doi:10.13362/j.jpmed.201904003　文章编号：2096-529X(2019)04-0291-06

· 论著 ·

腰椎间盘应激状态下髓核组织中 HSPA1A 表达的变化及其临床意义

刘畅[1]　相宏飞[1]　吴晓淋[1]　丁文元[2]　李祥林[3]　张薇[3]　黄辉[1]　王冠荣[1]　陈伯华[1]　张英泽[2]

（1　青岛大学附属医院骨科医院，山东 青岛　266061；　2　河北医科大学第三医院；　3　滨州医学院）

［摘要］　**目的**　探讨腰椎间盘不同应激状态下髓核组织中诱导型热休克蛋白 70(HSPA1A)表达的变化及其临床意义。**方法**　收集 2017 年 3 月—2019 年 4 月在青岛大学附属医院行腰椎手术治疗患者的腰椎间盘组织标本共 42 例，其中 13 例标本取自外伤后急性及亚急性期腰椎间盘突出症患者(急性应激组)，17 例标本取自无明显外伤史且经 6 个月以上保守治疗的腰椎间盘突出症患者(慢性应激组)，12 例标本取自腰椎滑脱症患者(病理退变组)。术前根据 MRI 检查结果对患者的腰椎间盘进行 Pfirrmann 分级。术中取出纤维环及髓核组织，经电镜观察各组患者腰椎间盘纤维环形态；各组随机抽取 6 例组织结构较全的样本经组织学处理后采用 Western blotting 方法对各组髓核组织中 HSPA1A 的表达水平进行检测；经细胞培养及染色后采用流式细胞术对 HSPA1A 抗凋亡特性进行检测。**结果**　MRI 检查结果显示急性应激组较慢性应激组及病理退变组 Pfirrmann 分级低($Z=2.725$、4.651，$P<0.05$)，而慢性应激组 Pfirrmann 分级与病理退变组比较差异无显著性($P>0.05$)。电镜观察结果显示，急性应激组椎间盘纤维环纤维排列整齐、有弹性且光滑，破裂处断面平整；慢性应激组和病理退变组中纤维环纤维排列紊乱，无弹性且粗糙，纤维交联，但两组纤维紊乱程度不一；各组髓核侵入处均有纤维粘连现象存在。Western blotting 方法检测结果显示，3 组腰椎间盘髓核中央区、髓核与纤维环交界区组织中 HSPA1A 均稳定表达但表达依次降低，差异有显著性($F=606.531$、$1\ 129.424$，$P<0.01$)。流式细胞术检测结果显示，各组髓核细胞未干预组与 HSPA1A 干预组相比有下调早期凋亡细胞比例的现象($t=3.15\sim4.95$，$P<0.05$)。**结论**　HSPA1A 在人椎间盘髓核组织急性、慢性应激状态及病理退变状态下均呈稳定表达，其表达与椎间盘应激程度具有相关性，HSPA1A 抗凋亡特性在该过程中可能发挥了作用。

［关键词］　椎间盘移位；脊椎滑脱；椎间盘退行性变；诱导型热休克蛋白 70；氧化性应激；细胞凋亡

［中图分类号］　R681.53；R681.52　　［文献标志码］　A

CHANGE IN THE EXPRESSION OF HSPA1A IN NUCLEUS PULPOSUS TISSUE UNDER DIFFERENT STATES OF LUMBAR DISC STRESS AND ITS CLINICAL SIGNIFICANCE

LIU Chang, XIANG Hongfei, WU Xiaolin, DING Wenyuan, LI Xianglin, ZHANG Wei, HUANG Hui, WANG Guanrong, CHEN Bohua, ZHANG Yingze　(Department of Orthopaedics, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266061, China)

