

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

蒲路桥, 刘 杰, 袁 超, 贾 敏, 王 建

(第三军医大学附属新桥医院骨科 400037 重庆市)

【摘要】目的:观察缺氧和营养缺乏对软骨终板干细胞(cartilage endplate-derived stem cells, CESC)凋亡的影响, 探讨 B 细胞淋巴瘤/白血病-2/腺病毒 E1B 19-kDa 结合蛋白 3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3, BNIP3)信号通路在其中的作用。**方法:**从临床获取退变椎间盘软骨终板标本, 分离培养软骨终板细胞, 使用琼脂糖筛选获得 CESC 并进行干细胞标志物鉴定, 将第三代细胞分别在常氧/完全培养基(对照组)与缺氧和营养缺乏(实验组)条件下培养 48h, 通过流式细胞术检测细胞凋亡率, CCK-8 法检测细胞活性, Western Blot 检测 BNIP3、Bcl-2 关联 x 蛋白(Bax)、Bcl-2 关联 k 蛋白(Bak)和低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)蛋白表达水平。使用 BNIP3 小干扰 RNA(siRNA)干扰 CESC 中 BNIP3 基因, 同时设置阴性干扰对照组(Scramble siRNA), 同前分组处理后再次检测细胞凋亡率、细胞活性及 BNIP3、Bax、Bak 蛋白的表达水平。**结果:**对 5 例标本获得的 CESC 进行了干细胞标志物鉴定, 其中细胞表面粘附分子 44 (CD44)、CD73、CD90 和 CD105 为阳性, CD34、CD45、CD11b、CD19 和 HLA-DR 为阴性, 提示 CESC 具有干细胞特性。实验组细胞凋亡率为 (29.12 $\pm$ 0.65)% 显著高于对照组的 (14.87 $\pm$ 2.03)% ($P<0.05$); 实验组的细胞增殖活性明显降低, 为对照组的 56.18% ($P<0.05$)。与对照组相比, 实验组 BNIP3、Bax、Bak 蛋白的表达均显著上调 ($P<0.05$)。使用 BNIP3 siRNA 干扰后, 缺氧和营养缺乏引起的细胞凋亡增加和细胞增殖活力下降均被明显抑制; 同时, 缺氧和营养缺乏导致 CESC 中 BNIP3、Bax 和 Bak 的蛋白表达升高也被显著逆转 ($P<0.05$)。**结论:**缺氧和营养缺乏能够诱导 CESC 发生凋亡, 此过程可能是通过上调 BNIP3、Bax 和 Bak 蛋白表达而发挥作用的。

【关键词】 软骨终板干细胞; 缺氧和营养缺乏; 凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 腺病毒 E1B 19-kDa 结合蛋白; Bcl-2 关联 x 蛋白; Bcl-2 关联 k 蛋白

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2017.05.11

中图分类号: R393, R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2017)-05-0449-07

The effects of hypoxia and nutrition deprivation on cartilage endplate stem cells and the related mechanism/PU Luqiao, LIU Jie, YUAN Chao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2017, 27(5): 449-455

【Abstract】 Objectives: To study the effects of hypoxia and nutrition deprivation on the apoptosis of cartilage endplate stem cells(CESC) as well as the role of Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3(BNIP3) in the process. **Methods:** The CESC were separated from the clinically acquired human intervertebral disc endplate cartilage tissue, and the third generation cells were cultured under normoxia with full medium(control group) or hypoxia with nutrition deprivation condition(experimental group) for 48h. Then, the cell apoptosis rate was detected by flow cytometry, the cell viability was detected by CCK-8, and the protein expressions of BNIP3, Bax, Bak and hypoxia-inducible factor-1(HIF-1 α) were detected by Western Blot. Furthermore, BNIP3 small interfering RNA(siRNA) was used to knock down the BNIP3 expression in CESC, and the interference-negative control group was treated with control siRNA. Thereafter, cells were treated as described previously and the apoptosis rate, cell viability and the expressions of BNIP3, Bax and Bak were detected again. **Results:** The CESC obtained from 5 clinical specimens were identified by stem cell markers. The CD44, CD73,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81272028)

