

益气化瘀中药对大鼠椎间盘软骨细胞基因表达的影响

王拥军¹, 孙 鹏², 周 泉¹, 刘 梅¹, 胡志俊¹, 周重建¹, 施 杞¹

(1 上海中医药大学龙华医院, 上海中医药大学脊柱病研究所, 上海 200032; 2 上海中医药大学针灸推拿学院, 上海 201203)

[摘要] 目的: 观察正常培养、诱导凋亡以及益气化瘀中药干预后的大鼠椎间盘软骨细胞基因表达水平的变化, 研究益气化瘀中药对椎间盘凋亡软骨细胞基因表达谱的调节作用。方法: 建立大鼠颈椎间盘软骨细胞培养体系, 使用抗 Fas 抗体诱导凋亡, 分别从正常组、诱导凋亡组和益气化瘀中药组的大鼠颈椎间盘软骨细胞中抽提 mRNA, 经反转录后分别用 Cy3、Cy5 荧光标记, 获得椎间盘软骨细胞 cDNA 的探针, 再与 BiostarR-40s 的基因表达谱芯片杂交, Scan Array 4000 激光扫描仪扫描, GenePix Pro 3.0 图像处理软件进行图像分析、标准化处理和 ratio 值分析。结果: 诱导凋亡组与正常组比较, 共筛选出 30 条表达有差异的已知基因, 20 条基因表达量明显下降 (ratio < 0.5), 10 条基因表达量明显上升 (ratio > 2); 中药组与凋亡组比较, 共筛选出 97 条表达有差异的已知基因, 中药上调 44 条基因 (ratio > 2), 下调 53 条基因 (ratio < 0.5), 涉及到丝分裂素激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和信号转导和激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT)。结论: 益气化瘀中药对椎间盘凋亡软骨细胞的调控涉及多个方面, 其对 MAPK 和 JAK-STAT 通路的影响可提示益气化瘀中药对信号转导通路的调控作用。这从一个侧面探索了中医气血理论与信号转导的关系。

[关键词] 益气化瘀方; 椎间盘; 软骨细胞; 凋亡; 基因芯片; 信号转导

[中图分类号] R289.5; R681.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2005)02-0111-04

Effects of Yiqi Huayu Recipe on gene expression pattern of normal and apoptotic chondrocytes in cervical intervertebral disc in rats

WANG Yong-Jun¹, SUN Peng², ZHOU Quan¹, LIU Mei¹, HU Zhi-Jun¹, ZHOU Chong-Jian¹, SHI Qi¹

(1. Spinal Research Institute, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. College of Acupuncture and Tuina, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects of Yiqi Huayu Recipe on the gene expression pattern in normal and apoptotic chondrocytes in the cervical intervertebral disc of rats. **Methods:** The intervertebral disc endplates of rats were digested enzymatically. The apoptosis of the chondrocytes was induced by anti-Fas antibody. BiostarR-40s microarray chips were used to investigate the gene expression pattern in chondrocytes in the normal control, apoptosis and Yiqi Huayu Recipe groups. The results were scanned with Scan Array 4000 and analyzed with GenePix Pro 3.0, and then subjected to standardization and ratio analysis. **Results:** In the apoptosis group, 30 kinds of genes expressed in cervical intervertebral disc chondrocytes were screened out, in which 10 were up-regulated (ratio > 2) and 20 down-regulated (ratio < 0.5) as compared with the normal control group. On the other hand, in the Yiqi Huayu Recipe group, 97 kinds of genes expressed in cervical intervertebral disc chondrocytes were screened out, in which 44 were up-regulated (ratio > 2) and 53 down-regulated (ratio < 0.5) as compared with the apoptosis group. **Conclusion:** There are some signal transduction pathways that control the apoptosis of the intervertebral disc chondrocytes. Yiqi Huayu Recipe regulates

[基金项目] 国家自然科学基金重点资助项目 (No. 30171170, 30330700), 上海市“启明星”基金资助项目 (No. 01QB14039)

[作者简介] 王拥军 (1965-), 男, 博士, 研究员。

Correspondence to: WANG Yong-Jun, MD, Professor. E-mail: yjwang88@hotmail.com

the gene express of the apoptotic chondrocytes in intervertebral disc . The study gives a further understanding to the mechanism of the cervical spondylosis and enriches the theories of qi and blood of traditional Chinese medicine .

