

基础研究

内质网应激在酸诱导的人椎间盘髓核细胞
损伤中的作用机制研究

谢志阳, 陈 露, 张 聪, 王 锋, 刘 磊, 洪 鑫, 吴小涛

(东南大学附属中大医院脊柱外科中心 东南大学医学院 210009 南京市)

【摘要】目的:模拟人椎间盘髓核(nucleus pulposus, NP)酸性环境,研究酸诱导的内质网应激活化以及内质网应激在酸诱导的髓核细胞损伤中的作用机制。方法:体外单层培养人正常髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)系,以 pH 值 7.4 为对照, pH 值 7.0 和 6.5 分别模拟正常和退变椎间盘酸性环境,培养 12~72h,建立酸诱导的髓核细胞损伤模型。采用 CCK8 法检测髓核细胞增殖情况,透射电镜检测髓核细胞中内质网应激活化情况,免疫荧光检测内质网应激特异性标志物糖调节蛋白 78 (78 kDa glucose-regulated protein, GRP78) 和 C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)表达。应用 4-PBA(内质网应激阻断剂)阻断内质网应激后,流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期; β 半乳糖苷酶染色检测细胞老化。Western blot 检测 LC3、GATA4、p53、p21、p16、Bax、Bcl-2 和 Caspase3 蛋白变化情况。结果:与对照组相比,酸刺激下(pH6.5 组)髓核细胞整体增殖力较对照组明显下降;透射电镜下可见内质网扩张明显,膜表面积增加,内质网线粒体膜结构形成,伴线粒体肿胀;细胞免疫荧光检测提示 GRP78 和 CHOP 表达明显增加($P<0.05$)。应用 4-PBA 后,细胞凋亡率增加,且能够显著增加酸诱导的 G1 期停滞及 β 半乳糖苷酶阳性染色率($P<0.05$)。Western blot 检测发现,酸刺激下,髓核细胞 LC3、GATA4、p53、p21、p16、Bax 和 Caspase3 表达增高($P<0.05$), Bcl-2 表达降低($P<0.05$);应用 4-PBA 后可降低 LC3 比值和 Bcl-2 表达水平,并显著升高 GATA4、p53、p21、p16、Bax 和 Caspase3($P<0.05$)。结论:酸性微环境能够活化内质网应激,在酸诱导的人髓核细胞急性损伤中起保护作用。

【关键词】椎间盘退变;髓核细胞;内质网应激;酸

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.08.10

中图分类号:R681.5, R364.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2018)-08-0732-09

A study of the effect of the endoplasmic reticulum stress in protection the human nucleus pulposus cells from the acid-induced injury/XIE Zhiyang, CHEN Lu, ZHANG Cong, HONG Xin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(8): 732-740

【Abstract】Objectives: To investigate the role of endoplasmic reticulum(ER) stress played in acid-induced injury of nucleus pulposus cells. Methods: Normal human nucleus pulposus cells(NPCs) were cultured in vitro, pH 7.4 was used as the control, pH 7.0 and 6.5 were used to simulate the normal and degenerative intervertebral disc acidic environment. All cells were cultured for 12-72h, acid-induced damage model of NPCs was established. CCK8 was used to detect the proliferation of NPCs and transmission electron microscopy (TEM) was used to detect the stress activation of endoplasmic reticulum in NPCs. Immunofluorescence assay was performed to detect the expressions of glycoregulin 78 (78 kDa glucose-regulated protein, GRP78) and C/EBP homologous protein (CHOP), the stress specific markers of endoplasmic reticulum. Apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry after 4-PBA (endoplasmic reticulum stress blocker) was used to block endoplasmic reticulum stress. SA- β -gal staining kit was used to observe aging cells. Acidity-induced changes in autophagy-, aging- and apoptosis-related markers were studied by using Western blotting analysis, including LC3, GATA4, p53, p21, p16, Bax, Bcl-2 and Caspase3. Results: Compared with the control group, the overall proliferation capacity of myeloid nucleus cells under acid stimulation (pH6.5 group) was significantly

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号 81572170, 81572190),江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(编号 KYLX16_0302)

第一作者简介:男(1987-),博士,研究方向:脊柱退行性病变的临床与基础研究

电话:(025)83262330 E-mail:uranter@126.com

通讯作者:吴小涛 E-mail:wuxiaotaospine@seu.edu.cn

lower than that of the control group. Under TEM, the endoplasmic reticulum expanded significantly, the membrane surface area increased, and the mitochondrial membrane structure of the endoplasmic reticulum was formed, accompanied by mitochondrial swelling. Immunofluorescence detection of cells indicated that GRP78 and CHOP expression increased significantly ($P < 0.05$). After 4-PBA was applied, the apoptosis rate of cells increased, and the acid induced G1 stagnate and transglutaminase positive staining rate significantly increased ($P < 0.05$). Western blot assay showed that the expressions of LC3, GATA4, p53, p21, p16, Bax and Caspase3 increased under acid stimulation ($P < 0.05$), while Bcl-2 expression decreased ($P < 0.05$). After applying 4-PBA, LC3 ratio and bcl-2 expression level decreased, and GATA4, p53, p21, p16, Bax and Caspase3 significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions:** Acidic microenvironment can activate endoplasmic reticulum stress and play a protective role in acute injury of human medullary nucleus cells induced by acid.

