论著

文章编号:1000-5404(2014)10-1036-04

成人髓核细胞特征性表达基因的筛选与验证

李海音,李长青 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[摘要] **目的** 筛选及验证成人健康髓核细胞特征性的表达基因。**方法** 取2012年4月至2013年12月于我科行脊柱骨折内固定手术患者的髓核及终板软骨组织共13例实验标本。分别对10例标本髓核细胞和终板软骨细胞进行单层培养,提取总RNA、反转录,进行微阵列基因芯片对比分析。通过Real-time PCR分析表达差异较大的基因在转录水平的表达。取余下3对标本经单层培养后对差异表达最大的基因进行Western blot检测,分析蛋白水平的表达。**结果** 通过对髓核细胞和终板软骨细胞进行微阵列基因芯片分析得到15个表达差异在20倍以上的基因。随后通过对这些基因进行Real-time PCR分析,发现POTEB在两种细胞间表达差异最大。Western blot检测证明POTEB在髓核细胞中的表达明显高于软骨细胞。**结论** POTEB可作为髓核组织工程种子细胞特征性的表达基因。

[关键词] 髓核;软骨终板;基因表达
[中图法分类号] R329.2;R394.2 [文献标志码] A

Selection and Identification of specific marker of nucleus pulposus cells

Li Haiyin, Li Changqing (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To select and identify the specific cell marker of healthy human nucleus pulposus cells. Methods Samples were taken from 13 patients who underwent spine fracture internal fixation in Xinqiao Hospital during Apr. 2012 to Dec. 2013. For each patient, healthy nucleus pulposus and cartilage endplate were collected. Total RNA extraction and reverse transcription were performed after monolayer culture of nucleus pulposus cells and chondrocytes from 10 patients separately and the differentially expressed genes were analyzed with microarray gene chip. The same samples were subjected to real-time PCR to evaluate the expression difference on the transcription level. Western blotting was performed to identify the genes with the greatest expression difference on the protein level in the samples from other 3 patients. Results Fifteen genes with greater than 20 fold change were found with microarray gene chip. POTEB was proven by real-time PCR results to be the gene with the greatest expression difference. It was identified with Western blot analysis that POTEB expression level was much higher in the nucleus pulposus cell than in the chondrocyte. Conclusion POTEB is considered a specific marker for nucleus pulposus cell.

[**Key words**] nucleus pulposus, endplate cartilage, gene expression

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC 2009BB5324). Corresponding author: Li Changqing, E-mail:changqli@163.com

腰椎退行性疾病的发病率逐渐增高,其治疗多采用外科手术。但是手术治疗可能带来各种并发症,从而进一步影响患者的生活质量 。近年来,髓核组织工程技术为腰椎退行性疾病的生物治疗带来了希望。但是由于髓核细胞来源较少,所以体外扩增髓核细胞是髓核组织工程中种子细胞研究的重要问题。目前的研究主要集中于将干细胞向髓核细胞分化,以期望能恢复椎间盘的生物力学特性[1-4]。

但是,由于目前髓核细胞缺乏特征性的标志物,所以尚无法确定共培养后的细胞是否为髓核细胞。由于成熟的髓核细胞为“类软骨细胞”,因此,目前有关髓核细胞的鉴定均使用与软骨细胞相同的标志物,如Ⅱ型胶原和sox-9[1]等。然而有学者将兔软骨细胞移植入退变椎间盘内,却在椎间盘内形成了透明软骨[2]。而采用髓核细胞却取得了良好的效果[3]。这些研究结果提示了髓核细胞和软骨细胞功能上并不相同。

目前,在人体标本中,Power等[5]取尸体的髓核与软骨比较得出CAⅫ可作为髓核细胞的标志物。但是

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5324)
[通信作者] 李长青, E-mail: changqli@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0956.019.html(2014-3-28)

