

沉默信息调节因子 2 同源蛋白 1 通过 Akt/PKB 通路抑制人退变椎间盘髓核细胞凋亡 *

王大武 胡侦明 ** 郝杰 何斌 甘强 钟小明 沈皆亮 方济

(重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016)

摘要 沉默信息调节因子 2 同源蛋白 1(silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1/sirtuin 1)是组蛋白去乙酰化酶,参与表观遗传修饰调节,促进多种细胞的生存,但目前对椎间盘髓核细胞的作用未见研究.为了阐明临床不同来源的椎间盘髓核手术标本 SIRT1 的表达变化,用免疫组化、定量 RT-PCR、Western blot 方法对中老年腰椎间盘突出症病人及青壮年腰椎骨折病人术中髓核标本进行研究,表明老年人髓核 SIRT1 的 mRNA 及蛋白质水平均显著低于青壮年的髓核.同时,用 resveratrol(SIRT1 激动剂)、烟碱(SIRT1 抑制剂)、SIRT1-siRNA 对培养的退变髓核细胞进行处理或转染后,用流式细胞仪检测凋亡率变化,结果表明 resveratrol 能显著促进退变髓核细胞生存,相反,当烟碱或 SIRT1-siRNA 转染后则显著促进髓核细胞凋亡.为了进一步分析 SIRT1 抑制退变髓核细胞凋亡的分子机制,应用 Western blot 及抑制剂方法研究表明,当 SIRT1-siRNA 转染髓核细胞后能降低磷酸化 Akt 蛋白的表达,而白藜芦醇处理则促进磷酸化 Akt 蛋白的表达,当用 LY294002(PI3K 抑制剂)或 Akt-siRNA 转染后显著抑制髓核细胞的生存率.研究结果表明, SIRT1 通过 Akt 通路能显著抑制髓核细胞凋亡,为深入揭示退变性椎间盘疾病的病理生理及生物治疗提供新的思路和靶点.

关键词 SIRT1, 髓核细胞, 凋亡, Akt 通路, 椎间盘, 退变性椎间盘疾病

学科分类号 R681.5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00484

有研究表明,在老年人群中,约 80%的人口患下腰痛疾病^[1],而椎间盘退变是腰椎间盘突出、退变性椎管狭窄、腰椎滑脱和椎间盘源性腰痛等一系列下腰痛疾病的主要病因.尽管椎间盘退变牵涉髓核、软骨终板及纤维环,但显著的改变还是发生在髓核,如细胞外基质成分降解、基质水合作用降低,其中,负责基质合成的髓核细胞的凋亡及细胞数量减少,在这个病变过程中发挥了关键作用^[2-4].因此,通过抑制髓核细胞的凋亡,可能会促进髓核基质的合成,延缓椎间盘退变.

沉默信息调节因子(silent information regulator 2, Sir2)最先在低等生物酵母中发现,研究表明 Sir2 能延长寿命、延缓衰老.沉默信息调节因子 2 同源蛋白 1(silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1)为哺乳动物中与 Sir2 最为相似的同系物^[5-7]. SIRT1 为细胞核去乙酰化酶,能调节细胞的增殖、分化、衰老、凋亡、炎症反应、能量代谢等决定细胞命运的功能^[5,8-9].

近来的研究表明, SIRT1 能延缓关节软骨细胞

等多种生物细胞的衰老凋亡^[10-15],促进关节软骨细胞外基质合成,抑制皮肤成纤维细胞基质金属蛋白酶的表达从而延缓皮肤衰老^[12-13,16].而既往研究也证实,人椎间盘髓核细胞为类软骨细胞,而基质金属蛋白酶在髓核基质的降解退变过程中也起重要作用,因此我们推测 SIRT1 可能在椎间盘髓核细胞退变凋亡过程中发挥作用.本研究的目的就是首先阐明 SIRT1 在临床不同来源的椎间盘髓核标本中的表达变化,分析 SIRT1 在髓核细胞凋亡中的作用及分子机制,以期对椎间盘退变性疾病的发病机制及基因治疗探索新的途径和方法.

