

椎间盘退变中自噬与凋亡的分子关系研究进展

茅峰^{1,2} 刘建文³ 陈静云³ 姜宏^{2△}

[关键词] 自噬;凋亡;椎间盘退变;综述文献

[中图分类号] R681.5 [文献标志码] A [文章编号] 1005-0205(2021)09-0081-04

椎间盘退变(IDD)是各种脊柱退行性疾病的病理基础,包括椎间盘突出症,椎体滑脱,椎管狭窄等,也是导致慢性腰背痛(LBP)的一个重要原因^[1-2]。一般认为细胞外基质(ECM)的丢失,椎间盘细胞减少和炎症反应在椎间盘退变中起重要作用^[3-4]。髓核细胞的减少是导致椎间盘退变的直接原因,随着髓核(NP)细胞过度凋亡,细胞外基质合成减弱,导致正常椎间盘结构和生理功能的破坏,进而加重椎间盘退变^[5-7]。近年来通过诱导髓核细胞自噬来拮抗凋亡,延缓椎间盘退变,逐渐成为热点^[8-9]。本文综述了最近几年,椎间盘组织中凋亡及自噬的研究,重点指出两者介导椎间盘退变过程中分子机制及相互串扰机制,为治疗椎间盘退变提供新思路。

1 凋亡与椎间盘退变

1.1 凋亡分子机制

凋亡包含两个核心途径——死亡受体介导(外源性)途径和线粒体依赖性(内源性)途径。外源性途径是由肿瘤坏死因子受体(TNFRs)、TNF 相关凋亡诱导配体受体(TRAILRs)和死亡受体(Fas 等)激活引发的^[10-11]。线粒体依赖性的内源性途径激活以线粒体外膜通透性(MOMP)为标志^[12]。

1.2 凋亡与椎间盘变性

髓核细胞过量的死亡导致细胞外基质生成减少,这是椎间盘变性最明显的生物学变化。此外,在椎间盘退变期间,促炎因子在髓核细胞中高表达,这些病理变化加剧了机体脊柱原有结构破坏和生物力学变化^[13-15]。内源性和外源性的凋亡途径均在髓核细胞变性中起关键作用,有证据表明在凋亡的内在途径中机体主要通过调节 Bcl-2, Caspase-3, 胶原蛋白和蛋白聚

糖的水平参与与髓核细胞变性。在血清饥饿的情况下,髓核细胞过表达 Bcl-2, 细胞凋亡减少, Caspase-3 水平降低, II 型胶原蛋白和蛋白聚糖的 mRNA 水平升高^[16]。线粒体功能障碍是 ROS 产生的主要原因,它的特征是线粒体质量减少,呼吸链缺陷,线粒体膜通透性增加以及线粒体膜电位的降低,功能异常的线粒体会泄漏更多的电子以产生 ROS。另一方面,ROS 累积到一定程度,会以线粒体为靶标发起攻击,致使线粒体 DNA 和呼吸酶遭受氧化性损伤,进一步加重线粒体功能障碍。用 H₂O₂ 处理的髓核细胞凋亡增加,检测到蛋白聚糖和 II 型胶原的 mRNA 水平降低^[17-18]。相反氧化还原辅助因子辅酶 PQQ,可清除细胞中积聚的活性氧(ROS)并抑制细胞凋亡^[19]。不仅如此,存在 PQQ 的情况下,尽管髓核细胞处于诱导凋亡环境中,仍可维持一定的细胞外基质产生。在研究炎症诱导椎间盘退变发病机理过程中,发现促炎性细胞因子(如 IL-1 β)会导致细胞外基质的表达下降,加入抗氧化剂后,IL-1 β 诱导的椎间盘退变明显受到了抑制^[20-21]。

