

软骨终板细胞凋亡的影响因素及其调控途径的研究进展

李文超^{1△} 林一峰¹ 沈国喜¹ 原超¹ 池立业¹ 朱辉¹ 张文财¹ 刘洪江¹

【关键词】 椎间盘退变;软骨终板细胞凋亡;细胞凋亡途径;颈腰痛

【中图分类号】 R68 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-0205(2019)04-0085-04

大约 80%~90% 的人在其一生中或多或少的会受到颈腰痛的折磨,以颈腰痛为主要症状的退变性脊柱病,其病理基础责之于椎间盘的退变^[1]。受年龄、异常应力等诱发,椎间盘软骨终板细胞的凋亡呈线性增加^[2],导致活性细胞密度降低^[3],刺激促炎细胞因子(如白细胞介素-1、肿瘤坏死因子等)的上升,不仅抑制了蛋白聚糖、II 型胶原等细胞外基质的合成,还促进基质金属蛋白降解酶(MMP-1,-2,-3,-4,-13 及-6 等)的释放,水、离子等营养通道也随之改变^[4,5],进一步降低软骨终板的生物物理学特性^[6],加速整个椎间盘退变。因此研究影响软骨终板细胞凋亡的诱发因素和调控其凋亡的信号传导途径是维持细胞正常稳态和延缓椎间盘退变、预防脊椎病变的一种策略。

1 软骨终板细胞凋亡及其影响因素

1.1 细胞凋亡

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡过程,细胞凋亡的失控被认为是众多退行性疾病(如椎间盘退变)、缺血性损伤、自身免疫性疾病、癌症等诸多疾病的致病因素^[7,8]。凋亡细胞表现出明显的形态学改变,如细胞逐渐圆形、假足回缩、细胞皱缩和质膜鼓泡以及细胞核凝聚和碎裂等。触发细胞凋亡是需要激活半胱氨酸蛋白酶(Caspase)家族,而引起的一系列复杂的能量依赖性级联反应^[8]。

1.2 影响软骨终板细胞凋亡的因素

软骨终板细胞凋亡作为椎间盘退变的始动因子,受多因素共同作用的复杂过程,这些因素包括年龄、营养缺乏、机械压力、缺氧、氧化应激反应、高糖及炎性细胞因子等。

1.2.1 年龄 Ariga 等^[2]报道随着年龄的增加软骨终板中阳性凋亡细胞数目明显增加,软骨终板的破坏

程度也会随着细胞凋亡的增加而加重,与椎间盘退变程度正相关。

1.2.2 低营养及缺氧 低胎牛血清^[9]、低营养^[10]都可诱导软骨终板细胞的凋亡,且研究表明营养缺乏可通过激活上调 Bcl-2/腺病毒 E1B 19 kDa 相互作用蛋白 3(BNIP3)的表达,导致 BNIP3 线粒体易位,降低线粒体膜电位的途径来介导软骨终板干细胞的凋亡^[11]。缺氧条件^[10,12]下软骨终板细胞凋亡明显增加,低氧诱导因子 1 α 可抑制软骨终板细胞在低氧环境中发生凋亡^[12]。

1.2.3 机械压力 机械压力能诱导体外培养小鼠软骨终板细胞凋亡,凋亡细胞的数量取决于负载的重量及持续时间,在机械刺激前用 JNK, p38-MAPK 和 ERK 抑制剂处理,可以激活 JNK, p38 MAPK 和 ERK 信号传导通路,逆转软骨终板细胞的凋亡^[13]。

1.2.4 氧化应激 Chen 等^[14]用 H₂O₂ 模拟氧化应激反应可以增加软骨终板细胞的自噬和凋亡。补充抗氧化剂可抑制活性氧的产生,防止椎间盘细胞的凋亡和衰老^[15]。细胞沉默调节蛋白 1 能通过 P53/P21CIP 信号途径来减轻氧化应激所诱导的软骨终板细胞的凋亡^[16]。

1.2.5 高糖及炎性因子 高糖能显著增加软骨终板细胞凋亡和活性氧的积累,且呈剂量-时间依赖性关系^[17]。另外,还有一些既具能诱发软骨终板细胞凋亡又能促进基质降解的炎性细胞因子,如白细胞介素^[18,19]、一氧化氮^[20]、肿瘤坏死因子- α ^[19]、基质金属蛋白降解酶-13^[21]等。