1 材料与方法

1.1 标本来源

人体组织标本的获取通过重庆医科大学附属第

* 国家自然科学基金资助项目(81171751).

** 通讯联系人.

Tel: 023-89011479, E-mail: zhenminghu62@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-10-26, 接受日期: 2012-02-03

一医院伦理委员会批准. 所收集的椎间盘髓核组织来源于重庆医科大学附属第一医院脊柱外科住院患者术中常规切除之髓核标本, 均获得患者知情同意. 退变的椎间盘髓核组织来源于腰椎间盘突出症(lumbar disc herniation, LDH)患者, 22 例病人, 病人年龄为 55~72 岁(男 13 例, 女 9 例), 共 22 个退变髓核样本. 腰椎爆裂性骨折(lumbar vertebra fracture, LVF)患者 8 例, 年龄分别为 22~25 岁(男 7 例, 女 1 例), 均为创伤后 24 h 内急诊行手术减压、椎间盘切除植骨、内固定术, 术中获取的髓核用于与 LDH 退变髓核相对照.

所有患者术前均常规完善脊柱 MRI 检测, 对获取的椎间盘退变程度均用 Pfirrmann 分级方法进行分级^[7]. 来源于 LDH 患者的髓核为 Grade III-VI, 而来源于 LVF 患者均为 Grade I.

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测. 对获取的 LDH 及 LVF 术中髓核标本取出后立即以 4% 多聚甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 连续切片备用. 切片常规脱蜡至水, 用 3% H_2O_2 以灭活内源性过氧化物酶及血清封闭, 用兔抗人 SIRT1 单抗(Abcam 公司, 美国)、兔抗人基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)多抗(Santa Cruz 公司, 美国), 一抗 4℃ 孵育过夜, DAB 显色, 用两步法免疫检测试剂盒检测(博士德公司, 武汉).

1.2.2 TUNEL 检测. 用脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测 LDH 及 LVF 标本髓核细胞的凋亡变化. 按免疫组化法制成髓核组织的石蜡切片后, 按 TUNEL 凋亡检测试剂盒(Roche 公司, 瑞士)说明书进行常规反应及显色.

1.2.3 髓核细胞的分离及培养. 术中摘除的髓核标本, 置入预先准备好的无菌培养瓶中, 内含少量 DMEM/F12(Invitrogen 公司, 美国)培养液, 并迅速置于冰盒内带回实验室. 按照文献[18]的方法, 稍加改进, 30 min 内在超净台内剪碎, 0.2% II 型胶原蛋白酶(Sigma 公司, 美国)37℃ 水浴消化 3 h 左右, 细胞筛收集细胞, 按合适密度接种于含 15% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM/F12 中培养. 所有实验用细胞均为传代至第 1~3 代.

1.2.4 荧光定量 PCR 检测. 分析 LDH 和 LVF 的培养髓核细胞中 SIRT1 的表达情况, 按 RNA 抽提试剂盒 RNAiso Plus(TaKaRa 公司, 大连)说明书提取细胞总 RNA, 用逆转录试剂盒 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser(TaKaRa 公司, 大连)

将 RNA 逆转录为 cDNA, 荧光定量 PCR 反应使用 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO 公司, 上海)试剂, 体系按说明书执行, iQ5 定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司, 美国)上机检测. 反应条件为: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 15 s, 各自的退火温度 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 共 40 个循环. 引物序列: SIRT1, 上游 5' ccagaacatagacacgctggaac 3', 下游 5' ctctctgtacagcttcacagtca 3'; COL2A1, 上游 5' ctcaagtcctcaacaaccaga 3', 下游 5' ggggtcaatccagtagtctccac 3'; 聚集蛋白聚糖(aggrecan), 上游 5' gccagcaccaccaatgtaagt 3', 下游 5' agtaacacccctccacgaactcag 3'; GAPDH, 上游 5' ctttggtatcgtggaaggactc 3', 下游 5' gtagaggcaggatgatgttct 3'. 以上引物均由 TaKaRa 公司(大连)合成.

