

综述

死亡受体介导的椎间盘细胞凋亡的研究进展

马 斌, 陈伯华

(青岛市青岛大学医学院附属医院脊柱外科 266003 山东省)

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-04-0312-03

细胞凋亡是退变椎间盘组织中细胞减少的主要因素, 椎间盘退变与细胞凋亡引起的细胞基质代谢障碍有关。死亡受体(death receptor, DR)家族是肿瘤坏死因子受体超家族的一员, 死亡受体与相应的配体结合后可以转导凋亡或生存信号。目前至少发现以下 8 类这种受体: 脂肪酸合酶(fatty acid-synthase, Fas/DR2)、肿瘤坏死因子受体 1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1/DR1)、维甲酸诱导模块化蛋白酶(tunicate retinoic acid-inducible modular protease, TRAMP/DR3)、肿瘤坏死因子相关凋亡配体受体 1(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-receptor 1, Trail-R1/DR4)、Trail-R2/DR5)、DR6、外胚层发育不全 A 受体(ectodysplasin a receptor, EDAR)、神经生长因子受体(nerve growth factor receptor, NGFR)^[1]。它们的结构特征为含有一个由 60~80 个氨基酸组成的称为“死亡结构域”(death domain, DD)的胞内区, 这种 DD 将死亡受体与胞内凋亡机制相偶联, 引起细胞的凋亡。Fas、Trail-R1、Trail-R2 等受体可以通过形成死亡受体信号复合物, 进一步激活 caspase-8, 从而引起细胞的凋亡; 另一组受体包括 TNFR1、DR3、DR6 和 EDAR 等, 其受体信号传导途径与前组不同, 既可以传递凋亡信号又可传递生存信号^[2]。国内外学者对 Fas、TNFR、Trail-R1 和 Trail-R2 介导椎间盘细胞的凋亡进行了深入的研究, 取得了一些成果, 现综述如下。

1 FasL-Fas 在椎间盘细胞凋亡中的作用

FasL-Fas 是一组配体与受体, FasL 与细胞表面的 Fas 结合后, 可以导致细胞的凋亡。金明熙等^[3]采用免疫组化化学方法, 对 35 例腰椎间盘突出症患者的退变椎间盘及 11 个(7 例)正常椎间盘组织中 Fas Apo-1 蛋白的表达进行检测, 首次发现手术切除的突出椎间盘组织中存在 Fas Apo-1 蛋白的较高表达, 突出椎间盘阳性表达率为 85.71%, 正常椎间盘为 36.3%, 髓核与纤维环细胞间无统计学差异。Park 等^[4]应用免疫组化方法检测 23 例突出椎间盘(包容型 9 例, 非包容型 14 例)中 Fas 表达情况, 结果表明突出椎间盘中有 Fas 表达, 且非包容型比包容型表达程度高, Fas 表达强度与患者年龄相关, 但与椎间盘在

MRI 上退变程度无关。Fas 的高表达可以说明 Fas 介导的凋亡占主要作用。Park 等^[4]应用免疫组化方法检测 FasL 在腰椎间盘突出细胞中表达情况, 共检测 23 例突出椎间盘(包容型 9 例, 非包容型 14 例), 结果表明 FasL 在椎间盘细胞中表达, 并且非包容型 FasL 表达要高于包容型, 统计学结果表明突出椎间盘细胞中 Fas 阳性表达与 FasL 阳性表达之间存在显著相关性; 随着年龄的增加, FasL 阳性率也随之增加, 但阳性率与椎间盘退变程度无关。陈伯华等^[5]应用免疫组化方法对脊柱侧凸(9 例特发型, 7 例神经肌肉型)患者经手术取出的 70 个椎间盘进行研究, 发现所有样本的髓核、纤维环、软骨终板区域均发现多聚 ADP-核糖聚合酶 p85(poly ADP-ribose polymerase, PARP85)的表达, 同时采用 TUNEL 法证明上述区域均存在凋亡细胞。在所有样本中均发现 Fas 和 FasL 的强烈表达, 在细胞凋亡区域同时存在 Fas 和 FasL 的高度表达, 提示 Fas/FasL 系统启动了椎间盘细胞的凋亡。

Fas 受体介导的凋亡有两种途径: (1)死亡受体途径; (2)线粒体相关凋亡途径, 退变椎间盘中存在凋亡细胞, 但是 Fas 介导椎间盘细胞凋亡主要通过哪种途径呢?