2 细胞凋亡途径及信号调控通路

2.1 细胞凋亡的三种途径

椎间盘细胞(髓核、软骨终板细胞)凋亡由线粒体、死亡受体和内质网应激三条凋亡途径发生的,其中内质网应激途径多在轻度椎间盘退变中起作用,死亡受体通路多在轻、中度阶段,线粒体途径多在中、重度阶段中起作用^[22]。三条途径既相互交叉又共同作用,最

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212454)。

¹ 广州中医药大学第三附属医院脊柱骨科(广州,518000)

[△]通信作者 E-mail:1264265810@qq.com

终都是激活凋亡级联信号反应的终端执行器(Caspase-3)而执行细胞凋亡。Yuan等^[23]证明软骨终板细胞的凋亡和Caspase-3的活性有时间依赖性增加的关系。Ding等^[24]用慢病毒caspase-3 shRNA介导的干扰剂能成功地抑制内源性Caspase-3的表达,从而有效防止软骨终板细胞的凋亡。

2.2 线粒体凋亡途径

线粒体凋亡途径属内源性细胞内凋亡途径,受多种信息通路和功能蛋白的调节,近年来关于活化的B细胞核因子 κ -轻链增强子(NF- κ B)信号的传导通路^[25]和B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白家族的研究较多,其中与后者关系最为密切^[26]。线粒体凋亡途径受多种细胞内凋亡信号激发,如:损伤DNA片段、各种细胞因子或刺激信号(如活性氧、细胞质中 Ca^{2+} 超载、应激、毒素和ATP耗竭)等,使线粒体内外膜之间的通透性转变孔开放,导致细胞色素C、凋亡诱导因子、核酸内切酶G、Smac和HtrA2等毒性蛋白从线粒体内膜释放到细胞质中,细胞色素C更是进一步与胞浆蛋白凋亡蛋白酶激活因子-1相互作用,与Caspase-9形成凋亡小体复合物,启动下游的Caspase级联反应从而导致核纤层蛋白的裂解和核分裂^[27]。

Li等^[28]证明了通过激活软骨终板细胞酸敏感离子通道1a能触发 Ca^{2+} 依赖性蛋白酶活性和NF- κ B信号的传导,致胞外酸中毒诱导细胞色素C从线粒体转到细胞质并激活Caspase-9和Caspase-3,导致软骨终板细胞凋亡。 H_2O_2 诱导的氧化应激是通过ROS/MAPK/NF- κ B信号通路来增加软骨终板细胞的凋亡和钙化的,抑制活性氧(ROS)的生成可减少线粒体介导的软骨终板细胞凋亡^[25]。Kong等^[13]实验表明机械压力可致线粒体膜电位的损失、细胞色素C的释放,是由MAPK信息通路介导的线粒体凋亡途径来诱导大鼠软骨终板细胞凋亡的。

Bcl-2蛋白家族有促凋亡蛋白(Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim和Hrk)和抗凋亡蛋白(Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1和Mcl-1)组成,抗凋亡Bcl-2和Bcl-xL蛋白阻止细胞色素C的释放抑制凋亡,而促凋亡蛋白Bad, Bid, Bax和Bim促进细胞色素C的释放诱导细胞凋亡^[26]。Yuan等^[23]通过牵张诱导软骨终板干细胞的凋亡,检测到促凋亡因子BNIP3与抗凋亡蛋白Bcl-2的比值显著升高,促凋亡蛋白BAK和Bax增加,而抗凋亡Bcl-xL减少。Chen^[29]证明了mir-34a通过直接靶向其3'非翻译区来抑制软骨终板细胞中Bcl-2的表达,且通过mir-34a结合位点的突变来消除这种抑制作用。参与椎间盘发育的胞外蛋白CCN3与肿瘤坏死家族细胞因子协同作用,导致软骨终板细胞中Bax和Bcl-2水平失衡,集聚活性氧,增加细胞色

素C释放^[30]。Pan等^[31]实验显示 H_2O_2 能诱导软骨终板细胞凋亡,Bax和Caspase3的表达上调。高糖培养的软骨终板细胞中也能检测到线粒体膜电位的破坏,Caspase-3、Caspase-9、Bax和细胞色素C的表达水平上升,抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平降低^[17]。