第一作者简介:男(1986-),硕士研究生在读,研究方向:脊柱外科

电话:(023)68757623 E-mail:285771515@qq.com

通讯作者:王建 E-mail:tonywjxq@aliyun.com

CD90 and CD105 were positive while the CD34, CD45, CD11b, CD19 and HLA-DR were negative, suggesting that the CESC s had the characteristics of stem cells. The apoptosis rate of the experimental group was $(29.12 \pm 0.65)\%$, which was significantly higher than that of the control group $(14.87 \pm 2.03)\%$ ($P < 0.05$). The cell viability in the experimental group was notably lower than that in the control group, which was about 56.18% of the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expressions of BNIP3, Bax and Bak in the experimental group were significantly up-regulated ($P < 0.05$). Knockdown of BNIP3 by RNA interference attenuated the increase of cell apoptosis and decrease of cell viability in CESC s caused by hypoxia and nutrition deprivation. Additionally, hypoxia and nutrition deprivation-induced expressions of BNIP3, Bax and Bak were also inhibited. **Conclusions:** Hypoxia and nutrition deprivation may induce CESC s apoptosis via up-regulating the expressions of BNIP3, Bax and Bak.

【Key words】 Cartilage endplate-derived stem cells; Hypoxia and nutrition deprivation; Apoptosis; BNIP3; Bax; Bak

【Author's address】 Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China

椎间盘退行性病变是引起颈腰痛的最常见原因^[1],给患者和社会带来巨大的经济负担^[2,3]。椎间盘退变的一个重要因素是营养供应不足^[4],其营养供给主要依赖于椎间盘软骨终板的扩散^[5]。软骨终板退变对营养成分的输送有明显的阻碍作用,可导致细胞代谢异常甚至死亡^[6]。相关研究表明,软骨终板细胞的凋亡参与了椎间盘退变^[7]。软骨终板干细胞 (cartilage endplate-derived stem cells, CESC s) 可能对维持软骨终板结构和功能的完整性具有重要意义,研究缺氧和营养缺乏对 CESC s 凋亡的影响及其在椎间盘退变中的作用具有重要意义。本课题组的前期研究发现,缺氧和营养缺乏可导致兔髓核细胞 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 腺病毒 E1B 19-kDa 结合蛋白 (Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3, BNIP3) 表达上调并诱导细胞凋亡^[8]。本研究模拟椎体缺血微环境,检测缺氧和营养缺乏对 CESC s 凋亡及 BNIP3、Bcl-2 关联 x 蛋白 (Bax)、Bcl-2 关联 k 蛋白 (Bak) 等凋亡相关蛋白表达水平的影响,探讨缺氧和营养缺乏对 CESC s 凋亡的影响及可能的信号通路,为进一步阐明椎间盘退变机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

改良杜氏伊格尔培养基 (DMEM/F12 培养基)、胎牛血清 (FBS)、青链霉素 (Gibco, USA); 琼脂糖、RNA 抽提试剂 Trizol Plus (Invitrogen, USA); 0.25% 胰酶 [含 0.02% 乙二胺四乙酸

(EDTA)] (HyClone, USA); II 型胶原酶 (Sigma, USA); 人间充质干细胞 (MSC) 分析试剂盒 (BD Biosciences, USA); 放射免疫沉淀 (RIPA) 细胞裂解液 (碧云天, 上海); 细胞培养瓶 (Corning, USA); 70 μ m 细胞滤网 (BD, USA); 鼠抗人 BNIP3、HIF-1 α 、Bax、Bak 抗体 (Abcam, UK); 辣根过氧化物酶 (HRP)-山羊抗兔 IgG (ZSGB-BIO, China); 全波长多功能酶标仪 (Thermo, USA); 倒置相差显微镜 (Leica, Germany); 流式细胞仪 (Beckman Coulter, USA); ChemiDoc TMXRS+ 成像系统 (Bio-Rad, USA)。

1.2 软骨终板细胞的分离与原代培养

软骨终板标本来源于 5 例因腰椎椎间盘退行性病变行后路椎间盘切除并进行融合手术的患者。术前患者签署知情同意书,本研究获第三军医大学附属新桥医院伦理委员会批准。腰椎终板退变的程度参考 Modic 分型进行评估。5 例患者的一般情况见表 1。

退变椎间盘的软骨终板标本于分离后 (在腰

表 1 5 例患者的临床资料

Table 1 Clinical characters of 5 patients

病例 Case	性别 Gender	年龄 Age	腰椎节段 Disc level	疾病 Disease	分级 Modic
1	男 Male	57	L4/5	腰椎滑脱症 Lumbar spondylolisthesis	IV
2	男 Male	50	L5/S1	腰椎间盘突出症 Lumbar disc herniation	IV
3	女 Female	52	L4/5	椎管狭窄症 Spinal stenosis	IV
4	男 Male	59	L4/5	腰椎间盘突出症 Lumbar disc herniation	V
5	女 Female	53	L5/S1	椎体滑脱症 Vertebral spondylolisthesis	IV

