文章编号:1000-5404(2006)11-1209-03

论著

腺病毒介导的 TGF-β_1 基因在兔髓核细胞中的表达

李华壮,周 跃,张传志,郭国宁,郭志良 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要:目的 检测腺病毒介导的转化生长因子(transforming growth factor β_1, TGF-β_1)基因在兔髓核细胞中的表达及其对蛋白多糖的调节作用。**方法** 体外分离培养兔髓核细胞,以腺病毒为载体将 TGF-β_1 基因转染至髓核细胞内,RT-PCR 和免疫组化方法检测 TGF-β_1 的表达,并检测其对髓核细胞基质中蛋白多糖含量的影响。**结果** 兔髓核细胞贴壁及生长的速度均十分缓慢,Ad-TGF-β_1 转染的髓核细胞内可检测到 TGF-β_1 基因的表达,并且可持续到8周,Ad-TGF-β_1 转染后的髓核细胞合成蛋白多糖的量增加。**结论** 腺病毒介导的 TGF-β_1 基因可以在髓核细胞内得到持续的表达,并且产生明显的生物学效应。

关键词:转化生长因子 β_1;髓核细胞;表达
中图法分类号:R323.4;R329.24;R394.8 **文献标识码**:A

Expression of recombinant adenovirus-mediated TGF-β_1 gene in rabbit nucleus pulposus cells

LI Hua-zhuang, ZHOU Yue, ZHANG Chuan-zhi, GUO Guo-ning, GUO Zhi-liang (Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression of transforming growth factor β_1 (TGF-β_1) gene mediated by adenovirus in rabbit nucleus pulposus cells and its biological effects on proteoglycans. **Methods** The rabbit nucleus pulposus cells were isolated and cultured *in vitro*. After transduced into the rabbit nucleus pulposus cells mediated by adenovirus, the expression of TGF-β_1 gene was evaluated with RT-PCR and immunohistochemical methods and its biological effects on proteoglycans was evaluated. **Results** The amount of nucleus pulposus cells cultured *in vitro* increased slowly. The expression of TGF-β_1 gene could be detected in the nucleus pulposus cells transfected with Ad-TGF-β_1, and persisted 8 weeks. The content of proteoglycans synthesized by nucleus pulposus cells increased when tansfected with Ad-TGF-β_1. **Conclusion** The TGF-β_1 gene mediated by adenovirus could persistently express in nucleus pulposus cells, and produce biological effects on nucleus pulposus cells.

Key words: transforming growth factor β_1; nucleus pulposus cells; expression

椎间盘退变是影响人类健康的常见病,一旦开始退变,则难以逆转。近年来对椎间盘退变的分子生物学发病机制进行了大量的研究。虽其确切的发病机制尚不清楚,但大多数学者认为:细胞因子减少和炎症因子增多,导致基质金属蛋白酶活性增加,细胞外基质降解加速,髓核进行性脱水,椎间盘细胞生存的内环境被破坏,出现了椎间盘退变,提出应用基因治疗和组织工程相结合的椎间盘再生治疗新思路[1,2]。

本研究拟将具有多重生物学效应的转化生长因子 β_1(transforming growth factor β_1, TGF-β_1)基因导入体外培养的兔髓核细胞中,检测其表达及生物学效应。为用基因强化组织工程学(gene-enhanced tissue engineering)技术高质量地修复退变椎间盘提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 兔髓核细胞的分离及原代培养

4周龄日本大耳白兔10只(第三军医大学新桥医院实验动物中心提供),体质量(450±25)g,雌雄不拘。称重后按0.5%戊巴比妥钠0.1 mg/kg肌注处死。无菌条件下将胸腰段脊柱整段取出,尖刀切开椎间盘纤维环,用眼科镊将胶冻状髓核完整取出,放入培养皿中PBS漂洗3遍,眼科剪将髓核进一步剪碎后转移至一离心管中,低速离心(900×g,5 min),收集沉淀。用0.25% Ⅱ型胶原酶消化液重悬组织,37 ℃消化15~20 min,期间间断用吸管轻轻吹打,待组织大部消化、培养液浑浊后停止消化,200目不锈钢网过滤,收集悬液,900×g 离心

作者简介:李华壮(1970-),男,山东省青州市人,博士,主治医师,主要从事脊柱外科和创伤方面的研究。电话:13594157855
通讯作者:周 跃,E-mail:happyzhou@vip.163.com
收稿日期:2005-11-29;修回日期:2006-03-17

