

Peroxiredoxin 在退变椎间盘髓核中的表达及其临床意义

罗平^{1,2} 陈学明¹ 刘玉林² 于博² 周初松^{2△}

(1 株洲市三三一医院 湖南 株洲 412002 2 南方医科大学珠江医院骨科 广东广州 510280)

摘要 目的:检测 Peroxiredoxin 在腰椎间盘髓核组织中的表达,分析其在椎间盘退变中的临床意义。方法:用蛋白免疫印迹(Western blot)的方法检测 Peroxiredoxin 在正常、突出及脱出腰椎间盘髓核中的表达情况。结果:Peroxiredoxin 在退变椎间盘髓核中表达丰富,而在正常椎间盘髓核中表达微弱,两者比较差异显著($P < 0.05$),在突出和脱出椎间盘髓核中表达无显著性差异($P > 0.05$)。结论:Peroxiredoxin 在正常及退变腰椎间盘髓核组织中差异表达。

关键词 Peroxiredoxin 椎间盘退变;Western blot

中图分类号 R683 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2011)06-1155-03

Expression of peroxiredoxin in nucleus pulposus of degenerative intervertebral disc and its clinical significance

LUO Ping^{1,2}, CHEN Xue-ming, LIU Yu-lin², YU Bo², ZHOU Chu-song^{2△}

(1 Zhuzhou 331 hospital, 412002, zhuzhou, China;

2 Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, 510280, Guangzhou, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the significance of Peroxiredoxin expression in the nucleus pulposus of intervertebral disc.

Methods: Western blot analysis was performed to determine the expression of Peroxiredoxin in 6 cases of normal nucleus pulposus and 24 cases of degenerative intervertebral disc (classified as protrusions and extrusions). **Results:** Peroxiredoxin was not expressed in nucleus pulposus of normal disc. The level of Peroxiredoxin in nucleus pulposus of extrusions types was significantly higher than that of protrusions types. **Conclusion:** Peroxiredoxin may play an accelerated or delayed role in the process of degeneration of intervertebral disc.

Key words: Peroxiredoxin; western blot; degenerative intervertebral disc

Chinese Library Classification: R683 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1155-03

前言

下腰痛是脊柱外科的常见病,其中椎间盘退变为其主要原因之一,目前对椎间盘退变的原因有较多的研究,但究竟何种机制启动退变,退变发展过程中的具体机理如何目前尚不清楚。本课题组前期通过双向电泳及质谱分析研究发现在正常及退变椎间盘髓核中存在6种差异蛋白,Prx为其中一种^[1]。本研究通过免疫印迹法(western blot)探讨Prx在退变椎间盘髓核中的表达及临床意义,为进一步的深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2008年3月-2009年4月南方医科大学珠江医院骨科中心突出及脱出腰椎间盘髓核组织手术标本38例,年龄28~52岁,男20例,女18例;其中突出组织23例,脱出组织15

例;取材范围L3~L5。纳入标准:所有退变腰椎间盘患者临床表现均有出现1年以上明显的腰腿痛症状,并由MRI证实为腰椎间盘突出或腰椎间盘脱出,术后病理切片证实椎间盘髓核退变。排除标准:①既往有腰椎间盘手术史;②仅有单纯椎管狭窄或侧隐窝狭窄,而无椎间盘突出表现;③合并有脊柱肿瘤、感染、椎管内肿瘤及其他可致腰腿疼痛类疾病。收集正常及新鲜骨折腰椎间盘髓核标本10例,其中男6例,女4例,年龄21~45岁,取材范围L3~L5。标本取出后以无菌生理盐水洗净血迹,迅速置-80℃冰箱保存。

PMSF、Triton X-100和蛋白酶抑制剂混合试剂(美国Sigma公司);小鼠来源的Anti-单克隆抗体(美国Sigma公司);DAB显色试剂盒(美国Maxim Biotech公司);台式微量离心机、台式低温高速离心机和高速冷冻离心机(美国Beckman公司);Mini VE垂直电泳系统、半干电转仪(瑞典Amersham Pharmacia公司);IS2000R多功能影像系统(美国Kodak公司)。

