.2 造模与转染

36 只兔子用氯胺酮(10mg/kg)及氯丙嗪(50mg/kg)肌注麻醉后,经右侧腹膜外入路,按照常用针刺方法^[5-7]针刺兔 L2/3、L3/4、L4/5 椎间盘制作椎间盘退变模型。造模 4 周后,在 MRI 影像学中,髓核的信号比正常减弱,证明造模成功(图 1d)。将动物随机分为 A、B、C 三组,每组 12 只, A 组注射 20 μ l 含 6×10^6 pfu 的 AAV-hBMP-2 基因(pSNAV-hBMP-2 的构建及重组质粒包装成 AAV-hBMP-2 均由北京本原正阳基因公司完成)溶液, B 组注射 20 μ l 含相同滴度的 AAV 溶液, C 组注射 20 μ l 生理盐水,随后将 A、B、C 每组再随机分为三组,每组 4 只,分笼饲养,于 2 周、4 周及 8 周后观察结果。

1.3 MRI 检查

分别于体内转染后 2 周、4 周及 8 周,将 A、B、C 三组兔子进行 MRI 检查,所有 MRI 影像资料由放射科医生进行盲法评估,将改良后的 Thompson 分级法作为评估标准,分 4 级:1 级,正

常;2 级,信号轻度减弱伴有高信号区范围的缩小;3 级,信号中度减弱;4 级,信号重度减弱^[2]。对每张片 T2W I 进行分级并统计分析。

1.4 Fas 及 Caspase-3 蛋白的检测

注射后各时间点取 L2/3、L3/4、L4/5 椎间盘,用 10% 福尔马林固定 24h, 10% 二乙胺四乙酸(EDTA)脱钙液脱钙 45d,石蜡包埋后连续切片,片厚 4 μ m,每个标本随机取石蜡切片 3 张,分别用 SP 免疫组化染色法检测 Fas 及 Caspase-3 蛋白表达,鼠抗兔 Fas 多克隆抗体(浓度 1:50 Abcam 公司),鼠抗兔 Caspase-3 多克隆抗体(浓度 1:100 Calbiochem 公司)。所有切片均在相同放大倍数(400 倍)、相同光强度下随机取 5 个视野拍照,用 Image-Pro Plus 6.0 (IPP6.0) 图像分析系统测量平均光密度。阴性对照:每次实验均以 PBS 液代替一抗作阴性对照。

1.5 细胞凋亡检测

每个标本随机取石蜡切片 3 张,进行细胞凋亡检测,操作步骤按 TUNEL 检测试剂盒(Roche 公司)说明书进行,结果处理同上。

阴性对照:每次实验加入 50 μ l 试剂盒内试剂 2 以代替 TUNEL 反应混合物作为阴性对照组。

1.6 统计方法

所有测量数据采用 SPSS 16.0 统计软件分析,数据以均数 $\pm$ 标准差表示($\bar{x} \pm s$),MRI 资料采用 Kruskal-Wallis H 检验;Fas、Caspase-3 与 TUNEL 结果采用方差分析,两两比较用 LSD 法。检验标准设 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 MRI 检查结果

在注射后 2 周、4 周及 8 周时 A 组兔腰椎间盘 MRI 髓核信号强度减弱不明显,椎间隙无改变, B 组和 C 组髓核信号强度呈逐渐减弱趋势,椎间隙变窄,椎间盘退变逐渐加重(图 2);改良 Thompson 分级结果见表 1, A 组 MRI 改良 Thompson 分级明显优于 B 组和 C 组($P < 0.05$),而 B 组与 C 组比较无明显差异($P > 0.05$), A 组不同时间点比较差异无显著性($P > 0.05$), B 组、C 组不同时间点比较有显著性差异($P < 0.05$);说明 A 组

表 1 各组兔腰椎间盘 MRI 改良 Thompson 分级

改良 Thompson 分级	A组			B组			C组		
	2周	4周	8周	2周	4周	8周	2周	4周	8周
1	3	2	0	0	0	0	0	0	0
2	8	9	10	9	6	0	6	4	0
3	1	1	2	2	3	10	5	6	7
4	0	0	0	1	3	2	1	2	5