8 min。细胞计数后，稀释细胞至 1×10^5/ml，接种细胞到100 ml塑料培养瓶中，生长培养液为 DMEM/F12（含 10% Hyclone 优胎、青霉素 10 万 U/L、链霉素 0.1 g/L，左旋谷胺酰胺 2 mmol/L，pH7.0），置于 37 ℃、饱和湿度、含 5%（体积分数）CO_2 的孵箱中培养。倒置显微镜每天观察细胞生长情况，3 d 换液 1 次。细胞融合为单层时用胰蛋白酶消化并进行细胞传代。进行甲苯胺蓝染色和Ⅱ型胶原免疫组化染色鉴定。

1.2 Ad-TGF-β_1 转染兔髓核细胞

将原代细胞传按 1∶2 代至 75 cm^2 培养瓶中，其中 1 瓶放有消毒的小盖玻片，待细胞融合 50% ~70% 时，按 200 pfu/cell 加入无血清无抗生素培养基稀释的 Ad-TGF-β_1（由英国曼彻斯特大学的 Kingston 博士惠赠），在 37 ℃，5% CO_2 条件下孵育，并间断轻微摇动培养瓶，使病毒液充分与细胞接触，4 h 后加入含 10% 胎牛血清和抗生素的 DMEM/F12 培养液，24 h 后将培养液倒掉，加入新鲜培养液。

1.3 TGF-β_1 免疫组化检测

在转染 3 d、1、2、4、8 周时，取出培养瓶中的盖玻片，按照 TGF-β_1 免疫组化试剂盒进行 TGF-β_1 免疫组化染色，DAB 显色，以细胞质内出现明确棕黄色颗粒为 TGF-β_1 阳性表达，将观察结果输入计算机图像分析仪，在 20×20 视野下，随机选择 5 个视野，以计算阳性细胞占细胞总数的比例和测量阳性区域灰度值的方法判定 TGF-β_1 表达程度，共计数 10 次，每个时间点 6 个标本。

1.4 RT-PCR 检测 TGF-β_1 mRNA 的表达

在转染 3 d、1、2、4、8 周时收集细胞，按照试剂盒说明提取 RNA 做 RT-PCR，检测 TGF-β_1 和Ⅱ型胶原 mRNA 的表达。TGF-β_1 上游引物：5′-GCAACAATTCCTGGCGATAC-3′；下游引物：5′-AGGCAGAAGTTGGCATGGTAG-3′，扩增片段 445 bp。β-actin 上游引物：5′-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′；下游引物：5′-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′，扩增片段 540 bp。琼脂糖凝胶电泳条带图像输入电脑，使用 Bandlead 电泳图像分析软件分析，得到代表各电泳条带强度的像素强度值。将目的条带的检测值与同一样本的 β-actin 条带的检测值相比得到的比值即代表目的基因的相对表达量。

1.5 Ad-TGF-β_1 转染对髓核细胞基质中糖醛酸含量的影响

Ad-TGF-β_1 转染和未转染的髓核细胞分别培养 3 d、1、2、4、8 周，每 3 天换培养液 1 次，收集培养液，终止培养时收获细胞，用咔唑硫酸法[3]测基质中糖醛酸含量，每个时相点 6 个标本。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

