

自噬在椎间盘退变中的作用研究进展

陈德横 周凯亮 徐华梓

摘 要 椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是脊柱退行性疾病发生的始动因素,也被认为是导致下腰痛发生的重要原因。目前认为椎间盘细胞的凋亡与衰老下调了细胞的功能,是椎间盘退变的重要致病因素。自噬(autophagy)是哺乳动物细胞的一种宿主防御机制,不仅与细胞的代谢、增殖、凋亡紧密相关,更参与多种退行性疾病的病理过程。近年来细胞自噬在椎间盘退变中的研究逐渐成为热点,本文就自噬在椎间盘退变中的发生、诱导因素、作用及机制综述如下。

关键词 椎间盘退变 细胞自噬 作用

中图分类号 R6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.12.003

自噬是存在于哺乳动物机体细胞内的一种分解代谢途径。细胞在体内面对各种应激,如缺氧、炎症、营养障碍、生长因子缺乏等,当应激强度超过细胞承受能力时,细胞启动凋亡机制清除受损细胞;但是当应激不足以致死时,细胞启动自噬机制,通过降解胞内受损细胞器,使细胞得以存活。但过度自噬可能引发不同于凋亡的另一种细胞程序性死亡——自噬性细胞死亡^[1]。在真核生物细胞中发现有 3 种类型的自噬:大自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬,三者在作用机制上有着不同的特点。自噬的发生过程中需要有多种自噬相关基因(ATG)的参与。胞质型 LC3(LC3 - I)和膜型 LC3(LC3 - II),是判断细胞中自噬体形成的重要标志;ATG6 是自噬体成熟和发挥吞噬作用的重要物质;自噬底物泛素化蛋白 P62,代表着自噬流的发生^[2]。笔者综述自噬在椎间盘退变中的发生、诱导因素、作用及机制,旨在更好地理解自噬与椎间盘退变之间的联系,从而从分子生物学角度来寻求延缓椎间盘退行性变的治疗策略。

一、细胞自噬参与椎间盘退变

椎间盘退变作为一种典型的退行性疾病,往往被认为与细胞衰老、营养缺乏,生物力学负荷,免疫等有着紧密的联系^[3]。从分子生物学角度上看,引起椎间盘退变的主要原因是在退变过程中,椎间盘细胞的死亡,衰老以及细胞功能的减弱^[4]。近年来,一些研

究指出,细胞自噬也参与椎间盘退变的发病过程。2011 年 Ye 等^[5]利用电子显微镜第 1 次发现在不同月龄 SD 大鼠的椎间盘髓核细胞中都有自噬体的表达,并且自噬体的数量随年龄增加也呈增加趋势;自噬相关蛋白 LC3 - II/LC3 - I 比值也随月龄增加而上升,表明大鼠髓核细胞自噬水平随着年龄不断上升。2014 年 Xu 等^[6]第 1 次在人体的椎间盘组织中发现,在颈椎退变的患者的终板细胞中,自噬水平相对正常的细胞表达更低。然而在 2015 年,Gruber 等^[7]研究发现在椎间盘退变患者的纤维环细胞中,自噬水平相对于正常人表达更高。综上所述,自噬在椎间盘退变中的改变似乎仍存在着不确定性。这可能是由于在体内不同的组织中,自噬水平的改变不尽相同。也可能在椎间盘退变的进展过程中,自噬水平可能随着退变程度的不同而发生不同程度的变化。

二、自噬在椎间盘退变中的诱导因素

1. 营养不足:椎间盘作为人体内最大的无血管组织,其营养主要来自于终板血管和纤维环的被动扩散,并长期处于营养相对不足的环境中。而由各种原因引起的椎间盘细胞营养成分的减少是椎间盘退变的一个重要因素。2011 年 Shen 等^[8]用低血清培养基模拟低营养环境培养大鼠纤维环细胞,发现与正常组相比,自噬相关蛋白表达上升。2012 年江立波等^[9]用平衡盐溶液饥饿处理大鼠腰椎间盘纤维环细胞,发现饥饿诱导下,单丹磺酰戊二胺(MDC)阳性细胞数及自噬泡数量增多,LC3 - II/LC3 - I 与 Beclin - 1 的 mRNA 与蛋白量表达均有增加。这说明,营养不足能够激活椎间盘细胞自噬,也可能是椎间盘退变的发生机制之一。