1.2.5 退变髓核细胞 SIRT1 激动剂及抑制剂的处理. 在对培养的退变髓核细胞进行处理之前, 将细胞接种至 6 孔板培养 24 h 后, 加入 SIRT1 激动剂, 白藜芦醇(resveratrol; Sigma 公司, 美国; 浓度为 8 $\mu\text{mol/L}$)或 SIRT1 的抑制剂, 烟酰胺(nicotinamide, NAM; Sigma 公司, 美国; 浓度为 7 mmol/L), 继续培养 24 h, 然后收集细胞用双染法流式细胞仪进行凋亡检测, 或进行 Western blot 分析. 为了诱导细胞凋亡, 加入肿瘤坏死因子 α (TNF α ; Peprotech 公司, 美国)或将细胞置于含 0.5% 的 FBS 低营养培养基中培养, 以分析白藜芦醇(resveratrol)或 NAM 对凋亡的进一步作用.

1.2.6 siRNA 转染人退变的椎间盘髓核细胞.

靶向沉默退变髓核细胞 SIRT1 基因的双链 siRNA、对照用 negative control-siRNA(NC-siRNA)由 Invitrogen 公司(上海)进行设计并化学合成. SIRT1-siRNA 的序列为: 上游 5' CCAAGCAGCUAAGAGUAAUTT 3', 下游 5' AUUACUCUUAGCUGCUUGGTT 3'. 在转染前 24 h 以 1.5×10^5 个/ml 种植于 6 孔板, 种植后 24 h 当细胞融合率达 60%~70%时, 用专用的 siRNA 转染试剂 PepMute siRNA Transfection Reagent(SignaGen, 美国)按照说明书进行 SIRT1-siRNA、NC-siRNA 转染 36 h, 在转染后进行各种相应处理. 最后收集退变髓核细胞进行凋亡检测, 或进行 Western blot 分析.

同法进行 Akt-siRNA(Invitrogen 公司, 上海)的转染.

1.2.7 流式细胞仪检测退变髓核细胞凋亡率. 经各种干扰处理后的退变髓核细胞, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(凯基公司, 南

京)检测细胞凋亡. 收集细胞后用 PBS 洗 2 次, 将细胞重悬结合缓冲液, 加入 Annexin V-FITC 和 PI 进行标记后用 FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司, 美国)检测凋亡率的变化情况. 早期凋亡细胞为 (Annexin V+, PI-), 晚期凋亡细胞为(Annexin V+, PI+), 对早、晚期凋亡共同计数.

1.2.8 细胞总蛋白提取及 Western blot 检测. 蛋白质提取均在冰上操作, 反应液均事先冰水预冷. 收集的细胞于 1.5ml EP 管内用冰 PBS 洗涤, 离心后弃上清, 重悬于含磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂的细胞裂解液(碧云天公司, 江苏)中, 反应液离心收集蛋白质. 用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(碧云天公司, 江苏)进行蛋白质含量的测定. 蛋白质样品于 5×上样缓冲液中煮沸 10 min 使之变性, 据不同目的蛋白分子质量用 6%~10%的 SDS-PAGE 进行电泳分离, 再电转至 PVDF 膜上, 膜用含 0.05% Tween-20 和 5%牛血清的 PBS 封闭 1 h、洗涤, 用相应一抗, 兔抗人 SIRT1(Abcam 公司, 美国)、兔抗人 COL2A1(Santa Cruz, 美国)、兔抗人 aggrecan (Santa Cruz, 美国)、兔抗人 Akt (Cell Signaling Technology, 美国)、兔抗人 phospho-Akt (Ser473)

(Cell Signaling Technology, 美国)、兔抗人 active caspase-3 (Epitomics 公司, 美国)、兔抗人 Bcl-2 (Epitomics 公司, 美国)、兔抗人 acetyl-histone H3 (lys9) (Cell Signaling Technology, 美国)、兔抗人 GAPDH(Santa Cruz, 美国), 分别 4℃ 孵育过夜. 用 PBS-Tween20 漂洗 5 min, 共 3 次, 用 HRP 标记的二抗反应, 再次 PBS-Tween20 洗膜, ECL 发光、显影.