［**ABSTRACT**］　***Objective***　To investigate the expression of HSPA1A in nucleus pulposus tissue under different states of lumbar disc stress and its clinical significance.　***Methods***　A total of 42 specimens of human lumbar intervertebral discs were collected from the patients who underwent surgical treatment of the lumbar vertebra in The Affiliated Hospital of Qingdao University from March 2017 to April 2019, among which 13 were obtained from the patients with acute and subacute intervertebral disc herniation after trauma (acute stress group), 17 were obtained from the patients with intervertebral disc herniation who had no history of trauma and underwent conservative treatment for more than 6 months (chronic stress group), and 12 were obtained from the patients with lumbar spondylolisthesis (pathological degeneration group). Pfirrmann grade was determined according to preoperative MRI findings. The annulus fibrosus and nucleus pulposus were obtained during surgery, and the morphology of the annulus fibrosus was observed under an electron microscope. Six specimens with a relatively complete structure were randomly selected from each group, and after histological treatment, Western blotting was used to measure the expression of HSPA1A in nuclear tissue. Flow cytometry was used to observe the anti-apoptotic effect of HSPA1A after cell culture and staining.　***Results***　MRI showed that the acute stress group had a significantly lower Pfirrmann grade than the chronic stress group and the pathological degeneration group ($Z=2.725$, 4.651, $P<0.05$), while there was no significant difference in Pfirrmann grade between the chronic stress group and the pathological degeneration group ($P>0.05$). Electron microscopy showed ordered arrangement of the annulus fibrosus, with elasticity, smooth surface, and flat fracture surface in the acute stress group; the chronic stress group and the pathological degeneration

［收稿日期］2019-06-13；　［修订日期］2019-08-05

［基金项目］国家自然科学基金(81802190，81772412)；中国博士后基金(2019M652329)；山东省自然科学基金(ZR2019BH-084)；泰山学者青年专家工程资助；山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS033)

［通讯作者］陈伯华，Email：bhchen@hotmail.com；张英泽，Email：yzling_liu@163.com(刘畅、相宏飞为本文共同第一作者)

group had disordered arrangement of the annulus fibrosus, with no elasticity, rough surface, and fiber crosslinking, but there was a difference in the degree of fiber disorder between the two groups; fibrous adhesion was observed in the nucleus pulposus in each group. Western blotting showed stable and gradually reduced expression of HSPA1A in the central area of the nucleus pulposus and the junctional region of the nucleus pulposus and the annulus fibrosus ($F=606.531, 1129.424, P<0.05$). Flow cytometry showed that compared with the non-intervention group of nucleus pulposus cells, the HSPA1A intervention group showed a significant reduction in the proportion of early apoptotic cells ($t=3.15-4.95, P<0.05$). ***Conclusion*** HSPA1A is stably expressed in the acute stress, chronic stress, and pathological degeneration of human nucleus pulposus, and its expression is correlated with the degree of intervertebral disc stress. The anti-apoptotic property of HSPA1A may play a role in this process.

[**KEY WORDS**] Intervertebral disc displacement; Spondylolysis; Intervertebral disc degeneration; Inducible heat shock protein 70; Oxidative stress; Apoptosis

张英泽教授，中国工程院院士。

青岛大学特聘教授，博士生导师，博士后导师，青岛大学附属医院骨科首席专家，学术带头人。中华医学会骨科学分会主任委员，中国医师协会骨科分会副会长，河北省医师协会会长。

张英泽教授长期从事创伤骨科相关临床和基础研究。主持、参与省部级以上课题 30 余项。以通讯作者和第一作者发表 SCI 收录论文 100 余篇。获得授权专利 118 项，其中发明专利 51 项。作为第一完成人荣获国家技术发明奖二等奖 1 项、国家科技进步奖二等奖 2 项、中华医学科技奖一等奖 2 项、河北省技术发明一等奖 1 项，河北省科技进步一等奖 3 项、二等奖 2 项。2015 年荣获“何梁何利”奖，2016 年获得国家高层次人才特殊支持计划（中组部“万人计划”）教学名师奖。

先后荣获卫生部有突出贡献中青年专家、全国先进工作者、全国十佳医生、全国优秀院长、全国优秀教师等多项国家和省级荣誉称号，是全国五一劳动奖章获得者，中国共产党第十七次全国代表大会代表，也是中国共产党第十五届中央委员会第五次全体会议唯一一名医师代表。河北省第七、八届政协委员，第十届、十一届人大常务委员，第十二届人大专业委员。

全球约有 6.32 亿人受腰痛困扰，腰痛已然成为导致人体运动功能障碍的最主要原因之一[1]。腰痛原因复杂，其中腰椎间盘退变在这一过程中扮演着重要的角色[2]。腰椎间盘退变最早发生部位为髓核（NP），这一阶段以髓核细胞的丢失和基质成分的改变为主[3]，进而导致椎间盘弹性下降及相应节段椎体生物力学的改变抑或在临床上引起下腰痛（LBP）这一泛见病症。