2. 压力负荷:适当的脊柱负荷有利于维持椎间盘

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81401871,81401162);浙江省自然科学基金资助项目(LY14H170002);浙江省“重中之重”学科开放基金资助项目(2011GK001)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院脊柱外科、浙江省骨科重点实验室

通讯作者:徐华梓,电子邮箱:spinexu@163.com

的正常生理代谢,而过度的载荷被认为是椎间盘退变发生的重要因素。近年来,研究表明压力负荷会影响椎间盘细胞的凋亡及自噬水平^[10]。2013年 Ma等^[11]向大鼠椎间盘髓核细胞施加1MPa的静态压力分别作用12~48h后检测得出,随着压力负荷作用时间增长,髓核细胞在电镜下能够检测到更多的自噬体,LC3-II蛋白表达也增多,并在作用36h后达到峰值。2014年 Xu等^[12]提取大鼠的终板软骨细胞每天施加间歇的周期性机械张力,分别持续5、10、20天后发现,在施加张力5天后,自噬标记蛋白LC3-II、Beclin-1表达明显上升,而在施加张力10天与20天后,自噬水平却有着明显的下降。这可能意味着,短期的应力负荷能够激活椎间盘细胞的自噬,并可能作为椎间盘细胞早期应对应力负荷的一种保护机制,而长期的过度应力会消耗这种保护机制。

3. 高糖:研究证实,高糖能够显著上调椎间盘细胞的自噬水平。2013年 Park等^[13]用高糖处理大鼠椎间盘脊索细胞,发现自噬水平也明显上升,并推测自噬的上调与氧化应激的激活有关。2014年 Kong等^[14]提取大鼠的髓核及纤维环细胞分别用不同浓度的高糖培养基培养,发现高糖组 Beclin-1、LC3-II等自噬相关蛋白的表达都有明显上升。2013年 Jiang等^[15]用链脲霉素(streptozotocin)注射诱导SD大鼠12周后,造成1型糖尿病大鼠模型后,发现糖尿病大鼠的椎间盘的II型胶原及蛋白聚糖表达下降,呈退行性改变,同时在髓核细胞中有也发现更多的自噬泡,LC3-II、Beclin-1的蛋白表达均有增高,自噬底物P62蛋白则明显降低。这表明糖尿病不但会引起糖代谢紊乱及微血管病变,也可能通过调控自噬,影响椎间盘的退变过程。

4. 酸性环境:在椎间盘组织中,糖酵解是最主要的供能方式,椎间盘细胞在无氧酵解中产生能量以及大量乳酸。因此,椎间盘细胞长期处于一高乳酸以及弱酸性的微环境中。研究发现,正常椎间盘细胞外液pH值为7.0~7.2,而在退变的椎间盘细胞外环境,pH值往往降低到5.7~6.5^[16]。2014年 Wu等^[17]在大鼠髓核细胞中研究发现,高浓度的乳酸能够明显上调髓核细胞的自噬及凋亡水平,同时使细胞呈退行性改变。然而酸性环境激活髓核细胞自噬的具体机制及作用仍有待于进一步研究。

5. 炎性刺激:大量研究证明,炎性刺激诱导的多种基质降解酶对椎间盘基质的降解是导致椎间盘退变发生的重要因素之一。炎性介质,如肿瘤坏死因

子- α (TNF- α)、白介素1- β (IL-1 β),在激活基质降解酶的同时,往往也伴随着椎间盘细胞自噬水平的提升。2011年 Shen等^[8]在体外无血清培养的大鼠椎间盘纤维环细胞给予IL-1 β 刺激后发现,自噬相关蛋白的表达及自噬体的数量都明显增加,说明炎性刺激也是椎间盘退变中上调自噬的诱导因素之一。

6. 高渗环境:椎间盘主要由纤维环及内部的髓核组织构成,髓核分泌大量的胶原及蛋白聚糖构成细胞外基质,从而起到缓冲压力及承担脊柱应力的作用。在高浓度的蛋白聚糖构成的细胞外基质以及椎体的压力负荷下,髓核细胞长期处于高渗的环境中^[18]。2015年 Jiang等^[19]在体外模拟高渗环境培养大鼠脊索细胞后发现,随着细胞外渗透压的升高,自噬水平也不断上升,在敲除自噬相关基因ATG5后,发现细胞的凋亡水平随着渗透压升高而明显上升,推测自噬可能是髓核细胞适应高渗环境的一种重要机制。