1.2 方法:蛋白免疫印迹(western blot)法

将髓核组织从-80℃冰箱提出,剪碎后加裂解液置于冰上裂解后4℃、12 000 rpm离心5 mins,取上清得到蛋白。Bradford法测定蛋白浓度。将待测蛋白60 μl加入5 μl上样缓冲液用95℃煮5 min变性后,行12% SDS-PAGE电泳,然后电转移至PVDF膜上,再用含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液(20

作者简介:罗平,男(1984-),硕士研究生,研究方向:脊柱退行性疾病。E-mail: luoping_lc@yahoo.com.cn

△通讯作者:周初松,主任医师,副教授,研究方向:脊柱脊髓伤病学。E-mail: zcsmd@yahoo.com.cn

(收稿日期:2011-01-10 接受日期:2011-01-30)

mmol/L Tris-base ,137 mmol/L NaCl ,0.1 % Tween-20)4 C 孵育进行封闭过夜 ,TBST 缓冲液漂洗后 ,PVDF 膜在室温下用小鼠来源 Anti- 单克隆抗体(1:1000 稀释)孵育 1 h 经 TBST 缓冲液漂洗三次 ,再与 HRP 偶合的羊抗鼠 Ig G 二抗(1:2000)室温下孵育 1 h ,TBST 缓冲液漂洗三次 ,然后再与化学发光剂反应 1 min 在 Kodak IS2000R 多功能图象工作站采集结果。

1.3 统计结果及分析

通过 Western blot 检测所有标本中 Prx 的表达 ,数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件 ,Western blot 结果所得结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,采用单因素方差分析 ,组间两两比较采用 Dunnett's T3 检验进行分析。

2 结果

应用 Prx 抗体对三组的组织蛋白进行免疫印迹检测发现在 22KDa 附近有明显蛋白表达的条带 ,Prx 蛋白表达在突出及脱出髓核组织高于正常髓核组织(图 1、2)。经 β -actin 内参对照及统计分析显示(表 1) :正常髓核组织的 Prx 蛋白表达(0.245 \pm 0.074)明显低于突出髓核组织(0.905 \pm 0.053) ,差异显著 , $P < 0.001$,有统计学意义 ;正常髓核组织的 Prx 蛋白表达(0.245 \pm 0.074)低于脱出髓核组织 (0.927 \pm 0.032) ,差异显著 , $P < 0.001$,有统计学意义 ;突出髓核组织的 Prx 蛋白表达(0.905 \pm 0.053)与脱出髓核组织(0.927 \pm 0.032)比较 ,差异不显著 , $P > 0.05$,无统计学意义。

表 1 Prx 2 在正常及退变椎间盘髓核内的表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of Prx in the nucleus nucleus gelatinosus of degenerative disc(Mean \pm SD)

分组 Groups	例数 cases	灰度值 gray scale value
正常组 normal group	12	0.245 \pm 0.074
突出组 protrude group	26	0.905 \pm 0.053*
退变组 cataplasia group	16	0.927 \pm 0.032**
F value		/
P value		<0.01

Note:* vs. normal group $P < 0.01$;** vs. normal group $P < 0.01$ 。

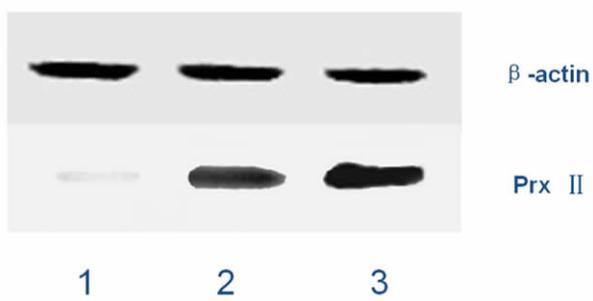


图 1 Prx 在不同髓核组织 Western blot 结果

1.正常髓核 2.突出髓核 3.脱出髓核。

Fig.1 The expression of Prx in each groups.