2.3 死亡受体凋亡途径

死亡受体凋亡途径属细胞外凋亡途径,目前Fas/FasL死亡受体信号的调控在软骨终板细胞凋亡中最受关注。细胞表面的促凋亡受体有肿瘤坏死因子受体、Fas受体、死亡受体3和TNF相关凋亡诱导配体等多种,一旦被激活,将与它们各自的配体结合,集聚激活的蛋白受体-结构域形成的超分子复合物,会被识别为死亡诱导信号复合物,激活Caspase-8,最终激活下游的caspase级联反应来启动细胞的凋亡。贾长青等^[32]检测Fas的表达在颈椎间盘的软骨终板中高于其在纤维环和髓核中的表达,说明在椎间盘退变中Fas凋亡途径主要作用于软骨终板。Haschtmann等^[33]在终板骨折标本检测到软骨终板细胞中caspase 3和Fas/FasL蛋白复合物和肿瘤坏死因子基因的表达在创伤后24 h后明显上调。在退变的软骨终板中上调miR-34能增加Fas介导的软骨终板细胞凋亡^[29]。作为细胞外蛋白之一的CCN蛋白,能够与肿瘤坏死因子受体、FasL等协同,促进活性氧的积累,导致软骨终板细胞的过度凋亡^[31]。miR-625在软骨终板干细胞的下调可诱导Fas表达上调和抗凋亡bcl-2的表达降低从而使细胞凋亡增加^[34]。Wang等^[35]用胰岛素样生长因子-1(IGF-1)可抑制这些Fas抗体诱导的软骨终板细胞的凋亡。

2.4 内质网应激凋亡途径

内质网应激途径对软骨终板细胞凋亡的研究较少,往往与线粒体凋亡途径共同起作用的。内质网是用于分泌和膜蛋白合成、折叠和组装的重要细胞器,维持着细胞内 Ca^{2+} 的稳态。营养缺乏、氧化应激、细胞内 Ca^{2+} 稳态失衡、糖基化抑制和蛋白质错误折叠等会导致内质网应激。过度的内质网应激则引起蛋白质折叠功能障碍和转运受损,耗尽内质网管腔内有 Ca^{2+} (内质网应激反应性凋亡的起始信使^[36]),激活一些凋亡因子、功能蛋白及其信息通路的表达(如蛋白激酶RNA样内质网激酶、肌醇需要蛋白1、转录因子6与葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、Bcl-2家族等),诱导表达伴侣蛋白阻止其它新蛋白质合成,激活内质网膜上的Caspase-12发生级联凋亡反应^[8]。Yuan等^[37]用卵巢癌G蛋白偶联受体1介导的酸诱导软骨终板细胞凋亡被证明是激活了对 Ca^{2+} 敏感蛋白酶通过内质网应激凋亡途径和下游信号Bid, Bad和Caspase 3线粒体通路进行的。有实验证明了椎间盘细胞(软骨终板、

髓核) 凋亡与葡萄糖调节蛋白 78, DNA 损伤诱导基因 153, Casase12 的表达以及线粒体细胞色素 C 的释放呈正相关, 提示线粒体和内质网共同参与细胞的凋亡^[38]。转录因子 6^[39] 能激活软骨终板细胞中内质网应激介导的 caspase 级联凋亡反应。Gu 等^[40] 用 H₂O₂ 处理软骨细胞, 检测 Caspase-3, Bax 和 C/EBP-同源蛋白(CHOP) 的含量显著增加, 二氮嗪处理后, 能有效抑制软骨细胞中 Caspase-3, Bax 和 CHOP 的表达量。说明二氮嗪能减轻内质网应激, 抑制细胞凋亡。

3 展望

虽然目前对软骨终板细胞凋亡的研究有着诸多可喜的发现, 但还缺乏深入系统的研究。将来可以在阻断影响凋亡途径的信息通路(如 JNK, p38-MAPK, ERK, P53/P21CIP, NF- κ B 及 ROS 等) 或抑制一些功能蛋白、细胞因子(如 IGF-1, miR-625, CHOP, GRP78, BNIP3, Bax, Bcl-2 及 Bcl x 等) 的表达等方面作进一步探索, 多角度发现新的干预软骨终板细胞凋亡的药物和方法, 以期在椎间盘退变发生的早期就能得到有效的修复。