多种原因引起的营养不足,不恰当的压力负荷,炎性刺激,代谢废物的积累都可导致椎间盘细胞微环境的改变,在上调自噬的同时,也导致了椎间盘组织代谢失衡,是引起椎间盘退变的重要致病因素。

三、细胞自噬在椎间盘退变的作用研究

越来越多的研究已经证明自噬可能参与椎间盘退变的过程,然而自噬在椎间盘退变的疾病发展中所起的作用仍充满争议。

1. 自噬激活延缓椎间盘退变:异常的应力负荷会逐步导致椎间盘终板软骨的钙化,减少终板血管的数量,影响终板的渗透能力,从而造成椎间盘血供不足,是导致椎间盘退变发生的重要致病因素^[3]。2014年 Xu等^[12]在体外模拟椎间盘终板软骨细胞的异常张力负荷后发现,自噬在张力应激早期就快速的做出反应以保持细胞的稳态。然而,在持续张力作用下,自噬水平开始下降,细胞凋亡增多。这意味着持续过度的应力负荷可能会耗尽这种保护机制,并破坏胞内基质的生成与降解的平衡,最终导致终板软骨细胞变性。在用自噬激动剂雷帕霉素上调终板软骨细胞的自噬水平后,终板细胞的钙化程度明显减轻,细胞外基质的降解也明显减少。

炎性因子也是椎间盘退变发生的重要因素。2015年 Xu等^[20]在用炎性因子(IL1- β 、TNF- α)处理的髓核细胞中加入雷帕霉素上调自噬水平后发现,自噬可以显著减少基质金属酶3,2,9(MMP-3,2,9),解整合素样金属蛋白酶4(ADAMTS-4)以及环氧化酶-2(COX-2)的表达,从而减少II型胶原及

蛋白聚糖的降解,从而延缓了髓核细胞的退变。

细胞凋亡被认为是椎间盘退变的重要参与因素。目前普遍认为自噬通路与凋亡通路之间存在相互影响,且都对细胞的存亡起重要作用。2013 年 Ma 等^[11]使用 3-MA 抑制自噬后发现髓核细胞中在压力负荷下调亡水平显著上升。2015 年 Miyazaki 等^[21]用重组人沉默调节因子 1(SIRT1)作用于人髓核细胞后,发现自噬水平上调,同时促凋亡基因 BAX,裂解型 caspase-3、caspase-9 的表达明显下降,而使用 3-MA 抑制自噬后,凋亡水平重新上升,细胞活性下降。在髓核细胞上应用白藜芦醇、葡萄糖胺等药物后,也发现这些药物能够通过激活自噬,抑制髓核细胞的凋亡,延缓细胞的退变^[22, 23]。

2. 自噬激活促进椎间盘退变的发生:自噬是一把双刃剑。仍有一部分研究表明过度激活自噬可能导致细胞凋亡,从而加剧椎间盘退变。2014 年 Chen 等^[24]用 H₂O₂ 处理髓核细胞后发现,氧化应激能够显著上调细胞的自噬及凋亡水平,在分别使用不同的自噬抑制剂(3-MA、BAF、U0126)处理后发现,随着髓核细胞的自噬水平下调,细胞凋亡也明显减少。而给予髓核细胞低氧刺激后,能够下调由饥饿引起的细胞自噬与凋亡水平,并减少活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的形成,推测低氧刺激可能通过低氧诱导因子- α (hypoxia-inducible factor- α , HIF- α)下调髓核细胞的自噬,从而减少了细胞的凋亡^[25]。这意味着在面对氧化应激时,过度激活自噬会促进髓核细胞凋亡,加剧椎间盘退变的发生。同年, Wu 等^[17]也发现在用不同浓度的乳酸在体外模拟髓核细胞退变的酸性环境后,随着乳酸浓度的升高,髓核细胞的自噬水平不断上升,而凋亡水平也同样上升,细胞外基质的分解也加剧,这说明过度的自噬激活可能会加重椎间盘退变。

在椎间盘退变的发生过程中,多种因素如力学负荷、氧化应激、炎性刺激都可能导致细胞凋亡及自噬的发生。目前多种研究证据表明,适当激活自噬能对抗细胞凋亡与衰老,可能在退行性疾病中起着一定的保护作用。椎间盘退变作为典型的退行性疾病之一,随着研究的深入,更多的研究者相信,适当的激活自噬,能够更好的帮助椎间盘细胞适应外界应激,促进椎间盘细胞存活,从而延缓椎间盘的退变。