1. Normal 2. Nuclear extrusion 3. Nuclear protrusion .

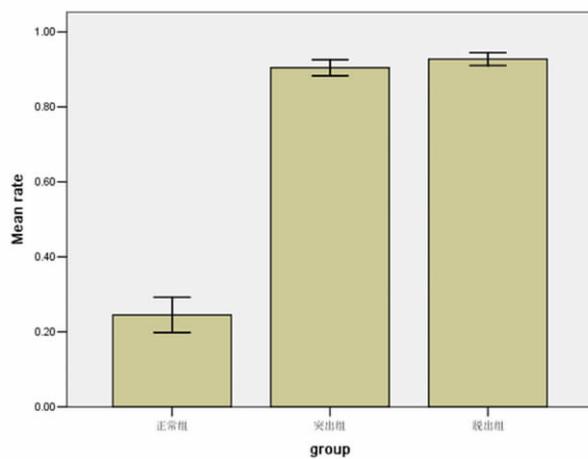


图 2 各组髓核内 Prx 表达情况

Fig. 2 The expression of Prx in three groups.

3 讨论

椎间盘退变的病因包括年龄、创伤、遗传等因素。椎间盘内的生物细胞因子及基质组成成分的改变在退变过程中产生了重要作用已为大多数学者所认同。髓核内蛋白多糖和水分的丢失是椎间盘退变的一个明显生化改变 ,蛋白多糖及水分的丢失直接导致椎间盘高度的降低以及椎间盘组成成分、生物力学、病理生理学变化。

Peroxiredoxin (Prx)是新近发现的过氧化物酶家族中的成员 ,其催化活性和蛋白序列与过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)等其它抗氧化剂完全不同。Prxs 在宫颈癌^[2]、关节炎^[3]、肺间质纤维化^[4]、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)和帕

金森病(Parkinson's disease)^[5]等有研究报道。哺乳动物的 Prxs 蛋白家族可分为 3 个亚类 :①2-Cys Prxs(Prx ~) ;②不典型 2-Cys Prx(Prx) ;③1-Cys Prx(Prx)^[6]。2-Cys Prxs 广泛存在于原核生物和真核生物中 ,在细胞内的各个细胞器均有分布 ,如 :细胞质、线粒体、内质网、过氧化物酶体 ,甚至细胞膜^[7]。Prx 在人类红细胞中含量丰富 ,存在人体内很多组织中 ,具有抗氧化、调节细胞内信号转导、参与细胞周期进程和影响细胞增殖等功能。Kim 等^[8]通过对宫颈癌不同阶段的比较 ,发现 Prx 的表达随着肿瘤的发展而上调。Li 等^[9]研究发现 Prx 在黄曲霉素诱导的树鼯肝癌组织中表达明显增高。

本研究小组前期通过双向凝胶电泳和质谱分析对正常与退变椎间盘髓核中蛋白质进行差异比较,发现 Prx 存在于退变椎间盘髓核中,而正常及新鲜骨折椎间盘髓核中没有。本研究通过 western blot 检测正常椎间盘髓核和突出及脱出椎间盘髓核中 Prx 的表达差异,结果显示 Prx 在正常及新鲜骨折椎间盘髓核中没有表达,在突出椎间盘髓核中有中量表达,而在脱出椎间盘髓核组织中 Prx 大量表达。Prx 突出及脱出椎间盘髓核组织中有表达,而在正常及新鲜骨折椎间盘髓核组织没有表达,与双向电泳的研究结果一致,进一步验证了 Prx 的表达在正常及退变椎间盘髓核组织中存在差异,证实了 Prx 在椎间盘退变的不同阶段表达量不同。Prx 在椎间盘髓核内的含量随着椎间盘退变程度的加重而增加,说明其在椎间盘退变的过程中扮演着重要角色。但其发挥着什么作用,是促进退变还是延缓退变?具体的机制怎样?

