

转染外源性转化生长因子(hTGF- β 1)基因对兔髓核细胞凋亡相关蛋白 Bcl-xs 和 Bcl-xl 的影响

李 晓

摘要:目的 探讨转染转化生长因子(hTGF- β 1)基因对兔髓核细胞凋亡相关蛋白 Bcl-xs 和 Bcl-xl 的影响,为活化椎间盘细胞功能、预防椎间盘组织退变提供理论依据。方法 取成年新西兰大白兔 5 只,将外源性转化生长因子 β 1 基因载体直接注射于 L3 ~ 4 椎间隙,术后 3 周取出相应椎间盘组织,利用免疫组织化学方法观察髓核细胞表达凋亡相关蛋白 Bcl-xs 和 Bcl-xl 的情况。应用 Vidas 图像分析系统进行免疫阳性细胞半定量分析。结果 注射转化生长因子基因的椎间盘,髓核细胞对凋亡相关蛋白 Bcl-xs 的表达少于对照组,测得 OPTDM 值分别为 0.0236 ± 0.0009 、 0.0391 ± 0.0406 ,二者之间有显著性差异 $P < 0.01$;而对 Bcl-xl 的表达则强于对照组,测得 OPTDM 值分别为 0.0354 ± 0.0078 、 0.0401 ± 0.0104 ,二者之间有显著性差异 $P < 0.01$ 。结论 转染转化生长因子(hTGF- β 1)基因可以明显减少兔椎间盘髓核细胞对凋亡相关蛋白 Bcl-xs 的表达,同时增强凋亡相关蛋白 Bcl-xl 的表达。

关键词:转化生长因子 β 1; 转染; 细胞凋亡蛋白; 椎间盘; 兔

Effect of transfection hTGF- β 1 gene on apoptosis related proteins Bcl-xs and Bcl-xl in nucleus pulposus cells of rabbits LI Xiao. The Third Department of Orthopedics, People's Hospital, Linyi 276000, China

Abstract: **Objective** Evaluate the effect of hTGF- β 1 gene on the apoptosis related proteins Bcl-xs and Bcl-xl of cells in nucleus pulposus. **Methods** The transforming growth factor- β 1 (hTGF- β 1) as a exogenous gene was injected directed into L₃₋₄ intervertebral space of 5 adult rabbits. The corresponding discs were removed 3 weeks later, and the apoptosis related proteins were examined and analyzed using immunohistochemistry and Vidas analysis system. **Results** The expression of apoptosis related proteins Bcl-xs in the cells became less by injecting hTGF- β 1 gene. There is significant different of OPTDM(0.0236 ± 0.0009 、 0.0391 ± 0.0406 accordingly). The expression of apoptosis related proteins Bcl-xl in the cells became more by injecting hTGF- β 1 gene. There is significant different of OPTDM(0.0354 ± 0.0078 、 0.0401 ± 0.0104 accordingly). **Conclusions** Transforming the hTGF- β 1 gene could dramatically lessen the apoptosis of cells in nucleus pulposus of intervertebral disc of rabbits.

Key words: Transforming growth factor β 1; Transfection; Apoptosis proteins; Intervertebral disc; Rabbits

不断发生的细胞凋亡是椎间盘纤维环破裂、髓核突出的病理学基础,而细胞凋亡的发生又受到许多凋亡相关蛋白的调控。我们试图通过转染外源性转化生长因子基因的方法,观察椎间盘髓核细胞凋亡相关蛋白表达的变化,从而为阻断椎间盘的退变过程提供理论依据,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 转染外源性基因

纯种新西兰大白兔 5 只,雌雄不限,术前 20 min

肌肉注射阿托品 0.04/kg,地西洋 5 mg/kg。采用氯氨酮 80 mg/kg 全麻下手术。腰椎侧前方倒八字入路进入,于腹膜外进入腰椎的侧前方,找到各椎间盘颜色呈白色的椎间盘,于 L₃₋₄ 椎间盘注射由青岛大学医学院骨科研究所构建的腺病毒载体^[1] Ad/CMV-hTGF- β 1(滴度为 6×10^6 pfu) 20 μ L,实验对照组注射 20 μ L 的磷酸缓冲液(PBS),在每个注射的椎间盘旁的腰大肌处以黑色丝线做标记。依次关闭伤口。手术后兔子予以分笼饲养。

1.2 免疫组化染色

手术后 3 周,兔耳中央静脉注射空气 10 mL 以迅速处死动物。立即取出其腰椎,并辨认原椎间盘注射标记,取相应椎间盘组织,常规固定,石蜡包埋,

以 10 μm 的厚度做连续切片,进行免疫荧光组化染色显示细胞凋亡相关蛋白的表达情况。染色试剂盒由广州中山生物工程有限公司提供。

2 结果

免疫组织化学染色结果显示,注射腺病毒载体 Ad/CMV-hTGF- β 1 的椎间盘髓核组织,髓核细胞细胞凋亡相关蛋白 Bcl-xs 的表达少于对照组;应用 Vidas 图像分析系统进行免疫阳性细胞半定量分析,测得 OPTDM 值分别为 0.0236 ± 0.0009 , 0.0391 ± 0.0406 , 二者之间有显著性差异 $P < 0.01$;而髓核细胞细胞凋亡相关蛋白 Bcl-xl 的表达则强于对照组,测得 OPTDM 值分别为 0.0454 ± 0.0078 , 0.0293 ± 0.0104 , 二者之间有显著性差异 $P < 0.01$ 。