热休克蛋白（HSPs）家族是一组进化上高度保守的保护性蛋白，其作为分子伴侣系统重要组成部分，参与多项细胞功能的调控[4]。HSP70 是 HSP 蛋白家族含量最多的一类蛋白，其功能体现在抗细胞凋亡、抗氧化、参与和调控蛋白质的折叠修饰等多个方面[5]。HSPA1A 即诱导型热休克蛋白 70，多在人体遭受创伤、氧化应激等条件下产生，有研究表明其可通过下调细胞凋亡相关因子表达并促进抗细胞凋亡因子生成，从而发挥抗细胞凋亡的特性[6]。研究结果显示，退变腰椎间盘纤维环组织中 HSP70 表达量减少[7]，但 HSPA1A 在人腰椎间盘髓核组织中的表达及其在椎间盘不同应激状态下抗凋亡作用尚不清楚。本研究旨在探讨腰椎间盘不同应激状态下髓核组织中 HSPA1A 表达的变化及其临床意义，以期为腰腿痛病人的治疗提供理论依据。

1　对象与方法

1.1　对象及分组

收集 2017 年 3 月—2019 年 4 月我院行 L3～S1 腰椎间盘手术患者的腰椎间盘组织标本 42 例。其中 13 例取自外伤后急性及亚急性期腰椎间盘突出症患者（急性应激组），男 6 例，女 7 例；年龄（32.02±7.83）岁。17 例取自无明显外伤史且经 6 个月以上保守治疗的腰椎间盘突出症的患者（慢性应激组），男 9 例，女 8 例；年龄（33.14±6.06）岁。12 例取自腰椎滑脱症患者（病理退变组），男 5 例，女 7 例；年龄（34.49±5.33）岁。3 组一般资料比较无差异，具可比性。该研究经本院伦理学委员会审批通过。

1.2　纳入及排除标准

纳入标准：①首要诊断为腰椎间盘突出症、腰椎滑脱症且为单一椎间盘责任节段致病原因；②患者年龄不超过 45 岁；③术中组织取材均经患者家属及本人同意；④取材椎间盘组织含纤维环及髓核；⑤急性、亚急性椎间盘突出症患者为外伤后发病，且发病至手术时间不超过 1 个月；⑥保守治疗指首次发病到手术时间超过 6 个月，期间未进行任何手术干预治疗；⑦腰椎滑脱症患者其滑脱症病史均超过 2 年；⑧入组患者均有可靠的外伤史与否的表述及病史记录。排除标准：①排除其他系统并发症如糖尿病、免疫系统疾病的患者；②肿瘤、感染及畸形患者；③伴有椎体骨折的椎间盘突出症患者；④初次发病至入

院手术期间有过侵入性干预治疗的患者;⑤椎间盘突出症复发患者;⑥各种原因不能行 MRI 检查的患者;⑦青少年椎间盘突出症患者;⑧不能描述或不能认定有无外伤史的患者;⑨合并其他椎间盘或椎管周围病变的患者。

1.3　研究方法

1.3.1　椎间盘 Pfirrmann 分级　术前所有的患者应用 GE 3.0 T 核磁共振行 T_1WI、T_2WI 扫描,获取矢状位椎间盘 T_2WI 图像,进行相应手术节段椎间盘 Pfirrmann 分级并比较。

1.3.2　椎间盘组织标本采集　所有术中获得的椎间盘组织,均置于无菌器皿于低温条件下半小时内运送至实验室,经生理盐水冲洗至无血污后进行解剖。其中行开放腰椎融合手术的患者,术中于显微镜下取得椎间盘破口处组织,并分辨髓核与纤维环界限,并在显微镜下进行组织识别,将组织分为髓核中央区(INP)、髓核与纤维环交界区(TNP)及纤维环区(AF)3 个部分。行微创手术者,将取得的成块髓核组织采用美蓝染色(对组织学无影响),孔镜下分辨并取得 INP 与 TNP 及 AF 3 部分组织。

1.3.3　纤维环组织的形态观察　每例样本取 2～3 mm 纤维环用于电镜观察。将手术中获得的纤维环组织分为破裂处(薄弱区)纤维环及非破裂处纤维环,以体积分数 0.10 多聚甲醛溶液浸泡 12 h 后,以锇酸固定液固定,电吹风烘干样品,低温下以二甲基亚砜处理断面,梯度乙醇脱水,干燥后表面喷 Ag 处理,采用日立场发射扫描电镜 s4800(SEM)扫描获得纤维环形态。