注:A:注射 AAV-hBMP-2 组,B:注射 AAV 组,C:注射生理盐水组

表 2 各组 Fas、Caspase-3 及 TUNEL 平均光密度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间(周)	Fas	Caspase-3	TUNEL
A组	2	0.40±0.06 ^①	0.40±0.03 ^①	0.43±0.02 ^①
	4	0.52±0.01 ^①	0.49±0.02 ^①	0.53±0.02 ^①
	8	0.58±0.00 ^①	0.54±0.01 ^①	0.63±0.02 ^①
B组	2	0.50±0.03 ^②	0.45±0.01 ^②	0.47±0.01 ^②
	4	0.60±0.029 ^②	0.63±0.01 ^②	0.64±0.03 ^②
	8	0.78±0.02 ^②	0.78±0.04 ^②	0.87±0.02 ^②
C组	2	0.54±0.00	0.46±0.04	0.47±0.02
	4	0.64±0.05	0.65±0.00	0.66±0.01
	8	0.80±0.016	0.80±0.00	0.91±0.04

注:①A组 Fas、Caspase-3 及 TUNEL 与 B、C 组比较 $P<0.01$;②不同时间点比较 $P<0.05$

髓核信号明显高于 B、C 组。腰椎间盘退变呈进行性加重。

2.2 免疫组化与 TUNEL 观察结果

A、B、C 三组 Fas、Caspase-3 及 TUNEL 染色随时间推移逐渐增强,但 A 组染色比 B 组、C 组浅(图 2~4),各组 Fas、Caspase-3、TUNEL 平均光密度值结果见表 2,B 组与 C 组比较无明显差异 ($P>0.05$),A 组不同时间点比较无显著性差异 ($P>0.05$),B 组及 C 组组内比较有显著差异 ($P<0.05$),随时间变化椎间盘细胞凋亡呈逐渐加重趋势。A 组 Fas、Caspase-3、TUNEL 平均光密度与 B 组、C 组比较有显著性差异 ($P<0.01$)。

3 讨论

在长期各种应力作用下,腰椎间盘内发生一系列变化导致细胞活力下降甚至凋亡。椎间盘内基质成分如蛋白多糖、硫酸软骨素等含量减少,导致腰椎间盘退变。在退变椎间盘中,I 型胶原含量增多,II 型胶原含量减少,可能与髓核中新合成的 II 型胶原绝对值减少有关^[8]。椎间盘基质的降解及基质与细胞黏附功能减退最终导致椎间盘退

变,同时由于传入细胞中的各种信号传导中断,细胞失去信号刺激而加速细胞凋亡,因此细胞凋亡可能是椎间盘基质大分子变化的根源^[9]。因此椎间盘细胞凋亡的调控基因、信号传导途径的进一步研究,有助于寻找延缓或抑制细胞凋亡的方法,从而深化退变椎间盘生物干预治疗的研究。

细胞凋亡为程序性细胞死亡过程,是多细胞有机体为调控机体发育、维护内环境稳定、由基因控制的细胞主动死亡过程,机体通过细胞凋亡消除损伤、衰老与突变的细胞,维持生理平衡。Fas 蛋白是细胞表面的一种凋亡信号受体,Fas 表达越高,引起细胞凋亡的作用越强^[10],Fas 介导的细胞凋亡途径中,Fas 与 FasL 结合诱导受体三聚体化,然后在细胞膜上与接头蛋白 FADD 结合形成凋亡诱导复合物,这个复合物募集 Caspase-8 前体,募集的 Caspase-8 前体自我激活,并且激活下游的 Caspase-3,最终使细胞凋亡。Caspase-3 被称为凋亡的“执行者”,目前认为是一切凋亡信号传导的共同通路,负责对凋亡途经最后执行阶段的全部或部分关键性蛋白的酶切,常常起到核心作用^[11]。有研究^[12]发现 Fas 蛋白可促进髓核细胞凋亡,其表达的高低与髓核细胞凋亡严重程度呈正相关。Tschoeke 等^[13]证实在外伤与退变的腰椎间盘中 Fas 及 FasL 配体、Caspase-3 等的表达明显高于正常组,说明细胞凋亡在退变椎间盘中起重要的作用。本实验在注射干预后检测结果,证实 hBMP-2 活体基因转导能够抑制 Fas 与 Caspase-3 的表达,起到抑制细胞凋亡的作用,hBMP-2 可能是通过抑制 Fas 介导的细胞凋亡途径,抑制髓核细胞凋亡,达到延缓椎间盘退变的作用。