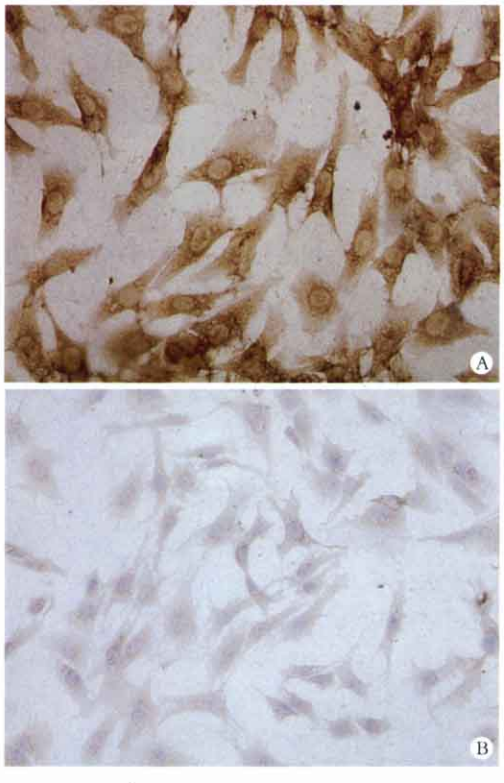
2 结果

2.1 细胞培养及鉴定结果

髓核细胞贴壁速度相当缓慢，72 ~96 h 才可以见到部分细胞黏附，5 d 左右方可以见到细胞铺展和明显的岛状克隆形成。贴壁生长的细胞呈多角形或梭形，细胞核成圆形，分界清楚，核仁明显，常见 2 个至多个核仁，细胞质较淡，近核处可见较多细小颗粒。细胞增殖能力较弱，20 d 可以到达 90% 融合。第 1 代细胞尚能保持类似原代培养的细胞，贴壁时间同原代细胞，18 d左右可以到达 90% 融合。第 2 代细胞增殖能力明显降低，很难达到 90% 融合，已不能再次传代，并且在培养液中出现较多黑色颗粒状物，细胞形态逐渐呈现梭形改变。培养细胞Ⅱ型胶原免疫组化染色阳性，进行甲苯胺蓝染色可见细胞质内有大量的基质成分异染。

2.2 TGF-β_1 免疫组化检测结果

TGF-β_1 免疫组化染色结果显示，Ad-TGF-β_1 转染细胞阳性（图 1A），在 3 d、1 周和 2 周时阳性细胞数量较多，4 周时阳性细胞数量减少，8 周时只有少量阳性细胞；未转染细胞为阴性或弱阳性（图 1B），表示 TGF-β_1 编码基因成功导入兔髓核细胞并表达相应蛋白。定量分析结果显示，在各时相点，Ad-TGF-β_1 转染细胞与未转染细胞相比，阳性细胞数量（表 1）和灰度值（表 2）均有显著性差异（$P<0.01$）。



A：Ad-TGF-β_1 转染细胞；B：未转染细胞

图 1 兔髓核细胞 TGF-β_1 免疫组化染色（SABC×200）

表 1 TGF-β_1 免疫组化阳性细胞百分比[$n=6$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	3 d	1 周	2 周	4 周	8 周
实验组	89.66±4.62[a]	91.25±2.89[a]	85.86±5.19[a]	53.31±9.66[a]	16.59±7.77[a]
对照组	3.70±2.37	2.67±1.13	3.22±1.19	3.17±2.10	2.99±1.48

a：$P<0.01$，与对照组比较

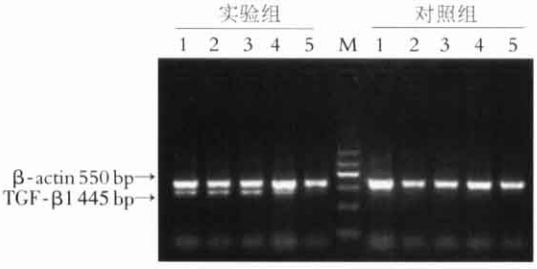
表 2 TGF-β_1 免疫组化阳性细胞灰度值（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	3 d	1 周	2 周	4 周	8 周
实验组	65.92±13.45[a]	61.36±16.71[a]	70.14±12.18[a]	138.75±22.19[a]	232.45±23.62[a]
对照组	273.99±17.30	276.81±10.92	271.89±9.70	268.41±15.89	276.44±5.76

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.3　RT-PCR 检测 TGF-β_1 mRNA 的表达

如图 2 所示，在各时相点，Ad-TGF-β_1 转染细胞均可检测到 TGF-β_1 mRNA 表达，3 d、1 周和 2 周时表达较强，4 周时表达开始减弱，8 周时仍可见微弱表达，对照组未见明显阳性目的条带。



1：3 d；2：1 周；3：2 周；4：4 周；5：8 周；M：标准

图 2　RT-PCR 检测 TGF-β_1 mRNA 表达

2.4　Ad-TGF-β_1 转染对髓核细胞基质中糖醛酸含量的影响

与未转染的髓核细胞相比，Ad-TGF-β_1 转染后的髓核细胞基质中糖醛酸含量明显增高，差异显著（$P<0.05$）（表 3）。

表 3　Ad-TGF-β_1 转染对髓核细胞基质中糖醛酸含量的影响

（ρ_B/mg · L^{-1}，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	3 d	1 周	2 周	4 周	8 周
实验组	141.8 ± 8.2[a]	148.7 ± 9.3[a]	171.4 ± 3.4[a]	158.7 ± 9.9[a]	132.5 ± 7.6[a]
对照组	87.9 ± 6.9	82.8 ± 6.8	98.8 ± 4.1	95.4 ± 5.4	76.6 ± 5.7

a：$P<0.05$，与对照组比较

3　讨论

髓核细胞是椎间盘髓核中的功能细胞，细胞功能的维持和正常发挥是保证髓核中细胞外基质正常合成和改建的前提。髓核细胞以类软骨细胞和脊索细胞为主，分化程度高，相对不分裂。随着椎间盘退变，脊索细胞消失，类软骨细胞逐渐坏死并在功能和形态上向类成纤维细胞转化[4]。髓核细胞的增殖能力较一般细胞弱，故其培养过程中要求是非常严格的。本实验中，培养基采用 DMEM/F12 培养基加 10% 胎牛血清以及 2 mmol/L 的左旋谷胺酰胺，pH 值为 7.0，每 3 天换液 1 次，以保证细胞有良好的生长环境[5]。髓核细胞经过传代，细胞形态逐渐呈现梭形改变，说明其类软骨细胞逐渐向类成纤维细胞转化。

