

## 凋亡促进因子 TFAR19, Apaf-1 与腰椎间盘突出症的关系研究\*

赵英伦<sup>1</sup>, 马元<sup>1</sup>, 李东冉<sup>2</sup>, 王军<sup>1</sup>, 刘冲<sup>1</sup>, 詹新立<sup>1</sup>

(1. 广西医科大学第一附属医院脊柱骨病外科, 南宁 530021;

2. 广西壮族自治区人民医院骨科, 南宁 530021)

**摘要:**目的 探究凋亡促进因子 TFAR19, Apaf-1 与腰椎间盘突出症关系。方法 随机选择广西医科大学第一附属医院脊柱骨病外科住院接受手术的腰椎间盘突出症患者 99 例, 其中设单个节段突出的患者 70 例为 A 组, 多个节段突出(腰椎间盘突出节段数量 $\geq 2$ 个)的患者 29 例为 B 组, 于入院次日收集外周静脉血。同时随机选取健康体检者 40 例作为对照组(C 组)。采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测腰椎间盘突出症患者血清中 TFAR19, Apaf-1 浓度。结果 C 组、B 组及 A 组血清中 TFAR19 浓度分别为  $1.30 \pm 0.09$ ,  $1.85 \pm 0.14$  和  $2.33 \pm 0.25$  ng/ml, 各组之间 TFAR19 浓度差异具有统计学意义( $F=7.979$ ,  $P<0.01$ )。与 C 组相比, A 组( $q=3.60$ ,  $P=0.012$ )、B 组( $q=5.59$ ,  $P<0.01$ ) TFAR19 浓度差异具有统计学意义。A 组、B 组之间 TFAR19 浓度差异有统计学意义( $q=2.93$ ,  $P=0.012$ )。C 组、B 组及 A 组血清中 Apaf-1 浓度分别为  $107.52 \pm 11.58$ ,  $159.22 \pm 11.87$ ,  $203.20 \pm 20.21$  pg/ml, 各组之间 Apaf-1 浓度差异具有统计学意义( $F=8.828$ ,  $P<0.01$ )。与 C 组相比, A 组( $q=3.89$ ,  $P=0.007$ )、B 组( $q=5.86$ ,  $P<0.01$ ) Apaf-1 浓度差异具有统计学意义。A 组、B 组之间 Apaf-1 浓度差异有统计学意义( $q=2.97$ ,  $P=0.037$ )。各组间性别构成比差异无统计学意义( $\chi^2=0.229$ ,  $P=0.892$ )。各组之间年龄差异无统计学意义( $F=0.091$ ,  $P=0.91$ )。结论 腰椎间盘突出症患者血清 TFAR19, Apaf-1 表达上调加速了腰椎间盘突出退变过程, 参与了腰椎间盘突出症的发生, 并且与椎间盘突出节段数量相关, 突出节段数量越多, TFAR19, Apaf-1 表达量越高。

**关键词:** 腰椎间盘突出退行性病变; 腰椎间盘突出症; TFAR19; Apaf-1; 细胞凋亡

中图分类号: R681.53; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)02-030-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.008

## Relationship between Apoptosis Promoting Effector Molecules TFAR19, Apaf-1 and Lubar Intervertebral Disc Protrusion

ZHAO Ying-lun<sup>1</sup>, MA Yuan<sup>1</sup>, LI Dong-ran<sup>2</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, LIU Chong<sup>1</sup>, ZHAN Xin-li<sup>1</sup>

(1. Department of Spine and Osteopathy Ward, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Department of Osteopathy Ward, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the relationship between apoptosis promoting effector molecules TFAR19, Apaf-1 and lumbar intervertebral disc protrusion. **Methods** 99 of operation patients with lumbar intervertebral disc protrusion in the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University Department of Spine and Osteopathy were recruited. Among them, single segment of lumbar intervertebral disc protrusion were 70 (Group A), more than one segments of lumbar intervertebral disc protrusion were 29 (Group B). In addition, 40 unrelated healthy people from physical examination center were enrolled as controls (Group C). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to examine serum TFAR19, Apaf-1 levels in lumbar intervertebral disc protrusion patients. **Results** The level of TFAR19 in Group A, Group B and Group C respectively were  $1.85 \pm 0.14$ ,  $2.33 \pm 0.25$  and  $1.30 \pm 0.09$  ng/ml. The TFAR19 activity in each group was statistically significant difference ( $F=7.979$ ,  $P<0.01$ ). Compared with Group C, the TFAR19 activity in Group B ( $q=5.59$ ,  $P<0.01$ ), Group A ( $q=3.60$ ,  $P=0.012$ ) was statistically significant difference. The TFAR19 activity in lumbar intervertebral disc protrusion patients subgroups (Group A, Group B) was statistically significant difference ( $q=2.93$ ,  $P=0.012$ ). The level of Apaf-1 in Group A, Group B and Group C respectively were  $159.22 \pm 11.87$ ,  $203.20 \pm 20.21$  and  $107.52 \pm 11.58$  pg/ml. The Apaf-1 activity in each group was statistically significant difference ( $F=8.828$ ,  $P<0.01$ ). Compared with Group C, the Apaf-1 activity in Group B ( $q=5.86$ ,  $P<0.01$ ), Group A ( $q=3.89$ ,  $P=0.007$ ) was statistically significant difference. The Apaf-1 activity in