BMP 是一种多功能生长因子,能够诱导新骨形成,刺激细胞外基质合成,调节细胞的生长、分化及凋亡。BMP-2 是 BMPs 家族中的一员,大小为 26kD,由两个相同单体构成的二聚体蛋白多糖,具有促进合成代谢作用^[14,15]。先前研究^[16]发现退变的椎间盘组织中 hBMP-2 的表达与退变的程度呈正相关,BMP-2 具有拮抗退变的作用。Yoon 等^[17]在重组人 BMP-2(rhBMP-2)干预 SD 大鼠腰椎间盘纤维环和移行带细胞研究中发现 rhBMP-2 可以促进蛋白多糖的合成,增加 II 型胶原和聚集蛋白聚糖的 mRNA 表达^[18],并证实 BMP-2 可以上调 BMP-7 基因的表达,而 BMP-7 也能够促进椎间盘表达 II 型胶原和蛋白多糖。Wei 等^[19]证实

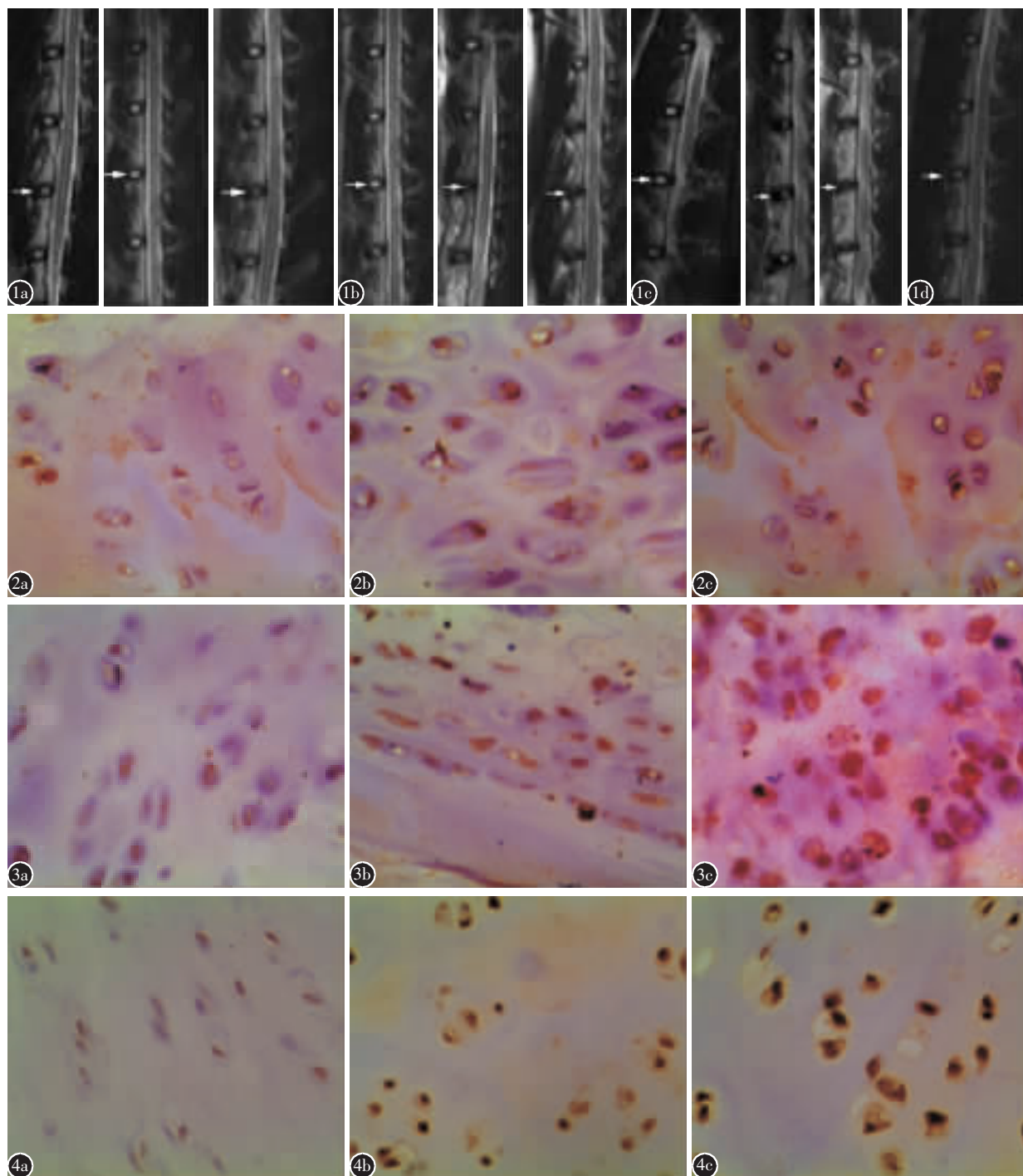


图 1 注射 AAV-hBMP-2 组各时间点髓核信号下降不明显,注射 AAV 组与生理盐水组各时间点髓核信号呈逐渐下降趋势(箭头所指为 L3/4 椎间盘) **a** 转染 2 周后各组 MRI 像 **b** 转染 4 周后各组 MRI 像 **c** 转染 8 周后各组 MRI 像(各图从左到右依次为注射 AAV-hBMP-2 组、注射 AAV 组、注射生理盐水组) **d** MRI 示髓核信号比正常低证明模型建立成功