1.3.4　Western blotting 方法检测椎间盘髓核组织中 HSPA1A 的表达　每组随机取 6 例样本(组织完整全面)进行处理,每例样本取 INP 与 TNP 组织各 0.1 g。具体如下:取 0.1 g 组织置于研钵中,加入 500 μL RIPA 裂解液充分研磨,匀浆于冰上裂解 30 min。4 ℃条件下高速离心机 15 000 r/min 离心 15 min,取上清液。BCA 法测定蛋白浓度。样品与 loading Buffer 按 4∶1 混合,煮沸 10 min。按测定蛋白浓度使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上样。以 80 V 直流电电泳 30 min 后,120 V 交流电电泳 45 min。300 mA 恒定电流湿法转膜 90 min,转膜后将膜移至含有封闭液平皿中 28 ℃下封闭 1 h。封闭结束后将膜与 HSPA1A 单克隆一抗溶液(10 μL 兔抗 HSPA1A 一抗+10 mL 一抗稀释液)、兔抗人 GAPDH 单克隆一抗溶液(GAPDH 一抗 5 μL+含 1.5 g/L 脱脂奶粉的 TBST 溶液 20 μL)4 ℃条件下孵育过夜。次日加入羊抗兔二抗(按 1∶4 000 与二抗稀释液混合),孵育 1 h 后用 ECL 显影液显影,获得灰度条带图。以 GAPDH 为内参,应用 Image J 软件测量各条带灰度值并进行比较,以获得 HSPA1A 的相对表达量。实验重复 3 次,取均值。

1.3.5　髓核细胞体外培养　3 组患者术中获得的髓核组织,于显微镜下去除终板及纤维环后,使用 PBS 浸泡、冲洗 3 min 去除血污。然后髓核组织以胰酶在 37 ℃下消化 4 h,收集细胞悬浊液,800 r/min 离心 8 min,取上清液,加入相同体积含体积分数 0.10 胎牛血清及 100 U/L 青霉素-链霉素 DMEM/F-12 培养基。将 3 mL 含悬细胞的培养基接种于 30 mL 培养瓶中,置于 37 ℃、含体积分数 0.05 CO_2 环境条件的孵育箱中,2 d 更换一次培养基,细胞融合达 85%时进行 1∶3 传代,选取 P_0 及 P_1 代髓核细胞进行下游实验。

1.3.6　流式细胞术(FCM)检测 HSPA1A 对各组髓核细胞早期凋亡的影响　取 P_0 及 P_1 代髓核细胞,分为未干预组及 HSPA1A 干预组。其中未干预组细胞采用 AnnexinV-FITC 和 PI 双染色法以后进行流式细胞术检测,HSPA1A 干预组于加入 50 μmol/L HSPA1A 1 mL(Stress Marq Biosciences Inc, Victoria BC, CANADA)共培养 32 h 以后,再采用 AnnexinV-FITC 和 PI 双染色法后进行流式细胞术检测。具体步骤如下:首先用预冷磷酸盐缓冲液洗涤细胞,后将细胞重悬于 Binding Buffer(10 mmol/L HEPES/NaOH,140 mmol/L NaCl 和2.5 mmol/L $CaCl_2$)中。加入 5 μL AnnexinVV-FITC 和 10 μL PI 对细胞染色,避光孵育 30 min,并在 1 h 内使用 FACS CantoⅡ分析式 FCM(美国,BD)检测各组细胞早期的凋亡率。其中 AnnexinV-FITC 染色(+)且 PI 染色(−)的细胞认定为早期凋亡细胞[8],早期凋亡率=早期凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.4　统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间的比较先采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验;计数资料多组间的比较采用等级秩和检验,两两比较采用 Kruskal Wallis 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　各组椎间盘髓核组织中 HSPA1A 的表达