在椎间盘变性过程中,髓核细胞还可以通过调节 Fas 等死亡受体介导凋亡的发生。髓核细胞受到刺激后,较低水平的 miR-155 即可以通过表达具有死亡域的 Fas 相关蛋白来靶向募集 Caspase-3,进一步促进细胞凋亡。如长非编码 RNA GAS5 通过该途径介导 Bcl-2 下调和 Caspase-3 上调促进椎间盘髓核细胞的凋亡。Qiu 等^[22]发现 RIPK1 的过表达可抑制 TNF 和 Caspase-3 活性,具有阻止或延缓椎间盘疾病变性潜力,因此可开发出毒性低的 RIPK1 来治疗或延缓椎间盘退化。

2 自噬与椎间盘退变

2.1 自噬分子机制

自噬过程作为细胞生存机制受到 Atg5 相关(ATG)蛋白严格调控,已发现的 ATG 基因编码蛋白中,ATG5 是目前被认为对于自噬囊泡的形成是必不可少的,敲除或靶向抑制 ATG5 会导致自噬水平的下调或完全抑制^[23-24]。雷帕霉素(mTOR)是一种机体

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK20190191)

¹ 上海中医药大学(上海,201203)² 苏州市中医医院³ 华东理工大学

△通信作者 E-mail:honghong751@126.com

必需的丝氨酸/苏氨酸激酶,是 PI3K/Akt/mTOR 信号传导途径的下游介质,负调控自噬,细胞应激后, mTORC1 去磷酸化的导致自噬激活^[25-28]。AMP 激活蛋白激酶 (AMPK) 是细胞面对能量供应缺失的中央调节器, AMPK 的核心是通过调控 mTORC1 活性来影响自噬过程^[29-30]。不仅如此, AMPK 还可以通过增加 ATG 表达, 提高自噬体膜结构的募集^[31]。Beclin-1 基因同样对于自噬至关重要, 是延伸自噬体的脂质膜, 促进被消除底物的募集和自噬体的成熟所必需的^[32-33]。

2.2 自噬与椎间盘变性

自噬作为细胞 II 型程序性死亡机制存在于各个组织和器官的发育过程中, 低水平的自噬在非退行性大鼠的髓核细胞中被观察到, 验证了自噬和椎间盘髓核细胞退变存在联系^[34]。Zhang 等^[35]发现自噬可能有助于髓核细胞维持外基质 (ECM) 的代谢平衡。也有报告指出 mRNA-129-5P 的甲基化通过靶向 Beclin-1 调节椎间盘退变来调节髓核细胞自噬, 阻止了髓核细胞的凋亡^[36]。Shen 等^[37]证实, IL-1 β 本身不会诱导纤维环 (AF) 细胞自噬, 但当血清剥夺诱导的自噬作用明显增强, 凋亡细胞减少, 证明了细胞的自噬作用可保护部分 AF 细胞免受凋亡。Zheng 等^[38]使用亚精胺促进髓核自噬作为对抗细胞凋亡的保护机制成功的改善椎间盘退变。在根据 MRI 确定的人类变性椎间盘的等级, 检查了重要的自噬通量标志物 LC3 和 p62 的表达。LC3-II 在 Pfirrmann 等级 III 中表达最高, 而其他等级的表达水平则明显更低, 而 p62 与椎间盘退变级别同向升高, 直至 V 级, 从这些结果中我们可以看出, 随着 Pfirrmann 等级的升高自噬反应逐渐减弱, 甚至自噬功能障碍^[39]。Miyazaki 等^[40]通过减少椎间盘髓核细胞营养供给诱导凋亡, 而 rhSIRT1 阻止了这种凋亡并诱导了自噬, 用抑制剂阻断自噬后, 观测到细胞凋亡显着增加, 该实验证明 rhSIRT1 通过诱导自噬高表达而表现出抗凋亡作用。髓核细胞在遭受外界压力刺激下, 可以通过调节细胞自噬水平提高细胞存活率, 从而改善椎间盘退变。然而在糖尿病患者的椎间盘退变实验中, 在高葡萄糖浓度下, 髓核、AF 细胞自噬标记物表达均随着剂量和时间而增加, 证实自噬与成年糖尿病患者椎间盘退变的潜存在正相关, 预防自噬可被认为是延缓成人糖尿病患者椎间盘变性的治疗方案^[41]。所以, 自噬可能拥有决定细胞命运的双重作用, 取决于响应外部刺激时不同细胞内途径的激活和基因表达谱的特定变化。

