

· 研究简报 ·

周期性张应变下调椎间盘纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达的分子机制研究

郭志良 周跃 滕海军 王亮 张大海 刘超

【摘要】目的 探讨细胞外信号调节激酶(ERK1/2)在周期性张应变下调椎间盘纤维环细胞聚蛋白多糖(Aggrecan)mRNA 中的相关机制。方法 采用自制周期性张应变加载装置对培养的大鼠椎间盘纤维环细胞施以幅度为 10%、频率为 1 Hz 的张应变刺激。采用 Western blot 技术检测周期性张应变作用不同时间后对椎间盘纤维环细胞 ERK1/2 信号分子磷酸化水平的影响,并观察其特异性阻断剂 PD98059 及 siRNA-ERK2 对周期性张应变下调椎间盘纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达的影响。结果 周期性张应变可上调纤维环细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化水平,具有双向、快速特点;阻断剂 PD98059 以及 siRNA-ERK2 均可部分逆转周期性张应变对纤维环细胞 Aggrecan mRNA 的下调作用。结论 周期性张应变可激活椎间盘纤维环细胞 ERK1/2 信号分子,并通过该信号分子下调椎间盘纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达。

【关键词】 周期性张应变; 椎间盘纤维环细胞; 聚蛋白多糖; 信号转导

下背痛是一个重要的公共卫生问题,虽然引起下背痛的原因很多,但是椎间盘退变仍是其主要原因之一。由于椎间盘长期承受着复杂的应力刺激^[1],生物力学因素在椎间盘退变中的作用已引起人们广泛关注^[2]。细胞外基质中的大分子物质,特别是聚蛋白多糖(Aggrecan)对椎间盘功能的维持具有重要作用,其数量及结构改变均会影响椎间盘功能^[3]。本课题前期研究表明,10%周期性张应变(cyclic tensile strain, CTS)能下调大鼠纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达^[4],其作用机制目前尚未阐明。高强度应力刺激是一个潜在炎症信号,其作用可能是通过 NF- κ B 信号途径实现的^[5-6];而 NF- κ B 活化与细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)关系密切^[7]。据此本研究拟对 ERK1/2 在 CTS 下调椎间盘纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达中的作用进行初步探讨,以期对椎间盘退变的防治提供新的实验依据及途径。

材料与方法

一、实验材料

共选取清洁级 1 月龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 15 只,体重 100 g 左右,雌雄不拘,由第三军医大学新桥医院动物中心提供,动物使用证号:SYXK-(军)2002-031。主要实验仪器包括自制周期性张应变加载装置、硅橡胶膜(Dow-corning)、CO₂ 细胞孵箱(Heraeus)、倒置相差显微镜(Olympus)、垂直电泳仪(Bio-rad)、PCR 扩增仪(Bio-rad)等。主要实验试剂包括 DMEM 培养基(Gibco)、II 型胶原酶(Sigma)、BCA 试剂(北京中山)、兔抗人多克隆 ERK1/2 或 pERK1/2 (Cell Signaling)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(Cell Signaling)、ECL(Santa Cruz)、RT-PCR 试剂盒等,所用引物均由北京赛百盛公司合成。

二、大鼠纤维环细胞培养

将大鼠处死后常规消毒,在无菌条件下提取脊椎组织,置入盛有磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)的培养皿中,去除椎间盘周围软组织,将椎间盘从中间切开,小心刮除髓核组织,然后用尖刀片将纤维环取下,置于 PBS 液中漂洗 3 次,用眼科剪将其剪成 1 mm³ 左右小块,置于 0.25% 胰蛋白酶(37 ℃)中消化 10 min,随后加入含血清培养基终止消化,并用 PBS 液清洗、去除胰蛋白酶。将组织块置入 0.1% II 型胶原酶溶液(37 ℃)中消化 2 h,经 200 目滤网过滤后,将细胞悬液离心(1000 r/min)5 min,然后将细胞置入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

三、周期性张应力干预

本研究所用周期性张应力(CTS)装置由变频器、直流低速电机、传动系统及细胞培养小室四部分组成^[8],由变频器控制电机转速,从而控制 CTS 频率。电机转动时通过传动系统使球冠上、下运动。细胞培养小室底部由硅橡胶膜制成,并且包被有纤维连接素(5 μ g/cm²)。本研究中细胞所受应变幅度为 10%,频率为 1 Hz,1/3 周期无应变,2/3 周期加载应变。