Western blotting 方法检测结果显示,急性应激组、慢性应激组、病理退变组腰椎间盘 INP 组织中

HSPA1A 的相对表达量分别为 1.46±0.14、0.75±0.03、0.48±0.04，TNP 组织中 HSPA1A 相对表达量分别为 1.37±0.08，0.70±0.05，0.50±0.03　急性应激组、慢性应激组、病理退变组腰椎间盘 INP 及 TNP 组织中 HSPA1A 均有表达但表达量依次降低，差异具有显著性（F=606.531、1 129.424，P<0.01）。见图 1。

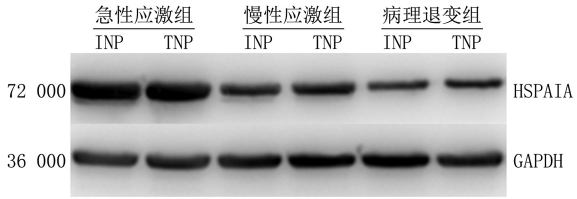


图 1　各组椎间盘髓核组织中 HSPA1A 的表达

2.2　HSPA1A 对各组髓核细胞早期凋亡的影响

HSPA1A 干预后各组均有细胞早期凋亡率降低的现象，急性应激、慢性应激、病理退变组中未干预组与 HSPA1A 干预组比较，差异均有统计学意义（t=3.15～4.95，P<0.05）。见图 2、表 1。

2.3　椎间盘纤维环组织电镜下形态

电镜观察显示，急性应激组椎间盘纤维环纤维排列整齐、有弹性且光滑，破裂处断面平整（图 3A）；慢性应激组和病理退变组中纤维环纤维排列紊乱，无弹性且粗糙，纤维交联，但两组纤维紊乱程度不一（图 3B、C）；各组髓核侵入处均有纤维粘连现象存在（图 3D）。

2.4　各组椎间盘 Pfirrmann 分级比较

MRI 检查显示，急性应激组较慢性应激组及病理退变组 Pfirrmann 分级低（Z=2.725、4.651，P<0.05），而慢性应激组 Pfirrmann 分级与病理退变组比较差异无显著性（P>0.05）。

表 1　不同应激组织中未干预组与 HSPA1A 干预组细胞早期凋亡率比较（χ/%）

组别	急性应激	慢性应激	病理退变
未干预组	3.666±0.275	5.243±0.542	10.458±0.771
HSPA1A干预组	3.303±0.310	4.072±0.808	9.312±0.861

表 2　各组椎间盘髓核组织 Pfirrmann 分级比较（例）

组别	n	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
急性应激组	13	0	3	9	1	0
慢性应激组	17	0	1	4	11	1
病理退变组	12	0	0	1	4	7