Park 等^[4]对鼠纤维环来源的培养细胞进行检测, 通过检测凋亡细胞数、caspase 活性、线粒体膜电位变化情况、Fas、procaspases、细胞色素 C 的表达情况, 结果表明鼠纤维环细胞的凋亡主要通过膜受体途径, caspase 抑制剂可以抑制椎间盘细胞的凋亡。Kim 等^[6]分别检测 4 周、6 个月和 12 个月大小鼠的椎间盘中: Fas、FasL、caspase-3、8、9、10、Ki-67 蛋白表达情况, 发现 Fas、FasL、caspase-9、3 在脊索细胞中表达, 且随着年龄的增大细胞增殖逐渐减弱, 凋亡逐渐增强, 提示鼠髓核脊索细胞存在 Fas 介导的线粒体凋亡途径(caspase-9), 脊索细胞的消失除了与年龄和退变有关外, 还可能与 Fas 介导的旁分泌和自分泌有关系(脊索细胞增殖的负调节有关)。Rannou 等^[7]采用免疫组化方法对人退变椎间盘纤维环细胞中 FasL 和细胞色素 C 的表达进行研究, 发现细胞色素 C 在退变纤维环细胞中普遍表达, 而 FasL 表达很少, 提示椎间盘纤维环细胞凋亡主要由线粒体凋亡途径介导, 同时对外力制造的鼠 IVD 退变模型研究也得出相同结论。Park 等^[4]通过 TUNEL 法证明腰椎间盘存在凋亡细胞, 接着用免疫组化和蛋白印迹技术来检测这两条途径中 caspase-8(受体途径)、细胞色素 C(线

粒体途径)、caspase-9、caspase-3(凋亡执行刽子手)表达情况,结果线粒体途径蛋白及 caspase-3 在所有样本中表达,提示腰椎间盘突出细胞主要通过 Fas 受体介导的线粒体相关凋亡途径发生凋亡。

Anderson 等^[11]对鼠人造纤维环撕裂模型的基因表达进行研究,发现纤维环被撕裂后,椎间盘 Fas 基因表达明显上升。视网膜及睾丸的免疫赦免归功于 FasL 的表达,可以导致入侵的 Fas 阳性 T 细胞的凋亡。Takada 等^[12]用免疫组化方法及 RT-PCR 方法对特发性脊柱侧凸患者手术取出的椎间盘和鼠椎间盘进行研究,检测其 FasL 表达情况,鼠的睾丸组织作为阳性对照,肌肉组织作为阴性对照,结果发现人与鼠髓核细胞及鼠阳性对照组织 FasL 强阳性表达,而外层纤维环及脊索细胞微弱表达,阴性对照组织不表达 FasL,提示 FasL 在椎间盘免疫赦免中起到重要作用。Inui 等^[13]对鼠胚胎组织进行研究,发现随着时间的推移,髓核组织中的脊索细胞 FasL 表达强度也在增强,14.5d 时脊索细胞形态一致且没有表达,16.5d 时脊索细胞向髓核细胞过渡时出现微弱表达,18.5d 时椎间盘形成后,FasL 在髓核细胞中表达显著。提示椎间盘的免疫赦免形成在椎间盘形成的早期,FasL 在椎间盘的形成中起了重要作用。

2 TNF α -TNFR 在椎间盘细胞凋亡中的作用

目前针对 TNF α 在椎间盘突出后对神经传导功能的影响以及如何导致根性痛研究较多,但是 TNF α 是否与椎间盘退变有关研究甚少。

通过对动物模型进行研究,发现髓核可使神经根传导速度明显减慢,引起神经根内血流量减少、神经内毛细血管栓塞等神经根的功能与结构的改变^[14,15]。Larsson 等^[16]对新生鼠的背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)细胞进行体外培养,观察髓核、冰冻髓核、TNF α 及 IL-1 β 对轴突生长的影响,结果冰冻髓核对轴突生长无影响, TNF α 及 IL-1 β 抑制轴突生长,髓核明显抑制轴突生长。Murata 等^[17]发现鼠 DRG 接触突出椎间盘 24h 后,引起 DRG 的细胞凋亡,并且有 ssDNA(单链 DNA)、caspase-3、TNF α 的表达。

在对 TNF α 的研究中发现,它所产生的神经损伤改变与髓核产生的神经损伤改变基本相同,因此推测髓核组织造成神经损伤的有效成分是 TNF α ,局部应用 TNF α 刺激鼠神经根后,可以引起神经根的异常放电,使得神经根痛觉敏感性增加^[18,19]。Olmaker 等^[20]对猪进行研究,用自体髓核刺激马尾神经,发现 TNF α 特异抑制剂可减少髓核组织对神经根的损伤。Murata 等^[21]用免疫组化方法观察鼠椎间盘突出后 DRG 中 TNF α 表达变化情况,发现在椎间盘突出 2 周内 DRG 中 TNF α 表达明显增加。Cuellar 等^[22]对鼠人造模型进行研究,分别将髓核(1组)、皮下脂肪(2组)、髓核加可溶性 TNFR1(3组)置于暴露的 L5 神经根,结果发现髓核(1组)对 DRG 刺激 1h 后 DRG 对热刺激和机械刺激敏感性增强,而 2,3 组对 DRG 敏感性影响不明显,提示髓核对神经根疼痛增敏作用在很短时间内就可以