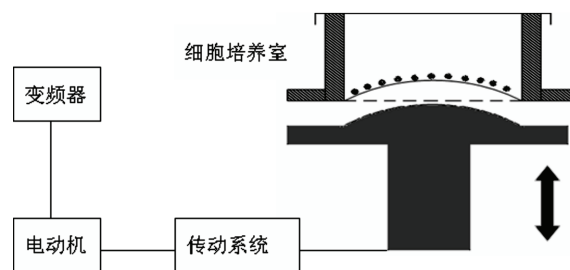


图1 周期性张应变加载装置示意图

四、免疫蛋白印迹(Western blot)检测

大鼠纤维环细胞经 CTS 处理不同时间后按比例加入裂解液(含 100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaF, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Na₃VO₄, 1% NP-40, 100 μ mol/L TPCK, 100 μ mol/L Quercetin, 1 mmol/L PMSF)制成样品,采用 BCA 法测定蛋白含量水平。于样品中加入 SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min 后按 6 000 r/min 离心 3 min,取上清液上样。经聚丙烯

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.010.021

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30900290)

作者单位:261021 潍坊,中国人民解放军第 89 医院骨科(郭志良、滕海军、王亮、张大海、刘超);第三军医大学新桥医院骨科(周跃)

酰胺凝胶电泳、转膜后,在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入兔抗人多克隆一抗(ERK1/2 或 pERK1/2,1:1000 稀释),4℃ 过夜后,加入 HRP 标记的二抗(1:10 000 稀释)在室温下摇育 1 h, ECL 显示蛋白条带。

五、pSilencer3.1 真核表达载体构建及细胞转染

根据小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 设计原则设计 63 bp 具有互补序列、能够编码 shRNA 的双链寡核苷酸,正义:5'-GATCCGTCTCTCGTACATCGGAGAATTCAAGAGATTCT-CCGATGTACGAGAGATTTTTTGGAAA-3',反义:5'-AGCTTTTC-CAAAAAATCTCTCGTACATCGGAGAATCTCTGAATTCTCCGATGTACGAGAGACG-3'。将上述合成的双链寡核苷酸退火后与 pSilencer3.1 线性载体定向连接,快速小量制备质粒并进行核酸测序,以确认得到的克隆序列正确,命名为 pSilencer3.1-ERK2。质粒用 Lipofectamine 2000 进行细胞转染。

六、逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)

根据 Trizol 试剂盒说明书抽提细胞 RNA,采用一步法检测 Aggrecan mRNA 表达,所用引物由北京赛百盛公司合成,具体引物序列如下:Aggrecan (sense:5'-CGCTTGCCAGGGGAGTTG-TATTC-3';anti-sense:5'-GGAGGCCAGGCTAGCATTTTGAGC-3';405 bp),内参 GAPDH (sense:5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAGT-3';anti-sense:5'-AGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3';287 bp)。RT-PCR 产物采用 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳,采用图象处理软件进行条带灰度分析。

七、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 版统计学软件包进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、CTS 对纤维环细胞 ERK1/2 分子磷酸化的影响

CTS 可上调大鼠纤维环细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化水平,具有双向、快速等特点,如 CTS 作用 30 min 时,发现大鼠纤维环细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化水平达到峰值,随 CTS 刺激时间延长,ERK1/2 蛋白磷酸化水平逐渐降低,于 CTS 作用 2 h 后降至静息水平;而相应的总 ERK1/2 在各时间段均无明显差异(图 2)。ERK1/2 特异性阻断剂 PD98059 可明显抑制 CTS 导致的 ERK1/2 蛋白磷酸化反应(图 3)。将 pSilencer3.1-ERK2 质粒转染至纤维环细胞,发现总 ERK2 和 CTS 诱导的 ERK2 磷酸化蛋白表达水平均明显降低(图 4)。

二、ERK1/2 分子在 CTS 下调 Aggrecan mRNA 表达中的作用

CTS 促使 Aggrecan mRNA 表达降低,ERK 抑制剂 PD98059 及 siERK2 均不同程度抑制了 CTS 对纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达的下调作用(图 5)。