[Key words] Intervertebral disc degeneration; Nucleus pulposus; Endoplasmic reticulum stress; Acid

[Author's address] Department of Spine Surgery, Zhongda Hospital, School of Medicine, Southeast University, Nanjing, Jiangsu Province, 210009, China

腰痛(low back pain, LBP)是全世界范围内是导致劳动力丧失的最重要因素之一^[1],造成了沉重的社会经济负担^[2-4],其最主要的病因是椎间盘退变。近年来,学者们尝试通过补充生长因子和移植骨髓间充质干细胞等生物学手段及时干预退变的诸多环节,已在动物模型中证实早期修复椎间盘退变的可行性^[5-8]。但椎间盘退行性变是多因素参与的对椎间盘成分、结构、功能起渐进性破坏复杂的慢性过程^[9,10]。椎间盘髓核是人体最大的缺血缺氧组织,以糖酵解为主要的能量供应形式,正常椎间盘中 pH 值为 6.9~7.2^[11],当椎间盘退变时,椎间盘内弥散功能发生障碍,形成了髓核中酸性和高渗的“恶劣”环境,严重退变的椎间盘中 pH 可低达 6.5^[12]。当椎间盘内 pH 浓度低于 6 时,持续数天细胞即开始死亡,pH 达 6.4 时,细胞虽能存活,但合成细胞外基质的能力严重损害。

内质网是蛋白质合成、脂质代谢的重要细胞器,也是细胞内主要的钙库,维持胞浆内 Ca^{2+} 稳定,同时内质网亦是细胞感受刺激的重要感受器,通过内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress, ERstress)的形式发挥效应,调节细胞微环境的稳态,与细胞的分化、老化、自噬、凋亡均紧密相关^[13-15]。缺氧酸性环境是内质网应激的重要诱因^[16]。我们的前期研究已经证实^[17,18],退变髓核中存在内质网应激蛋白表达,且随退变程度加剧表达增加,而体外酸刺激能够诱导髓核细胞发生内质网应激,但对于内质网应激在椎间盘髓核退变中所扮演的角色研究不深。

本研究拟通过胞外酸化刺激模拟椎间盘酸性微环境,检测髓核细胞损伤(包括自噬、老化及凋

亡相关指标)及内质网应激的活化情况,阻断内质网应激后,探讨内质网应激与酸诱导的髓核细胞损伤间的联系。研究内容经东南大学附属中大医院伦理委员会批准(批件编号 2017ZDKYSB095)。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂和仪器

人正常髓核细胞株 (ScienCell 4800);NPCs 培养液(DMEM-F12,含 10%FBS、1%青霉素和链霉素双抗)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基)、CCK-8 增殖检测试剂盒(南京凯基)、兔抗人抗体(表 1)、全蛋白抽提试剂盒(杭州碧云天)、BCA 试剂盒(南京凯基)等;细胞培养相关仪器、流式细胞仪(西门子,德国)、激光共聚焦显微镜(OLYMPUS,日本)、紫外分光光度计(Thermo,美国)、电泳仪(BioRad,美国)、曝光仪

表 1 Western Blotting、ICC 抗体

Table 1 Western Blotting and the antibody of ICC

抗体 Antibody	公司,产品编号,用量 Company, product number, dosage
GRP78(BIP)	Abcam, ab21685(1:200)
CHOP(DDIT3)	Abcam, ab10444(1:200)
LC3A/B	CST, 12741(1:1000)
GATA4	Abcam, ab134057(1:1000)
p62	Abcam, ab91526 (1:500)
p53	Abcam, ab1431(1:500)
p21	Abcam, ab109199(1:1000)
p16	Abcam, ab51243 (1:1000)
Bax	Abcam, ab32503(1:1000)
Bcl-2	Abcam, ab32124(1:1000)
Cleaved caspase3	Abcam, ab2302(1:1000)
β -actin	Abcam, ab8227(1:5000)

(北京赛智)、酶标仪(Thermo, 美国)、高速离心机(Eppendorf, 德国)、超低温冰箱(三洋, 日本)等。

1.2 细胞培养及传代

人正常 NPCs 接种于 T25 培养瓶中, 添加培养液 3ml, 37℃、饱和湿度、5%CO₂ 细胞培养箱中, 每 3d 换液, 倒置相差显微镜观察细胞生长情况, 待细胞 80%融合时, 1:2 传代。

1.3 酸诱导髓核细胞损伤模型建立

乳酸配制不同 pH 值的 DMEM-F12, 无菌滤器过滤后配制为 NPCs 培养基。参照我们以往研究^[17,19,20], 以 pH 7.4 作为对照组, pH 7.0 模拟正常椎间盘酸性环境, pH 6.5 模拟退变椎间盘酸性环境。取 P3 代 NPCs, 不同 pH 分别培养 12、24、48、72h。内质网应激阻断剂组加入终浓度为 10mM 的 4-PBA, 预处理 12h。

1.4 CCK-8 细胞增殖检测

将 NPCs 按 1×10^4 个/ml 种植于 96 孔板, 每孔 100μl。12~72h 内特定时间点分别取出一块 96 孔板, 每孔加入 10μl CCK-8 溶液, 等量的培养液及 CCK-8 溶液作为空白对照组(无细胞), 孵育 4h 后酶标仪检测各孔在 450nm 处吸光度值。

1.5 细胞凋亡检测

消化 NPCs, PBS 洗涤 2 次 (2000r/min 离心 5min), 用 500μl 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5μl Annexin V-FITC 混匀, 再加入 5μl Propidium iodide 混匀, 室温、避光、静置 15min, 1h 内流式细胞仪检测。

1.6 细胞周期检测

消化 NPCs, PBS 洗涤 1 次 (2000r/min 离心 5min), 70%乙醇固定 2h, 用 500μl 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5μl Propidium iodide 混匀, 室温、避光、静置 30min, 1h 内流式细胞仪检测。