由于Power所取标本为退变的髓核,所以并不能完全揭示髓核细胞特征性表达基因。本研究通过比较健康髓核以及终板软骨筛选出人髓核细胞标志性表达基因。

1 材料与方法

1.1 材料

取2012年4月至2013年12月于我科行脊柱骨折内固定手术患者的髓核及终板软骨组织共13例实验标本。DMEM/F12培养基、胰酶购自Hyclone公司,胎牛血清(FBS)购自Gibco公司,Mix *Taq* 购自TaKaRa公司,Trizol购自Invitrogen公司,SYBR Green Master购自Roche公司。兔抗POTEB多克隆抗体、辣根过氧化物酶羊抗兔二抗购自Santa公司。

1.2 研究对象

入组标准:年龄25~35岁;根据Thompson分级[6],术前腰椎间盘MRI检查均为1~2级;患者受伤前无明显慢性腰痛史。排除脊柱肿瘤、结核和感染患者。患者术前均签署知情同意书,本研究经第三军医大学伦理委员会认证。

1.3 细胞分离、培养

用PBS缓冲液清洗手术取出的髓核及终板软骨,在体视显微镜(×4)下去除纤维环以及软骨下骨,分离终板软骨和髓核。用眼科剪和眼科镊分别将组织剪至1 mm×1 mm×1 mm大小。加入0.2% Ⅱ型胶原酶(Sigma)10 mL,混匀后放至37 ℃,5% CO_2细胞培养箱8 h。待组织完全消化,吹打数次后将其通过70 μm滤网,将收集到的滤液1 500×g离心10 min,离心后弃上清,重新悬浮细胞后接种于70 cm^2培养瓶中,加入含10%胎牛血清(Gibco)和1%青霉素+链霉素的DMEM/F12。待细胞完全贴壁后,每隔2 d换液。待细胞长满培养瓶后,胰酶(Hyclone)消化细胞,细胞计数。取1 mL细胞至35 mm×12 mm培养皿,待细胞贴壁后,加入阿尔辛蓝(上海源叶,1%,pH=1)染料。其余细胞200×g离心10 min,PBS洗涤1次,收集至-70 ℃待用。

1.4 RNA提取及反转录

本实验采用TRIzol法提取细胞总RNA。取10对髓核及终板软骨细胞溶于40 μL DEPC水后,取2 μL RNA稀释50倍,紫外分光光度计测定光密度 $D(260)/D(280)$ 值。取2 μg的RNA。反转录所得cDNA于-70 ℃待用。

1.5 微阵列基因芯片分析

实验由生物芯片上海国家工程研究中心完成。实验采用Agilent人类全基因芯片,共20个标本。样本经RNA提取及纯化,检测RIN。将RNA反转录为cDNA,测其浓度后,掺入荧光标记Cy3和Cy5后,上样,进行基因芯片分析。

1.6 Real-time PCR检测

对上述10对标本进行Real-time PCR检测,进一步明确转录水平的表达。Real-time PCR采用SYBRGreen法,在PCR System 7500(Applied Biosystems)上完成。引物序列见表1。内参选用β-actin。20 μL PCR体系如下:cDNA 2 μL,正反引物各0.5 μL,SYBRGreen 10 μL,H_2O 7 μL。反应条件:94 ℃,5 min→(94 ℃,30 s→57 ℃,30 s→72 ℃,30 s)×40个循环→72 ℃,10 min。通过扩增曲线得到各基因的Ct值。

1.7 Western blot检测

取3例样本进行细胞培养后,收集细胞,加入裂解液,冰上裂解30 min,4 ℃ 12 000 r/min离心15 min,用BCA法检测蛋白浓度。根据POTEB的相对分子质量确定8% SDS-PAGE胶。加样孔中加入适量经高温变性的蛋白样品后接通电源。电泳结束后,采用半干法转膜。将PVDF膜在无水甲醇中浸泡10 s,放入已浸泡滤纸和海绵垫的电转液中5 min。根据条带大小切取胶条,放于PVDF膜上,组装完成后100 V 1 h。转膜后按顺序加入兔抗POTEB多克隆抗体(1∶200,Santa Cruz)及二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG 1∶2 000,Santa Cruz),37 ℃ 1 h;TBS-T洗膜,DAB显色。内参选用β-actin,步骤同上。暗室曝光可得结果。将所得条带用ImageJ软件进行灰度分析。