参考文献

- [1] SCHEPPER E I, DAMEN J, MEURS J B, et al. The association between lumbar disc degeneration and low back pain: the influence of age, gender, and individual radiographic features[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2010, 35(5): 531-536.
- [2] ARIGA K, MIYAMOTO S, NAKASE T, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc[J]. Spine, 2001, 26(22): 2414-2420.
- [3] TOMASZEWSKI K A, WALOCHA J A, MIZIA E, et al. Age- and degeneration-related variations in cell density and glycosaminoglycan content in the human cervical intervertebral disc and its endplates[J]. Pol J Pathol, 2015, 66(3): 296-301.
- [4] NGUYEN Q T, JACOBSEN, N CHAHINE, et al. Effects of inflammation on multiscale biomechanical properties of cartilaginous cells and tissues[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2017, 3(11): 2644-2656.
- [5] ABBIE L A, BINCH IRVING M, SHAPIRO, et al. Syndecan-4 in intervertebral disc and cartilage: Saint or Synner? [J]. Matrix Biol, 2016, 52-54: 355-362.
- [6] NEWELL N, LITTLE J P, CHRISTOU A, et al. Biomechanics of the human intervertebral disc: a review of testing techniques and results[J]. Mech Behav Biomed Mater, 2017, 69: 420-434.
- [7] SOLANO-GÁLVEZ S G, ABADI-CHIRITI J. Apoptosis: activation and inhibition in health and disease[J]. Med Sci (Basel), 2018, 6(3): 54-58.

- [8] ZHANG F, ZHAO X L, SHEN H X, et al. Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(6): 1439-1448.
- [9] LI D, ZHU B, DING L, et al. Role of the mitochondrial pathway in serum deprivation-induced apoptosis of rat endplate cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 452(3): 354-360.
- [10] 浦路桥, 刘杰, 袁超, 等. 缺氧和营养缺乏对软骨终板干细胞凋亡的影响及相关机制[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2017, 27(5): 449-455.
- [11] HE Z, PU L, YUAN C, et al. Nutrition deficiency promotes apoptosis of cartilage endplate stem cells in a caspase-independent manner partially through upregulating BNIP3[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(1): 25-32.
- [12] 黄志刚, 王耀, 马克, 等. 低氧诱导因子 1 α 基因在大鼠终板软骨细胞中的表达及意义研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2017, 31(3): 351-356.
- [13] KONG D C, ZHENG T S, ZHANG M, et al. Static mechanical stress Induces apoptosis in rat endplate chondrocytes through MAPK and mitochondria-dependent caspase activation signaling pathways [J]. PLoS One, 2013, 8(7): 694-698.
- [14] CHEN K, XIAOHUA L V, WEI L I, et al. Autophagy is a protective response to the oxidative damage to endplate chondrocytes in intervertebral disc: implications for the treatment of degenerative lumbar disc[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 9(4): 404-406.
- [15] FENG C, YANG M, LAN M, et al. ROS: Crucial intermediators in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017: 5601593.
- [16] ZHOU N, LIN X, DONG W, et al. SIRT1 alleviates senescence of degenerative human intervertebral disc cartilage endo-plate cells via the p53/p21 pathway[J]. Sci Rep, 2016, 6: 226-228.
- [17] JIANG Z, LU W, ZENG Q, et al. High glucose-induced excessive reactive oxygen species promote apoptosis through mitochondrial damage in rat cartilage endplate cells[J]. Orthop Res, 2018, 36(9): 2476-2483.
- [18] PAN T, REN M D, ZHU M D, et al. The NLRP3/Caspase-1/Interleukin-1 β axis is active in human lumbar cartilaginous endplate degeneration[J]. Clin Orthop Relat Res, 2016, 474(8): 1818-1826.
- [19] ZARIEL I, JOHNSON, ZACHARY R. et al. Disc in flames: roles of TNF- α and IL-1 β in intervertebral disc degeneration[J]. Eur Cell Mater, 2015, 30: 104-117.
- [20] MOBASHERI A, MATTA C. Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Maturitas, 2015, 80(3): 237-244.
- [21] 牛凯, 赵永见, 张雷, 等. 苦杏仁苷联合羟基红花黄色素 A

对 IL-1 β 诱导的大鼠椎间盘软骨终板细胞的影响[J]. 药
学学报, 2014, 49(8): 1136-1142.

[22] WANG H, LIU H. Role of death receptor, mitochondrial
and endoplasmic reticulum pathways in different stages of
degenerative human lumbar disc[J]. Apoptosis, 2011, 16
(10): 990-1003.

[23] CHAO Y, PU L Q, HE Z L, et al. BNIP3/Bcl-2-mediated
apoptosis induced by cyclic tensile stretch in human carti-
lage endplate-derived stem cells[J]. Exp Ther Med, 2018,
15(1): 235-241.