四、椎间盘退变中自噬的调节通路

参与细胞自噬过程的信号转导分子机制非常复杂,目前在椎间盘退变中的相关转导机制主要有以下

几种。mTOR (mammalian target of rapamycin)信号通路是上调细胞自噬的最经典通路。mTOR 属于脂酰肌醇 3-激酶相关激酶(phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase, PI₃K)蛋白家族,在调节细胞生长、增殖、调控细胞周期等多个方面起到重要作用。mTOR 在生物体以两种复合物的形式存在,即 mTORC1 及 mTORC2,其中 mTORC1 被认为与自噬紧密相关。在能量充足或生长因子刺激下,mTORC1 蛋白的磷酸化可激活其下游的 S6K1 蛋白的磷酸化,进而抑制自噬,而能量不足及生长因子缺乏或者在雷帕霉素作用下,mTORC1 的激酶活性被抑制,磷酸化 mTOR 蛋白减少,最终导致自噬激活。mTOR 信号通路可被多种上游信号分子通路调控,如 AMPK 通路, PI₃K/Akt 通路, MAPK/ERK 通路等。

AMPK(AMP-activated protein kinase)是腺苷酸依赖的蛋白激酶,是生物能量代谢调节的关键分子。2014 年 Chen 等^[24]在髓核细胞中发现,营养不足以及氧化应激都可以通过激活 AMPK 蛋白的磷酸化,抑制 mTORC1 的活性,从而上调自噬,并且在 2015 年又提出低氧处理可以通过下调 AMPK 信号通路,抑制自噬^[25]。Jiang 等^[19]的研究也发现高渗环境下脊索细胞的自噬激活也是通过 AMPK/mTOR 信号通路。

PI₃K/AKT 通路是 mTOR 的经典上游信号分子。2015 年 Ni^[26]等研究发现在椎间盘纤维环细胞给予转化因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)可以通过上调 AKT 蛋白的磷酸化,促进磷酸化 mTOR 的形成,从而抑制自噬,同时也发现 ERK 蛋白磷酸化增多,推测 PI₃K/AKT 信号通路与 MAPK/ERK 通路都可能参与调控椎间盘细胞中的自噬发生。

SIRT1 信号通路也被认为与自噬激活相关。2014 年 Jiang 等发现白藜芦醇能够通过激活 SIRT1 上调椎间盘细胞的 LC3-II 及 ATG6 的蛋白表达,并抑制凋亡关键蛋白 caspase-3 的裂解,从而保护椎间盘细胞。笔者认为,目前关于椎间盘退变中调控自噬的确切信号通路的研究仍处在相对浅显的阶段,多种信号通路都可能参与椎间盘自噬水平的调控,然而对于其中调控自噬的关键信号分子仍缺乏确切的认识,运用基因学技术找寻椎间盘退变中自噬调控的关键靶点将是今后研究的目标。

目前对自噬与椎间盘相关性的研究尚处于起始阶段,我们已经明确在椎间盘退变的病理过程中,自噬能被多种因素激活。目前各种研究证据表明,自噬

可以抑制终板软骨的钙化,上调细胞外基质的表达,抑制细胞凋亡。但过度的自噬也可能导致细胞死亡,加重椎间盘退变。现阶段对于调控自噬的信号通路,自噬对髓核细胞功能的调控等多方面的认识还有待进一步研究。随着对椎间盘退变中自噬机制的深入研究,期待能够从分子水平调控椎间盘细胞的自噬,从而延缓椎间盘退变发展,为椎间盘退变的临床治疗提供更有效的手段。