1.8 统计学分析

实验重复3次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用SPSS 18.0统计软件进行两独立样本 t 检验。

表1 Real-time PCR引物序列

基因名称	NCBI序列号	上游引物5′→3′	下游引物5′→3′	片段大小(bp)
ANXA8L2	NM_001630	CCAGCCCCATTCCCATCTAC	CGGCTGCATGATAGAGAAGTGTT	103
ATRNL1	NM_207303	TTGCCCTTCCTCTCCTAGCTGC	GCGCTCGTGTTGGGAAGAAGAC	185
CDH2	NM_001792	CGCGTGAAGGTTTGCCAGTGTG	GGCGTTCTTTATCCCGGCGTTTC	172
DNAJC12	NM_021800	AAAGAACCCAAGCCCCTAGAG	GGCAGCATAGGGGACAGTCTT	202
EGR4	NM_001965	GGCGGACATCCCTGGAAG	CAAAGCTCCGCACACAACTCT	188
HOXB6	NM_018952	CCCCGTTCCACCCCGAGC	GGCGTGCGCGATCTCGA	257
HOXB8	NM_024016	CCGTCGCCCACACAGCTC	GCCGCTTACGAGTCAGATAGGG	142
LECT1	NM_007015	TGCGGTGACCTTCCTATTTTCTG	GCTTTCCCCTTCCTGCTGATGA	231
PLEKHG1	NM_001029884	CCCGGTTCCAGCGATTCTC	CCCGCCTCTACTAACAACACAAA	101
POTEB	NM_207355	TGGGGAGACTACGACGACAGC	CGGCCTTTATCAGAGCTGTCCT	283
ROBO4	NM_019055	CCCATCCTTAGCCCCTGCAGTC	CTGCCCATGTCCGTGAACTCTGA	278
SCGB2A2	NM_002411	CGGCCCTCTCCCAGCACTG	GGCATTTGTAGTGGCATTGTCGT	146
SLC24A3	NM_020689	GGCGTTCGTCTCTCCTGTGC	GCTGGAAAAGTCACGTGGATGTT	164
SPTLC3	NM_018327	GGCAGGAGGGTAAAGAAATGTTG	GCTTGCTTTCTGCCCCTTTTCT	245
TNFSF11	NM_003701	CGCGTATTTACAGCCAGTGGGAG	GGGCACATGACCAGGGACCAA	168

2 结果

2.1 细胞培养及鉴定

细胞培养采用70 cm^2 细胞培养瓶,胰酶消化细胞后,计数细胞数量为(1~2.5)×10^5/mL。髓核细胞与软骨细胞大小及形态均相似,成梭状,镜下可见"铺路石"样(图1)。椎间盘内可能会有成纤维细胞、免疫细胞等其他细胞,因此采用阿尔辛蓝染色鉴定。阿尔辛蓝染色可见细胞均呈蓝色,染色阳性,说明此细胞能分泌蛋白多糖分子,证明培养中无其他细胞污染(图1)。

