

基础研究

p16^{INK4a} 和 Fas 在椎间盘组织细胞中的表达及意义周昊崑¹, 侯树勋¹, 商卫林¹, 杨毅², 梅芳³

(1 中国人民解放军总医院第一附属医院骨科; 2 病理科 100037 北京市;

3 北京大学医学部基础医学院解剖学与组织胚胎学系 100083 北京市)

【摘要】目的:分析衰老关键基因 p16^{INK4a} 及凋亡相关基因 Fas 在人类椎间盘退变过程中的表达变化。**方法:**分别取正常人和腰椎间盘退变患者的髓核及纤维环组织块制作石蜡切片, 利用免疫组织化学及免疫荧光法检测 p16^{INK4a} 和 Fas 的表达情况; 提取总蛋白及总 RNA, 利用 Western blot 及 RT-PCR 对 p16^{INK4a} 和 Fas 的表达以及视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)的磷酸化状态进行分析。**结果:**p16^{INK4a} 在正常人椎间盘髓核及纤维环组织中的表达阳性率分别为 6.6%、4.7%, 在内破裂椎间盘(IDD)及突出椎间盘(LIDP)组织中的表达分别为 44.1%、38.9% 和 56.1%、46.7%, 较正常人椎间盘明显升高($P<0.05$), 尤以 LIDP 中的表达上调显著($P<0.05$); Fas 在正常椎间盘与 IDD 的髓核及纤维环组织中的表达阳性率均较低, 分别为 9.9%、8.1% 和 10.2%、10.9%, 在 LIDP 组织中有相对较高表达阳性率, 分别为 25.2% 和 22.0%; Western blot 及 RT-PCR 分析显示, p16^{INK4a} 与 Fas 在各自蛋白及相应 mRNA 水平上的表达具有相同的变化趋势; p16^{INK4a} 与 Fas 极少在同一个椎间盘细胞内表达; 随着 p16^{INK4a} 表达的升高磷酸化 pRb 也逐渐减少。**结论:**p16^{INK4a} 可能参与了椎间盘细胞的衰老过程, 是导致椎间盘退变发生和发展的原因之一; Fas 表达升高可能是突出椎间盘细胞中的一种继发改变。

【关键词】 p16^{INK4a}; Fas; 椎间盘; 衰老

中图分类号: R681.5, Q71 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-01-0042-04

Expression and significance of p16^{INK4a} and Fas in lumbar intervertebral discs/ZHOU Haowei, HOU Shuxun, SHANG Weilin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(1): 42~45

【Abstract】 Objective: To demonstrate the roles of p16^{INK4a} and Fas in the progression of degeneration of human intervertebral disc (IVD). **Method:** Sections from normal and symptomatic human discs (IDD and LIDP) were immunostained with an antibody labeling p16^{INK4a} or Fas, and detected by immunohistochemistry and immunofluorescence. In addition, total protein and RNA was isolated from normal and symptomatic human IVD and analysed by Western blot and RT-PCR for p16^{INK4a} and Fas expression on protein and mRNA level. The phosphorylation status of pRb was also studied by Western blot. **Result:** p16^{INK4a} expression in nuclea pulposus and fibrosic annulus of normal IVD was 6.6% and 4.7% respectively, while 44.1%, 38.9% and 56.1%, 46.7% in IDD and LIDP respectively, which had significant difference compared with those in normal IVD ($P<0.05$), the upregulation of p16^{INK4a} and Fas was especially higher in LIDP ($P<0.05$). Fas expression in nuclea pulposus and fibrosic annulus of normal IVD and IDD was 9.9%, 8.1% and 10.2%, 10.9% respectively. While 25.2% and 22.0% in LIDP. The p16^{INK4a} and Fas expression in the level of both protein and mRNA had the same orientation with both gene rarely coexpressed in the same cell of IVD. The phosphorylated pRb decreased with the rising expression of p16^{INK4a}. **Conclusion:** p16^{INK4a} may be involved in the senescence of cells in IVD which lead to the progression of degenerative IVD. The rising expression of Fas may be a reaction secondary to the result of LIDP.