1.7 β-半乳糖苷酶染色检测细胞老化

吸取 6 孔板中细胞培养液, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入 1ml SA-β-Gal 染色固定液, 室温固定 15min; 吸除染色固定液, PBS 洗涤 3 次, 每次 3min; 吸除 PBS, 每孔加入 1ml 染色液; 用保鲜膜封住 6 孔板防止蒸发, 37℃孵育过夜, 光学显微镜下观察计数阳性细胞。

1.8 Westernblot 检测蛋白表达

按说明书抽提 NPCs 全蛋白, BCA 法检测蛋白浓度, 热变性后取相同量蛋白样品, 10%

SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 封闭后孵育一抗(见表 1), 4℃过夜, 加入 HRP 标记的二抗(1:5000)室温孵育 2h, 化学发光显影, 拍照。

1.9 透射电镜检测

预处理的 NPCs 消化离心后 PBS 洗涤一次, 去除 PBS 后 2.5%戊二醛固定, PBS 漂洗三次, 每次 10min, 1%四氧化锇固定 20min, PBS 漂洗后, 梯度丙酮脱水, 加纯丙酮-EPON812 包埋剂(体积比 1:1)室温 30min, 加入纯包埋剂过夜, 包埋后恒温箱 60℃加热固化 2h, 送电镜室处理观察成像。

1.10 免疫荧光检测

NPCs 预先种植在玻底小皿上, 贴壁后酸处理 24h, TBST 冲洗三次, 每次 5min, 4%多聚甲醛固定 15min, TBST 洗涤三次, 室温下 5%BSA 的 TBST 封闭 30 分钟, 吸去封闭液后加入一抗, 4℃孵育过夜。TBST 冲洗三次, 每次 5min, 吸去多余水分后, 用 488 荧光标记驴抗兔二抗或 647 荧光标记山羊抗兔二抗避光孵育 30min; TBST 洗涤三次, DAPI 孵育 5min, TBST 洗涤三次后封片, 激光共聚焦显微镜观察拍照。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。数据以均数±标准差形式($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用独立样本 *t* 检验, 组内比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 酸刺激诱导人髓核细胞内质网应激

透射电镜观察 pH6.5 酸刺激时, 内质网扩张明显, 膜表面积增加, 内质网线粒体膜结构形成, 伴线粒体肿胀(图 1), 提示发生内质网应激。

细胞免疫荧光检测提示酸刺激能够诱导内质网应激特异性标志物糖调节蛋白 78 (78 kDa glucose-regulated protein, GRP78) 和 CHOP (C/EBP homologous protein, C/EBP 同源蛋白) 表达明显增加(图 2、3)。

2.2 CCK-8 检测髓核细胞增殖能力

pH7.4、7.0 组在干预后 72h, 细胞呈现稳定增殖, 细胞增殖无明显差异($P > 0.05$)。pH6.5 组在干预后 12h 内增殖趋于停滞, 12~24h 出现稳定上升, 24~48h 进入增殖平台期, 48~72h 出现第二个增殖高峰, 但整体增殖力较对照组明显下降($P <$

0.05)。pH7.4+4PBA 组与对照组相比,增殖力无明显差异($P>0.05$),pH7.0+4PBA 组细胞增殖较对照组减慢,pH6.5+4PBA 组在干预后 72h 内增殖陷于停滞($P<0.05$)(图 4)。

2.3 阻断内质网应激显著增加酸诱导的髓核细胞老化

2.3.1 流式细胞术检测细胞周期 与对照组(图 5a)相比[pH7.4, (50.02±1.82)%, $n=3$],仅 4PBA 处理(图 5b)[pH7.4+4PBA, (51.51±2.21)%, $n=3$]不增加 G1 期停滞;酸刺激(图 5c)[pH6.5, (71.5±3.01)%, $n=3$]能够诱导髓核细胞 G1 期停滞($P<0.01$),4PBA(图 5d)[pH6.5+4PBA, (83.41±4.47)%, $n=3$]能够显著增加酸诱导的 G1 期停滞($P<0.01$)。

2.3.2 β 半乳糖苷酶染色检测髓核细胞老化率 与对照组(图 6a)[pH7.4, (4.80±0.84)%, $n=5$]相比,仅 4PBA 处理(图 6b)[pH7.4+4PBA, (5.27±

0.55)%, $n=5$]不增加 β 半乳糖苷酶阳性细胞比例($P>0.05$),酸刺激(图 6c)[pH6.5, (33.24±2.01)%, $n=5$]能够明显增加髓核细胞中 β 半乳糖苷酶阳性细胞的比例($P<0.01$),4PBA(图 6d)[pH6.5+4PBA, (62.45±5.67)%, $n=5$]能够显著增加酸诱导的 β 半乳糖苷酶阳性染色率($P<0.01$)。

2.3.3 Western blot 检测老化相关蛋白 酸刺激能够诱导 p53、p21、p16、GATA4 高表达,并增加 LC3II/LC3I 比值,4-PBA 能够明显降低酸诱导增加的 LC3II/LC3I 比值,并促进 p53、p21、p16 和 GATA4 表达升高($P<0.01$,图 7)。

2.4 阻断内质网应激显著增加酸诱导的髓核细胞凋亡

2.4.1 流式细胞术检测细胞凋亡 与对照组(图 8a)相比[pH7.4, (4.6±0.05)%, $n=3$],单纯 4PBA(图 8b)[pH7.4+4PBA, (4.4±0.05)%, $n=3$]处理不增加 NPCs 凋亡率。酸刺激(图 8c)[pH6.5, (8.1±0.51)