KEY WORDS Yiqi Huayu Recipe; intervertebral disc; chondrocytes; apoptosis; gene chip; signal transduction

J Chin Integr Med, 2005, 3(2):111-114

颈椎间盘退变是导致颈椎病的重要因素之一,其退变机制可能涉及多个层次,多个侧面^[1]。近年来,基因芯片技术已广泛应用于基因的序列分析、突变检测、多态性分析、基因组图谱分析以及疾病的基因诊断等方面。为探索中药延缓椎间盘凋亡的机制,本课题在细胞培养,并诱导细胞凋亡的基础上采用基因芯片技术进一步研究益气化瘀中药对大鼠颈椎间盘凋亡软骨细胞基因表达谱的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 (1)药物和动物:益气化瘀方(黄芪、党参、丹参等组成),由上海中医药大学脊柱病研究所提供;实验动物为 1 月龄雄性 SD 大鼠,清洁级,由上海中医药大学动物实验中心提供。(2)细胞培养相关试剂与仪器^[2]:达氏修正依氏培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), Gibco 公司;胶原酶, Sigma 公司;胰蛋白酶,上海细胞生物研究所;小牛血清,杭州四季青生物工程有限公司;细胞培养箱, Heraeus B-5060 EK-CO₂;倒置相差显微镜, Olympus 公司;超净工作室,上海市净化设备厂;大鼠 BioStarR-40S cDNA 表达谱基因芯片,上海博星基因芯片有限责任公司,包含约 3 900 个公开数据库登录大鼠基因和 100 多个看家基因。

1.2 实验方 法

1.2.1 软骨细胞培养 取 SD 大鼠,颈椎分离软骨终板、髓核和纤维环。Hanks 液清洗椎间盘软骨终板组织后剪碎至 1 mm² 大小,先后加 0.25% 的胰蛋白酶溶液和 0.02% 型胶原酶,37℃ 下搅拌消化 30 min;然后以 1 000 r/min 过滤离心 5 min;按 2 × 10⁴/ml 密度种植于底面积为 25 mm² 的培养瓶中,加入适量含 20% 小牛血清的 DMEM 培养液;将培养瓶置于含 95% 空气、5% CO₂ 的 37℃ 细胞培养箱中培养,倒置显微镜观察细胞贴壁及生长情况。每 2~3 d 更换培养液。原代细胞形成单层后,进行传代,用 0.25% 胰蛋白酶消化,收获细胞制成细胞悬液,按 2 × 10⁴/ml 密度接种于培养瓶中。

1.2.2 益气化瘀中药药理血清的制备 大鼠所用生药剂量按照人与动物体质量换算。根据四唑盐比

色试验法(tetrazolium salt colorimetric assays, MTT)筛选结果,灌服 SD 大鼠的生药量为正常人体的 5 倍量,按 2.9 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 生药连续给药 3 d,末次给药后 5 h 采血。血清经 56℃ 灭活,0.22 μm 过滤器过滤。

1.2.3 诱导细胞凋亡及中药干预 (1)将含中药血清用 DMEM 液配成体积浓度为 20% 的培养液;(2)将代椎间盘软骨细胞以 2 × 10⁴/ml 密度,接种于培养瓶内,分为正常组和凋亡组。其中凋亡组根据文献^[3],加入抗 Fas 抗体培养 12 h;(3)分别将 20% 中药血清加入正常和诱导软骨细胞,正常组加入 20% 小牛血清,均培养 48 h。

1.2.4 基因表达谱检测

1.2.4.1 总 RNA 抽提 去除经诱导后的细胞、正常细胞及中药干预后细胞培养瓶内的培养液,按每 10 cm² 2 ml Trizol 试剂的比例加入 Trizol 试剂,缓慢旋转培养瓶数次,使 Trizol 试剂充分接触培养瓶表面进行消化,反复吹打细胞使之充分溶解于 Trizol 中形成清亮不黏稠的液体,转移到 RNase-free 的试管中,根据 Trizol reagent 的步骤提取总 RNA,并通过琼脂糖电泳检验。

1.2.4.2 基因芯片检测 第一部分:正常组 Cy3 荧光标记,凋亡组 Cy5 荧光标记;第二部分:凋亡组 Cy3 荧光标记,中药组 Cy5 荧光标记。用 Cy5、Cy3 荧光染料通过逆转录反应将椎间盘细胞的 mRNA 分别标记成探针,将探针混合后与基因芯片进行预杂交、标记、探针纯化、杂交、洗片。具体步骤按照 BiostarR-40s 基因芯片说明书进行。本次实验归一化系数在 0.4~2.5 之间,正常组、实验组扫描图的平均信号强度与平均背景的比值均 > 3,符合表达谱芯片实验成功标准。