图 2 A、B、C 三组注射后 4 周椎间盘髓核中 Fas 染色阳性结果,A、B、C 三组 Fas 染色随时间推移逐渐增强,但 A 组染色比 B 组、C 组浅(有棕褐色颗粒沉着为阳性细胞, $\times 400$) **a** A 组(注射 AAV-hBMP-2 组) **b** B 组(注射 AAV 组) **c** C 组(注射生理盐水组)

图 3 A、B、C 三组注射 4 周后椎间盘髓核中 Caspase-3 染色阳性结果,A、B、C 三组 Caspase-3 染色随时间推移逐渐增强,但 A 组染色比 B 组、C 组浅(有棕褐色颗粒沉着为阳性细胞, $\times 400$) **a** A 组(注射 AAV-hBMP-2 组) **b** B 组(注射 AAV 组) **c** C 组(注射生理盐水组)

图 4 A、B、C 三组转染 4 周后椎间盘髓核中 TUNEL 染色结果,A、B、C 三组 TUNEL 染色随时间推移逐渐增强,但 A 组染色比 B 组、C 组浅(有棕褐色颗粒沉着为阳性细胞, $\times 400$) **a** A 组(注射 AAV-hBMP-2 组) **b** B 组(注射 AAV 组) **c** C 组(注射生理盐水组)

