

关节软骨细胞的凋亡

Apoptosis of articular chondrocytes

余海波¹ 杨海韵¹ 钟广铃¹ 朱通伯²

YU Haibo, YANG Haiyun, ZHONG Guangling, ZHU Tongbo

【关键词】 软骨, 关节; 细胞 【Key Words】 Cartilage, articular; Cells

细胞凋亡 (Apoptosis) 又称程序性细胞死亡 (Programmed Cell Death, PCD), 为 Kerr 于 1972 年首次描述, 是一种不同于坏死的细胞死亡方式。通常认为导致细胞凋亡的程序 (即自杀程序) 事先就装配在细胞中, 如该程序在机体的内、外因素作用下被启动, 细胞凋亡即开始发生。凋亡的细胞起初表现为染色质和胞浆浓缩, 随之 DNA 被裂解, 细胞膜皱缩、内陷, 并包裹裂解的核苷酸片段, 形成多个碎裂小体 (Apoptosis Bodies), 最后由吞噬细胞对其进行吞噬、清除。因整个过程既无炎症反应的出现, 也不造成周围组织的损伤, 故被认为是机体维持内环境稳定的一种主动、有序的细胞死亡方式。髌板软骨细胞的凋亡早在 1987 年就被发现, 因关节软骨细胞与髌板软骨细胞有共同的胚胎来源, 故关节软骨细胞也应存在凋亡。1995 年 Blanco 等^[1]报道将白细胞介素 21 (IL21) 诱生的一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 加入培养的关节软骨细胞中, 可诱发软骨细胞凋亡。此后人们对关节软骨细胞的凋亡进行了大量的研究。由于关节软骨由软骨细胞和软骨基质组成, 软骨内无血管分布, 细胞凋亡过程比较特别, 现就有关研究状况综述如下。

1 软骨细胞凋亡的激发途径

1.1 NO 途径 NO 是 80 年代被发现的一种新的气性信息分子, Blanco 等^[1]在关节软骨细胞的培养液中加入 IL21 后可使软骨细胞诱生更多的 NO, 并引发软骨细胞凋亡; 进一步研究发现这一现象可被 I2 单甲基精氨酸所抑制, 并表现为剂量依赖关系^[2]。由于 I2 单甲基精氨酸为 NO 合成原料 I2 精氨酸的竞争性抑制剂, 故表明 NO 可诱发凋亡。Pelletier 等^[3]给予实验性骨性关节炎的狗服用 N2 亚氨基 I2 赖氨酸 (一种一氧化氮合酶抑制剂), 发现软骨细胞凋亡明显减低, 对 NO 的作用予以了有力的佐证。但 Studer 等^[4]将诱生型一氧化氮合酶基因转入软骨细胞, 虽 NO 产物较高但软骨细胞并无明显凋亡现象, 可见 NO 的体内作用十分复杂。至于 NO 是如何诱发软骨细胞凋亡的目前也不十分清楚, 但有人研究发现前列腺素 E2 (PGE2) 是一种软骨细胞生长的抑制剂, 如将其加入培养的牛关节软骨中, 可诱发软骨细胞的凋亡^[2, 5]。然 PGE2 并不诱生 NO, 其生成也不需要 NO 的诱生, 而硝酸钠可诱生高水平的 PGE2, I2 单甲基精氨酸可减少 PGE2 的水

平, 提示 PGE2 可能为 NO 诱发软骨细胞凋亡级联反应中的下一激活物; Miwa 等进一步研究发现 PGE2 在体外通过激活环磷酸腺苷 (cAMP) 来诱发软骨细胞凋亡^[5]。