3　讨　　论

腰椎间盘退变是脊柱外科常见病变，其症状严重影响患者日常生活[9]，其发生与遗传、年龄、环境等多种因素有关。DING 等[10]在分析人椎间盘成熟

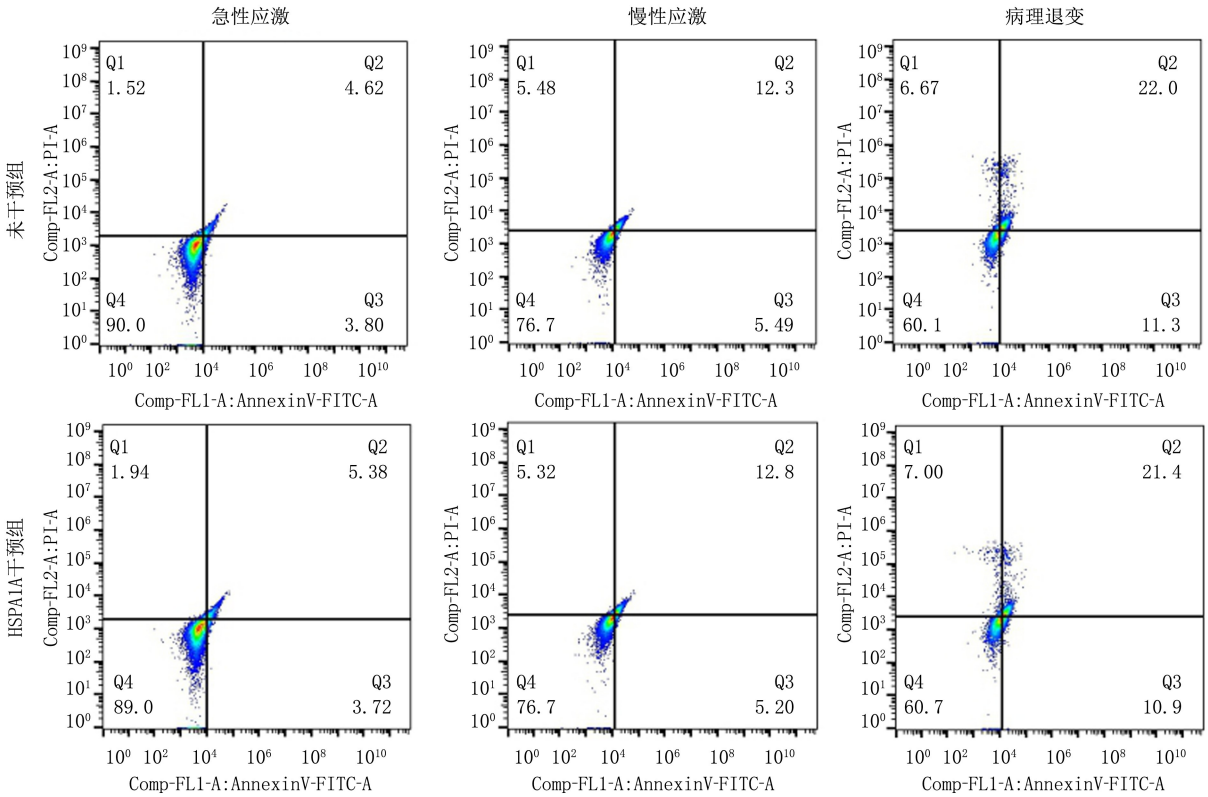
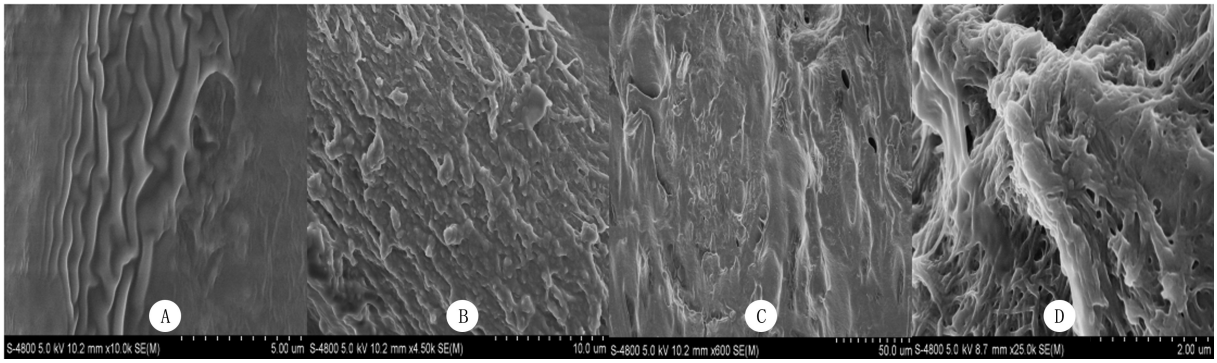


图 2　不同应激组织中未干预组与 HSPA1A 干预组细胞早期凋亡率比较



A:急性应激组;B:慢性应激组;C:病理退变组;D:髓核侵入处

图 3　扫描电镜下各组椎间盘纤维环形态

和退变过程时发现,退变阶段椎间盘内细胞凋亡发生率较高。髓核内细胞数量丢失可引起椎间盘退变,而细胞凋亡正是椎间盘组织细胞数量下降的重要原因[11],这提示抗细胞凋亡是延缓腰椎间盘退变可行的策略。而各种应激,如缺氧、氧化应激、创伤等均可导致细胞内蛋白未折叠或错误折叠,引发线粒体结构的重构及内质网应激(ERS),进而启动下游凋亡途径[12]。这些均提示应激及凋亡与腰椎间盘退行性病变这一进程联系密切。