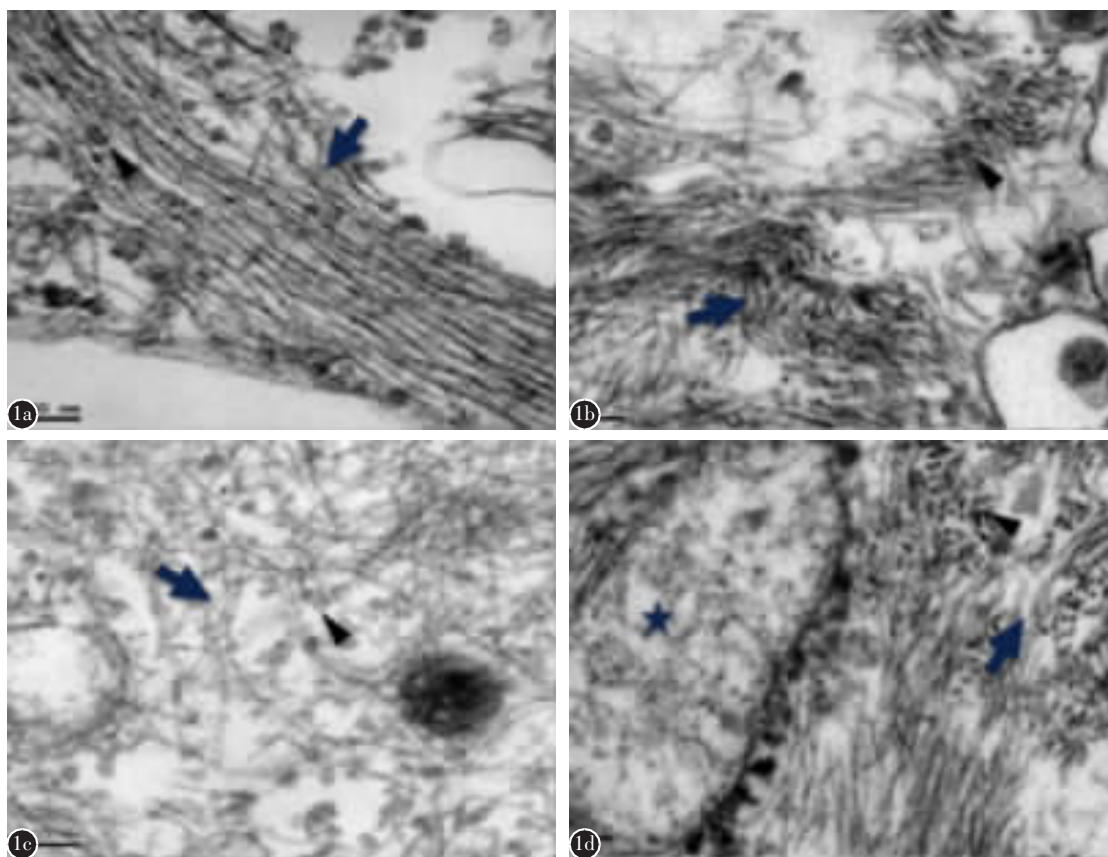


图 1 透射电镜观察酸诱导的内质网应激(➡内质网, ◄核糖体, ★线粒体) a、b 正常内质网形态平滑,排列致密,表面有大量核糖体附着 c、d 酸诱导下,内质网腔扩张明显,膜面积增加,线粒体肿胀

Figure 1 Acid induced-ER stress was observed under transmission electron microscope(➡Endoplasmic reticulum, ◄ribosome, ★mitochondria) a, b rough endoplasmic reticulum integrity was smooth with lots of ribosome attached c, d Acid treatment triggered dilation of rough endoplasmic reticulum and mitochondria swelling