1.3 统计学方法 使用 GenePix Pro 3.0 图像处理软件进行分析。将正常组以 Cy3 为标记,凋亡组以 Cy5 标记,比较分析正常与凋亡细胞的基因表达差异。芯片四个角的强表达管家基因为强阳性(白色),分布在各微矩阵的管家基因为阳性,在样品中表达的基因为阳性(可为黄、绿、蓝色),42 个点样液(空白对照)阴性及空白对照为黑、灰色。用特有的两种荧光波长扫描芯片,得到这些基因在各组中的

表达谱图片,通过图像处理软件 GenePix Pro 3.0 处理分析出基因表达的差异。两图经叠加处理,进行散点图荧光信号比值的离散程度分析。

2 结果

2.1 琼脂糖电泳检验 用于芯片研究的各组细胞 mRNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值都在 1.8~2.0 之间。见表 1。

表 1 mRNA 制备结果

Tab 1 mRNA preparation result

Group	mRNA result (μg)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
Normal control	23.04	2.09
Apoptosis	84.72	1.97
Yiqi Huayu Recipe	146.64	2.05

2.2 基因表达谱检测 凋亡组有特异变化的共 231 条,其中 30 条是已知基因,20 条基因表达量明显下降 (ratio < 0.5),10 条基因表达量明显上升 (ratio > 2)。下调的基因包括:蛋白质酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase type A, member 2, Ptp4a2), 激酶锚定蛋白-12 [A kinase (PRKA) anchor protein 12] 等;上调的基因有:蛋白酶-28 (protease 28), 蛋白

质磷酸酯酶-2 (protein phosphatase 2), 转化生长因子- (transforming growth factor beta, TGF-), 信号转导和激活因子-1 (signal transducer and activator of transcription-1, STAT -1) 等。

益气化痰中药组共 508 条基因表达有差异,其中 97 条是已知基因,上调 44 条基因 (ratio > 2), 下调 53 条基因 (ratio < 0.5)。下调的基因包括: TGF-, 丝氨酸蛋白酶抑制剂-2c (serine protease inhibitor2c, Spin-2c), 丝氨酸蛋白酶抑制剂-2b (serine protease inhibitor2b, Spin-2b), 蛋白酶-28, STAT-1, 纤维结合素-1 (fibronectin-1, FN-1) 等;上调的基因包括:丝分裂素激活蛋白激酶-6 (mitogen-activated protein kinase 6, MAPK 6), 蛋白质酪氨酸磷酸酶非受体-11 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11, PTPN 11), 蛋白质激酶 C 结合蛋白, 蛋白质酪氨酸磷酸酶受体 (protein tyrosine phosphatase receptor, Ptp) 等。