产生,并且 TNF α 与痛觉增敏作用有关。Onda 等^[23]采用电生理学的方法研究 TNF α 抗体是否能够减少鼠髓核组织导致的鼠 DRG 的异常放电,试验分为三组:分别用髓核+TNF α 抗体,髓核+生理盐水,肌肉+生理盐水置于 L5 神经根,结果表明 TNF α 抗体对髓核引起的 DRG 异常放电有抑制作用,提示 TNF α 抗体对腰椎间盘突出后引起的坐骨神经痛有治疗意义。

Seguin 等^[24]采用 RT-PCR 法检测 TNF α 对培养的鼠椎间盘细胞基因表达的影响,结果发现 II 型胶原纤维和蛋白聚糖表达减少,基质金属蛋白酶 1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、MMP-3、MMP-13、新型整合素样金属蛋白酶(a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin 4, ADAM-TS4)、ADAM-TS5 的表达增加,提示 TNF α 与椎间盘退变有关系。Takahashi 等^[25]采用放射免疫测定法和酶联免疫吸附测定法对 77 例人突出椎间盘相邻组织进行炎症因子表达的研究,发现 IL-1 α (β)、IL-6、TNF- α 的表达,脱出或游离型椎间盘标本的巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞,突出型椎间盘标本的软骨细胞主要产生上述因子。Miyamoto 等^[26]通过免疫组化法发现人突出椎间盘软骨细胞胞浆中有 TNF α 表达,RT-PCR 法发现突出椎间盘来源细胞表达 TNF α 。Ahn 等^[27]用 RT-PCR 方法来检测人突出椎间盘标本的细胞因子表达情况,结果 65% 的突出椎间盘标本有 TNF α 的表达,但该作者的研究未用正常椎间盘作为对照,且对 TNF α 的细胞来源不能确定。Scuderi 等^[28]对人硬膜外灌洗液进行研究,采用蛋白组学技术、酶标记免疫吸附测定法、聚丙烯酰胺凝胶电泳技术未发现 TNF α 的表达。

3 Trail-TrailR 在椎间盘细胞凋亡中的作用

牛涛等^[29]用免疫组化方法对从 20 例非正常死亡的身体健康且没有椎间盘突出家族史者(年龄 18~25 岁)体内获得的 31 个腰椎间盘突出标本进行研究,发现在正常椎间盘组织髓核、纤维环及软骨终板中均存在 Trail 的表达,其中髓核中 Trail 表达高于纤维环及软骨终板,纤维环中表达最低,差异有显著性。说明 Trail 在正常椎间盘组织的不同部位存在着区域性分布,提示在正常椎间盘组织中可能存在着由 Trail/TrailR 诱导的凋亡途径。但此试验未检测 TrailR 的表达情况。

综上所述,目前研究已经证明退变椎间盘中存在 Fas 介导的椎间盘细胞凋亡途径,退变椎间盘中有 TNF α 和 Trail 的表达。椎间盘组织中是否存在 TNFR, TrailR 以及其他死亡受体的表达,尚未得到证实,均有待于进一步研究。

4 参考文献

1. French LE, Tschopp J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors [J]. Cell Death Differ, 2003, 10 (1): 117-123.
2. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling [J]. J