3 自噬与凋亡在椎间盘退变中共同的分子机制

3.1 氧化应激

ROS 对髓核细胞的自噬与凋亡均有促进作用。

随着椎间盘退变进展, 髓核细胞中线粒体质量减少, 线粒体呼吸增强, 退化性椎间盘中过多的产生过多的 ROS, 使 ROS 在椎间盘细胞中生成与清除关系失衡, 导致氧化应激反应发生。ROS 已经被确定为在体外对髓核细胞的有效促细胞凋亡因子^[43]。基于这些发现, 抗氧化可以作为防止椎间盘细胞凋亡, 增加椎间盘中细胞存活潜在措施。不仅如此, 椎间盘细胞自噬过程同样有 ROS 参与, 已发现 H₂O₂ 刺激大鼠髓核细胞通过 ERK/mTOR 信号通路激发下游效应器进而促进细胞的自噬。血清剥夺同样引起的细胞中产生 ROS, 通过 AMPK/mTOR 信号通路促进的自噬^[44]。Bai 等^[45]认为自噬可帮助椎间盘细胞清除过量 ROS 以及受损的细胞器等, 减少髓核细胞凋亡, 从而使椎间盘细胞在一定程度下氧化损伤中存活。然而, 过多的 ROS 产生导致自噬的过度激活, 可能造成的椎间盘细胞自噬性死亡, 加重椎间盘退变的进程。

3.2 胱天蛋白酶

胱天蛋白酶对细胞自噬及凋亡均有调节作用, 其作为细胞中的非活性前体存在, 通过寡聚, 调节前结构域的裂解或与内源性抑制剂的解离而被激活。胱天蛋白酶识别并切割多种 ATG, 导致自体吞噬功能的废除, 有利于体内平衡偏向于凋亡^[46-49]。然而, 胱天蛋白酶介导的 ATG 的裂解并不总是没有活性的产物, 已经显示了几种 ATG 片段具有新的活性, 这些具有活性的新片段以多种方式影响凋亡和自噬, 所以胱天蛋白酶也存在对自噬有促进作用的可能^[50-51]。已发现 Caspase-1 可能引起的 LC3 和 Beclin-1 的上调激活自噬^[52]。Caspase-2 控制线粒体 ROS 水平过防止 ROS 积累, 导致 mTORC 的去磷酸化启动自噬。Caspase-3、6、8 证明会切割 ATG5 和 Beclin-1, 其解离的 Beclin-1 片段具有促凋亡功能^[53-55]。虽然胱天蛋白酶调节自噬的精确机制仍然未知, 笔者认为除非最初引起压力的刺激力超过了阈值, 否则大多数细胞在死亡之前将首先通过发自噬反应来生存^[56-57]。相反地, 在过度自噬中, 某些胱天蛋白酶可以通过降解 ATG 来充当分子制动器, 以防止该过程达到无法恢复的地步, 例如 Caspase-8 降解 RIPK1, 从而抑制自噬通量^[58]。总体而言, 由于胱天蛋白酶对自噬的效应似乎在很大程度上取决于微环境, 因此需要进一步的工作来描述椎间盘细胞面对外部刺激时自噬蛋白与凋亡蛋白之间的复杂关系。

3.3 Beclin-1 基因

Beclin-1 基因被证实与自噬基因 Atg6 同源, 可以与 III 型 PI3K 形成复合物, 募集胞浆中自噬体膜形成所需结构蛋白, 并引导其他自噬相关蛋白结合于前自噬小体上, 促进自噬体成熟。Bcl-2 和 Bax 是调控凋亡