椎融合手术中分离)2h 内带入超净工作台,在解剖显微镜($\times 4$ 倍)下使用无菌眼科器械包对软骨终板进行再次分离,用磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗。将洗净的组织剪切成 $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}$ 大小的组织块,转入 25 cm^2 培养瓶中,加入约 5 倍体积含 0.2% II 型胶原酶无血清 DMEM/F12 培养基,静置于 37°C 、5% CO_2 培养箱 12h。消化完毕后用细胞滤网过滤,滤液在 $200 \times g$ 条件下离心 5min;弃上清,加入含有 10% FBS、1% 青链霉素的 DMEM/F12 培养基重悬细胞并转移到 25 cm^2 培养瓶,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。倒置相差显微镜下观察细胞生长情况,3~4d 更换一次培养液。当原代培养的细胞达 90% 融合后,进行琼脂糖筛选培养。

1.3 CESC 的筛选

利用琼脂糖悬浮培养方法^[9]获得 CESC:将 2% 低熔点琼脂糖进行高压灭菌,并使之温度平衡到 37°C 。然后将用 $2 \times \text{DMEM/F12}$ 培养液与 2% 低熔点琼脂糖等体积混合制备 1% 底层琼脂,并用此浓度的琼脂糖包被培养皿(直径 60mm)。将体外扩增的第 1 代软骨终板细胞用 0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA)消化后用 20% FBS DMEM/F12 培养液吹散成单个细胞悬液,计数。随后,将 0.75ml DMEM/F12、0.75ml 2% 低熔点琼脂糖和 1.5ml 含有 5×10^4 个细胞的 20% FBS DMEM/F12 培养液均匀混合后加入到铺被底层琼脂的培养皿中,待其凝固后将培养皿置于 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养,倒置显微镜下观察。并用含有 10% FBS、1% 青链霉素的 DMEM/F12 培养液培养,每周换液 2 次。培养 6 周后,用无菌巴斯德吸管将直径大于 $50 \mu\text{m}$ 的细胞克隆吸入培养瓶,加入 3ml 新鲜完全培养液,扩大培养。选取第 3 代 CESC 用于实验研究。

1.4 CESC 表面抗原标志物检测

经琼脂糖筛选后的 CESC 生长融合度达 90% 后,用 PBS 漂洗 3 次,0.25% 胰酶消化后收集细胞,计数后制备成为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的单细胞悬浮液,按照人 MSC 分析试剂盒进行染色后,流式细胞仪检测表面抗原 CD44、CD90、CD105、CD73 和 CD34、CD11b、CD19、CD45 和 HLA-DR 的表达水平。

1.5 CESC 缺氧和营养缺乏模型的建立

将 P3 代 CESC 用 DMEM 培养液制成单细

胞悬液,以 2.5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板,继续培养 24h,待细胞贴壁并融合生长后,在缺氧和营养缺乏条件下(1% O_2 ,无血清及葡萄糖)培养 48h,同时设置常氧/完全培养基对照组(21% O_2 ,10% 胎牛血清,5mM 葡萄糖)^[8]。

1.6 细胞活性检测

取 1.5 中分组条件处理后的 CESC,去除培养基,用 PBS 冲洗 2 次,加入 0.25% 胰酶消化,收集细胞,计数后将细胞接种至 96 孔培养板中(每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液,约 5000 个细胞)。将培养板放在培养箱中预培养 24h 后,向各孔加入 $10 \mu\text{l}$ CCK-8 溶液,孵育 4h。酶标仪测定 450nm 处的吸光度(Optical density, OD 值)。

1.7 细胞凋亡检测

按照 1.6 中的方法收集细胞。细胞计数后取 1×10^5 个/EP 管,加入 $195 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 重悬细胞,再加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 和 $10 \mu\text{l}$ 碘化丙啶(PI)轻轻混匀,室温避光孵育 15min,将样品通过流式细胞术在 1h 内进行分析,计算细胞总凋亡率(早期和晚期凋亡率之和)。

1.8 免疫蛋白印迹(Western blot)检测 BNIP3、Bax、Bak 和 HIF-1 α

取 1.5 中分组条件处理后的 CESC,用 PBS 冲洗 2 次,用细胞裂解液裂解后提取总蛋白并用 BCA 法定量。取 $30 \mu\text{g}$ 蛋白经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将蛋白电转至硝酸纤维素(PVDF)膜并用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h。分别加鼠来源一抗 BNIP3、Bax、Bak 和 HIF-1 α (1:1000)、GAPDH (1:10000) 4°C 孵育过夜,用 TBST 缓冲液漂洗 3 次,加 HRP 标记的羊抗鼠二抗(1:10000)室温孵育 2h,化学发光(ECL)法显色,应用 ChemiDoc TMXRS+ 成像系统(BioRad, USA)拍照。