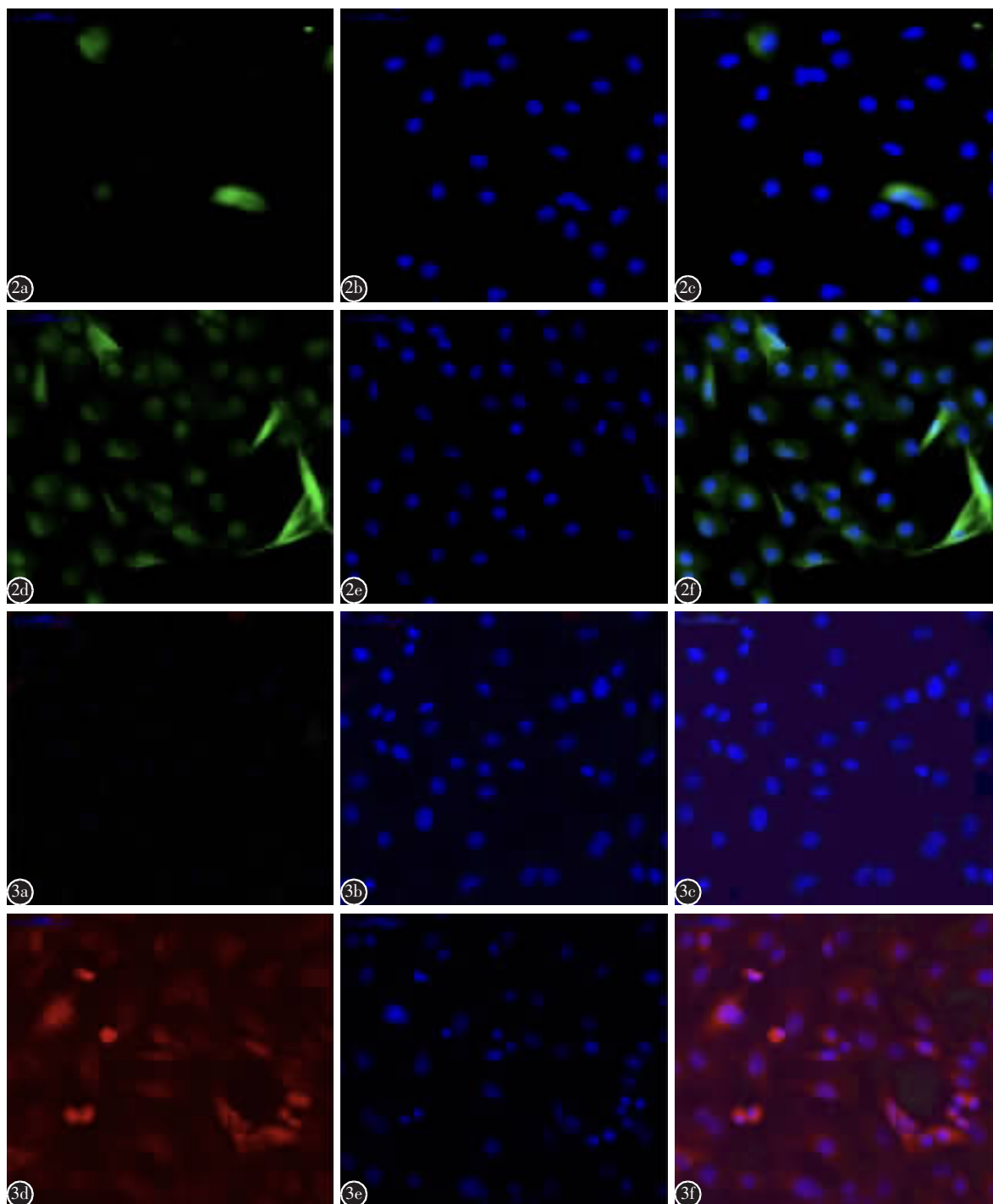


图 2 细胞免疫荧光检测 GRP78 (绿色荧光代表 GRP78, 蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核) **a~c** pH7.4 时 NPCs 中的 GRP78 表达量相对较低 **d~f** 酸刺激能够诱导人 NPCs 中的 GRP78 表达明显增高 **图 3** 细胞免疫荧光检测 CHOP (红色荧光代表 CHOP, 蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核) **a~c** pH7.4 时 NPCs 中 CHOP 表达很低, 多在细胞质中 **d~f** 酸刺激可诱导 CHOP 表达增高, 并聚集在细胞核内与核周围

Figure 2 Immunofluorescence staining of GRP78 (GRP78 showed green while nucleus counter stained with DAPI showed blue) **a~c** In pH 7.4 condition, the level of GRP78 was very low **d~f** Acid treatment significantly increased level of GRP78 in human NPCs **Figure 3** Immunofluorescence staining of CHOP. CHOP showed red while nucleus counter stained with DAPI turned blue **a~c** In pH 7.4 condition, CHOP distributed in cytoplasm and the level was very low **d~e** Acid treatment significantly increased level of CHOP which located in or around the nucleus