的主要蛋白,Beclin-1 可以与抗凋亡蛋白 Bcl-2 直接结合形成新的聚合体,导致 Beclin-1 不能激活自噬^[59]。促凋亡蛋白通过 BH3 结构域与 Bcl-2 结合,从蛋白聚合物中释放 Beclin-1,DAPK 磷酸化 Beclin-1,JNK 磷酸化 Bcl-2,自噬过程被激活,所以抗凋亡蛋白 Bcl-2 过表达可抑制自噬^[60]。在调节肿瘤干细胞(CSCs)的凋亡中抗凋亡蛋白 Bcl-2 起着关键作用,主要通过 Beclin-1 的结合,从而阻止了后者与Ⅲ型 PI3K 结合在自噬中的相互作用。肿瘤干细胞长时间暴露于 Rottlerin 中会导致细胞凋亡(主要与抗凋亡蛋白下调相关)和自噬行为,Rottlerin 诱导的自噬可导致肿瘤干细胞死亡即自噬性死亡^[61]。另外凋亡抑制自噬可以通过 Caspase-3 等对 Beclin-1 剪切功能,形成短的失活蛋白,进而自噬被抑制。因此,凋亡与自噬之间相互作用关系,可以通过对 Beclin-1 基因的进行调节,这主要取决于拥有 BH3 结构域蛋白之间的争夺以及部分 Caspase 关键蛋白的相关活性。

4 小结与展望

目前临床上使用药物和物理疗法可缓解大部分椎间盘退变所致症状,但仍有不少患者因盘源性疼痛接受手术治疗。在过去的 10 a 中,大量研究报告使人们对自噬和凋亡途径有了深刻的理解,这些结论都验证了自噬与凋亡之间存在相互串扰、紧密联系,提高椎间盘细胞的自噬水平减少椎间盘细胞凋亡,进而预防椎间盘退变的提供新方向。但是过度自噬也引发椎间盘细胞自噬性死亡,导致椎间盘退变加重,如何寻求自噬与凋亡之间的平衡则极为重要^[62]。随着对椎间盘退变中自噬与凋亡机制研究的越发深入,期待能够从分子水平理解椎间盘细胞的自噬与凋亡关系,从而为延缓椎间盘退变的发展及临床治疗提供更有效的手段。

参考文献

- [1] DESMOULIN G T, PRADHAN V, MILNER T E. Mechanical aspects of intervertebral disc injury and implications on biomechanics[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2020, 45(8):457-464.
- [2] DOWDELL J, ERWIN M, CHOMA T, et al. Intervertebral disk degeneration and repair[J]. Neurosurgery, 2017, 80(3S):46-54.
- [3] ALVAREZ-GARCIA O, MATSUZAKI T, OLMER M, et al. FOXO are required for intervertebral disk homeostasis during aging and their deficiency promotes disk degeneration[J]. Aging Cell, 2018, 17(5):e12800.
- [4] WANG S Z, RUI Y F, TAN Q, et al. Enhancing intervertebral disc repair and regeneration through biology: platelet-rich plasma as an alternative strategy[J]. Arthritis Research & Therapy, 2013, 15(5):220.
- [5] HE R, CUI M, LIN H, et al. Melatonin resists oxidative

- stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells[J]. Life Sciences, 2018, 199:122-130.
- [6] JIANG W, ZHANG X M, HAO J, et al. SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative human disc nucleus pulposus cells[J]. Scientific Reports, 2014, 4:7456.
- [7] DING F, SHAO Z W, XIONG L M. Cell death in intervertebral disc degeneration[J]. Apoptosis, 2013, 18(7):777-785.
- [8] HONG J, LI S, MARKOVA D Z, Liang A, et al. Bromodomain-containing protein 4 inhibition alleviates matrix degradation by enhancing autophagy and suppressing NL-RP3 inflammasome activity in NP cells[J]. Cell Physiol, 2020, 235(7/8):5736-5749.
- [9] LIN J, ZHUGE J, ZHENG X, et al. Urolithin A-induced mitophagy suppresses apoptosis and attenuates intervertebral disc degeneration via the AMPK signaling pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 150:109-119.
- [10] HONG J, YAN J, CHEN J, et al. Identification of key potential targets for TNF- α /TNFR1-related intervertebral disc degeneration by bioinformatics analysis[J]. Connect Tissue Res, 2020, 26:1-11.
- [11] LI Z, ZHANG K, LI X, et al. Wnt5a suppresses inflammation-driven intervertebral disc degeneration via a TNF- α /NF- κ B-Wnt5a negative-feedback loop[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2018, 26(7):966-977.
- [12] KANG L, LIU S, LI J, et al. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ protects against intervertebral disc degeneration by ameliorating mitochondrial dysfunction and redox imbalance[J]. Cell Prolif, 2020, 53(3):e12779.
- [13] CUI L, WEI H, LI Z M, et al. TGF- β 1 aggravates degenerative nucleus pulposus cells inflammation and fibrosis through the upregulation of angiopoietin-like protein 2 expression[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(23):12025-12033.
- [14] LI H, LI W, LIANG B, et al. Role of AP-2 α /TGF- β 1/Smad3 axis in rats with intervertebral disc degeneration[J]. Life Sci, 2020, 263:118567.
- [15] FUBIAO Y E, WANG H, ZHENG Z M, et al. Role of SHOX2 in the development of intervertebral disc degeneration[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2017, 35(5):1047-1057.
- [16] SUDO H, MINAMI A. Regulation of apoptosis in nucleus pulposus cells by optimized exogenous Bcl-2 overexpression[J]. J Orthop Res, 2010, 28:1608-1613.
- [17] VAN DEURSEN J M. The role of senescent cells in ageing[J]. Nature, 2014, 509(7501):439-446.
- [18] MIYAZAKI S. Recombinant human SIRT1 protects against nutrient deprivation-induced mitochondrial apoptosis through autophagy induction in human intervertebral disc nucleus pulposus cells[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17(1):253.
- [19] YANG L, RONG Z, ZENG M, et al. Pyrroloquinoline qui-