1.9 BNIP3 siRNA 对缺氧和营养缺乏诱导 CESC 凋亡的影响

将对照 siRNA (Scramble siRNA) 和 BNIP3 siRNA (h) (Santa Cruz, USA) 用 Lipofectamine RNAiMAX Reagent 试剂(Life Technologies, USA)分别转染 P3 代 CESC,24h 后分别于常氧/完全培养基、缺氧和营养缺乏条件下培养 48h,经流式细胞术检测细胞凋亡,CCK-8 法检测细胞活性,免疫蛋白印迹法检测 BNIP3、Bax、Bak 的表达水平。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计分析软件, 独立样本 t 检验检验各组之间差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。所有实验均重复 3 次, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

2.1 CESC 表面抗原标志物检测

流式细胞术检测筛选后的 CESC 表面抗原 CD44、CD73、CD90 和 CD105 表达为阳性, CD34、CD45、CD11b、CD19 和 HLA-DR 表达为阴性 (图 1), 依据国际细胞治疗学会制定的干细胞表面标

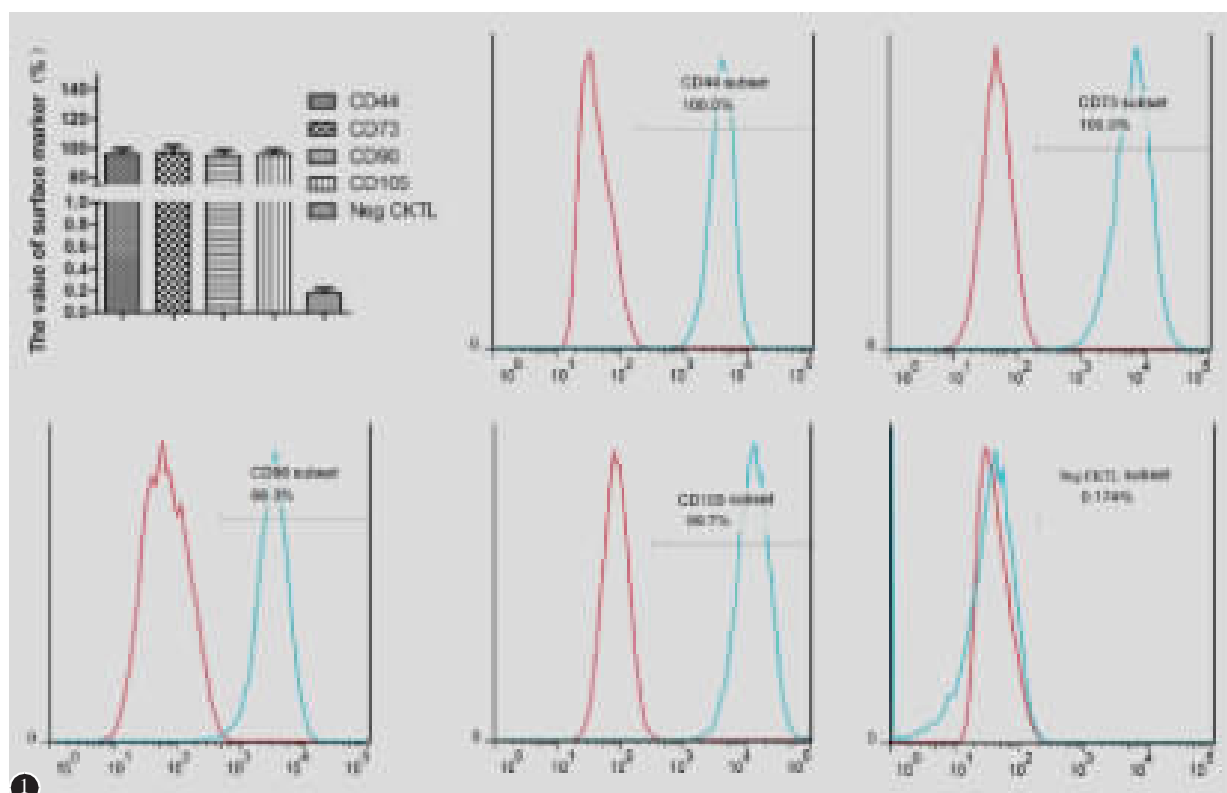
志物鉴定标准^[10], 经过琼脂糖筛选后的软骨终板细胞具有干细胞特性。

2.2 缺氧和营养缺乏对 CESC 活性和凋亡率的影响

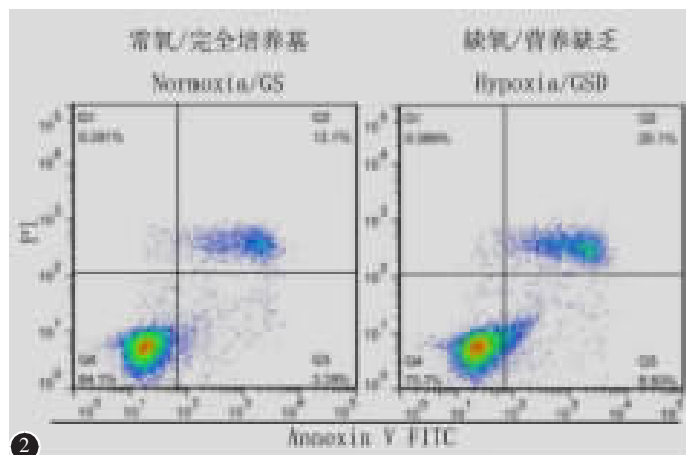
两组 CESC 的凋亡率和活性见图 2 和表 2。缺氧和营养缺乏组 CESC 的凋亡率显著高于常氧/完全培养基组; 细胞活性显著低于常氧/完全培养基组 ($P < 0.05$)。提示缺氧和营养缺乏可显著降低 CESC 细胞活性, 增加细胞凋亡率。

2.3 缺氧和营养缺乏对 CESC 中 BNIP3、Bax、Bak 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响

缺氧和营养缺乏组 CESC 中 BNIP3、Bax、



①



②

图 1 CESC 表面抗原标志物检测 (流式细胞术检测 CESC 表面抗原标记物 CD44、CD73、CD90、CD105 和 CD34、CD45、CD11b、CD19、HLA-DR, 红色为同型对照) 图 2 流式细胞仪检测 CESC 的凋亡率