1.1.2 Fas 途径 Fas 是位于细胞膜上的 N 型跨膜糖蛋白, 也称 APC2 或 CD95, 属肿瘤坏死因子 (TNF) 家族成员, 是一条已被公认的程序性细胞死亡信号传递通路, Hashimoto 等^[6]不仅用分子杂交的方法检测到 Fas 及 Fas 配体在关节软骨中的表达, 而且将抗 Fas 抗体加入到培养的软骨细胞中, 并可诱导软骨细胞凋亡的发生, 进一步的研究发现 Fas 与 NO 之间并无联系, 因为抗 Fas 抗体激发的凋亡既不能诱导 NO 的产生, 也不能被 NO 合成的抑制剂所抑制。这表明由 Fas 激发的软骨细胞凋亡途径是一条独立于 NO 之外的途径。体外研究还发现 Fas 及 Fas 配体的表达还受到细胞密度的调节, 低密度区细胞不仅 Fas 表达较高密度区细胞高, 且 Fas 的激活也是高密度区细胞的 11.5 倍^[7]。

2 关节软骨细胞凋亡的特点

用原位杂交及 TUNEL 技术显示正常人关节软骨细胞可出现凋亡现象, 但检出率低, 主要位于表层, 在骨性关节炎的病人除表层的数量增加外, 中层 (包括移行层和辐射层) 均可查到^[8, 9]。Fas 抗原是一种被公认的程序性细胞死亡的主要基因编码产物, 用流式细胞仪可测到正常关节软骨细胞表面的表达情况, 阳性率为 27.1%~21.6% 并与骨性关节炎的病人无显著性差异; Fas 抗原免疫组化观察也证实了原位杂交的研究结果^[2]。Hashimoto 等^[6]还发现关节软骨细胞的凋亡与年龄关系密切。Adams 等^[10]对不同鼠龄的小鼠和大白鼠关节软骨细胞凋亡现象进行了观察, 结果发现随着实验动物年龄的增加, 关节软骨细胞凋亡小体的数量也随之增多。由于关节软骨无血管分布, 仅有细胞成分软骨细胞被基质包围, 可见关节软骨内不存在有清除凋亡小体的单核巨噬细胞, 关节软骨细胞凋亡后产生的凋亡小体可能被滞留在关节软骨内, 除非软骨基质发生降解凋亡小体才有可能被释放到关节间隙中而被清除。Hashimoto 等^[8, 11]对这些凋亡小体的去向进行了观察, 结果发现在软骨细胞发生凋亡的同时, 软骨基质也发生了降解, 凋亡的小体就积聚于软骨细胞间隙内或软骨基质泡中。如将关节软骨基质泡分离出来连同正常的软骨细胞以及软骨细胞诱生的凋亡小体进行碱性磷酸酶 (AKP) 及三磷酸核苷酸磷酸脱氢酶 (NTPPH) 的活性检测, 发现 AKP 在

三者间相差无几,而 NTPPH 在软骨细胞间隙内或软骨基质间凋亡小体内的活性明显升高,由于 NTPPH 可使钙化沉积与骨的钙化有关,说明软骨细胞凋亡形成的凋亡小体还具有加速关节软骨钙化的功能特性^[11]。

3 关节软骨细胞凋亡与疾病

311 骨性关节炎 骨性关节炎是以关节软骨降解为特征的退行性关节疾病,Hashimoto 等^[6]发现 Fas 及 Fas 配体在骨性关节炎病人软骨中的表达范围比正常人要广,在软骨的中、深层均可测到。TUNEL 技术在原位对凋亡的软骨细胞检测也发现骨性关节炎病人的软骨细胞凋亡明显高于正常组^[9, 11, 12]。大白兔实验性骨性关节炎原位杂交及 TUNEL 结果与人相同,流式细胞仪分析发现实验组关节软骨细胞凋亡数明显高于正常组^[13]。说明骨性关节炎与软骨细胞凋亡密切相关。电镜研究发现具有一定功能特性的凋亡小体积聚在凋亡后的细胞间隙及降解的基质小泡内;在它们的周围并可看到大量的羟磷酸石灰微结晶。如将分离出来的关节软骨基质泡和软骨细胞诱生的凋亡小体用硝酸钠或 Fas 抗体处理,它们均有沉积钙的作用^[11, 14]。这表明凋亡小体中与骨的钙化有关的碱性磷酸酶及三磷酸核苷酸磷酸脱氢酸在某些因素的作用下可被激活,加速关节软骨的钙化,这从较大程度上解释了骨性关节炎发病机理。Pelletier 等^[3]根据这一机理对实验性骨性关节炎的狗服用 N2 亚氨基 L2 赖氨酸(一种一氧化氮合酶抑制剂),不仅使软骨细胞凋亡受到抑制,而且骨性关节炎的病理表现明显轻于对照组。然而骨性关节炎的发病要涉及到软骨细胞及软骨基质两个方面,极为复杂,有关详细情况还有待于进一步探究。