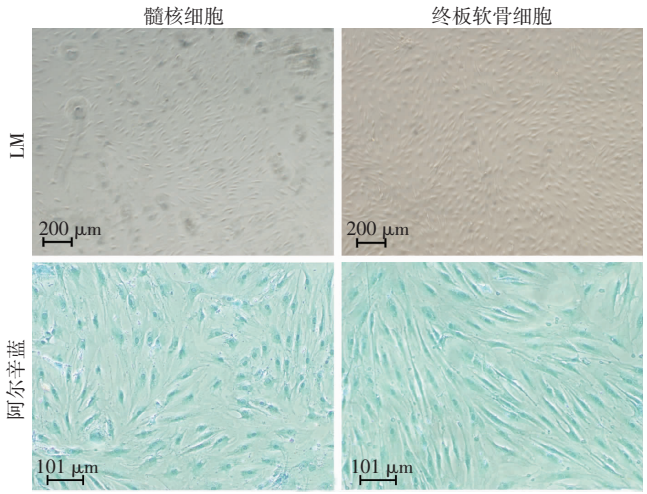


图1 髓核细胞与软骨细胞培养及鉴定结果

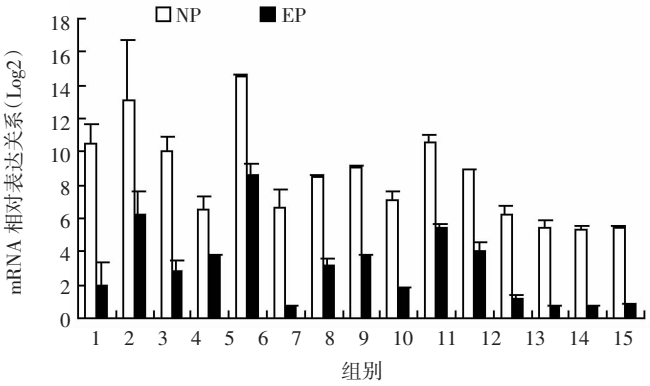
2.2 基因芯片分析

送检的10例标本经RNA提取后检测RIN(RIN>7),检测结果合格,可进行基因芯片分析。此基因芯片总共分析30 413个转录片段,包含了以往所确定的差异性表达基因,但是结果显示其差异较小,并不足以区分两种细胞。

采用倍数变化法(Fold Change)对基因芯片结果进行初步筛选差异性表达的基因(图2),选取表达差异倍数达20倍以上的基因(表2)进行下一步分析,共获得15个基因,通过Real-time PCR验证mRNA水平的表达。

2.3 Real-time PCR 检测

选用β-actin作为内参,实验所得Ct值均采用$2^{-\Delta t}$法检测15个基因在mRNA水平的表达量。实验所得溶解曲线呈单峰,说明无引物二聚体干扰;扩增曲线中,各曲线斜率基本一致,说明实验一致性较好。通过扩增曲线得到各基因Ct值。实验结果显示POTEB(3.36±0.15)、ROBO4(1.44±0.21)以及EGR4(1.82±0.78)在髓核细胞和软骨细胞中表达均具有显著统计学差异($P<0.01$)。在这3个基因中,POTEB在髓核细胞和软骨细胞中表达差异最大。

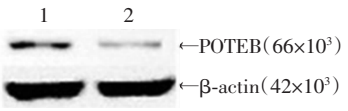


1: SLC24A3; 2: HOXB6; 3: SPTLC3; 4: ANXA8L2; 5: LECT1; 6: POTEB; 7: ROBO4; 8: TNFSF11; 9: CDH2; 10: EGR4; 11: DNAJC12; 12: ATRNL1; 13: PLEKHG1; 14: HOXB8; 15: SCGB2A2

图2 基因芯片中表达差异在20倍以上基因的相对表达关系

2.4 Western blot 检测

Western blot结果显示,POTEB在髓核细胞和终板软骨细胞中的表达分别为(30.65±2.89)%、(13.22±1.45)%,二者差异具有统计学意义($P<0.01$,图3)。



