

· 综述 ·

骨性关节炎软骨细胞凋亡的诱导途径研究

段晓琴 孙宏志 刘忠良 张海娜 王欢 曲福玲 郭丽新 康治臣

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种退行性关节疾病, 在 65 岁以上的人群中, 男性患病率约 60%, 女性患病率约 70%^[1]。年龄、性别、遗传、创伤、肥胖是 OA 发病及进展的常见高危因素^[2]。软骨细胞凋亡数量与早期 OA 及软骨损害严重程度呈正相关, 表明软骨细胞凋亡与软骨损害间存在本质联系, 可能与 OA 关节退变密切相关^[3]。目前, 较多研究显示关节退变与软骨细胞及关节中其它细胞死亡有关, 但 OA 是以何种死亡方式 (凋亡、坏死) 为主尚存在争议。此外, 在检测关节软骨细胞死亡方式的研究中也一直存在方法学差异。目前检测软骨细胞死亡的“金标准”为电子显微镜, 镜下发现软骨细胞形态学改变是以凋亡为主, 提示凋亡在 OA 中扮演着重要角色^[4]。有研究报道, OA 软骨中凋亡的细胞比例明显高于正常组织, 且凋亡细胞位于浅表及中层区域^[5-8]。绝大多数研究均表明 OA 软骨中凋亡细胞的数目明显增加, 但其凋亡机制尚未明确。本文就 OA 中软骨细胞的凋亡诱导途径综述如下, 旨在为 OA 的治疗提供新思路、新靶点。

OA 中软骨细胞的凋亡诱导途径

软骨细胞凋亡是一个较为复杂的过程。国内研究认为, OA 软骨细胞的凋亡存在两个独立诱导途径, 一个是与滑膜炎相关的自杀相关因子 (factor associated suicide, Fas) 介导的凋亡途径, 另一个是与滑膜炎无关的一氧化氮 (nitric oxide, NO) 途径。NO 在白介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、低氧等多种条件下诱导产生^[9]。有较多研究人员认为 NO 不是导致软骨细胞凋亡的原发、独立诱导途径。Kim 等^[10]认为 OA 软骨中 DR、线粒体和内质网途径是主要的细胞凋亡途径。事实上, 综合国内外研究来看, OA 中软骨细胞凋亡的诱导途径包括 6 个方面: DR 途径、线粒体介导途径、内质网相关途径、颗粒酶 B 介导途径、细胞核相关途径、失巢凋亡途径, 其具体机制如下。

一、DR 途径

死亡受体 (death receptors, DR) 是能传导凋亡信号的细胞表面受体, 可与特异配体相结合, 如自杀相关因子配体 (factor associated suicide ligand, FasL)。迄今已发现 8 种类型的 DR, 分别为分化群 95 (cluster of differentiation 95, CD95)、肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptors 1, TNFR1)、肿瘤坏死因子受体 2 (tumor necrosis factor receptors 2, TNFR2)、人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA)-DR4、HLA-DR5、诱捕受体 1 (decoy receptor 1, DcR1)、诱捕受体 2 (decoy receptor 2, DcR2)。上述 DR 均是 TNF 超家族的跨膜蛋白, 与配体结合后即可引发

半胱氨酸蛋白酶级联。通过 1 个包含 DR 的区域转导死亡信号, 从而快速诱导细胞发生凋亡。

虽然不同 DR 活化的信号途径有所差异, 但其凋亡信号途径大致相同。与配体结合之后, 细胞内结构域的构象变化揭示了死亡结构域的存在, 允许各种凋亡蛋白向受体聚集。该蛋白复合物通常被称为死亡诱导信号复合物 (death inducing signaling complex, DISC), 其之后的步骤是募集 1 种半胱氨酸蛋白酶, 导致半胱氨酸蛋白酶 8 活化及凋亡程序启动。在 DR 途径中, Fas/FasL 途径、TNFR1/TNF- α 途径、DR4、DR5/TNF 相关的凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 途径是软骨细胞凋亡的主要途径。