- none protects nucleus pulposus cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis by inhibiting the mitochondria-mediated pathway[J]. *Eur Spine J*, 2015, 24(8): 1702-1710.
- [20] JIANG X, XIE L, HUANG C, et al. Oral oxymatrine for hepatitis B cirrhosis: a systematic review protocol[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(49): e13482.
- [21] WANG Y, CHE M, XIN J, et al. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110660.
- [22] QIU X, ZHUANG M, LU Z, et al. RIPK1 suppresses apoptosis mediated by TNF and caspase-3 in intervertebral discs[J]. *Transl Med*, 2019, 17(1): 135.
- [23] TEKIRDAG K A, KORKMAZ G, OZTURK D G, et al. MIR181A regulates starvation-and rapamycin-induced autophagy through targeting of ATG5[J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 374-385.
- [24] NAKATOGAWA H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy[J]. *Essays Biochem*, 2013, 55: 39-50.
- [25] ZONCU R, EFEKAN A, SABATINI D M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(1): 21-35.
- [26] LAPLANTE M, SABATINI D M. mTOR signaling in growth control and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274-293.
- [27] LIU P, GAN W, CHIN Y R, et al. PtdIns(3,4,5)P3-dependent activation of the mTOR C2 kinase complex[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(11): 1194-1209.
- [28] DIBBLE C C, ELIS W, MENON S, et al. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1[J]. *Mol Cell*, 2012, 47(4): 535-546.
- [29] CARROLL B, DUNLOP E A. The lysosome: A crucial hub for AMPK and mTOR C1 signalling[J]. *Biochem*, 2017, 474(9): 1453-1466.
- [30] ANTONIOLI M, DI RIENZO M, PIACENTINI M. Emerging mechanisms in initiating and terminating autophagy[J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(1): 28-41.
- [31] RABANAL-RUIZ Y, OTTEN E G, KOROLCHUK V I. mTOR C1 as the main gateway to autophagy[J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 565-584.
- [32] RYTER S W, MIZUMURA K, CHOI A M. The impact of autophagy on cell death modalities[J]. *Int J Cell Biol*, 2014, 502676.
- [33] HE C, ZHU H, LI H, et al. Dissociation of Bcl-2-Beclin 1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes[J]. *Diabetes*, 2013, 62(4): 1270-1281.
- [34] KONG C G, PARK J B, MAN S K, et al. High Glucose accelerates autophagy in adult rat intervertebral disc cells[J]. *Asian Spine J*, 2014, 8(5): 543-548.
- [35] ZHANG Q C, HU S Q, HU A N, et al. Autophagy-activated nucleus pulposus cells deliver exosomal miR-27a to prevent extracellular matrix degradation by targeting MMP-13[J]. *Orthop Res*, 2020, DOI: 10. 1002/jor. 24880.
- [36] ZHAO K, ZHANG Y, KANG L, et al. Methylation of microRNA-129-5P modulates nucleus pulposus cell autophagy by targeting Beclin-1 in intervertebral disc degeneration[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 86264-86276.
- [37] SHEN C, YAN J, JIANG L S, et al. Autophagy in rat annulus fibrosus cells: evidence and possible implications[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(4): R132.
- [38] ZHENG Z, WANG Z G, CHEN Y, et al. Spermidine promotes nucleus pulposus autophagy as a protective mechanism against apoptosis and ameliorates disc degeneration[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(6): 3086-3096.
- [39] QUAN M, HONG M W, KO M S, et al. Relationships between disc degeneration and autophagy expression in human nucleus pulposus[J]. *Orthop Surg*, 2020, 12(1): 312-320.
- [40] MIYAZAKI S, KAKUTANI K, YURUBE T, et al. Recombinant human SIRT1 protects against nutrient deprivation-induced mitochondrial apoptosis through autophagy induction in human intervertebral disc nucleus pulposus cells[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 253.
- [41] KONG C G, PARK J B, KIM M Set al. High glucose accelerates autophagy in adult rat intervertebral disc cells[J]. *Asian Spine*, 2014, 8(5): 543-548.
- [42] ZOU L, LEI H, SHEN J, et al. HO-1 induced autophagy protects against IL-1 β -mediated apoptosis in human nucleus pulposus cells by inhibiting NF- κ B[J]. *Aging (Albany N Y)*, 2020, 12(3): 2440-2452.
- [43] SASAKI H, TAKAYAMA K, MATSUSHITA T, et al. Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 2012; 64(6): 1920-1928.
- [44] HE J, ZHANG G, PANG Q, et al. SIRT6 reduces macrophage foam cell formation by inducing autophagy and cholesterol efflux under ox-LDL condition[J]. *FEBS*, 2017, 284(9): 1324-1337.
- [45] TAKASAKA N, ARAYA J, HARA H, et al. Autophagy induction by SIRT6 through attenuation of insulin-like growth factor signaling is involved in the regulation of human bronchial epithelial cell senescence[J]. *Immunol*, 2014, 192(3): 958-968.
- [46] VAN DEURSEN J M. The role of senescent cells in ageing[J]. *Nature*, 2014, 509(7501): 439-446.
- [47] NORMAN J M, COHEN G M, BAMPTON E T W. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases[J]. *Autophagy*, 2010, 6(8): 1042-1056.
- [48] DJAVAHERI-MERGNY M, MAIURI M C, KROEMER G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1[J]. *Oncogene*, 2010, 29(12): 1717-1719.