正常组与凋亡组基因芯片杂交信号双色荧光标记叠加图、杂交信号散点图见图 1; 中药组与凋亡组基因芯片杂交信号双色荧光标记叠加图、杂交信号散点图见图 2。

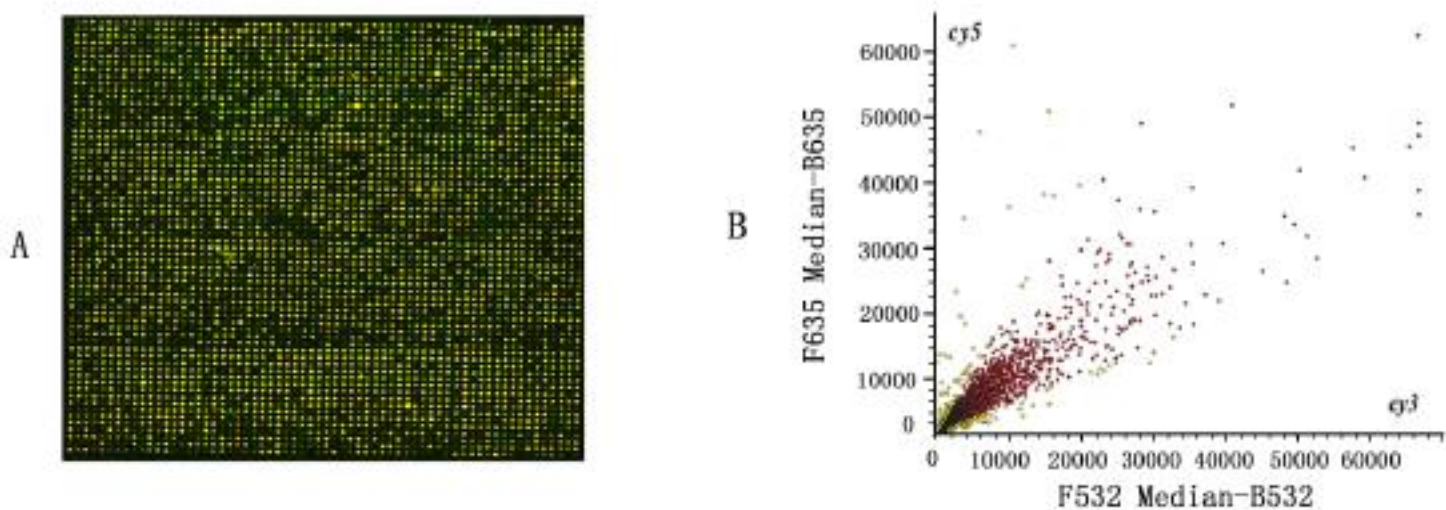


图 1 正常组与凋亡组基因芯片杂交信号图

Fig 1 Gene chip hybridized signal of normal control and apoptosis groups

A: Fluorescent marked overlay; B: Scatter

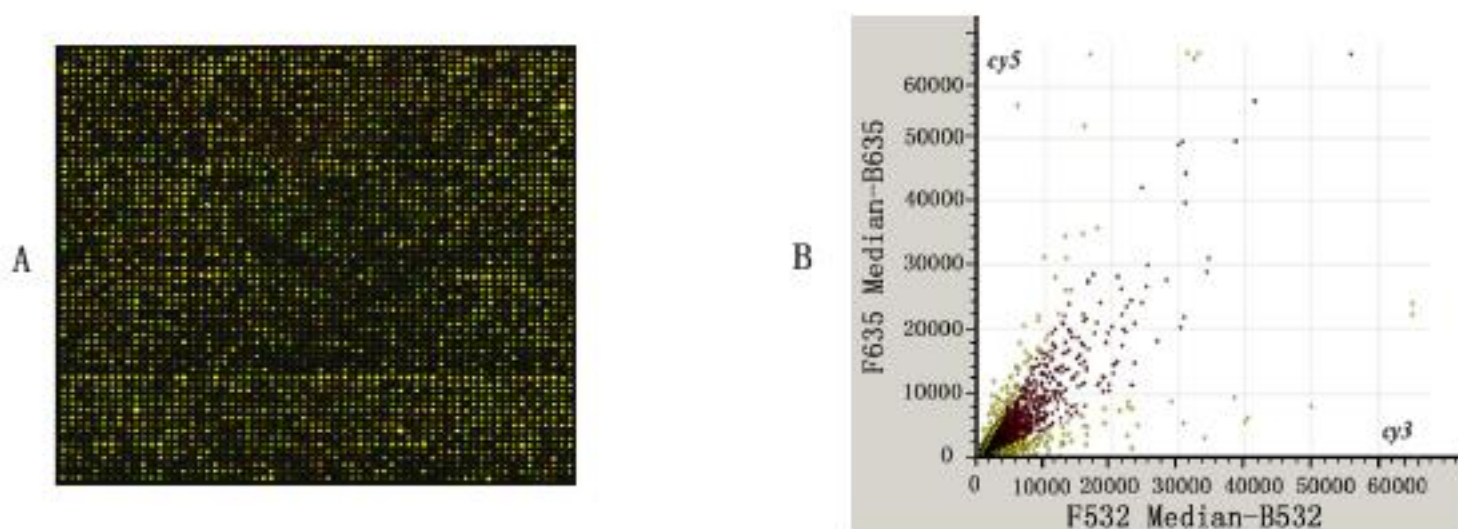


图 2 中药组与凋亡组基因芯片杂交信号图

Fig 2 Gene chip hybridized signal of Yiqi Huayu Recipe and apoptosis groups

A: Fluorescent marked overlay; B: Scatter

3 讨论

研究发现,椎间盘退变程度与年龄^[4]和异常应力^[5]关系密切。随着年龄的增长和应力的异常升高,椎间盘软骨细胞的凋亡程度也显著增加^[6]。细胞凋亡是一个由细胞内基因编程控制、主动的细胞消亡过程。细胞凋亡的发生与抑制是信号转导的直接结果。本研究通过抗 Fas 抗体,诱导大鼠椎间盘软骨细胞产生凋亡;然后使用基因芯片技术,发现有明显表达变化的已知基因共 30 条,其中涉及蛋白酶类、生长因子类以及信号转导类等多方面。说明大鼠椎间盘软骨细胞的凋亡受到各种基因的调控,印证了我们既往的相关工作^[6]。