1. Fas/FasL 途径: 通过激活其受体, Fas 和 FasL 可发挥较多作用。接头蛋白 Fas 相关死亡结构域可以直接募集到 Fas 受体上的死亡结构域, 配体的结合可促使受体聚集、DISC 形成、半胱氨酸蛋白酶级联激活。在软骨细胞分析样品中, 发现 Fas mRNA 有广泛的表达, 且来源于软骨细胞表面^[11]。有研究报道, Fas 介导的软骨细胞凋亡在 OA 软骨的退化中发挥着重要作用^[12]。

2. TNFR1/TNF- α 途径: TNF- α 与 TNFR1 结合可导致胞内死亡结构域的聚集。通过死亡结构域之间的相互作用, 可使细胞内 TNF 受体相关死亡域的接头蛋白相互结合。TNF 受体相关死亡域能把许多不同的蛋白质向活化的受体募集。此外, TNF 受体相关死亡域与死亡结构蛋白有关联, 可通过募集和裂解半胱氨酸蛋白酶 8 前体诱导细胞凋亡。活化的半胱氨酸蛋白酶 8 可激活下游的半胱氨酸蛋白酶成员, 不断诱导细胞内凋亡蛋白裂解。

3. DR4、DR5/TRAIL 途径: TRAIL 在行为上与 FasL 相似。TRAIL 与 DR4 或 DR5 结合可引发许多细胞快速凋亡。DcR1 和 DcR2 能够与 DR4 或 DR5 受体竞争, 但这些受体结合后不会启动细胞凋亡程序。TRAIL 可诱导软骨细胞凋亡, 推测这一变化可能在 OA 的发病中起到一定作用。研究表明, TRAIL 在体外通过半胱氨酸蛋白酶 8 和半胱氨酸蛋白酶 3 诱导细胞凋亡, 在 OA 大鼠软骨细胞中的表达水平明显增加, 自分泌的 TRAIL 依赖于 DR 超家族成员介导, 若阻断 TRAIL, 则可防止软骨细胞凋亡^[13-14]。

二、NO 途径

NO 和 NO 合酶的作用一直是研究 OA 发病机制的焦点之一^[15]。研究显示, NO 并不是细胞凋亡的启动信号, 认为 NO 在 OA 软骨细胞凋亡中并不是原发途径^[16]。NO 一旦产生, 即可导致软骨细胞凋亡, 实现这一过程主要是通过半胱氨酸蛋白酶 8、细胞外信号调节激酶 1/2 和 p38 激酶途径^[17-18]。外源性和内源性 NO 均可通过线粒体依赖性机制诱导细胞凋亡^[19-20]。研究表明, 用 NO 供体硝普钠培养人关节软骨细胞, 可引起凋亡事件发生, 进一步检测发现 NO 供体硝普钠所诱导的 DNA 片段化、细胞骨架重构、线粒体功能障碍、半胱氨酸蛋白酶活化和细胞色素

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-1424. 2014. 09. 020

作者单位: 130000 长春, 吉林大学第二医院康复科 (段晓琴、刘忠良、张海娜、王欢、曲福玲、郭丽新、康治臣), 急救医学科 (孙宏志)

通信作者: 康治臣, Email: kang-zhichen@163.com

C 释放均是细胞凋亡的标志,用 NO 清除剂治疗后可显著降低硝普钠诱导的细胞多重损伤^[21]。

三、线粒体介导途径

线粒体在退化性疾病中的作用已得到广泛认可。与正常软骨细胞比较,OA 关节软骨细胞复合物 II 和 III 的活性明显降低。有研究报道,OA 软骨细胞培养物中含有较高比例的失能线粒体,推测线粒体可能参与了 OA 的病理生理学变化^[22]。线粒体是细胞功能和存活的重要调节剂,可能在与衰老相关的疾病中发挥着关键作用。研究表明,OA 软骨细胞的线粒体功能障碍可能来自于线粒体 DNA 的体细胞突变或促炎介质的直接影响^[23]。线粒体功能障碍、DNA 损伤可能与过多氧自由基的紊乱现象存在因果关系。与正常人比较,OA 患者软骨细胞中普遍存在线粒体 DNA 损伤,且会随着线粒体 DNA 修复能力、细胞活力降低而逐渐丧失功能,导致 OA 软骨细胞凋亡增加,提示线粒体 DNA 损伤及修复能力欠佳可能会导致 OA 发病^[24-26]。