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据显著性检验用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 SIRT1 蛋白在 LDH、LVF 患者髓核组织中的表达差异

首先用免疫组化的方法检测 SIRT1 蛋白在不同患者髓核组织中的表达情况, 结果显示在 LDH 患者髓核组织中 SIRT1 阳性表达显著低于 LVF 患者组(图 1a). 我们为了进一步验证在 LDH 中 MMP-2 是否为高表达, 结果证实 LDH 的髓核组

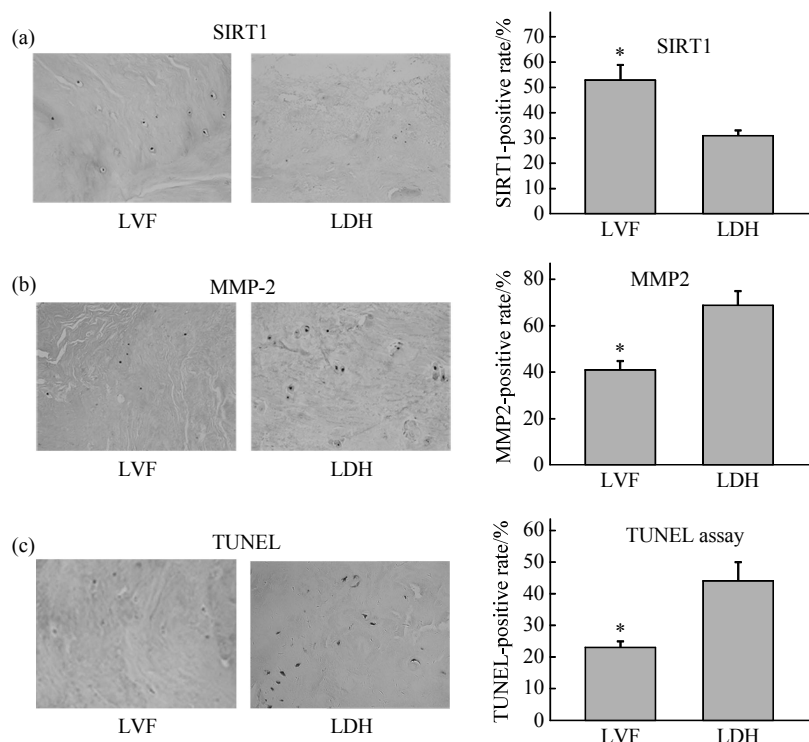


Fig. 1 Examination of SIRT1 and metalloproteinase 2 (MMP-2) expression in human NP surgical sample by immunohistochemistry

(a) SIRT1 levels are elevated in NP surgical sample from patients with lumbar vertebra fracture (LVF). (b) Metalloproteinase 2 (MMP-2) levels of NP surgical sample from patients with LVF are reduced compared with those of NP surgical sample from patients with lumbar disc herniation (LDH). (c) The percentages of apoptotic cells in the disc NP surgical sample from LVF and LDH were detected using TUNEL assay. Data of image analysis represents the $\bar{x} \pm s$. *Significant difference with respect to LDH($P < 0.05$).

组织中阳性表达显著高于 LVF 患者髓核组织(图 1b)。为了验证是否退变的 LDH 髓核组织细胞凋亡率增加,对 LDH、LVF 髓核组织行 TUNEL 凋亡检测,结果证实在退变的 LDH 髓核中阳性凋亡率明显增加(图 1c)。

2.2 SIRT1 在 LDH、LVF 患者髓核培养细胞中的表达差异

对 LDH、LVF 髓核细胞进行培养,进一步用

荧光定量 PCR(图 2a)及 Western blot(图 2b, c)的方法检测 SIRT1 的基因及蛋白质水平的表达差异,证实了免疫组化的检测结果,LDH 髓核细胞中 SIRT1 的基因及蛋白质水平均显著降低。同时,也对 COL2A1、aggrecan 进行分析,结果显示在退变的 LDH 髓核细胞中较 LVF 显著低表达(图 2b, d, e)。