益气化瘀是中医药临床常用的治疗方法。已有研究发现,益气化瘀中药有抑制椎间盘退变的作用,其机制包括诸多方面^[7-10]。在基因研究方面,笔者^[11]使用益气化瘀方灌服椎间盘退变动物模型,对比服药前后,发现益气化瘀方可以调控退变椎间盘中包括蛋白质酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)在内的诸多信号转导和酶类基因。本研究使用益气化瘀药理血清干预凋亡的椎间盘软骨细胞,发现益气化瘀中药对凋亡细胞的诸多基因产生调控作用。其中不仅包括蛋白酶类基因,而且还包括诸多信号转导通路类基因。如对 STAT-1 的下调(ratio=0.394)和对 MAPK 6 的上调(ratio=3.96)。

STATs 是一类细胞内信号传递和基因表达调控因子家族,由 STAT-1~STAT-7 几个成员组成。该家族与非受体性蛋白质酪氨酸激酶超家族中的 Jauns 激酶家族 JAK 结合,构成 JAK/STAT 途径^[12]。外界的细胞因子激活 Jauns 家族酪氨酸激酶(Jauns 激酶),后者磷酸化 STAT,活化后的 STAT 则以同源或异源二聚体形式易位到胞核,在靶基因的启动区与特定的 DNA 元件结合,发挥其生物学活性。MAPK 信号转导途径是诸多信号途径中,与细胞增殖、分化等生理过程密切相关的重要信号途径之一。某些多肽生长因子与受体结合,激活下游信号分子如 Ras、MAPK 等,通过级联酶促反应,影响基因表达,调控细胞增殖和分化。Ariga 等^[13]研究发现椎间盘软骨终板内细胞凋亡程度随着压力的增高而增加,而这种变化与 MAPK 信号通路存在关系。

在本实验中,益气化瘀中药表现为对 STAT 的下调,同时又对 MAPK 上调。其机制可能是益气化瘀中药分别对这两种通路的作用,也可能是对二者之间可能存在的 crosstalk 起作用。根据本实验的提示,我们将对结果中某些信号转导因子和蛋白酶类变化结果进行定量分析,以进一步探讨益气化瘀中药对颈椎病治疗的深层机制。

总之,本研究使用基因芯片技术,初步探讨了益气化瘀中药药理血清对椎间盘软骨细胞基因表达谱的调控情况,为益气化瘀中药的疗效机制和颈椎病的病理基础研究提供了有益的思路。

(本课题得到上海第二医科大学瑞金医院邓廉夫教授、倪培华教授、冯伟博士、许福平老师和上海博星基因公司的大力支持与合作,特此致谢!)

[参考文献]

- 1 Gruber HE, Hanley EN Jr. Recent advances in disc cell biology[J]. Spine, 2003, 28(2): 186-193.
- 2 孙鹏,王拥军,施杞.椎间盘软骨终板细胞的形态及表型特征研究[J].脊柱外科杂志,2003,1(6):346-349.
- 3 Hashimoto S, Sctareh M, Ochs RL, et al. Fas/ Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(10): 1749-1755.
- 4 Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro[J]. Spine, 2000, 25(17): 2153-2157.
- 5 Lotz JC, Colliou OK, Chin JR, et al. Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study[J]. Spine, 1998, 23(23): 2493-2506.
- 6 王拥军,施杞,李家顺,等.大鼠退变颈椎间盘组织基因表达谱的研究[J].第二军医大学学报,2002,23(12):1335-1338.
- 7 王拥军,施杞,周重建,等.益气化瘀方对大鼠颈椎间盘软骨终板内血管的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2002,10(4):1-4.
- 8 施杞,周红海,沈培芝,等.益气化瘀补肾法对退变颈椎间盘 II 型胶原 mRNA 表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2001,9(1):1-9.
- 9 王拥军,施杞,石印玉,等.芪麝颈康丸对椎间盘内 IL-1、IL-6、TNF 含量的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2000,8(1):23-25.
- 10 周重建,王拥军,施杞,等.益气化瘀方对大鼠腰神经根受压后神经肌肉终板再生修复的作用[J].中西医结合学报,2003,1(4):277-280.
- 11 王拥军,施杞,李家顺,等.益气化瘀方调控椎间盘细胞基因表达谱的研究[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(4):32-37.
- 12 Zamorano J, Wang HY, Wang R, et al. Regulation of cell growth by IL-2: role of STAT5 in protection from apoptosis but not in cell cycle progression[J]. J Immunol, 1998, 160(7): 3502-3512.
- 13 Ariga K, Yonenobu K, Nakase T, et al. Mechanical stress-induced apoptosis of endplate chondrocytes in organ-cultured mouse intervertebral discs: an ex vivo study[J]. Spine, 2003, 28(14): 1528-1533.

[收稿日期] 2004-09-20 [本文编辑] 白玉金