312 类风湿性关节炎 1995 年 Firestein 等^[15]就查到类风湿性关节炎病人滑膜细胞 Fas 抗原的表达,如加入 Fas 抗体则可诱发滑膜细胞的凋亡。随后 Hoa 等^[16]也在滑膜液体及组织中查到 Fas 配体的表达,说明类风湿性关节炎的发病与滑膜细胞凋亡相关。但目前的研究尚未查到类风湿性关节炎病人软骨细胞凋亡的更详细的证据^[17, 18]。

313 软骨损伤 为了观察关节软骨细胞及基质对损伤所产生的反应, Tew 等^[19]将幼年及成年牛的关节软骨予体外培养并制成损伤模型,结果发现关节软骨细胞在出现坏死的同时也出现凋亡,未成熟关节软骨细胞坏死尤为明显;伤后的细胞坏死区内未死亡的细胞随之发生增殖,以达到修复。说明关节软骨损伤及修复的过程中也存在软骨细胞凋亡的现象,如何减少凋亡,提高软骨修复质量,应作为今后研究的方向。

由于关节软骨细胞的凋亡与一些关节疾病的发生发展较为密切,开展关节软骨细胞凋亡的研究就显得较为重要,相信随着研究的深入,大量细节的探明,人们通过调控细胞凋亡基因以达到防治关节软骨性疾病的目的是为时不远了。

参考文献

1 Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, et al. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol*, 1995, 146(1): 75285.

2 Blanco FJ, Lotz M. IL21-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. *Exp Cell Res*, 1995, 218(1): 3192325.

3 Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(6): 129021299.

4 Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M. Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999, 7(4): 3772379.

5 Miwa M, Saura R, Hirata S, et al. Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E(2) through cAMP2-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8(1): 17224.

6 Hashimoto S, Setareh M, Roseen F, et al. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(10): 17421755.

7 Kuhn K, Hashimoto S, Lotz M. Cell density modulates apoptosis in human articular chondrocytes. *J Cell Physiol*, 1999, 180(3): 4392447.

8 Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, et al. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(9): 163221638.

9 Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, et al. Osteoarthritis chondrocyte die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(2): 2842289.

10 Adams SC, JR Horton WE. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Record*, 1998, 250: 4182425.

11 Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95: 30923099.

12 胡建华, 黄公怡, 黄尚志, 等. 骨关节炎软骨细胞凋亡调控基因的研究. *中华外科杂志*, 2000, 38(4): 2662268.

13 Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, et al. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(7): 126621274.

14 Kour JB, Aguilera JM, Reyes J, et al. Apoptotic chondrocytes from osteoarthrotic human articular cartilage and abnormal calcification of subchondral bone. *J Rheumatol*, 2000, 27(4): 100521019.

15 Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ, et al. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest*, 1995, 96: 16321638.

16 Hoa T, Hasunuma T, Aono H. Novel mechanisms of selective apoptosis in synovial T cell patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1996, 23: 13321337.

17 Fujisawa K, Asahara H, Okamoto K. Therapeutic effect of the anti-Fas antibody on arthritis in HTLV-1 tax transgenic mice. *J Clin Invest*, 1996, 98: 272278.

18 Kim HA, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(7): 15221537.

19 Tew SR, Kwan AP, Hann A. The reactions of articular cartilage to experimental wound: role of apoptosis. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(1): 212225.

(收稿: 20020711 编辑: 李为农)