\* 基金项目: 本研究受国家自然科学基金(No. 81560359), 广西自然科学基金项目(NO. 2012GXNSFAA053141, NO. 2014GXNSFAA118173)资助。

作者简介: 赵英伦(1992—), 男, 满族, 在读硕士, 研究方向: 骨科, Tel: 15078895040, E-mail: 834904502@qq.com。

通讯作者: 詹新立(1970—), 男, E-mail: 3cstar@163.com。

lubar intervertebral disc protrusion patients subgroups (Group A, Group B) was statistically significant difference ( $q=2.97, P=0.037$ ). Male/female ratio between each groups was not statistically significant difference ( $\chi^2=0.229, P=0.892$ ). Age between each groups was not statistically significant difference ( $F=0.091, P=0.91$ ). **Conclusion** The augment of TFAR19 and Apaf-1 promotes apoptosis of lubar intervertebral disc protrusion. It is connected with quantity of protrusive segments. The more segments of protrusion, the higher TFAR19 and Apaf-1 level of examination will be.

**Keywords:** lumbar intervertebral disc degeneration; lubar intervertebral disc protrusion; TFAR19; apaf-1; apoptosis

腰椎间盘突出性病变是腰椎间盘突出症(prolapse of lumbar intervertebral disc, lumbar intervertebral disc hernia)的病因基础,常在外力因素作用下,使椎间盘纤维环破裂,髓核突出压迫后方神经,造成患者产生腰腿痛及坐骨神经痛。近年来,腰椎间盘突出性病变越发趋于年轻化,腰椎间盘突出症发病率也逐年升高,而其治疗方法相对局限,主要包括药物保守治疗、手术治疗、康复治疗等,尚不能避免药物治疗产生的副作用及手术治疗产生的并发症等,因此,寻找新的治疗手段迫在眉睫。研究表明,细胞凋亡异常是腰椎间盘突出及腰椎间盘突出症发生发展过程中的重要病因机制,而凋亡促进因子 TFAR19 及凋亡蛋白酶活化因子-1 (apoptotic protease activating factor, Apaf-1)在细胞凋亡过程中具有核心调控作用,但腰椎间盘突出症患者体内 TFAR19, Apaf-1 活性变化尚未见报道。因此,本实验拟检测腰椎间盘突出症患者血清中 TFAR19, Apaf-1 浓度。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 随机选取 2014 年 12 月~2016 年 5 月在我院住院手术治疗的腰椎间盘突出症患者 99 例,其中设单个节段突出的患者 70 例为 A 组,男性 40 例,女性 30 例,平均年龄  $45.59 \pm 1.10$  岁;多个节段突出(腰椎间盘突出节段数量  $\geq 2$  个)的患者 29 例为 B 组,男性 18 例,女性 11 例,平均年龄  $49.03 \pm 1.43$  岁;同时随机选取健康体检者 40 例作为对照组(C 组),男性 24 例,女性 16 例,平均年龄  $44.55 \pm 1.65$  岁。于入院次日采集外周静脉血,分离出的血清于  $-78^\circ\text{C}$  保存。

1.2 入选标准 A、B 组患者须满足 MRI 或 CT 诊断仅为腰椎间盘突出症,且术后病理回报为退变椎间盘组织,所有患者及健康对照组人群均排除急/慢性炎症、椎体滑脱、骨折、心脏、肾脏、肝脏、结核、肿瘤及内分泌病史,无其他合并症及并发症。