[24] DING L, WU P, XU G, et al. Lentiviral-mediated RNAi
targeting caspase-3 inhibits apoptosis induced by serum
deprivation in rat endplate chondrocytes in vitro[J]. Braz
J Med Biol Res, 2014, 47(6): 445-451.

[25] HAN Y, LI X, YAN M, et al. Oxidative damage induces
apoptosis and promotes calcification in disc cartilage end-
plate cell through ROS/MAPK/NF- κ B pathway: implica-
tions for disc degeneration. [J] Biochem Biophys Res
Commun, 2017, 23(17): 30578-8.

[26] KIRSTEEN J, CAMPBELL, STEPHEN W G, et al. Tar-
geting BCL-2regulated apoptosis in cancer[J]. Open Biol,
2018, 8(5): 180002.

[27] HALIME, KALKAVAN, DOUGLAS R, et al. MOMP,
cell suicide as a BCL-2 family business[J]. Cell Death Dif-
fer, 2018, 25(1): 46-55.

[28] LI X, WU FR, XU RS, et al. Acid-sensing ion channel 1a-
mediated calcium influx regulates poptosis of endplate
chondrocytes in intervertebral discs[J]. Expert Opin Ther
Targets, 2014, 18(1): 1-14.

[29] CHEN H, WANG J, HU B, et al. MiR-34a promotes Fas-
mediated cartilage endplate chondrocyte apoptosis by tar-
geting Bcl-2[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 406(1-2): 21-
30.

[30] DING L, WU J P, FANG D, et al. Effects of CCN3 on rat
cartilage endplate chondrocytes cultured under serum dep-
rivation in vitro[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3): 2017-
2022.

[31] PAN Y, CHEN D, LU Q, et al. Baicalin preventsthe apop-
tosis of endplate chondrocytes by inhibiting the oxidative
stress induced by H₂O₂ [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(3):
2985-2991.

[32] 贾长青, 刘洪亮, 王俊丰, 等. Bcl2、Fas 在人颈椎间盘软骨
终板、纤维环及髓核中的表达及意义[J]. 中国组织化学
与细胞化学杂志, 2007, 16(2): 169-173.

[33] DANIEL HASCHTMANN, JIVKO V, STOYANOV, et
al. Vertebral endplate trauma induces disc cell apoptosis
and promotes organ degeneration in vitro[J]. Eur Spine J,
2008, 17(2): 289-299.

[34] BEILEI ZHAN, YAN ZHAN, WEI WANG et al. Expres-
sion of miR-625 and Fas in cervical vertebral cartilage
endplate[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 513-519.

[35] WANG Y J, SHI Q, SUN P, et al. Insulin-like growth fac-
tor-1 treatment prevents anti-Fas antibody-induced apop-
tosis in endplatechondrocytes[J]. Spine, 2006, 31(7): 736-
741.

[36] ENTAZ BAHAR, HYONGSUK KIM. ER Stress-media-
ted signaling: action potential and Ca²⁺ as key players[J].
Int J Mol Sci, 2016, 17(9): 1558-1562.

[37] YUAN F L, WANG H R, ZHAO M D, et al. Ovarian
cancer G protein-coupled receptor 1 is involved in acid-in-
duced apoptosis of endplatechondrocytes in intervertebral
discs[J]. Bone Miner Res, 2014, 29(1): 67-77.

[38] ZHAO C Q, ZHANG Y H, JIANG S D, et al. Both endo-
plasmic reticulum and mitochondria are involved in disc
cell apoptosis and intervertebral disc degeneration in rats
[J]. Age(Dordr), 2010, 32(2): 161-177.

[39] HAN X, ZHANG P, JIANG R, et al. Explore on the effect
of ATF6 on cell growth and apoptosis in cartilage devel-
opment[J]. Histochem Cell Biol, 2014, 142(5): 497-509.

[40] GU Y, CHEN J, MENG Z, et al. Diazoxide prevents
H₂O₂-induced chondrocyte apoptosis and cartilage degen-
eration in a rat model of osteoarthritis by reducing endo-
plasmic reticulum stress[J]. Biomed Pharmacother, 2017,
95: 1886-1894.

(收稿日期: 2018-08-07)

广告目次

1. 国药集团精方(安徽)药业股份有限公司	
颈舒颗粒	封二
2. 颈复康药业集团有限公司	
腰痛宁胶囊	彩插一
3. 广东省医药进出口公司珠海公司	
同息通	封三
4. 陕西盘龙药业集团股份有限公司	
盘龙七片	封四