Figure 1 The surface antigen markers of CESC were detected by flow cytometry. The marks include CD44, CD73, CD90, CD105, CD34, CD45, CD11b, CD19 and HLA-DR. Red is the same type of control **Figure 2** The apoptosis rate of CESC was detected by flow cytometry. Normoxia/GS: Normoxia/full medium(+FBS+Glucose); Hypoxia/GSD: Hypoxia/glucose and serum deprivation(GSD)

Bak 和 HIF-1 α 蛋白表达水平均显著上调 ($P<0.05$, 图 3、表 3)。提示缺氧和营养缺乏可显著上调 CESC 中 BNIP3、Bax、Bak 和 HIF-1 α 蛋白的表达水平。

2.4 干扰 BNIP3 基因对 CESC 中 BNIP3、Bax 和

表 2 未干扰 BNIP3 基因时两组细胞凋亡率及细胞活性 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 The result of cell apoptosis rate and cell activity without BNIP3 interfering

	常氧/完全培养基组 Normoxia/GS	缺氧/营养缺乏组 Hypoxia/GSD
细胞凋亡率(%) Cell apoptosis rate	14.87 $\pm$ 2.03	29.12 $\pm$ 0.65 ^①
细胞活性(吸光值) Cell activity (OD 值)	0.89 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.01 ^①

注: ①与常氧/完全培养基组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with Normoxia/GS, $P<0.05$

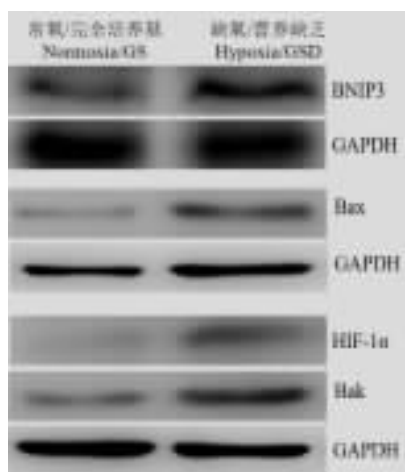


图 3 缺氧和营养缺乏上调 BNIP3、Bax、Bak 和 HIF-1 α 的表达水平, 内参为 GAPDH

Figure 3 Hypoxia and nutrition deprivation upregulated expression levels of BNIP3, Bax, Bak and HIF-1 α . Protein expression levels were detected by WB. GAPDH was used as the internal reference.