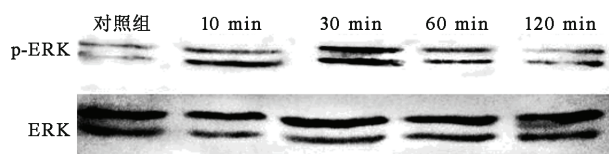


图 2 CTS 对纤维环细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化的影响

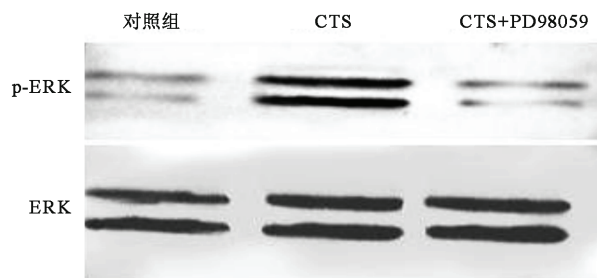


图 3 PD98059 对 CTS 诱导纤维环细胞 ERK 磷酸化的影响

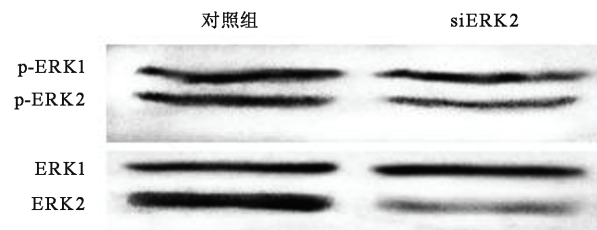
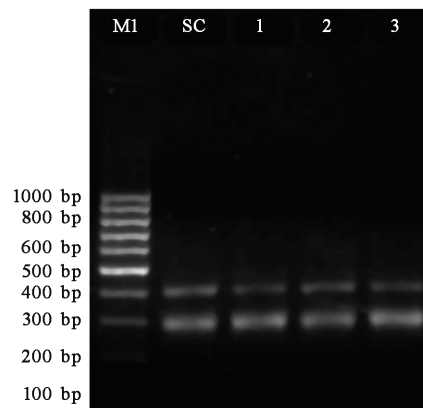


图 4 siERK2 转染对纤维环细胞 ERK2 蛋白表达的影响



M1: DNA marker; SC: 对照组; 1: CTS 组; 2: CTS + PD98059 组; 3: CTS + siERK2 组

图 5 PD98059 及 siERK2 对 CTS 下调纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达的影响

讨 论

机体椎间盘长期承受着复杂应力作用,应力刺激可影响椎间盘细胞功能^[2]。本研究前期实验发现,CTS 能下调椎间盘纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达^[4],而作为椎间盘蛋白多糖主要组分 Aggrecan 在椎间盘退变过程中发挥重要作用^[9]。

力学刺激能调节细胞外基质合成,其信号转导过程可能与炎症信号通路有关。相关研究已证实,过度力学负荷能够激活炎症通路,而治疗性负荷却具有抑制炎症作用^[10-11]。在体实验亦表明,剧烈运动可加速软骨破坏,导致骨性关节炎发生^[12-13]。上述研究结果均提示炎症信号通路的调节过程可能也是细胞力学信号转导的重要环节。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是目前已知唯一一种受酪氨酸蛋白激酶磷酸化调控的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它在细胞增殖、分化及炎症发生、发展和细胞因子生成等方面均具有重要作用^[14]。ERK1/2 是

MAPK 家族中最早发现的信号分子,相关研究表明 ERK1/2 信号通路参与应激刺激、细菌产物、炎症介质等引起的细胞反应,提示 ERK1/2 通路激活与炎症反应密切相关^[15]。本研究结果显示,CTS 可增加 ERK1/2 磷酸化水平,具有快速、双向特点,如 CTS 刺激 10 min 即可增加 ERK1/2 磷酸化水平,于刺激 30 min 时达到峰值,随后开始下降,当刺激 2 h 时 ERK1/2 磷酸化水平下降至静息时水平,提示 CTS 可激活 ERK1/2 信号转导通路;若预先给予 ERK1/2 抑制剂 PD98059 或 siERK2 则能抑制 CTS 诱发的促 ERK1/2 磷酸化效应。本研究前期实验证实,CTS 可显著下调大鼠纤维环细胞 Aggrecan 基因表达,在 CTS 干预 6 h 时作用达到峰值^[4],而 CTS 对 ERK1/2 磷酸化的调节作用在刺激 30 min 时即达到峰值,可见基因表达与激酶活化之间存在时间延迟,提示 ERK1/2 可能是调控 Aggrecan 表达的中间信号分子。通过进一步实验证实 PD98059 或 siERK2 均能不同程度抑制 CTS 下调纤维环细胞 Aggrecan mRNA 的作用,提示 CTS 可能通过 ERK1/2 信号途径调控 Aggrecan 基因表达。