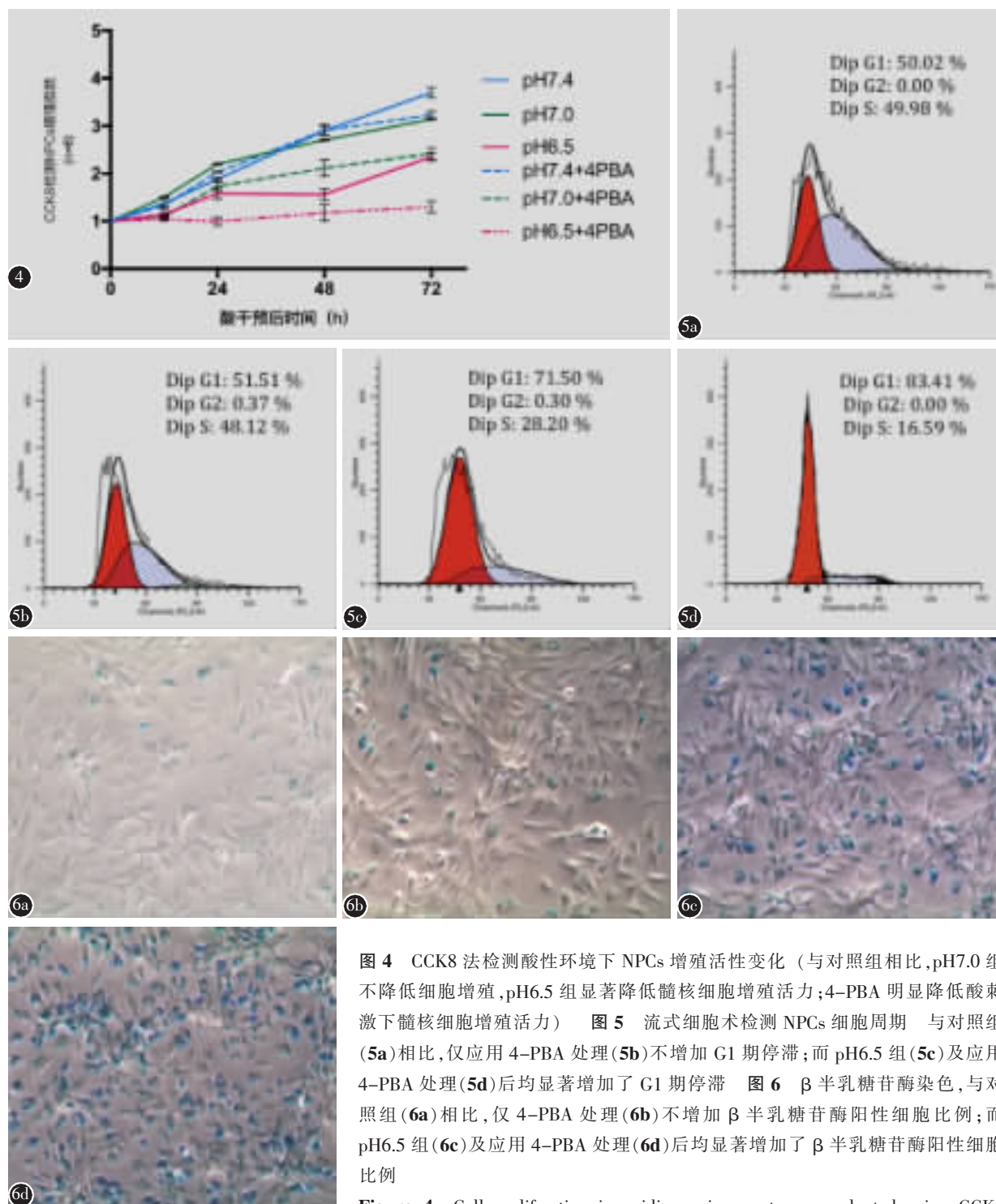


图 4 CCK8 法检测酸性环境下 NPCs 增殖活性变化 (与对照组相比, pH7.0 组不降低细胞增殖, pH6.5 组显著降低髓核细胞增殖活力; 4-PBA 明显降低酸刺激下髓核细胞增殖活力) **图 5** 流式细胞术检测 NPCs 细胞周期 与对照组 (5a) 相比, 仅应用 4-PBA 处理 (5b) 不增加 G1 期停滞; 而 pH6.5 组 (5c) 及应用 4-PBA 处理 (5d) 后均显著增加了 G1 期停滞 **图 6** β 半乳糖苷酶染色, 与对照组 (6a) 相比, 仅 4-PBA 处理 (6b) 不增加 β 半乳糖苷酶阳性细胞比例; 而 pH6.5 组 (6c) 及应用 4-PBA 处理 (6d) 后均显著增加了 β 半乳糖苷酶阳性细胞比例

Figure 4 Cell proliferation in acidic environment was evaluated using CCK8 assay [Compared with control group, mild acid stimulus (pH 7.0) with no reduction in the cell viability. Severe acid stimulus significantly lowered the cell viability. 4-PBA significantly decreased cell viability in acid stimulus] **Figure 5** Cell cycle was analyzed using flow cytometry: Compared with control group (5a), applying 4-PBA (5b) did not increase the stagnation of G1 phase; while pH6.5 group (5c) and applied 4-PBA (5d) significantly increased the stagnation of G1 phase **Figure 6** Senescence-associated β -galactosidase staining of NPCs: Compared with control group (6a), applying 4-PBA (6b) did not increase the number of β -galactosidase positive cells; while pH6.5 group (6c) and applied 4-PBA (6d) significantly increased the number of β -galactosidase positive cells

% , $n=3$] 能够诱导髓核细胞凋亡 ($P<0.01$), 4PBA (图 8d)[pH6.5+4PBA, $(14.4\pm1.12)\%$, $n=3$] 能够显著增加酸诱导的髓核细胞凋亡 ($P<0.01$)。

2.4.2 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达情况 酸刺激能够活化 Bax 和 Caspase3, 并降低 Bcl-2 ($P<0.01$), 阻断内质网应激能够加强酸诱导的 Bax 和 Caspase3 活化, 并进一步降低 Bcl-2 ($P<0.01$, 图 9)。

3 讨论

细胞应激损伤常常伴随着自噬、衰老与凋亡的发生, 其中凋亡是应激导致的细胞不可逆损伤的最终结局, 衰老是细胞损伤集聚后防止有害变异传递的重要保护手段, 而自噬则是细胞清除胞内有害集聚的重要方式。内质网应激的活化在自噬、衰老与凋亡的发生中扮演了重要作用。

内质网应激主要引发三种细胞保护性机制

[17]: 上调如 Grp78 的分子伴侣表达, GRP78 的解离活化未折叠蛋白反应 (Unfolded protein response, UPR) 的三条通路, 辅助蛋白再折叠; 经 PERK 磷酸化 eIF2 α , 降低蛋白翻译; 经内质网相关降解途径、泛素-蛋白酶体途径或细胞自噬降解蛋白聚集。但长时间过度的内质网应激会导致炎症通路 NF- κ B 活化诱导衰老, 还会导致内质网特异性的细胞凋亡。内质网应激特异性凋亡由 CHOP 介导, 可诱导包括 TRB3、GADD34 和 DR5 等大量促凋亡因子的表达。此外内质网应激还可以激活 Bcl-2 家族成员 (Bak/Bax)、Caspase-12 和 JNK 诱导凋亡。

酸刺激能够导致细胞氧化还原状态改变、能量匮乏、蛋白合成紊乱和钙稳态失衡, 诱导髓核细胞凋亡。这一过程中伴随着内质网应激和 UPR 的活化。理论上内质网应激是细胞内信号调控的双刃剑, 一方面可以活化 UPR 提高髓核细胞酸抗