1:髓核细胞;2:终板软骨细胞

图3 Western blot检测髓核细胞与终板软骨细胞中POTEB的蛋白表达

3 讨论

由于腰椎退行性疾病的外科治疗存在明显的局限

表2 基因芯片中表达差异在20倍以上的基因

基因名称	NCBI号	髓核/终板软骨(差异倍数)	髓核细胞信号值(Log2)	终板软骨细胞信号值(Log2)	基因全称
SLC24A3	NM_020689	366.29	10.50466	1.987819	Solute carrier family 24
HOXB6	NM_018952	112.8671	13.05186	6.233374	Homeobox B6
SPTLC3	NM_018327	146.9476	9.982175	2.783017	Serine palmitoyl-transferase, long chain base subunit 3
ANXA8L2	NM_001630	6.966245	6.512235	3.711854	Annexin A8-like 2
LECT1	NM_007015	61.42463	14.55636	8.615618	Leukocyte cell derived chemotaxin 1
POTEB	NM_207355	62.27946	6.663996	0.703311	POTE ankyrin domain family, member B
ROBO4	NM_019055	40.30779	8.470844	3.137858	Roundabout homolog 4
TNFSF11	NM_003701	40.60632	9.027008	3.683376	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
CDH2	NM_001792	37.28399	7.050607	1.830122	Cadherin 2
EGR4	NM_001965	34.65668	10.52938	5.414319	Early growth response 4
DNAJC12	NM_021800	29.30629	8.937395	4.064256	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12
ATRNL1	NM_207303	33.15536	6.228893	1.177722	Attractin-like 1
PLEKHG1	NM_001029884	26.58292	5.474545	0.742117	Pleckstrin homology domain containing, family G , member 1
HOXB8	NM_024016	25.22979	5.371381	0.714325	Homeobox B8
SCGB2A2	NM_002411	24.05846	5.433262	0.844789	Secretoglobin, family 2A, member 2

性,随着组织工程研究的深入,其在腰椎退行性疾病治疗中的地位愈发凸显。特别是干细胞,如骨髓间充质干细胞[1-2],其向髓核细胞定向分化后移植入体内已显示出初步的治疗前景。但是由于缺乏髓核细胞的特征性表达蛋白,所以无法确定 BMSC 分化后的细胞是否为髓核细胞。胚胎发育方面两者有明显的差异。组织学上,软骨组织中多为大分子的蛋白聚糖多聚物,蛋白聚糖与Ⅱ型胶原之比为2∶1;而髓核中主要为小分子的蛋白聚糖单体,且蛋白聚糖与Ⅱ型胶原比为27∶1。说明髓核细胞和软骨细胞在多方面存在差异,理论上髓核细胞有区分于软骨细胞的细胞标志物。

Power 等[5]认为 CAⅫ是髓核细胞的一个新型的标志物,在髓核中高表达对髓核细胞在低 pH 环境下的生存有重要作用。CAⅫ的主要作用是可逆性地催化二氧化碳与水产生碳酸氢根的过程,维持细胞内外的酸碱平衡环境[7]。Power 等[5]在实验中总共取得7例标本进行微阵列基因芯片和 Real-time PCR 分析,其中仅3例 Thompson 分级1~2级,其他均为3级以上;并且明确提出,CAⅫ的表达与髓核的退变有密切联系。所以,CAⅫ无法作为确定的成人健康髓核细胞的特征性表达基因。

本实验采用微阵列基因芯片初步分析髓核细胞和软骨细胞的基因表达谱,采用 Real-time PCR 法对表达差异较大的基因进行进一步的分析,发现 Real-time PCR 与基因芯片的结果并不完全一致。这是因为基因芯片分析的数据量较大,所以基因芯片的结果在特异性上较 Real-time PCR 弱,但仍不失为全基因组分析的一种良好的手段。本研究发现 POTEB 为成人健康髓核细胞特征性表达基因。POTEB 属于 POTE 家族性蛋白,主要分布于各种肿瘤组织以及正常的前列腺、卵巢、胎盘以及睾丸中[8-9]。同其他 POTE 家族蛋白一样,POTEB 的 N 末端包含了37个氨基酸的富含亮氨酸的序列,中间为6个锚蛋白重复序列(ANKRD),以及 C 末端的血影蛋白序列[9]。研究发现 POTE 家族蛋白在抗凋亡中发挥了作用[10]。POTEB 蛋白主要结构特点为中间的6个锚蛋白重复序列,而锚蛋白重复序列可以与多种蛋白结合,其中包括 FIH-1。Coleman 等[11]发现在 Hela 细胞中激活 Notch-1 信号通路可以抑制 FIH 对 HIF-1α 的羟化作用,从而减少对其的抑制,说明 FIH 可以通过与其他含有 ANKRD 的蛋白质结合从而减少对 HIF-1α 的抑制作用,而 HIF-1α 在髓核细胞低氧环境中的生存具有重要意义[12-13]。上述猜想需进一步研究证实。