【Key words】 p16^{INK4a}; Fas; Intervertebral disc; Senescence

【Authors's addresss】 Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of China People's Liberation Army General Hospital, Beijing, 100037, China

椎间盘老化退变是人类腰痛最常见的原因之一。老化相关的关键基因 p16^{INK4a} 以及 Fas 在椎间

盘退变过程的作用尚不清楚。本研究对其在正常人、内破裂椎间盘(IDD)及突出椎间盘(LIDP)组织中的表达进行对比, 以期能发现它们在退变椎间盘中的表达规律, 明确椎间盘退变在分子学上的主要病因。

第一作者简介: 男(1966-), 副主任医师, 医学博士, 博士后在站工作, 研究方向: 脊柱外科

电话: (010)66867350 E-mail: doctorzhou6654@sina.com.

1 材料与方法

1.1 椎间盘来源

4 个正常人椎间盘取自 2 具死后 8h 的尸体,生前无腰痛及坐骨神经痛病史。4 个 IDD 取自 4 例椎间盘源性腰痛的患者,均因持续性盘源性腰痛行椎间融合术,术前均行椎间盘造影术及 MRI 检查证实内破裂存在而无椎间盘突出。5 个 LIDP 来自 5 例腰椎间盘突出症患者,均行后路椎间盘摘除术。所有椎间盘供体的年龄均在 20~30 岁,平均 24 岁。均来自 L4/5 和 L5/S1。仔细将每个椎间盘标本的髓核与纤维环分开,随机在 3 个标本的髓核与纤维环中取约 0.5×0.5×0.5cm 大小组织块,用于免疫组织化学及免疫荧光分析,余组织及标本用于直接提取总蛋白及总 mRNA 进行分析比较。

1.2 免疫组织化学分析

制备 5μm 厚组织切片。利用 p16^{INK4a} 单抗或 Fas 多抗进行免疫组织化学分析。每块组织中随机抽取 6 张切片,每个切片随机选取 10 个高倍视野,计算 p16^{INK4a} 及 Fas 染色阳性细胞百分率。

1.3 蛋白提取及免疫学鉴定

分别自纤维环及髓核组织中提取蛋白^[1]。利用 Western blot 方法分析 p16^{INK4a} 和磷酸化及非磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白 (pRb) 的表达。Luminol 试剂盒显色后进行印迹强度定量分析。

1.4 RT-PCR 检测

直接从髓核或纤维环组织中细胞的总 RNA 取 1μg RNA,以随机引物反转录获取 cDNA 并保存于 -80℃。分别用 p16^{INK4a}[2]、Fas^[3]和磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH) [2]引物进行 PCR 扩增。扩增产物行琼脂糖凝胶电泳。GAPDH 为内参照,比较 p16^{INK4a} 及 Fas 表达水平的差异。

1.5 免疫荧光双重标记及激光共聚焦扫描检测

将石蜡切片用 p16^{INK4a} 单抗及 Fas 多抗在 4℃ 下孵育过夜^[4]。分别用四甲基异硫磺若丹明 (TRITC) 标记的山羊抗鼠和异硫氰酸荧光素 (FITC) 二抗标记。二脒基苯基吡啶 (DAPI) 复染细胞核,封片后在同一焦平面下用不同的通道连续截取图像并进行叠加对 TRITC 和 FITC 荧光染色进行检测。

1.6 统计学分析

数据用平均数±标准差表示。统计学分析采用 SPSS 10.0 软件包。在确定正态分布和方差齐

性后,对平均值进行单因素方差分析,并用 LSD 法进行多个平均值之间的两两比较。显著性差异水平定为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 免疫组织化学分析

p16^{INK4a} 阳性信号为棕色颗粒,主要位于细胞核内;Fas 阳性信号亦为棕色颗粒,位于细胞膜(图 1~3,后插页 II),与两种蛋白的表达特性相一致。在正常人椎间盘髓核及纤维环中,p16^{INK4a} 和 Fas 染色阳性细胞百分率均在较低水平,在 IDD 及 LIDP 的髓核及纤维环中,p16^{INK4a} 表达阳性细胞均有显著性增多($P<0.05$),这种增高在 LIDP 中更为显著($P<0.05$);而 Fas 染色阳性细胞百分率在 IDD 组织中仍保持在较低水平,与正常人椎间盘组织中的阳性率无显著性差异($P>0.05$),相对于正常人及 IDD 椎间盘组织,LIDP 椎间盘的髓核及纤维环中 Fas 的表达阳性率明显增高($P<0.05$)(表 1)。