HSPA1A 是 HSP70 家族重要的诱导型表达蛋白,该蛋白家族具多效性,尤其是参与新合成蛋白正确折叠及促进蛋白应激受损后的复性[13],多在氧化应激、缺氧、物理损伤以及局部缺血等情况下大量表达[14]。诸多研究表明,HSPA1A 在细胞凋亡过程中发挥着重要调控作用。GUO 等[15]研究显示,当急性髓性白血病患者 HL-60 细胞异位过表达 HSPAlA 时,HSPAlA 将结合线粒体上游的 BAX,起到抑制 HL-60/HSP70 细胞凋亡的作用,而且 HSPA1A 可抑制线粒体上游由 FAS 调控的细胞凋亡途径[16]。另外 KIM 等[17]研究表明,HSPA1A 可抑制蛋白酶对 BCL-2 蛋白降解,从而避免这类抑凋亡蛋白过度降解,起到抗凋亡作用。

基于 HSPA1A 在机体应激状态下大量诱导产生并参与调控多条凋亡通路的特性[15-18],有理由认为其在腰椎间盘退变这一过程中发挥了重要作用。目前尚无 HSPA1A 是否在腰椎间盘髓核组织中表达及其表达量是否与腰椎间盘应激程度有关的研究报道。本研究以人腰椎间盘的不同应激状态及 HSPA1A 抗凋亡特性为切入点,术前使用 MRI 进行 Pfirrmann 分级,联合应用 Western blotting、流式细胞术分别检测不同应激状态下人腰椎间盘髓核组织中 HSPA1A 的表达情况及 HSPA1A 抗凋亡作用,辅以电镜对纤维环形态进行观察,从组织、细胞、蛋白三个层级探讨其抗凋亡特性在腰椎间盘不同应激状态下的作用。

本研究结果显示,急性应激组与慢性应激组及病理退变组 Pfirrmann 分级比较差异有显著性,提示所取样本组间在影像学这一宏观层面存在退变程度和应激状态上的差异。电镜结果亦显示急性应激组中纤维环纤维排列整齐、光滑有弹性,相应急性突出破裂处纤维断面平整,而慢性应激组和病理退变组纤维环纤维排列紊乱,无弹性且粗糙,纹路结构不清晰,纤维环纤维交联,且退变组纤维交联不明显只呈现为纤维紊乱,从微观角度进一步证实了 3 组样本在应激状态方面存在的差异性。以往研究证实,多种病理生理状态下细胞凋亡在组织损伤中都发挥着重要作用[19],而腰椎间盘急性突出正是以破坏性细胞损失为代价,即短时间内细胞凋亡现象增加。而在椎间盘退变过程中,凋亡亦是细胞减少的主要因素,退变与凋亡引起的基质代谢障碍有关,但这一过程相对缓慢[20]。若在急性应激状态下存在短时间内大量细胞凋亡现象,那么这种应激反应在椎间盘组织中是否诱导产生 HSPA1A 仍未明确,HSPA1A 抗凋亡特性在这一过程中作用也尚未知。

为此,本实验首先使用 Western blotting 检测各组椎间盘样本中 HSPA1A 的表达情况,结果显示急性应激组、慢性应激组、病理退变组中 INP 及 TNP 组织中 HSPA1A 均有表达且表达依次降低,差异有显著性,且在急性应激组其表达水平远高于其他两组,提示急性应激状态下髓核细胞大量表达 HSPA1A,印证了这一应激过程中 HSPA1A 的过表达现象,有理由认为该蛋白表达增高是为拮抗急性应激导致的细胞凋亡,由此推测其在此过程中可能发挥了抗细胞凋亡特性[5]。

为了进一步验证 HSPA1A 的抗凋亡特性在椎间盘不同的应激状态下的作用,在对髓核细胞进行

HSPA1A 干预后对 3 组样本进行 AnnexinV-FITC 和 PI 双染色法染色并使用 FCM 检测,结果显示病理退变组髓核细胞凋亡率远高于另外两组,另外与未干预组相比较,HSPA1A 干预组均显示出细胞早期凋亡比例下降现象,该结果在细胞层面上支持了 HSPA1A 抗凋亡特性在不同应激状态下椎间盘中发挥了作用。而病理退变组髓核细胞凋亡率远高于其他两组,这可能是腰椎间盘退变过程中凋亡的时间累积效应导致其髓核细胞损失远远大于急性损伤产生的应激性细胞损失。

本实验尚未涉及纤维环 HSPA1A 表达和分布情况,是研究局限性所在,而纤维环 HSPA1A 表达与纤维形态是否存在关系,正是下一步研究的方向。另外有研究提示,纤维环中 HSPA1A 表达增高具有一定临床意义[7],因此本研究采用电镜观察纤维环形态,发现慢性应激组与病理退变组相比纤维交联不明显,只呈现为纤维紊乱,这从微观角度上提示慢性应激组破口处的髓核组织对纤维环起到修复作用,髓核组织内的 HSPA1A 是否参与并促进了这一进程值得进一步探讨。