腰椎间盘退变是引发腰背痛的主要原因之一，有关椎间盘组织退变的发生、发展是一缓慢而又复杂的过程，具体的病理生理机制目前尚不完全清楚。经过大量的实验研究显示，椎间盘细胞是高度分化细胞，细胞分裂极不活跃。蛋白多糖是构成椎间盘髓核组织主要的基质成分，当蛋白多糖含量减少，以及髓核中Ⅱ型胶原降低时，退变也随之发生[6,7]。TGF-β_1 具有多重生物学效应，能促进未分化和分化早期的软骨细胞增殖，并刺激Ⅱ型胶原和蛋白多糖的合成。髓核细胞为类软骨细胞，因此，TGF-β_1 基因可作为椎间盘组织退变基因治疗和组织工程修复有效的目的基因。但外源性生长因子半衰期短，常需反复大剂量使用，通过何种方法使生长因子持续高效发挥作用一直是基因治疗和组织工程学研究的关键问题。利用转基因技术将外源性目的基因转入种子细胞，通过转基因细胞在缺损局部持续高效表达高生物活性的内源性生长因子，有可能解决这一关键问题[8,9]。腺病毒可以高效转染非分裂期细胞[10]，而髓核细胞即为相对不分裂细胞。另外，髓核细胞被纤维环包裹并且没有血供，可以看做是免疫豁免的组织，能够避免宿主的免疫反应。

在本研究中，我们以腺病毒为载体，将兔椎间盘髓核细胞作为基因转染的靶细胞，RT-PCR 和免疫组织化学染色结果显示，TGF-β_1 基因成功转入兔椎间盘髓核细胞，并能够表达相应蛋白，至少可维持 8 周。说明髓核细胞虽然生长能力较弱，但外源性基因仍然可以在细胞内得到持续的表达；腺病毒在椎间盘组织退变基因治疗和组织工程修复的研究中，是一个较理想的载体。Ad-TGF-β_1 转染后的髓核细胞合成蛋白多糖的量增加，提示 TGF-β_1 基因可作为椎间盘组织退变基因治疗和组织工程修复有效的目的基因。为椎间盘组织退变的基因治疗和基因强化组织工程学技术高质量地修复退变椎间盘提供了实验依据。然而，仍需对其在体内的表达及生物学效应进行更深入的研究。

参考文献：

[1] GRUBER H E, HANLEY E N, Jr. Biologic strategies for the therapy of intervertebral disc degeneration[J]. Expert Opin Biol Ther, 2003, 3(8): 1209 - 1214.

[2] GUIOT B H, FESSLER R G. Molecular biology of degenerative disc disease[J]. Neurosurgery, 2000, 47(5): 1034 - 1040.

[3] TRIPPEL S B. Growth factor actions on articular cartilage[J]. J Rheumatol Suppl, 1995, 43: 129 - 132.

[4] 胡有谷. 腰椎间盘突出症[M]. 第 3 版. 北京：人民卫生出版社，2004：9.

[5] MOON S H, GILBERTSON L G, NISHIDA K, *et al*. Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer: implications for the clinical management of intervertebral disc disorders[J]. Spine, 2000, 25(20): 2573 - 2579.

[6] ADLER J H, SCHOENBAUM M, SILBERBERG R. Early onset of disk degeneration and spondylosis in sand rats (Psammomys obesus)[J]. Vet Pathol, 1983, 20(1): 13 - 22.

[7] PEARCE R H, GRIMMER B J, ADAMS M E. Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc[J]. J Orthop Res, 1987, 5(2): 198 - 205.

[8] GRANDE D A, BREITBART A S, MASON J, *et al*. Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions[J]. Clin Orthop Relat Res, 1999, (367 Suppl): S176 - S185.

[9] SETO H, TANAKA S, SETO H, *et al*. Relationship between gene transfer and cartilage tissue engineering[J]. Clin Calcium, 2004, 14(7): 72 - 75.

[10] ROBBINS P D, GHIVIZZANI S C. Viral vectors for gene therapy[J]. Pharmacol Ther, 1998, 80(1): 35 - 47.

（编辑　王　红）