1.3 试剂和仪器 人 TFAR19, Apaf-1 试剂盒(ELISA)购自江苏晶美生物科技有限公司,试剂盒包括:标准品(100 ng/L)1.8 ml,标准品稀释液 6 ml,辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)10 ml,样品稀释液 6 ml,显色剂 A 液 6 ml,显色剂 B 液 6 ml,20×浓缩洗涤液 25 ml,终止液 6

ml。使用  $A_{450\text{ nm}}$  酶标仪对样本进行检测。

1.4 TFAR19, Apaf-1 检测方法 采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测各样本中 TFAR19, Apaf-1 浓度。分别设标准品孔、待测样品孔及空白孔。在标准品孔中加入不同浓度梯度的标准品 50  $\mu\text{l}$ ,在待测样品孔中先加待测样品 50  $\mu\text{l}$ ,标准品孔和待测样品孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 HRP,空白孔除外。封膜后于  $37^\circ\text{C}$  恒温箱温育 60 min。洗板 5 次后加入显色液 A, B。  $37^\circ\text{C}$  避光显色 15 min。加入终止液,10 min 后立即读吸光度 A 值。先根据标准孔的吸光度 A 值标准曲线,然后,根据样品的吸光度 A 值在  $A_{450\text{ nm}}$  标准曲线上计算出对应的 TFAR19, Apaf-1 浓度。以上所有操作过程均严格遵循试剂盒说明书进行。

1.5 统计学分析 用 SPSS16.0 软件中  $\chi^2$  检验比较各组间性别构成比;用单因素方差分析(F 检验)比较各组的年龄及 TFAR19, Apaf-1 浓度;用方差分析中多个均数之间两两比较的  $q$  检验(LSD 法)比较各亚组间血清 TFAR19, Apaf-1 浓度。连续性资料数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果 A 组、B 组及 C 组血清中 TFAR19 浓度分别为  $1.85 \pm 0.14$ ,  $2.33 \pm 0.25$  和  $1.30 \pm 0.09$  ng/ml,各组之间 TFAR19 浓度差异具有统计学意义( $F=7.979, P<0.01$ )。与 C 组相比, A 组( $q=3.60, P=0.012$ )、B 组( $q=5.59, P<0.01$ ) TFAR19 浓度差异具有统计学意义。A 组、B 组之间 TFAR19 浓度差异有统计学意义( $q=2.93, P=0.012$ )。A 组、B 组及 C 组血清中 Apaf-1 浓度分别为  $159.22 \pm 11.87$ ,  $203.20 \pm 20.21$  和  $107.52 \pm 11.58$  pg/ml,各组之间 Apaf-1 浓度差异具有统计学意义( $F=8.828, P<0.01$ )。与 C 组相比, A 组( $q=3.89, P=0.007$ )、B 组( $q=5.86, P<0.01$ ) Apaf-1 浓度差异具有统计学意义。A 组、B 组之间 Apaf-1 浓度差异有统计学意义( $q=2.97, P=0.037$ )。各组间性别构成比差异无统计学意义( $\chi^2=0.229, P=0.892$ )。各组之间年龄差异无统计学意义( $F=0.091, P=0.91$ )。

3 讨论 细胞凋亡又称细胞程序性死亡,是一种由基因决定的细胞自杀程序活化而导致的细胞生

理性死亡,其意义在于清除机体衰老、变异、感染等异常细胞,控制机体器官或组织细胞数量和维持机体自稳。正常机体内,细胞凋亡与增殖可形成动态平衡,而此平衡被打破常是疾病发生的重要机制。近年来,越来越多的研究发现细胞凋亡参与了腰椎间盘突出退变及腰椎间盘突出症发生的过程:细胞凋亡异常使得椎间盘组织中活性细胞数量减少,改变了椎间盘内的胶原构成,打破了椎间盘基质生成与破坏的动态平衡<sup>[1]</sup>。据 Stanic 等<sup>[2]</sup>报道,退变椎间盘组织中细胞凋亡率可高达 53%~73%,髓核大小发生改变,各类细胞排列均规律的减少,即便是存活细胞,其生理活性也大大减弱。