综上所述,本研究结果显示,在几种不同应激状态下的人类腰椎间盘髓核组织中 HSPA1A 稳定表达且髓核细胞中表达量与腰椎间盘应激程度有关,且 HSPA1A 干预可使应激状态下髓核细胞早期凋亡率下降,提示 HSPA1A 在腰椎间盘应激状态下的抗凋亡过程中发挥了作用,为腰椎间盘退变急性应激期的生物治疗提供了新的思路。

[参考文献]

[1] VOS T, FLAXMAN A D, 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.

[2] SAMPARA P, BANALA R R, VEMURI S K, et al. Understanding the molecular biology of intervertebral disc degeneration and potential gene therapy strategies for regeneration: A review[J]. Gene Ther, 2018,25(2):67-82.

[3] VO N V, HARTMAN R A, PATIL P R, et al. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs[J]. J Orthop Res, 2016,34(8):1289-1306.

[4] RÉROLE A L, JEGO G, GARRIDO C. Hsp70: Anti-apoptotic and tumorigenic protein[J]. Methods Mol Biol, 2011, 787:205-230.

[5] WANG X X, CHEN M J, ZHOU J, et al. HSP27,70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy[J]. Int J Oncol, 2014,45(1):18-30.

[6] GENG J N, LI H N, HUANG C, et al. Functional analysis of HSPA1A and HSPA8 in parturition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017,483(1):371-379.

[7] YE D P, LIANG W G, DAI L B, et al. Comparative and quantitative proteomic analysis of normal and degenerated human annulus fibrosus cells[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015,42(5):530-536.

[8] HENRY C M, HOLLVILLE E, MARTIN S J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry[J]. Methods, 2013,61(2):90-97.

[9] VADALÀ G, RUSSO F, DI MARTINO A, et al. Intervertebral disc regeneration: From the degenerative cascade to molecular therapy and tissue engineering[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2015,9(6):679-690.

[10] DING F, SHAO Z W, YANG S H, et al. Role of mitochondrial pathway in compression-induced apoptosis of nucleus pulposus cells[J]. Apoptosis, 2012,17(6):579-590.

[11] TONG W, LU Z Y, QIN L, et al. Cell therapy for the degenerating intervertebral disc[J]. Transl Res, 2017,181:49-58.

[12] SIMARD J C, VALLIERES F, DE LIZ R, et al. Silver nanoparticles induce degradation of the endoplasmic reticulum stress sensor activating transcription factor-6 leading to activation of the NLRP-3 inflammasome[J]. J Biol Chem, 2015,290(9):5926-5939.

[13] STRICHER F, MACRI C, RUFF M, et al. HSPA8/HSC70 chaperone protein[J]. Autophagy, 2013,9(12):1937-1954.

[14] PIANO A, VALBONESI P, FABBRI E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of Ostrea edulis exposed to heat and heavy metals[J]. Cell Stress Chaperones, 2004,9(2):134-142.

[15] GUO F, ROCHA K, BALI P, et al. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin[J]. Cancer Res, 2005,65(22):10536-10544.

[16] CLEMONS N J, BUZZARD K, STEEL R, et al. Hsp72 inhibits fas-mediated apoptosis upstream of the mitochondria in type Ⅱ cells[J]. J Biol Chem, 2005,280(10):9005-9012.

[17] KIM E M, JUNG C H, SONG J Y, et al. Pro-apoptotic Bax promotes mesenchymal-epithelial transition by binding to respiratory complex-Ⅰ and antagonizing the malignant actions of pro-survival Bcl-2 proteins[J]. Cancer Lett, 2018,424:127-135.

[18] DESAGHER S, MARTINOU J C. Mitochondria as the central control point of apoptosis[J]. Trends Cell Biol, 2000,10(9):369-377.

[19] D'ARCY M S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. Cell Biol Int, 2019,43(6):582-592.

[20] ZHANG F, ZHAO X L, SHEN H X, et al. Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration(Review)[J]. Int J Mol Med, 2016,37(6):1439-1448.

(本文编辑　耿波　厉建强)