表 3 未干扰 BNIP3 基因时两组 BNIP3、Bax、Bak 的蛋白表达情况 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 3 Protein expression results of BNIP3, Bax and Bak without BNIP3 interfering

	常氧/完全培养基组 Normoxia/GS	缺氧/营养缺乏培养基组 Hypoxia/GSD
BNIP3	0.69 $\pm$ 0.06	1.23 $\pm$ 0.10 ^①
Bax	0.78 $\pm$ 0.10	1.14 $\pm$ 0.04 ^①
Bak	0.78 $\pm$ 0.14	1.44 $\pm$ 0.13 ^①
HIF-1 α	0.73 $\pm$ 0.08	1.05 $\pm$ 0.08 ^①

注: ①与常氧/完全培养基组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with Normoxia/GS, $P<0.05$

Bak 蛋白表达水平的影响

BNIP3 siRNA 可明显抑制 CESC 中 BNIP3 蛋白的表达; 同时, Bax、Bak 的表达水平也显著降低 ($P<0.05$, 图 4、表 4、5)。提示在 CESC 细胞中, 缺氧和营养缺乏可能通过 BNIP3 上调 Bax、Bak 蛋白的表达。

2.5 干扰 BNIP3 基因对缺氧和营养缺乏诱导 CESC 凋亡和细胞活性的影响

干扰 BNIP3 基因可显著降低缺氧和营养缺乏介导的 CESC 凋亡 ($P<0.05$, 图 5、表 6); 显著减少缺氧和营养缺乏引起的 CESC 细胞活性下降 ($P<0.05$, 表 6)。提示缺氧和营养缺乏可能通过

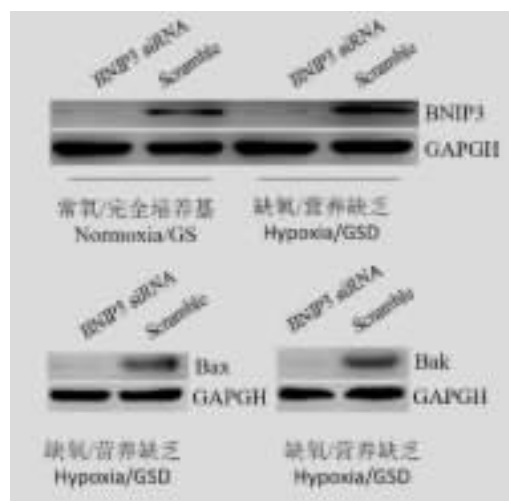


图 4 干扰 BNIP3 基因对 BNIP3、Bax 和 Bak 蛋白表达水平的影响 (GAPDH 为内参蛋白; Scramble 为阴性对照 siRNA)

Figure 4 CESC cells transfected with scramble or BNIP3 siRNA(h) were treated with normal or hypoxia and nutrition deprivation condition (GAPDH was used as the internal reference. Scramble: negative control siRNA)

表 4 干扰 BNIP3 基因后两组 BNIP3 蛋白表达结果 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 4 Protein expression levels of BNIP3 with BNIP3 interfering

	常氧/完全培养基组 Normoxia/GS	缺氧/营养缺乏培养基组 Hypoxia/GSD
阴性对照 Scramble siRNA	0.46 $\pm$ 0.02	0.81 $\pm$ 0.04 ^①
干扰 BNIP3 BNIP3 siRNA	0.11 $\pm$ 0.04 ^②	0.14 $\pm$ 0.03 ^②

注: ①与常氧/完全培养基组比较 $P<0.05$; ②与阴性对照比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with Normoxia/GS, $P<0.05$; ② Compared with scramble siRNA, $P<0.05$

BNIP3 上调,从而诱导 Bax、Bak 凋亡蛋白上升,进而导致 CESC 细胞活性降低、凋亡增加。

3 讨论

成年人椎间盘是一种无血管的组织,其营养供给主要依赖于椎间盘软骨终板的扩散。软骨终板在维持椎间盘营养代谢运输、生物力学完整性

和生理功能发挥着关键作用。因此,椎体血供不足或椎体外周微循环障碍引起的营养缺乏会导致软骨终板退变,进而影响椎间盘中营养物质的供给,是导致椎间盘退变的一个重要因素^[11]。研究表明,通过阻断营养供给引起的兔软骨终板细胞凋亡会导致兔的椎间盘退变,同时可以发现终板软骨细胞密度降低^[12]。CESCs 的增值、分化、死亡之间的平衡在维持软骨终板的结构和功能的完整性方面具有重要作用^[13]。本研究结果初步表明,缺氧和营养缺乏影响了 CESC 的增殖活力,并可能在椎间盘退变过程中发挥重要作用。