ERK1/2 分子激活后移位以及对下游底物的选择性作用,是激酶级联信号特异性转导的重要机制,而 ERK 的底物包括表皮生长因子受体、Ras 交换因子 Sos、转录因子 Elk1、Ets1、Sapla、c-Myc、Tal 以及 STAT (signal transducers and activators of transcription) 等诸多信号分子^[13],因此 ERK1/2 信号通路调节纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达的具体机制,即其下游事件值得进一步深入探讨。

参 考 文 献

- [1] 李光灿,李康华,郑连杰,等. 全脊柱终板抗压强度分布规律的生物力学研究. 医用生物力学,2011,26:521-526.
- [2] Inoue N, Orías AA. Biomechanics of intervertebral disk degeneration. Orthop Clin North Am,2011,42: 487-499.
- [3] Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, et al. Variations in aggrecan localization and gene expression patterns characterize increasing stages of human intervertebral disk degeneration. Exp Mol Pathol, 2011, 91: 534-539.
- [4] 郭志良,周跃,李华壮,等. 周期性张应变对纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达的影响. 重庆医学,2007,36:545-547.
- [5] Huang H, Kamm RD, Lee RT. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. Am J Physiol Cell Physiol, 2004,287:1-11.
- [6] Deschner J, Hofman CR, Piesco NP, et al. Signal transduction by mechanical strain in chondrocytes. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003,6:289-293.
- [7] Gantke T, Sriskantharajah S, Ley SC. Regulation and function of TPL-2, and IκB kinase-regulated MAP kinase. Cell Res, 2011, 21: 131-145.
- [8] 胥春,范震,郝轶,等. 一种新型机械应变细胞加载装置的研制. 医用生物力学,2011,26:534-539.
- [9] Watanabe H, Nakata K, Kimata K, et al. Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote cmd mice defective aggrecan. Proc Natl Acad Sci USA, 1997,94:6943-6947.
- [10] Frenkel SR, Di PE. Degradation and repair of articular cartilage. Front Biosci, 1999, 15: 671-685.
- [11] Williams JM, Moran M, Thonar EJ, et al. Continuous passive motion stimulates repair of rabbit knee articular cartilage after matrix proteoglycan loss. Clin Orthop, 1994,304:252-262.
- [12] Quinn TM, Allen RG, Schalet BJ, et al. Matrix and cell injury due to subimpact loading of adult bovine articular cartilage explants: effects of strain rate and peak stress. J Orthop Res, 2001,19:242-249.
- [13] Bonassar LJ, Grodzinsky AJ, Srinivasan A, et al. Mechanical and physicochemical regulation of the action of insulin-like growth factor-I on articular cartilage. Arch Biochem Biophys, 2000,379:57-63.
- [14] 袁琳,宋关斌,罗庆,等. ERK 信号分子介导周期机械拉伸诱导的骨髓间充质干细胞增殖. 医用生物力学,2011,26:217-224.
- [15] Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy from molecular mechanisms to therapeutic benefits. Biochim Biophys Acta, 2005,1754:253-262.

(修回日期:2012-09-06)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

中国医科大学附属盛京医院康复技术培训基地 Bobath 初级培训班第一期通知

中国医科大学附属盛京医院康复培训基地兹定于 2012 年 11 月 23 日 - 25 日在盛京医院举办 Bobath 第一期初级培训班。此次培训班由大连惠智医疗设备有限公司承办。为了使广大学员能够系统、完整地掌握 Bobath 技术,我们将举办初级系列课程、中级系列课程和高级系列课程。请参加学习的学员提前复习相关解剖、生理知识,多了解一些神经传导通路,以便达到良好的学习效果。

主讲老师:土井锐二郎先生(Bobath 纪念医院康复部副部长、国际 Bobath 技术指导、高级讲师)。

学习班日期:2012 年 11 月 22 日报到,11 月 23 日至 25 日培训授课。

地点:沈阳市铁西区滑翔路 39 号,中国医科大学盛京医院康复中心。

费用:1800 元/人(含午餐费,晚餐及交通费、住宿费自理)。

学员要求:有一定工作经验的康复医师、治疗师,限定 25 名。

联系人:张小姐(电话 0411-66833715;邮箱:zk-medical@163.com);

周老师(电话:18940251216;邮箱:zhoufh@sj-hospital.org)。

欲参加者,可打电话或发邮件报名,报名时告知单位名称、联系人姓名、性别、联系电话、报名人数、邮箱等必要信息。

中国医科大学附属盛京医院