Nerlich 等^[10]用免疫组化方法研究 N-羧甲基赖氨酸(CML,活性氧的一种生物标记)在人各个年龄阶段的椎间盘内表达时,发现 CML 沉积最早出现于 13 岁人的髓核内,随着年龄的增长,髓核和纤维环内 CML 沉积越多,且髓核区域比纤维环内 CML 的沉积更多,提示活性氧的增多与椎间盘退变有关。Li 等^[9]在培养的 Hep3B 肝癌细胞株中通过 RNA 干扰沉默 Prx,结果显示细胞的增值和克隆明显减少,流式细胞学分析细胞的凋亡百分比增加。Choi 等^[11]研究发现,Prx 是血小板源性生长因子(PDGF)介导的信号通路的负性调节因子,而 PDGF 可通过调节 H₂O₂ 的浓度来调节多种信号蛋白的酪氨酸残基磷酸化,使之失活或活化。Gruber 等^[12]通过椎间盘细胞进行体外培养,在培养液中加入不同浓度的 IGF-1 和 PDGF,发现这两种生长因子均可降低椎间盘细胞的细胞凋亡指数(AI),并且抑制效应与生长因子的浓度相关。综合以上文献复习结果,一方面,Prx 可能通过其独特的抗氧化保护机制在椎间盘退变过程中起延缓退变的作用;另一方面,Prx 可促进或阻止细胞凋亡,但对椎间盘退变细胞凋亡的作用尚不明确。然而,作为一种在椎间盘髓核内新发现的蛋白,Prx 在肿瘤、神经退变性疾病中得到了较多的研究,在疾病的发生发展过程中也起到了重要作用^[2,5,9,13]。本实验证实了 Prx 在正常及椎间盘退变不同阶段髓核中的表达差异,但对于其在椎间盘内的具体作用还不清楚,是否能够导致蛋白多糖的改变,胶原比例的失调,炎症介质的产生,相关细胞因子及酶类的变化还不可知,相关研究正在进行之中。

参考文献(References)

- [1] 吕志德,周初松,靳安民,等.正常和退变腰椎间盘蛋白质的双向电泳和质谱鉴定 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(07): 1271-1274
Lü Zhi-de, Zhou Chu-song, Jin An-min, et al. Identification of the proteins in the normal and degenerative intervertebral discs by two-dimensional electrophoreses and mass spectrometry[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009,13 (07): 1271-1274
- [2] Kim, K., et al. Expression of human peroxiredoxin isoforms in response to cervical carcinogenesis[J]. Oncol Rep, 2009. 21(6): p. 1391-6
- [3] Bo, G.P., et al. Analyses of differential proteome of human synovial fibroblasts obtained from arthritis[J]. Clin Rheumatol, 2009. 28(2): p. 191-9
- [4] Vuorinen, K., et al. Peroxiredoxin II expression and its association with oxidative stress and cell proliferation in human idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J Histochem Cytochem, 2008. 56(10): p. 951-9
- [5] Hattori, F. and S. Oikawa. Peroxiredoxins in the central nervous system [J]. Subcell Biochem, 2007. 44: p. 357-74
- [6] Rhee, S.G., et al. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases[J]. IUBMB Life, 2001. 52(1-2): p. 35-41
- [7] Kang, S.W., et al. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications [J]. Trends Mol Med, 2005. 11 (12): p. 571-8
- [8] Kim, H.J., et al. Preferential elevation of Prx I and Trx expression in lung cancer cells following hypoxia and in human lung cancer tissues [J]. Cell Biol Toxicol, 2003. 19(5): p. 285-98
- [9] Li, Y., et al. Proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) and functional identification of candidate protein peroxiredoxin II [J]. Proteomics, 2008. 8(7): p. 1490-501
- [10] Nerlich, A.G., et al. Immunomorphological analysis of RAGE receptor expression and NF-kappaB activation in tissue samples from normal and degenerated intervertebral discs of various ages [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1096: p. 239-48
- [11] Choi, M.H., et al. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II[J]. Nature, 2005. 435(7040): p. 347-53
- [12] Gruber, H.E., H.J. Norton and E. Jr Hanley. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2000. 25(17): p. 2153-7
- [13] Zhang, B., Y. Wang and Y. Su. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy[J]. Cancer Lett, 2009