本研究中,CESC 体外培养分为两组,缺氧和营养缺乏组及常氧/完全培养基组,缺氧和营养缺乏模拟了体内椎体供血不足的微环境。缺氧和营养缺乏培养组中 CESC 的凋亡率显著高于常氧/完全培养基组,活性低于常氧/完全培养基组。说明缺氧和营养缺乏可显著抑制 CESC 增殖活力,促进 CESC 凋亡,可能在椎间盘退变过程中发挥着重要作用。因此,通过改善椎体供血可能会提高 CESC 的活力,进而减少 CESC 的凋亡,从而延缓椎间盘的退变进程。

BNIP3 属于 Bcl-2 家族 BH3-only 结构域亚家族的线粒体促凋亡蛋白,具有调节细胞自噬和凋亡的功能^[14]。在正常生理条件下,BNIP3 在细胞中不表达或低表达,且大都定位于细胞质线粒体外膜上^[15]。在缺氧诱导等条件刺激下 BNIP3 的蛋白表达量上调,并通过其 C 端结合至线粒体外膜,导致线粒体外膜通透性增加、膜电位降低、PT 孔道(permeability transition pore)开放,释放促凋亡因子,诱导细胞凋亡^[16]。同时也有研究表明,在小鼠心肌细胞和胚胎成纤维细胞中,BNIP3 通过激活 Bax、Bak 蛋白与线粒体结合,介导细胞线粒体功能异常导致细胞死亡^[17]。Gustafsson 等^[18]的研究发现,BNIP3 蛋白主要通过激活 Bax/Bak 致使

表 5 干扰 BNIP3 基因后 Bax 和 Bak 的蛋白表达 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 5 Protein expression levels of Bax and Bak with BNIP3 interfering

	干扰 BNIP3 组 BNIP3 siRNA	阴性对照组 Scramble siRNA
Bax	0.23±0.04	0.77±0.02 ^①
Bak	0.22±0.04	0.73±0.01 ^①

注:①与阴性对照组比较 P<0.05
Note: ①Compared with Scramble siRNA, P<0.05

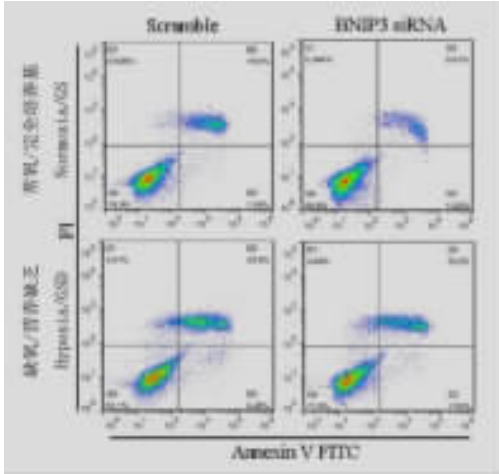


图 5 干扰 BNIP3 基因对缺氧和营养缺乏诱导 CESC 凋亡影响

Figure 5 CESC transfected with scramble or BNIP3 siRNA(h) were treated with normoxia and full medium or hypoxia and nutrition deprivation condition. The apoptosis rate of CESC was detected by flow cytometry

表 6 干扰 BNIP3 基因表达后细胞凋亡率和细胞活性的检测结果 (n=3, $\bar{x}\pm s$)
Table 6 The result of cell apoptosis rate and cell activity with BNIP3 interfering

	细胞凋亡率(%) Cell apoptosis rate		细胞活性(OD 值) Cell activity	
	常氧/完全培养基组 Normoxia/GS	缺氧/营养缺乏组 Hypoxia/GSD	常氧/完全培养基组 Normoxia/GS	缺氧/营养缺乏组 Hypoxia/GSD
阴性对照 Scramble siRNA	19.21±1.40	32.68±0.81 ^①	0.89±0.02	0.32±0.02 ^①
干扰 BNIP3 BNIP3 siRNA	13.89±1.70 ^②	23.78±1.43 ^{①②}	1.06±0.06	0.51±0.02 ^{①②}

注:①与常氧/完全培养基组比较 P<0.05,②与阴性对照比较 P<0.05
Note: ① Compared with Normoxia/GS, P<0.05, ② Compared with scramble siRNA, P<0.05