3 讨论

在椎间盘退变过程中,组织中细胞排列有规律的减少,髓核大小发生了很大的变化。而在细胞减少中,功能性细胞数量的减少更为明显,且即便是存活的细胞,其生理活性亦明显降低^[2]。有报道称髓核中死亡细胞的比例从胎儿时期的 2% 逐渐增加到成人的 50% 以上^[3]。伴随着椎间盘退变、尤其是细胞数量的减少,肯定有不同程度的细胞凋亡发生^[4]。Gruber 通过对突出和正常椎间盘组织的对比研究,指出不论是否发生椎间盘突出,随年龄的增加都有大量椎间盘细胞发生凋亡^[5]。

而细胞的凋亡受到多种调控机制的影响,研究表明原癌基因 Bcl-2 是调节细胞凋亡途径中的一个重要调节基因。随着研究的不断深入,又发现许多基因结构与 Bcl-2 相似,具有保守的 BH1 和 BH2 区,序列却与 Bcl-2 均具有不同程度同源性的基因参与细胞凋亡的调节,它们通过相互作用,正向或反向调节细胞凋亡,因此将这些基因统称为 Bcl-2 基因家族。根据它们对细胞凋亡作用结果的不同,可将 Bcl-2 家族成员分为两类:一类能促进细胞凋亡,有 Bax、Bcl-xs、Bad、Bak;另一类能抑制细胞凋亡,有 Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-2、Bag-1、Alc、ced-9 和一些病毒基因。研究表明,Bcl-2 基因及其家族成员在细胞凋亡中起重要作用,它们共同构成一个非常复杂的相互作用网络,调控细胞凋亡。Bcl-x 分为 2 类:Bcl-xL 与 Bcl-xs。前者与 Bcl-2 有 74% 的同源性可调控细胞死亡,

Bcl-xs 较 Bcl-xL 少一段由 63 个氨基酸组成的 Bcl-2 和 Bcl-xl 有高度同源性的充列。研究发现 Bcl-xs 的作用与 Bcl-2 和 Bcl-xl 相反,并通过抑制后二者的作用而引起细胞凋亡。近来认为 Bcl-xs 可能是作为 Bcl-2 的结构抑制因子通过对其下游的调节而抑制 Bcl-2 的功能^[6]。

不断发生的细胞凋亡使椎间盘细胞不断减少,生理活性减低,细胞外基质也随之发生了一系列的改变,这就为椎间盘纤维环破裂、髓核突出提供了相应的组织学及组织化学的基础。从这一个方面理解,也为预防椎间盘突出的发生提供了较广阔的空间。青岛大学医学院骨科研究所成功构建了以腺病毒为载体的转化生长因子 β 1 基因(Ad/CMV-hTGF- β 1),并以免椎间盘髓核细胞为靶细胞进行了转染实验,得到了髓核细胞成功表达 TGF- β 1 蛋白的结果^[1]。而转化生长因子 β 1 对特定靶细胞的生物学效应取决于细胞类型、分化状态、生长条件、其他生长因子的存在及其本身的浓度和时间等诸多因素。我们转染转化生长因子 β (TGF- β) 基因的兔椎间盘髓核组织中,获得了转染转化生长因子(hTGF- β 1)基因可以明显减少兔椎间盘髓核细胞对凋亡相关蛋白 Bcl-xs 的表达、同时增强凋亡相关蛋白 Bcl-xL 的表达,尽管对出现这种结果的蛋白调控机制尚有待于进一步证实。

【参 考 文 献】

- [1] Tan Jianwei, Hu Yougu, Zheng Hongjun, et al. Construction of recombinant adenoviral vector Ad-CMV-hTGF for reversion of intervertebral disc degeneration by gene transfer. Chinese Journal of Traumatology 2002 5 97.
- [2] Meachim. Fine structure of juvenile human nucleus pulposus. J Anat, 1970 53 544.
- [3] Trout JU, HUGGER A, Simen J, et al. Ultrastructure of the human intervertebral discs: changes in notochordal cells with age. Tissue and Cell, 1982, 14 396.
- [4] 陈晓亮, 胡有谷. 椎间盘超微结构观察. 中华骨科杂志, 1990, 10 331.
- [5] Gruber HE, Hanley EN. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine, 1998 23 757.
- [6] Uren AG, Vaux DL. Molecular and clinical aspects of apoptosis. Pharmacol Ther, 1996 72 37.

(收稿日期 2006-01-15)