本实验仍然存在不足。椎间盘的环境比较特殊,由于其不存在血管,所以椎间盘内的 pH 值和氧浓度均较低。实验证明,在低氧、低 pH 值环境下,髓核细胞的代谢会发生改变[14]。那么在此条件下,髓核细胞以及终板软骨细胞的表型是否会发生改变还需进一步的研究证明。

参考文献:

[1] Jin E S, Min J, Jean S R, *et al*. Analysis of molecular expression in adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: prospects for use in the treatment of intervertebral disc degeneration[J]. J Korean Neurosurg Soc, 2013, 53(4): 207-212.

[2] Yuan M, Yeung C W, Li Y Y, *et al*. Effects of nucleus pulposus cell-derived acellular matrix on the differentiation of mesenchymal stem cells [J]. Biomaterials, 2013, 34(16): 3948-3961.

[3] Gorensek M, Jaksimovic C, Kregar-Velikonja N, *et al*. Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes[J]. Cell Mol Biol Lett, 2004, 9(2): 363-373.

[4] Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study[J]. Spine (Phila Pa 1976), 1998, 23 (14): 1531-1538.

[5] Power K A, Grad S, Rutges J P, *et al*. Identification of cell surface-specific markers to target human nucleus pulposus cells: expression of carbonic anhydrase XII varies with age and degeneration[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(12): 3876-3886.

[6] Thompson J P, Pearce R H, Schechter M T, *et al*. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc[J]. Spine (Phila Pa 1976), 1990, 15(5): 411-415.

[7] Chiche J, Ilc K, Laferriere J, *et al*. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase Ⅸ and Ⅻ promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH[J]. Cancer Res, 2009, 69(1): 358-368.

[8] Huang Y H, Terabe M, Pendleton C D, *et al*. Identification and enhancement of HLA-A2.1-restricted CTL epitopes in a new human cancer antigen-POTE[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e64365.

[9] Bera T K, Zimonjic D B, Popescu N C, *et al*. POTE, a highly homologous gene family located on numerous chromosomes and expressed in prostate, ovary, testis, placenta, and prostate cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(26): 16975-16980.

[10] Liu X F, Bera T K, Liu L J, *et al*. A primate-specific POTE-actin fusion protein plays a role in apoptosis[J]. Apoptosis, 2009, 14(10): 1237-1244.

[11] Coleman M L, McDonough M A, Hewitson K S, *et al*. Asparaginyl hydroxylation of the Notch ankyrin repeat domain by factor inhibiting hypoxia-inducible factor [J]. J Biol Chem, 2007, 282 (33): 24027-24038.

[12] Richardson S M, Knowles R, Tyler J, *et al*. Expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-3, GLUT-9 and HIF-1alpha in normal and degenerate human intervertebral disc[J]. Histochem Cell Biol, 2008, 129(4): 503-511.

[13] Gogate S S, Nasser R, Shapiro I M, *et al*. Hypoxic regulation of beta-1, 3-glucuronyltransferase 1 expression in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disc: role of hypoxia-inducible factor proteins [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(7): 1950-1960.

[14] Bibby S R, Jones D A, Ripley R M, *et al*. Metabolism of the intervertebral disc: effects of low levels of oxygen, glucose, and pH on rates of energy metabolism of bovine nucleus pulposus cells[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(5): 487-496.

(**收稿**:2014-02-24;**修回**:2014-03-10)

(编辑 龙 亮)