通过线粒体释放的细胞凋亡诱导分子主要有细胞色素 C、半胱氨酸蛋白酶活化剂、凋亡诱导因子及核酸内切酶 G 等。线粒体跨膜电位下降总是会伴随着软骨细胞凋亡,其电位保持则需依赖于线粒体通透性转换孔,而能诱发细胞凋亡的因素均可导致线粒体通透性转换孔损害^[27]。提示线粒体在软骨细胞凋亡过程中,不仅是一种引发剂,还是一种信号放大器。

四、内质网相关途径

软骨细胞凋亡时,内质网和高尔基体增多,表现为蛋白质合成增加。增多的内质网膜分隔细胞质,提供消化细胞质和细胞器的场所。有研究推测,在软骨细胞凋亡中,内质网途径发挥的作用较 DR 介导或线粒体介导途径更大,其溶酶体蛋白酶与半胱氨酸蛋白酶的作用同等重要^[26-27]。随着 OA 进展,内质网应激可导致软骨细胞凋亡,与细胞凋亡增强和保护性反应程度降低密切相关^[28]。内质网应激有 3 条信号转导通路,主要涉及 RNA 依赖性蛋白激酶(RNA-dependent protein kinase,PKR)样内质网激酶、肌醇酶-1、活化转录因子-6。上述 3 种成分的活性依赖于管腔伴侣解离,一旦被激活,即可开启真核翻译起始因子 2 的磷酸化过程,下调蛋白质的合成量,上调雌激素受体(estrogen receptor,ER)伴侣蛋白、蛋白折叠酶及与 ER 相关的降解系统组件基因的转录水平,通过这个机制,错折叠蛋白可重新进入细胞质,并由蛋白酶体系统降解^[29-31]。

蛋白激酶样内质网激酶是内质网中的蛋白质。在非应激状态下,其与分子伴侣结合。当 ER 管腔内未折叠蛋白含量增加,蛋白激酶样内质网激酶与分子伴侣解离,导致自身磷酸化、低聚和激酶结构激活。有研究报道,有部分转录因子可激活抑制氧化应激基因,参与氨基酸代谢和基因转运过程,特异蛋白的高表达和细胞内蛋白质的水平下调会使细胞生长速度减慢,甚至凋亡^[32-33]。

五、颗粒酶 B 介导途径

颗粒酶 B 是一种凋亡诱导因子,曾被认为是由自然杀伤细胞和细胞毒性 T 细胞表达。最近的研究表明,颗粒酶可在多种细胞中表达。在一定的促炎条件下,颗粒酶可由 CD4 细胞、巨细胞、活化的巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、树突状细胞、调节性 T 细胞、软骨细胞、平滑肌细胞、角质形成细胞、II 型肺细胞、支持细胞、初级精母细胞、颗粒细胞、合体滋养层细胞表达^[34]。颗粒酶 B 在关节炎软骨及软骨细胞中有所表达,且其表

达水平与细胞凋亡程度有关。Saito 等^[35]研究结果表明,软骨细胞具有与天然免疫相关的自然杀伤细胞样活性,其凋亡可通过颗粒酶 B 介导。

一旦被释放到细胞质中,颗粒酶 B 即可针对细胞质和细胞核中的底物,通过多种途径诱导细胞凋亡。首先,含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-依赖途径是颗粒酶 B 诱导凋亡的重要途径。多种半胱氨酸蛋白酶前体可被颗粒酶 B 激活,从而诱导细胞凋亡。其次,线粒体相关途径是颗粒酶 B 诱导细胞凋亡的主要机制,线粒体膜的完整性被破坏,增加了细胞膜的通透性,导致凋亡因子(如细胞色素 C)释放。细胞色素 C 释放会刺激凋亡体等大分子复合物形成,导致天冬氨酸蛋白水解酶-3、天冬氨酸蛋白水解酶-7、天冬氨酸蛋白水解酶-9 被激活。再次,颗粒酶 B 可裂解天冬氨酸蛋白水解酶底物,裂解核膜蛋白,导致核膜完整性遭到破坏^[36-37]。总之,颗粒酶 B 介导的通路可高效、快速使细胞发生凋亡,但其在 OA 中的相关研究尚不多见。