- Cell Sci, 2005, 118(Pt 2):265-267.
3. 金明熙, 李小川, 谢林. 凋亡相关基因产物 Fas APO-1 蛋白在腰椎间盘组织中的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志, 2000, 17(2):188.
 4. Park JB, Kim KW, Han CW, et al. Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue[J]. Spine, 2001, 26(2):142-146.
 5. Park JB, Chang H, Kim KW. Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue[J]. Spine, 2001, 26(6):618-621.
 6. Chen B, Fellenberg J, Wang H, et al. Occurrence and regional distribution of apoptosis in scoliotic discs[J]. Spine, 2005, 30(5):519-524.
 7. Park JB, Park IC, Park SJ, et al. Anti-apoptotic effects of caspase inhibitors on rat intervertebral disc cells [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(4):771-779.
 8. Kim KW, Kim YS, Ha KY, et al. An autocrine or paracrine Fas-mediated counterattack: a potential mechanism for apoptosis of notochordal cells in intact rat nucleus pulposus[J]. Spine, 2005, 30(11):1247-1251.
 9. Rannou F, Lee TS, Zhou RH, et al. Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload [J]. Am J Pathol, 2004, 164(3):915-924.
 10. Park JB, Lee JK, Park SJ, et al. Mitochondrial involvement in fas-mediated apoptosis of human lumbar disc cells[J]. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87(6):1338-1342.
 11. Anderson DG, Izzo MW, Hall DJ, et al. Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs: analysis of a rabbit annular laceration model [J]. Spine, 2002, 27(12):1291-1296.
 12. Takada T, Nishida K, Doita M, et al. Fas ligand exists on intervertebral disc cells: a potential molecular mechanism for immune privilege of the disc [J]. Spine, 2002, 27(14):1526-1530.
 13. Inui Y, Nishida K, Doita M, et al. Fas-ligand expression on nucleus pulposus begins in developing embryo[J]. Spine, 2004, 29(21):2365-2369.
 14. Kayama S, Konno S, Olmarker K, et al. Incision of the annulus fibrosus induces nerve root morphologic, vascular, and functional changes: an experimental study [J]. Spine, 1996, 21(22):2539-2543.
 15. Olmarker K, Nordborg C, Larsson K, et al. Ultrastructural changes in spinal nerve roots induced by autologous nucleus pulposus[J]. Spine, 1996, 21(4):411-414.
 16. Larsson K, Rydevik B, Olmarker K. Disc related cytokines inhibit axonal outgrowth from dorsal root ganglion cells in vitro[J]. Spine, 2005, 30(6):621-624.
 17. Murata Y, Nannmark U, Rydevik B, et al. Nucleus pulposus-induced apoptosis in dorsal root ganglion following experimental disc herniation in rats[J]. Spine, 2006, 31(4):382-390.
 18. Wagner R, Myers RR. Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors [J]. Neuroreport, 1996, 7(18):2897-2901.
 19. Onda A, Hamba M, Yabuki S, et al. Exogenous tumor necrosis factor-alpha induces abnormal discharges in rat dorsal horn neurons[J]. Spine, 2004, 29(15):1618-1624.
 20. Olmarker K, Rydevik B. Selective inhibition of tumor necrosis factor-alpha prevents nucleus pulposus-induced thrombus formation, intraneural edema, and reduction of nerve conduction velocity: possible implications for future pharmacologic treatment strategies of sciatica[J]. Spine, 2001, 26(8):863-869.
 21. Murata Y, Onda A, Rydevik B, et al. Distribution and appearance of tumor necrosis factor-alpha in the dorsal root ganglion exposed to experimental disc herniation in rats [J]. Spine, 2004, 29(20):2235-2241.
 22. Cuellar JM, Montesano PX, Carstens E. Role of TNF-alpha in sensitization of nociceptive dorsal horn neurons induced by application of nucleus pulposus to L5 dorsal root ganglion in rats[J]. Pain, 2004, 110(3):578-587.
 23. Onda A, Yabuki S, Kikuchi S. Effects of neutralizing antibodies to tumor necrosis factor-alpha on nucleus pulposus-induced abnormal nociceptive responses in rat dorsal horn neurons [J]. Spine, 2003, 28(10):967-972.
 24. Seguin CA, Pilliar RM, Roughley PJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha modulates matrix production and catabolism in nucleus pulposus tissue[J]. Spine, 2005, 30(17):1940-1948.
 25. Takahashi H, Suguro T, Okazima Y, et al. Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine[J]. Spine, 1996, 21(2):218-224.
 26. Miyamoto H, Saura R, Harada T, et al. The role of cyclooxygenase-2 and inflammatory cytokines in pain induction of herniated lumbar intervertebral disc[J]. Kobe J Med Sci, 2000, 46(1-2):13-28.
 27. Ahn SH, Cho YW, Ahn MW, et al. mRNA expression of cytokines and chemokines in herniated lumbar intervertebral discs[J]. Spine, 2002, 27(9):911-917.
 28. Scuderi GJ, Brusovanik GV, Anderson DG, et al. Cytokine assay of the epidural space lavage in patients with lumbar intervertebral disk herniation and radiculopathy [J]. J Spinal Disord Tech, 2006, 19(4):266-269.
 29. 牛涛, 陈伯华, 胡有谷. TRAIL 在正常椎间盘细胞中的分布及表达[J]. 青岛大学医学院学报, 2007, 43(3):265-266.

(收稿日期:2007-03-12 末次修回日期:2007-12-27)

(本文编辑 卢庆霞)