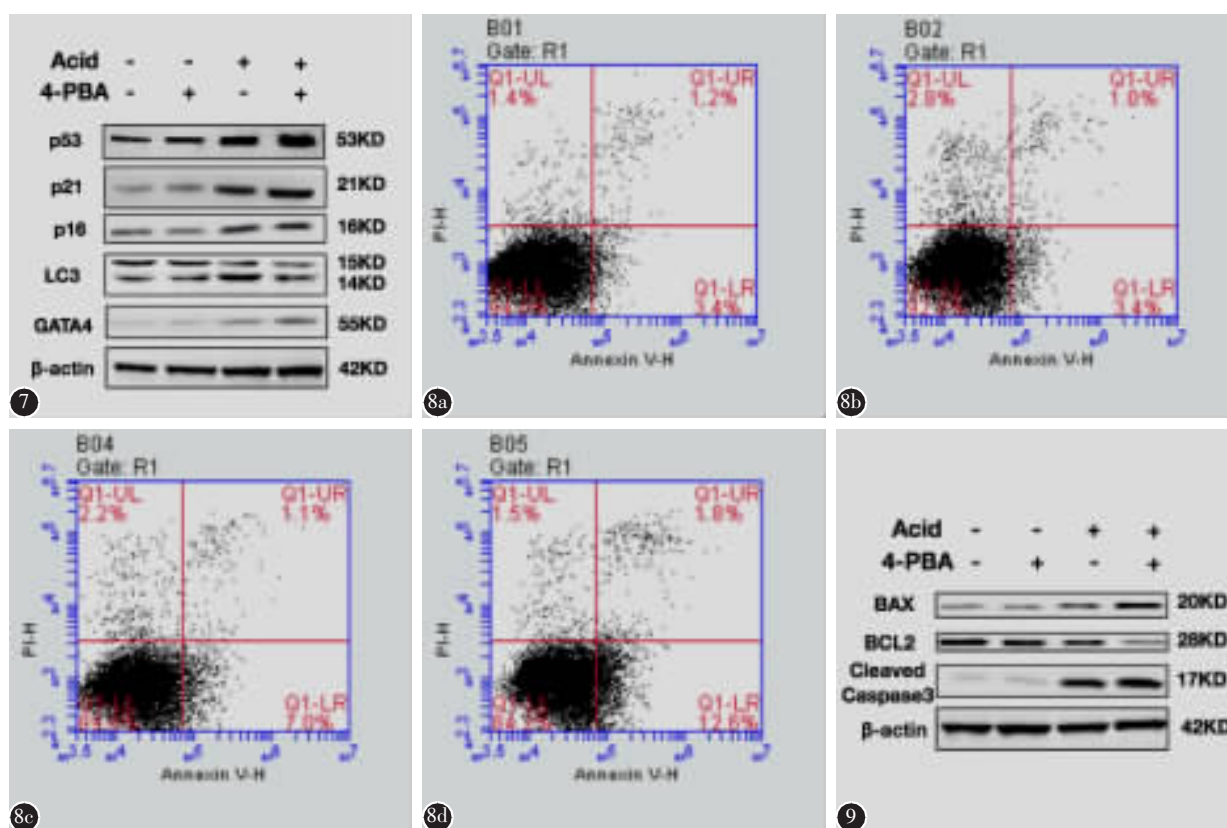


图 7 Western blot 检测老化、自噬相关蛋白表达 图 8 流式细胞术检测 NPCs 坏死与凋亡, 阻断内质网应激显著增加酸诱导的 NPCs 凋亡 图 9 Western blot 检测凋亡相关蛋白活化

Figure 7 Western blot analysis of ageing- and autophagy-related proteins **Figure 8** Flow cytometry analysis of NPCs Inhibition of ER stress increased apoptosis of NPCs induced by acid **Figure 9** Western blot analysis of apoptosis-related proteins

性;另一方面,过强或过久的酸应激也可以启动死亡程序,活化内质网特异性凋亡通路,清除过度损伤的细胞。在前期研究中^[18,20],我们已经发现急性酸刺激诱导的髓核细胞损伤中,ASIC1a 活化和钙稳态失衡才是导致髓核细胞凋亡的主要原因,内质网应激能够通过调节钙稳态和加强 UPR,减少钙离子依赖的相关凋亡途径活化,从而保护细胞免受凋亡。本研究则发现酸刺激能够活化 Bax 和 Caspase3,并降低 Bcl-2,此时阻断内质网应激会加强酸诱导的 Bax 和 Caspase3 活化,并进一步降低 Bcl-2,这提示我们内质网应激在发挥抗凋亡作用。而流式细胞术的结果也证实了内质网应激主要保护急性酸刺激诱导的髓核细胞凋亡。

酸应激能够活化经典的 p53-p21 信号途径和 p16INK4a 信号途径,从而诱导人髓核细胞衰老^[20]。虽然目前已知内质网应激的三条通路均参与了 p53 和 p16INK4a 信号途径^[21,22],但我们的研究结果提示在急性酸应激中,UPR 反应的抗衰老作用是不容忽视的,阻断内质网应激能显著增加酸诱导的髓核细胞衰老,包括 G1 期停滞、衰老相关蛋白表达增加和 β 半乳糖苷酶阳性染色阳性细胞增多等。这其中有两点需要注意:一是本部分研究中,我们针对的是急性酸暴露情况,而延长持续的酸应激是能够诱导衰老相关表型 (SASP) 产生的^[23]。相关研究表明,持续 pH6.5 酸处理可以诱导髓核细胞表型发生变化,包括 TIMPs-1、TIMPs-2、TIMPs-3、MMP-3、ADAMTS-4 和 5 在内的分解代谢表型和包括 IL-1、IL-6 在内的炎症相关表型表达明显活跃^[23]。内质网应激是否参与了这些细胞表型的产生过程呢?目前尚不得而知。二是我们发现了内质网应激在酸诱导的自噬中不可或缺的作用,而自噬相关蛋白是 SASP 的重要组成部分。亦有学者认为内质网应激的 UPR 反应蛋白本身就是 SASP^[22],尤其是慢性衰老过程中 UPR 蛋白的过度表达可能会加重细胞内蛋白紊乱^[24]。