六、细胞核相关途径

近年来,有研究发现,与细胞核相关的细胞凋亡途径主要集中在 p53 基因,其在诱导细胞凋亡中具有重要作用。在正常细胞中,细胞质 p53 的含量被机体严密监测和控制。在不利条件下,如 DNA 损伤、缺氧、癌基因激活等,p53 基因会被激活或上调表达水平,导致 p53 胞质含量、稳定性和转录活性显著增加。p53 基因不仅能阻止细胞周期进展,还能通过促进 bax、fas 等基因表达诱导细胞凋亡^[38-39]。

七、失巢凋亡

失巢凋亡是细胞程序性死亡的一种形式,其机制较为复杂。通常情况下,细胞贴近其所属组织,以便与胞外基质取得联系。当细胞从胞外基质分离,也就表示正常的细胞-基质作用丧失,细胞可能会发生失巢凋亡^[40-41]。目前,有关 OA 软骨细胞失巢凋亡的研究较少,仍存在较广阔的探索空间。

结 论

OA 的发病机制较为复杂,总体而言,有关细胞凋亡途径的研究尚属于早期阶段,进一步探讨其在 OA 软骨细胞凋亡中的特异信号转导机制及重要性、寻找有效的治疗策略将是研究 OA 发病机制及防治的一个重要任务。

参 考 文 献

- [1] Chikanza I, Fernandes L. Novel strategies for the treatment of osteoarthritis[J]. Expert Opin Investig Drugs,2000,9(7):1499-1510.
- [2] Kimura T. Progress of research in osteoarthritis. An overview of the recent knowledge on osteoarthritis: pathogenesis, evaluation and therapies[J]. Clin Calcium,2009, 19(11):1565-1571.
- [3] Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, et al. Chondrocyte death by apoptosis is associated with the initiation and severity of articular cartilage degradation[J]. Int J Rheum Dis,2011, 14(2):191-198.
- [4] Zamli Z, Sharif M. Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis[J]. Int J Rheum Dis,2011, 14(2):159-166.
- [5] Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: a possible pathway for osteoarthritis pathology[J]. Arthritis Rheum,1998, 41(2):284-289.
- [6] Conrozier T. Death of articular chondrocytes. Mechanisms and protection[J]. Presse Med,1998, 27(36):1859-1861.