表 1 正常人、内破裂 (IDD) 及突出 (LIDP) 椎间盘髓核 (NP) 与纤维环 (AF) 组织中 p16^{INK4a} 和 Fas 染色阳性细胞的百分率 (%)

		正常人椎间盘	IDD	LIDP
p16 ^{INK4a}	NP	6.550±1.304	44.147±1.538 ^①	56.050±1.304 ^②
	AF	4.717±1.142	38.920±1.088 ^①	46.737±1.641 ^②
Fas	NP	9.937±1.339	10.197±1.537	25.150±2.072 ^②
	AF	8.077±1.771	10.870±0.836	21.970±1.102 ^②

注:①与正常椎间盘细胞比较 $P<0.05$;②与 IDD 比较 $P<0.05$

2.2 Western blot 和 RT-PCR 分析

正常人椎间盘髓核及纤维环组织中 p16^{INK4a} 基因无论在蛋白水平还是在 mRNA 水平的表达均保持在极低水平,而在 IDD 及 LIDP 组织中的表达明显升高,尤以 LIDP 组织中的表达最为明显($P<0.05$);Fas 基因的表达仅在 LIDP 组织中明显上调($P<0.05$),在正常人椎间盘与 IDD 组织中表达较低,且差异无显著性($P>0.5$)(表 2,图 4)。

正常人椎间盘组织中 pRb 处于高磷酸化状态,相比之下,IDD 及 LIDP 中 pRb 的磷酸化状态明显回落($P<0.05$),磷酸化 (pRb^{phos}) 与非磷酸化 (pRb^{unphos}) Rb 蛋白之比明显下降($P<0.05$),这种回落和下降在 LIDP 中更明显($P<0.05$)(表 3,图 5)。

表 2 正常人、内破裂(IDD)及突出(LIDP)椎间盘髓核(NP)与纤维环(AF)组织中细胞内源性 p16^{INK4a}、Fas 在蛋白和 mRNA 水平上的表达

		正常人椎间盘	IDD	LIDP
蛋白	p16 ^{INK4a}	NP 0.084±0.022	0.454±0.030 ^①	0.617±0.017 ^{①②}
		AF 0.082±0.008	0.389±0.018 ^①	0.631±0.020 ^{①②}
	Fas	NP 0.049±0.022	0.062±0.034	0.235±0.067 ^{①②}
		AF 0.020±0.007	0.035±0.013	0.183±1.018 ^{①②}
mRNA	p16 ^{INK4a}	NP 0.108±0.010	0.622±0.016 ^①	0.724±0.019 ^{①②}
		AF 0.054±0.010	0.584±0.015 ^①	0.709±0.023 ^{①②}
	Fas	NP 0.073±0.014	0.082±0.012	0.250±0.025 ^{①②}
		AF 0.033±0.014	0.037±0.010	0.239±0.031 ^{①②}

注：每组电泳条带灰度值相对于内参 GAPDH 灰度值标准化后的平均数±标准差，①与正常人椎间盘比较 $P<0.05$ ；②与 IDD 比较 $P<0.05$

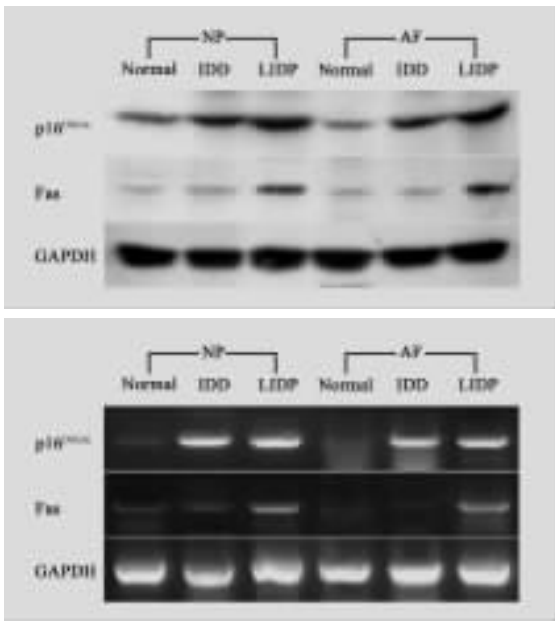


图 4 正常人椎间盘、IDD 及 LIDP 组织中细胞内源性 p16^{INK4a} 和 Fas 在蛋白及 mRNA 水平上的表达（上图为 Western blot 分析的典型蛋白电泳条带；下图为 RT-PCR 分析的典型凝胶电泳条带。GAPDH 为内参照）