选择性自噬和 SASP 相关的 GATA4 途径是研究内质网应激与细胞老化的新思路^[25-27]。我们的结果揭示了内质网应激与调控 SASP 的 GATA4 途径之间存在关联,阻断内质网应激会导致 GATA4 的表达明显升高。而 GATA4 是不依赖于经典衰老途径 p53 和 p16INK4a 的新型衰老调控因子,能够通过 NF- κ B 调节包括 TNF- α 、IL-6 在

内的多种致炎因子表达,是连接 DNA 损伤与细胞衰老及 SASP 的桥梁^[25-27]。

综上所述,短期急性酸应激能够诱导髓核细胞衰老与凋亡的发生,并活化内质网应激。阻断内质网应激和未折叠蛋白反应会显著增加酸诱导的髓核细胞老化与凋亡,这提示内质网应激和未折叠蛋白反应在急性酸应激中主要发挥保护性作用。这为研究椎间盘髓核退变的机制以及生物治疗提供了新的思路和实验依据。但由于内质网应激在椎间盘酸性环境中发挥的调控作用相当复杂,不仅串联了炎症、自噬、衰老与凋亡等多条通路^[17,8,28],而且在短期应激与长期应激所活化通路也存在不一致,仍需要后续进一步研究加以阐明。

4 参考文献

1. Stewart WF, Ricci JA, Chee E, et al. Lost productive time and cost due to common pain conditions in the US workforce [J]. *Jama*, 2003, 290(18): 2443-2454.
2. Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, et al. Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain [J]. *Lancet*, 1997, 350(9072): 178-181.
3. Luo X, Pietrobon R, Sun SX, et al. Estimates and patterns of direct health care expenditures among individuals with back pain in the United States [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29 (1): 79-86.
4. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2163-2196.
5. 谢志阳, 吴小涛. 基因和基因修饰的骨髓间充质干细胞治疗椎间盘退变的研究进展 [J]. *东南大学学报(医学版)*, 2012, 31 (4): 516-519.
6. 王锋, 吴小涛, 王运涛, 等. 干细胞移植修复椎间盘退变的研究现状 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2013, 27(5): 575-579.
7. 王锋, 吴小涛, 王运涛, 等. 非接触共培养条件下人 BMSCs 对氧化应激环境中退变髓核细胞凋亡的保护研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(4): 19-26.
8. 时睿, 洪鑫, 王运涛, 等. 大鼠椎间盘巢源性干细胞的体外分离、培养和特性鉴定 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2015, 25(11): 1018-1025.
9. 王锋, 郑陈静美, 吴小涛. 细胞老化及老化表型改变在椎间盘退行性变中的研究进展 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2012, 26 (12): 1448-1452.
10. 康新桂, 吴小涛, 王锋, 等. 人老化椎间盘髓核细胞体外老化模型的建立与细胞老化表型的初步研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2017, 25(1): 64-72.
11. Ohshima H, Urban JP. The effect of lactate and pH on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral

- disc[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 1992, 17(9): 1079–1082.
12. Liang CZ, Li H, Tao YQ, et al. The relationship between low pH in intervertebral discs and low back pain: a systematic review[J]. *Arch Med Sci*, 2012, 8(6): 952–956.
13. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle[J]. *Cell Calcium*, 2002, 32(5–6): 235–249.
14. Marchi S, Patergnani S, Pinton P. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1837(4): 461–469.
15. 周菁华, 韩晓凤, 刘艳娜, 等. BiP 调控 IRE1 启动子转录活性及蛋白表达的效应[J]. *遗传*, 2013, 35(3): 343–351.
16. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology[J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10: 173–194.
17. Xie ZY, Chen L, Wang F, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in nucleus pulposus degeneration and attenuates low pH-induced apoptosis of rat nucleus pulposus cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(8): 627–637.
18. Xie ZY, Chen L, Zhang C, et al. Acid-sensing ion channel 1a regulates fate of rat nucleus pulposus cells in acid stimulus through endoplasmic reticulum stress[J]. *Biores Open Access*, 2018, 7(1): 2–9.
19. Cai F, Zhu L, Wang F, et al. The paracrine effect of degenerated disc cells on healthy human nucleus pulposus cells is mediated by MAPK and NF- κ B pathways and can be reduced by TGF- β 1[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(2): 143–158.
20. Cai F, Wang F, Hong X, et al. Acid-sensing ion channel 1a regulates the survival of nucleus pulposus cells in the acidic environment of degenerated intervertebral discs[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(8): 812–820.
21. Garg A D, Kaczmarek A, Krysko O, et al. ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression?[J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(10): 589–598.
22. Pluquet O, Pourtier A, Abbadie C. The unfolded protein response and cellular senescence: a review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308(6): C415–425.
23. Gilbert HT, Hodson N, Baird P, et al. Acidic pH promotes intervertebral disc degeneration: acid-sensing ion channel -3 as a potential therapeutic target[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37360.
24. Ryoo HD. Long and short (timeframe) of endoplasmic reticulum stress-induced cell death[J]. *Febs J*, 2016, 283 (20): 3718–3722.
25. Wang T, Yuan Y, Zou H, et al. The ER stress regulator Bip mediates cadmium-induced autophagy and neuronal senescence[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38091.
26. Kang C, Elledge SJ. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence [J]. *Autophagy*, 2016, 12 (5): 898–899.
27. Kang C, Xu Q, Martin TD, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4[J]. *Science*, 2015, 349(6255): aaa5612.
28. Chen L, Liu L, Xie ZY, et al. Endoplasmic reticulum stress facilitates the survival and proliferation of nucleus pulposus cells in TNF- α stimulus by activating unfolded protein response[J]. *DNA Cell Biol*, 2018, 37(4):347–358.
- (收稿日期:2018-03-25 修回日期:2018-06-08)
(英文编审 郑国权/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)