目前对椎间盘细胞凋亡的信号通路研究多集中在线粒体通路、内质网通路和死亡受体通路上。Park 等<sup>[3]</sup>研究发现,破裂型椎间盘组织中被凋亡促进因子 Fas 标记的细胞数量多于正常椎间盘组织;另有学者发现 FasL 可诱导 Fas 表达增加,使髓核细胞凋亡率增高;上述研究证实了椎间盘细胞可通过 Fas 介导的死亡受体途径发生细胞凋亡。Zhao 等<sup>[4]</sup>发现硝普钠可诱导大鼠椎间盘纤维环细胞发生凋亡,且活性纤维环细胞内线粒体膜电位降低,胞质中细胞色素 C 大量聚集,表明椎间盘细胞也可通过线粒体通路介导凋亡,实验中还发现半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-12(caspase-12)抑制剂可明显抑制椎间盘纤维环细胞凋亡,并结合前期试验结果证实了内质网通路也参与了退变椎间盘的细胞凋亡过程。

凋亡促进因子 TFAR19 定位于人染色体 19q12~q13.1,由 6 个外显子和 5 个内含子组成。研究表明<sup>[5]</sup>,TFAR19 可促进线粒体通透性转运孔开放,使线粒体跨膜电位消失,线粒体肿胀,细胞色素 C 释放,激活线粒体通路进而发生凋亡;TFAR19 还可通过线粒体转位使细胞色素 C 释放减少,进而抑制半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(caspase-3)表达,产生抗凋亡效果<sup>[6]</sup>。此外,TFAR19 不仅可以促进细胞凋亡,还可以促进细胞发生以胞浆出现空泡化,线粒体、内质网结构损伤为主要表现的副凋亡<sup>[6]</sup>。与之不同的是,定位于人染色体 12q23,分子量为 130KD 的 Apaf-1,常通过与死亡受体通路及线粒体通路中的其他凋亡因子结合形成凋亡小体,导致细胞凋亡<sup>[7]</sup>,可见 Apaf-1 是凋亡小体形成的真正核心。

大量研究显示<sup>[8]</sup>,TFAR19,Apaf-1 可通过细胞凋亡通路参与多种疾病的发生发展。而本实验首次通过血液学水平报道了腰椎间盘突出症与 TFAR19,Apaf-1 的关系,结果显示腰椎间盘突出

症患者血清中 TFAR19,Apaf-1 的浓度均高于正常对照组,且与腰椎间盘突出节段数量成正比,突出节段数量越多,TFAR19,Apaf-1 的浓度越高,这说明了 TFAR19,Apaf-1 可介导椎间盘细胞发生凋亡,从而参与了腰椎间盘突出症的发生过程,但 TFAR19,Apaf-1 介导椎间盘细胞凋亡的通路机制有待进一步研究。今后在研究通路机制的同时,我们可以筛选出更多与椎间盘细胞凋亡相关的因子,并以其为治疗靶点,研制成多价疫苗对腰椎间盘突出症进行防治,为腰椎间盘突出症的免疫治疗开辟新道路。

#### 参考文献:

- [1] 黄秀芳,原向伟. Sox9 和 II 型胶原蛋白在人腰椎间盘突出退变中的表达及意义[J]. 中国医药科学, 2014, 4(3): 18-21.  
Huang XF, Yuan XW. Expressions of Sox9 and Col2a1 in human degenerated lumbar intervertebral disk [J]. China Medicine and Pharmac, 2014, 4(3): 18-21.
- [2] Stanic I, Facchini A, Borzi RM, et al. Polyamine depletion inhibits apoptosis following blocking of survival pathways in human chondrocytes stimulated by tumor necrosis factor alpha[J]. J Cell Physiol, 2006, 206(1): 138-146.
- [3] 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.
- [4] Zhao CQ, Zhang YH, Jiang SD, et al. Both endoplasmic reticulum and mitochondria are involved in disc cell apoptosis and intervertebral disc degeneration in rats[J]. AGE, 2010, 32(2): 161-177.
- [5] Zhuge C, Sun X, Chen Y, et al. PDCD5 functions as a regulator of p53 dynamics in the DNA damage response [J]. Journal of Theoretical Biology, 2015 (388): 1-10.
- [6] Bock FJ, Tanzer MC, Haschka MD, et al. The p53 binding protein PDCD5 is not rate-limiting in DNA damage induced cell death [J]. Scientific Reports, 2015, 5(68): 1-14.
- [7] Hu Q, Wu D, Chen W, et al. Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(46): 16254-16261.
- [8] 仇秋明, 赵英伦. 子痫前期患者血清中 TFAR19 活性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 68-69, 73.  
Qiu QM, Zhao YL. Serum TFAR19 activity in pre-eclampsia patients[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(2): 68-69, 73.

收稿日期: 2016-12-01

修回日期: 2017-01-16