表 3 正常人、内破裂(IDD)及突出(LIDP)椎间盘髓核(NP)与纤维环(AF)组织中 pRb^{phos} 与 pRb^{unphos} 电泳条带灰度之比及 pRb^{phos} 电泳条带灰度值

		正常人椎间盘	IDD	LIDP
pRb ^{phos/unphos}	NP	4.867±0.285	1.733±0.296 ^①	0.533±0.092 ^②
	AF	4.622±0.563	2.067±0.088 ^①	0.507±0.050 ^②
pRb ^{phos}	NP	46.400±3.281	24.033±2.008 ^①	9.330±1.099 ^②
	AF	48.567±4.129	22.533±1.625 ^①	8.467±0.731 ^②

注：每组电泳条带灰度值相对于内参照 GAPDH 灰度值标准化后的平均数±标准差，①与正常人椎间盘比较 $P<0.05$ ；②与 IDD 比较 $P<0.05$

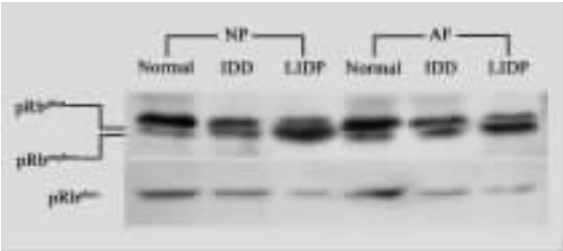


图 5 pRb 磷酸化状态的 Western blot 分析电泳图(上图为抗 pRb 抗体的检测结果；下图为抗磷酸化 pRb 抗体的检测结果)

2.3 p16^{INK4a} 及 Fas 表达的相关性分析

采用免疫荧光双重标记的 LIDP 组织石蜡切片中,红色荧光显示的 p16^{INK4a} 大多分布在细胞核内,而绿色荧光显示的 Fas 则主要分布在细胞膜上,与免疫组织化学结果表明的分布特征相同(图 6,后插页 II)。在 p16^{INK4a} 阳性的细胞中,很少表达 Fas 阳性,反之亦然。说明 p16^{INK4a} 与 Fas 很少共同表达在同一个椎间盘细胞内。

3 讨论

目前针对椎间盘细胞老化的研究大多数集中在椎间盘细胞凋亡的研究上。近来有文献报道细胞凋亡相关基因 Fas 及其配体 Fas-L 表达的增加存在于人类突出椎间盘组织中^[5,6],而且在纤维环急性破裂的动物模型中也发现了凋亡相关基因 Fas 的高表达^[7]。但是前者是一个缺乏正常椎间盘组织对照的研究结果,而后者是在一个非生理状态下的动物模型中的实验结果。有研究发现在机械负荷下建立的鼠椎间盘退变模型中 Fas 的配体 Fas-L 的表达并没有明显增高^[8]。而且细胞凋亡本身是组织正常发育和保持自身内环境稳定所必须的。因此,细胞凋亡是否是椎间盘退变的起始因子有待进一步证实。

在人体其它组织内,细胞功能随年龄的衰退促成了老化相关的组织退变。这些衰老的体细胞与凋亡细胞不同,它们虽然存活,但它们丧失了复制 DNA 的能力,丧失了某些或全部的合成能力以及其它一些特殊的功能。这种细胞能力的改变是来自于基因表达的变化,而某些结合于 DNA 特殊序列上的转录因子或者某些基因的直接表达控制着这些老化相关的改变。如果细胞衰老的基因可以明确,那么恰当的转录因子活性就可以中止或逆转细胞在功能上的衰老改变。p16^{INK4a} 在人类很多衰老体细胞包括关节软骨细胞中都可见到表达

的累积现象。它通过抑制 CDK4 和 CDK6 激酶的活性,使 pRb 维持在低磷酸化,从而使细胞处于生长抑制状态。p16^{INK4a} 与其它成员主要不同之处在于其在受到衰老或致癌基因应力时有转录上调的能力。因此人们普遍认为 p16^{INK4a} 基因是衰老的关键效应基因。而其在椎间盘组织中的表达规律尚不清楚。