BMP-7 能够抑制髓核细胞的凋亡。这说明 BMP-2 可能与其他 BMPs 一起参与控制细胞凋亡。

本实验中体内转染 AVV-hBMP-2 基因组, Fas、Caspase-3 和 TUNEL 检测的平均光密度值均明显低于单纯转染 AAV 组和注射生理盐水组 ($P<0.01$); MRI 显示, 体内转染 AVV-hBMP-2 基因组髓核信号明显高于单纯转染 AAV 组和生理盐水组, 相应的椎间盘改良 Thompson 分级要明显优于后两者 ($P<0.05$)。上述结果均提示体内转染 AAV-hBMP-2 基因能够抑制椎间盘髓核细胞 Fas 与 Caspase-3 蛋白的表达, 进而抑制细胞凋亡。虽然 BMP-2 能够抑制细胞凋亡, 但是 BMP-2 参与退变椎间盘调节作用的具体机制目前还不清楚, Le 等^[20]研究发现在人的椎间盘细胞中有 BMP 受体表达, 说明配体-受体模式可能是 BMP-2 对退变椎间盘发挥作用的一种方式, 但 BMP-2 是否还通过其他途径抑制细胞凋亡及如何抑制凋亡的机制仍不清楚, 有待于进一步的研究。

4 参考文献

- Nishida K, Doita M, Takada T, et al. Biological approach for treatment of degenerative disc diseases [J]. Clin Calcium, 2005, 15(3): 79-86.
- Masuda K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors [J]. Spine, 2008, 17(4): 441-451.
- Wehling P, Schulitz KP, Robbins PD, et al. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorder by local gene therapy [J]. Spine, 1997, 22(10): 1092-1097.
- Levicoff EA, Kim JS, Sobajima S, et al. Safety assessment of intradiscal gene therapy: effect of dosing and vector choice [J]. Spine, 2008, 33(14): 1509-1516.
- Sobajima S, Kompel JF, Kim JS, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology [J]. Spine, 2005, 30(1): 15-24.
- Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration [J]. Spine, 2005, 30(1): 5-14.
- 林鸿宽, 叶君健. 纤维环损伤诱导兔椎间盘退变模型 [J]. 解剖学杂志, 2008, 31(5): 699-702.
- Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc [J]. Spine, 2001, 26(22): 2414-2420.
- Ganey T, Libera J, Moos V, et al. Disc chondrocyte transplantation in a Canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc [J]. Spine, 2003, 28(23): 2609-2620.
- Takemura Y, Fukuo K, Yasuda O, et al. Fas signaling induces Akt activation and upregulation of endothelial nitric oxide synthase expression [J]. Hypertension, 2004, 43(4): 880-884.
- Meggiato T, Calabrese F, Decesare CM, et al. C-jun and cyp32 (caspase-3) in human pancreatic cancer: relation to cell proliferation and death [J]. Pancreas, 2008, 26(1): 65-70.
- 叶君健, 林金贵. 退变椎间盘组织细胞凋亡及相关基因 Fas 和 Bcl-2 蛋白的表达 [J]. 福建医科大学学报, 2007, 41(6): 506-508.
- Tschoeke SK, Hellmuth M, Hostmann A, et al. Apoptosis of human intervertebral discs after trauma compares to degenerated discs involving both receptor-mediated and mitochondrial-dependent pathways [J]. J Orthop Res, 2008, 26(7): 999-1006.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic protein [J]. Growth factors, 2004, 22(4): 233-241.
- Kim DJ, Moon SH, Kim H, et al. Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic phenotype of human intervertebral disc cells [J]. Spine, 2003, 28(24): 2679-2684.
- 李慧章, 傅冷西, 叶君健. 骨形态发生蛋白-2 和 II 型胶原在退变椎间盘髓核组织中的表达及意义 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2007, 17(9): 706-709.
- Yoon ST, Kim KS, 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.
- Li J, Yoon ST, Hutton WC. Effect of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) on matrix production, other BMPs, and BMP receptors in rat intervertebral disc cells [J]. J Spinal Disord Tech, 2004, 17(5): 423-428.
- Wei A, Brisby H, Chung SA, et al. Bone morphogenetic protein-7 protects human intervertebral disc cells in vitro from apoptosis [J]. Spine, 2008, 33(3): 466-474.
- Le Maitre CL, Richardson SM, Baird P, et al. Expression of receptors for putative anabolic growth factors in human intervertebral disc: implications for repair and regeneration of the disc [J]. J Pathol, 2005, 207(4): 445-452.

(收稿日期: 2009-11-16 修回日期: 2010-03-15)

(英文编审 蒋欣/郭万首)

(本文编辑 刘彦)