线粒体功能障碍,最终导致细胞凋亡。然而,缺氧和营养缺乏对 CESC 凋亡的影响及 BNIP3 在其中的作用和具体机制尚未阐明。本研究通过模拟体内椎体缺血微环境,研究缺氧和营养缺乏对 CESC 凋亡的影响及可能信号通路,为进一步阐明椎间盘软骨终板退变机制提供了实验依据。

有研究报道,BNIP3 通过激活 Bax、Bak 蛋白与线粒体结合,介导细胞线粒体功能异常,进而诱导细胞凋亡^[17]。为明确此途径是否参与了缺氧和营养缺乏介导的 CESC 凋亡,我们对缺氧和营养缺乏组、常氧/完全培养基组 CESC 中 BNIP3、Bax、Bak 和 HIF-1 α 的表达水平进行了检测,结果显示,在缺氧和营养缺乏条件下,CESC 中 BNIP3、Bak 和 Bax 蛋白表达水平均显著上调;干扰 BNIP3 基因表达后,Bak 和 Bax 的蛋白表达水平明显下降,同时,CESC 的凋亡和活性得到明显改善。提示缺氧和营养缺乏可能通过上调 BNIP3 蛋白、Bax 及 Bak 蛋白,进而诱导了 CESC 的凋亡。以上结果表明,BNIP3 可能参与了缺氧和营养缺乏介导的 CESC 凋亡,并在缺氧和营养缺乏引起的椎间盘退化中发挥重要作用。通过抑制 BNIP3 的表达,可能成为由于供血不足引起 CESC 凋亡的有效治疗靶点。

本研究证实缺氧和营养缺乏可能通过上调 BNIP3、Bax 及 Bak 蛋白的表达,诱导 CESC 凋亡。对于进一步揭示缺氧和营养缺乏对软骨终板细胞增殖活力的影响及机制具有重要意义,为探索椎间盘退行性疾病的防治提供了新的思路。

4 参考文献

- Simon J, Mcauliffe M, Shamim F, et al. Discogenic low back pain[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2014, 25(2): 305-317.
- Wieser S, Horisberger B, Schmidhauser S, et al. Cost of low back pain in Switzerland in 2005 [J]. Eur J Health Econ, 2011, 12(5): 455-467.
- Haldeman S, Kopansky-Giles D, Hurwitz EL, et al. Advances in the management of spine disorders [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2012, 26(2): 263-280.
- Zhao CQ, Wang LM, Jiang LS, et al. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration[J]. Ageing Res Rev, 2007, 6(3): 247-261.
- Huang YC, Urban JP, Luk KD. Intervertebral disc regeneration: do nutrients lead the way[J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(9): 561-566.
- Zhu Q, Gao X, Gu W. Temporal changes of mechanical signals and extracellular composition in human intervertebral disc during degenerative progression[J]. J Biomech, 2014, 47(15): 3734-3743.
- Chan WC, Au TY, Tam V, et al. Coming together is a beginning: the making of an intervertebral disc [J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2014, 102(1): 83-100.
- Liu J, Wang J, Zhou Y. Upregulation of BNIP3 and translocation to mitochondria in nutrition deprivation induced apoptosis in nucleus pulposus cells[J]. Joint Bone Spine, 2012, 79(2): 186-191.
- Burdick JA, Vunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(2): 205-219.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.
- Grunhagen T, Shirazi-Adl A, Fairbank JC, et al. Intervertebral disk nutrition: a review of factors influencing concentrations of nutrients and metabolites[J]. Orthop Clin North Am, 2011, 42(4): 465-477.
- Xu HG, Chen XW, Wang H, et al. Correlation between chondrocyte apoptosis of vertebral cartilage endplate and degeneration of intervertebral disc[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2008, 88(3): 194-197.
- Tomaszewski KA, Walocha JA, 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): 296-309.
- Maes H, Van Eygen S, Krysko DV, et al. BNIP3 supports melanoma cell migration and vasculogenic mimicry by orchestrating the actin cytoskeleton[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1127.
- Vande VC, Cizeau J, Dubik D, et al. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(15): 5454-5468.
- Landes T, Emorine LJ, Courilleau D, et al. The BH3-only Bnip3 binds to the dynamin Opa1 to promote mitochondrial fragmentation and apoptosis by distinct mechanisms[J]. EMBO Rep, 2010, 11(6): 459-465.
- Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak [J]. Biochem J, 2007, 405(3): 407-415.
- Gustafsson AB. Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium[J]. Pediatr Cardiol, 2011, 32(3): 267-274.

(收稿日期:2016-12-15 末次修回日期:2017-03-06)

(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)