- [7] Kim HA, Lee YJ, Seong SC, et al. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis[J]. *J Rheumatol*, 2000, 27(2):455-462.
- [8] Johnson EO, Charchandi A, Babis GC, et al. Apoptosis in osteoarthritis: morphology, mechanisms, and potential means for therapeutic intervention[J]. *J Surg Orthop Adv*, 2008, 17(3):147-152.
- [9] de Isla NG, Stoltz JF. In vitro inhibition of IL-1 β catabolic effects on cartilage: a mechanism involved on diacerein anti-OA properties[J]. *Biorheology*, 2008, 45(3-4):433-438.
- [10] Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage[J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(2):333-345.
- [11] Masuko-Hongo K, Sakata M, Yuan GH, et al. Expression of Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE) inhibitory protein (FLIP) in human articular chondrocytes; possible contribution to the resistance to Fas-mediated death of in vitro cultured human articular chondrocytes[J]. *Rheumatol Int*, 2001, 21(3):112-121.
- [12] Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, et al. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(10):1749-1755.
- [13] Lee SW, Lee HJ, Chung WT, et al. TRAIL induces apoptosis of chondrocytes and influences the pathogenesis of experimentally induced rat osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(2):534-542.
- [14] Musumeci G, Loreto C, Carnazza ML, et al. Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011, 19(2):307-313.
- [15] Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, et al. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide[J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(1):75-85.
- [16] Wang H, Wang Z, Chen J, et al. Apoptosis induced by NO via phosphorylation of p38 MAPK that stimulates NF- κ B, p53 and caspase-3 activation in rabbit articular chondrocytes[J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31(9):1027-1035.
- [17] Greisberg J, Bliss M, Terek R. The prevalence of nitric oxide in apoptotic chondrocytes of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10(3):207-211.
- [18] Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, et al. Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase[J]. *J Rheumatol*, 2001, 28(11):2509-2519.
- [19] Wu GJ, Chen TG, Chang HC, et al. Nitric oxide from both exogenous and endogenous sources activates mitochondria-dependent events and induces insults to human chondrocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2007, 101(6):1520-1531.
- [20] Maneiro E, López-Armada MJ, de Andres MC, et al. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(3):388-395.
- [21] Cherng YG, Chang HC, Lin YL, et al. Apoptotic insults to human chondrocytes induced by sodium nitroprusside are involved in sequential events, including cytoskeletal remodeling, phosphorylation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1/c-Jun N-terminal kinase, and Bax-mitochondria-mediated caspase activation[J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(7):1018-1026.
- [22] Maneiro E, Martín MA, de Andres MC, et al. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(3):700-708.
- [23] Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(3):161-169.
- [24] Grishko VI, Ho R, Wilson GL, et al. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(1):107-113.
- [25] Kim J, Xu M, Xo R, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(3):424-432.
- [26] Roach HI, Aigner T, Kouri JB. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(3):265-277.
- [27] Kouri JB, Lavallo C. Do chondrocytes undergo "activation" and "transdifferentiation" during the pathogenesis of osteoarthritis? A review of the ultrastructural and immunohistochemical evidence[J]. *Histol Histopathol*, 2006, 21(7):793-802.
- [28] Takada K, Hirose J, Senba K, et al. Enhanced apoptotic and reduced protective response in chondrocytes following endoplasmic reticulum stress in osteoarthritic cartilage[J]. *Int J Exp Pathol*, 2011, 92(4):232-242.
- [29] Foulle F, Ferré P. Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology[J]. *Med Sci (Paris)*, 2007, 23(3):291-296.
- [30] Tsang KY, Chan D, Cheslett D, et al. Surviving endoplasmic reticulum stress is coupled to altered chondrocyte differentiation and function[J]. *PLoS Biol*, 2007, 5(3):44.
- [31] Boot-Handford RP, Briggs MD. The unfolded protein response and its relevance to connective tissue diseases[J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 339(1):197-211.
- [32] Vonk LA, Doulabi BZ, Huang CL, et al. Endoplasmic reticulum stress inhibits collagen synthesis independent of collagen-modifying enzymes in different chondrocyte populations and dermal fibroblasts[J]. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88(3):539-552.
- [33] Cao YP, Wen LC, Li J, et al. Acetabular revision using acetabular reinforcement cages with a hook[J]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2009, 17(9):671-673.
- [34] Boivin WA, Cooper DM, Hiebert PR, et al. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma[J]. *Lab Invest*, 2009, 89(11):1195-1220.
- [35] Saito S, Murakoshi K, Kotake S, et al. Granzyme B induces apoptosis of chondrocytes with natural killer cell-like cytotoxicity in rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(10):1932-1943.
- [36] Han J, Goldstein LA, Gastman BR, et al. Degradation of Mcl-1 by granzyme B: implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(21):22020-22029.
- [37] Han J, Goldstein LA, Hou W, et al. Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(29):22473-22483.
- [38] Iannone F, De Bari C, Scioscia C, et al. Increased Bcl-2/p53 ratio in human osteoarthritic cartilage: a possible role in regulation of chondrocyte metabolism[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(2):217-221.
- [39] Johnson EO, Charchandi A, Babis GC, et al. Apoptosis in osteoarthritis: morphology, mechanisms, and potential means for therapeutic intervention[J]. *J Surg Orthop Adv*, 2008, 17(3):147-152.
- [40] Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(5):555-562.
- [41] Olivetto E, Vitellozzi R, Fernandez P, et al. Chondrocyte hypertrophy and apoptosis induced by GRO α require three-dimensional interaction with the extracellular matrix and a co-receptor role of chondroitin sulfate and are associated with the mitochondrial splicing variant of cathepsin B[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210(2):417-427.

(修回日期:2014-08-27)

(本文编辑:凌 琛)