本研究通过免疫组织化学、RT-PCR 及蛋白印迹法检测等方法,比较不同来源椎间盘组织中 p16^{INK4a} 和 Fas 的表达情况,以期找到它们在退变椎间盘组织中的表达规律,确定椎间盘退变发生和发展的主要基因调控因素。结果证实在人类早期退变的 IDD 及晚期退变的 LIDP 组织中存在 p16^{INK4a} 基因的高表达,尤其在 LIDP 组织中其表达更为明显,而在正常人椎间盘中 p16^{INK4a} 表达极低。这种变化规律不仅存在于椎间盘的髓核中,也存在于椎间盘纤维环中。与之相对应,p16^{INK4a} 下游靶物质 pRb 的磷酸化状态也随 p16^{INK4a} 表达的升高而发生回落。这表明细胞衰老的 p16^{INK4a}/pRb 途径可能存在于椎间盘退变过程中;而细胞凋亡的相关基因 Fas 只在严重退变的 LIDP 组织中的表达有所升高,在退变较轻的 IDD 与正常人椎间盘组织中的表达很低,且无明显差异。由于凋亡往往是发生迅速而且在数小时内结束,故很难辨别其组织学信号,即使为数不多的细胞出现凋亡信号也表明有大量的凋亡已经发生。Fas 是细胞凋亡的重要起始因子,虽然 Fas 在正常人椎间盘和退变早期的 IDD 组织中表达较低,也说明在这些组织中存在着一程度的细胞凋亡,这种凋亡更象是一种正常的细胞程序性死亡。细胞的凋亡可以被多种外部环境因素所诱导,Fas 在 LIDP 椎间盘组织中的过高表达极有可能是由于椎间盘突出后周围环境发生的变化导致更多椎间盘细胞趋向凋亡的一种继发改变^[5]。IDD 细胞中 Fas 的低水平表达也从反面支持这种结论。研究还发现,在 p16^{INK4a} 表达的椎间盘细胞中,很少有 Fas 的表达,反之亦然。这与以往衰老的细胞对凋亡的刺激具有一定对抗能力^[9,10]的结论相一致。同时也说明在椎间盘组织中,细胞的衰老与凋亡是两个相互独立的事件。

总之,衰老关键基因 p16^{INK4a} 在退变椎间盘细胞中有较高水平的表达,表明 p16^{INK4a}/pRb 介导的细胞衰老途径可能参与了椎间盘退变的发生和发

展的全部病理过程;而凋亡相关基因 Fas 仅在 LIDP 组织内有较高的表达,在退变相对早期的 IDD 组织中未见明显升高,说明椎间盘细胞凋亡的发生并非椎间盘退变的直接诱因,而椎间盘细胞的衰老或者说过早衰老才是椎间盘组织退变或过早退变的主要原因。为了进一步确定 p16^{INK4a} 及 Fas 两个基因是否参与人类椎间盘的退变过程,针对两种基因在椎间盘细胞中的功能性分析将是十分必要的。

4 参考文献

1. Chubinskaya S, Kumar B, Merrihew C, et al. Age-related changes in cartilage endogenous osteogenic protein-1 (OP-1) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1588(2): 126-134.
2. Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16^{INK4a}-specific siRNA in vitro [J]. *Rheumatol (Oxford)*, 2004, 43(5): 555-568.
3. Morimoto Y, Morimoto H, Okamura H, et al. Upregulation of the expression of Fas antigen and Fas ligand in a human submandibular gland ductal cell line by okadaic acid [J]. *Arch Oral Biol*, 2000, 45(8): 657-666.
4. Schad A, Fahimi HD, Volkl A, et al. Expression of catalase mRNA and protein in adult rat brain: detection by nonradioactive in situ hybridization with signal amplification by catalyzed reporter deposition (ISH-CARD) and immunohistochemistry (IHC)/immunofluorescence (IF) [J]. *J Histochem Cytochem*, 2003, 51(6): 751-760.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Gansauge S, Gansauge F, Gause H, et al. The induction of apoptosis in proliferating human fibroblasts by oxygen radicals is associated with a p53- and p21WAF1/CIP1 induction [J]. *FEBS Lett*, 1997, 404(1): 6-10.
10. Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(11): 2284-2292.

(收稿日期: 2006-05-24 修回日期: 2006-10-11)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)