参考文献

- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(4):463-477
- Pyo JO, Nah J, Jung YK. Molecules and their functions in autophagy [J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44(2):73-80
- Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? [J]. *Spine*, 2006, 31(18):2151-2161
- Ding F, Shao ZW, Xiong LM. Cell death in intervertebral disc degeneration [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(7):777-785
- Ye W, Xu K, Huang D. *et al.* Age-related increases of macroautophagy and chaperone-mediated autophagy in rat nucleus pulposus [J]. *Connect Tissue Res*, 2011, 52(6):472-478
- Xu H, Xiong S, Wang H, *et al.* The evidence and the possible significance of autophagy in degeneration model of human cervical end-plate cartilage [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(3):537-542
- Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, *et al.* Autophagy in the degenerating human intervertebral disc in vivo molecular and morphological evidence, and induction of autophagy in cultured annulus cells exposed to proinflammatory cytokines-implications for disc degeneration [J]. *Spine*, 2015, 40(11):773-782
- Shen C, Yan J, Jiang LS, *et al.* Autophagy in rat annulus fibrosus cells: evidence and possible implications [J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(4):R132
- 江立波, 张小磊, 徐华梓, 等. 细胞自噬对饥饿环境下椎间盘髓核细胞的保护作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(7):1302-1307
- Kobayashi S, Baba H, Uchida K, *et al.* Effect of mechanical compression on the lumbar nerve root: Localization and changes of intradiscal inflammatory cytokines, nitric oxide, and cyclooxygenase [J]. *Spine*, 2005, 30(15):1699-1705
- Ma KG, Shao ZW, Yang SH, *et al.* Autophagy is activated in compression-induced cell degeneration and is mediated by reactive oxygen species in nucleus pulposus cells exposed to compression [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(12):2030-2038
- Xu HG, Yu YF, Zheng Q, *et al.* Autophagy protects end plate chondrocytes from intermittent cyclic mechanical tension induced calcification [J]. *Bone*, 2014, 66:232-239
- Park EY, Park JB. High glucose-induced oxidative stress promotes autophagy through mitochondrial damage in rat notochordal cells [J].

Int Orthop, 2013, 37(12):2507-2514

- Kong CG, Park JB, Kim MS, *et al.* High glucose accelerates autophagy in adult rat intervertebral disc cells [J]. *Asian Spine Journal*, 2014, 8(5):543-548
- Jiang L, Zhang X, Zheng X, *et al.* Apoptosis, senescence, and autophagy in rat nucleus pulposus cells: Implications for diabetic intervertebral disc degeneration [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(5):692-702
- Jiang L, Yuan F, Yin X, *et al.* Responses and adaptations of intervertebral disc cells to microenvironmental stress: a possible central role of autophagy in the adaptive mechanism [J]. *Connect Tissue Res*, 2014, 55(5-6):311-321
- Wu W, Zhang X, Hu X, *et al.* Lactate down-regulates matrix synthesis and promotes apoptosis and autophagy in rat nucleus pulposus cells [J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(2):253-261
- Tao YQ, Liang CZ, Li H, *et al.* Potential of co-culture of nucleus pulposus mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in hyperosmotic microenvironment for intervertebral disc regeneration [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(8):826-834
- Jiang LB, Cao L, Yin XF, *et al.* Activation of autophagy via Ca²⁺-dependent AMPK/mTOR pathway in rat notochordal cells is a cellular adaptation under hyperosmotic stress [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(6):867-879
- Xu K, Chen W, Wang X, *et al.* Autophagy attenuates the catabolic effect during inflammatory conditions in nucleus pulposus cells, as sustained by NF- κ B and JNK inhibition [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(3):661-668
- Jiang L, Jin Y, Wang H, *et al.* Glucosamine protects nucleus pulposus cells and induces autophagy via the mTOR-dependent pathway [J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(11):1532-1542
- Jiang W, Zhang X, Hao J, *et al.* SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative human disc nucleus pulposus cells [J]. *Sci Rep*, 2014, 4:7456
- Chen JW, Ni BB, Li B, *et al.* The responses of autophagy and apoptosis to oxidative stress in nucleus pulposus cells: implications for disc degeneration [J]. *Cel Physiol Biochem*, 2014, 34(4):1175-1189
- Chen JW, Ni BB, Zheng XF, *et al.* Hypoxia facilitates the survival of nucleus pulposus cells in serum deprivation by down-regulating excessive autophagy through restricting ROS generation [J]. *Int J Biochem & Cell Biol*, 2015, 59:1-10
- Meijer AJ, Lorin S, Blommaert EF, *et al.* Regulation of autophagy by amino acids and mTOR-dependent signal transduction [J]. *Amino Acids*, 2015, 47(10):2037-2063
- Ni BB, Li B, Yang YH, *et al.* The effect of transforming growth factor beta 1 on the crosstalk between autophagy and apoptosis in the annulus fibrosus cells under serum deprivation [J]. *Cytokine*, 2014, 70(2):87-96

(收稿日期:2016-04-13)

(修回日期:2016-05-03)