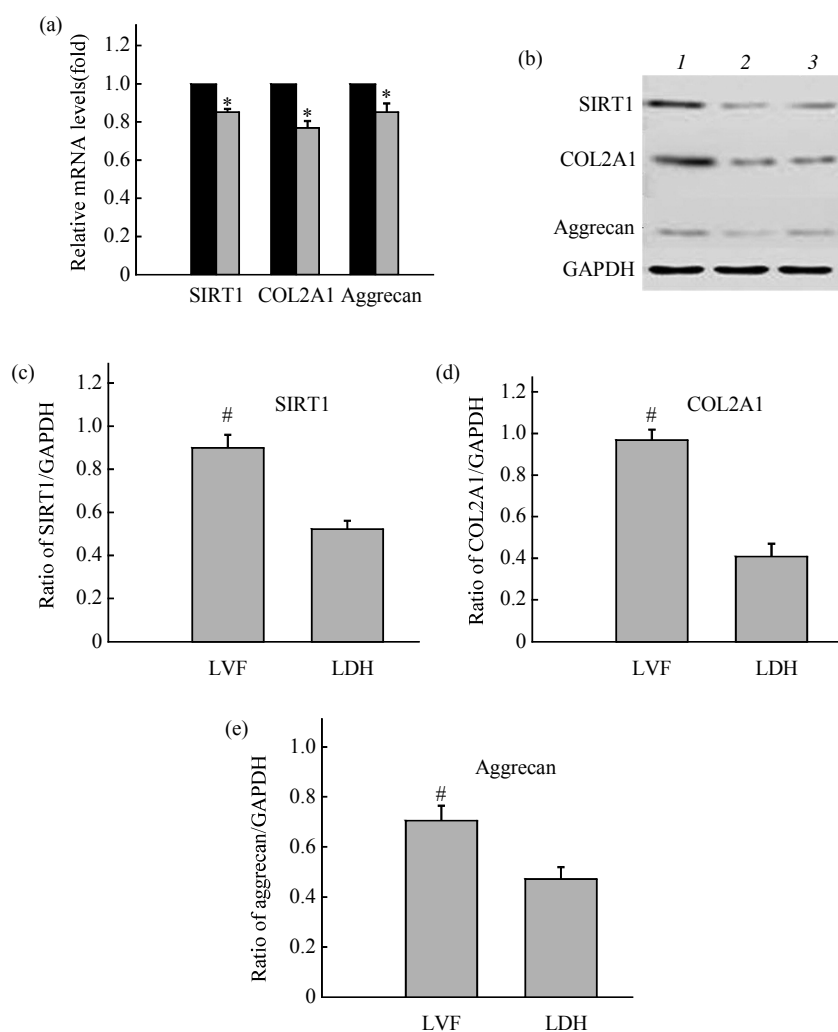


Fig. 2 Analysis of SIRT1, COL2A1 and aggrecan expression in human NP cells by real-time PCR and Western blotting

(a) The values of real-time PCR for SIRT1, COL2A1 and aggrecan gene expression obtained from patients with LVF were normalized versus those from patients with LDH. ■: LVF; □: LDH. (b) Western blotting analysis of SIRT1, COL2A1 and aggrecan protein expression in human NP cells from LVF and LDH. 1: LVF; 2: LDH1; 3: LDH2. (c, d, and e) Quantitative analysis of the Western blotting was performed with software. The data are mean of three different experiments. *Significant difference with respect to LVF ($P < 0.05$), #Significant difference with respect to LDH ($P < 0.05$).

2.3 NAM(SIRT1 抑制剂)处理增加退变髓核细胞的凋亡率

为了明确 SIRT1 抑制剂 NAM 能否参与髓核细胞凋亡率的调节,我们对培养的退变髓核细胞加入 NAM 干扰。如图 3a 所示,当加入 NAM 后,

乙酰化组蛋白 H3 的表达显著增加,说明 NAM 发挥了抑制 SIRT1 去乙酰化的作用,证实了 NAM 的抑制剂作用。当 NAM 处理 48 h 后进行流式细胞仪检测表明,大大增加了退变髓核细胞的凋亡率(图 3b 和 c)。

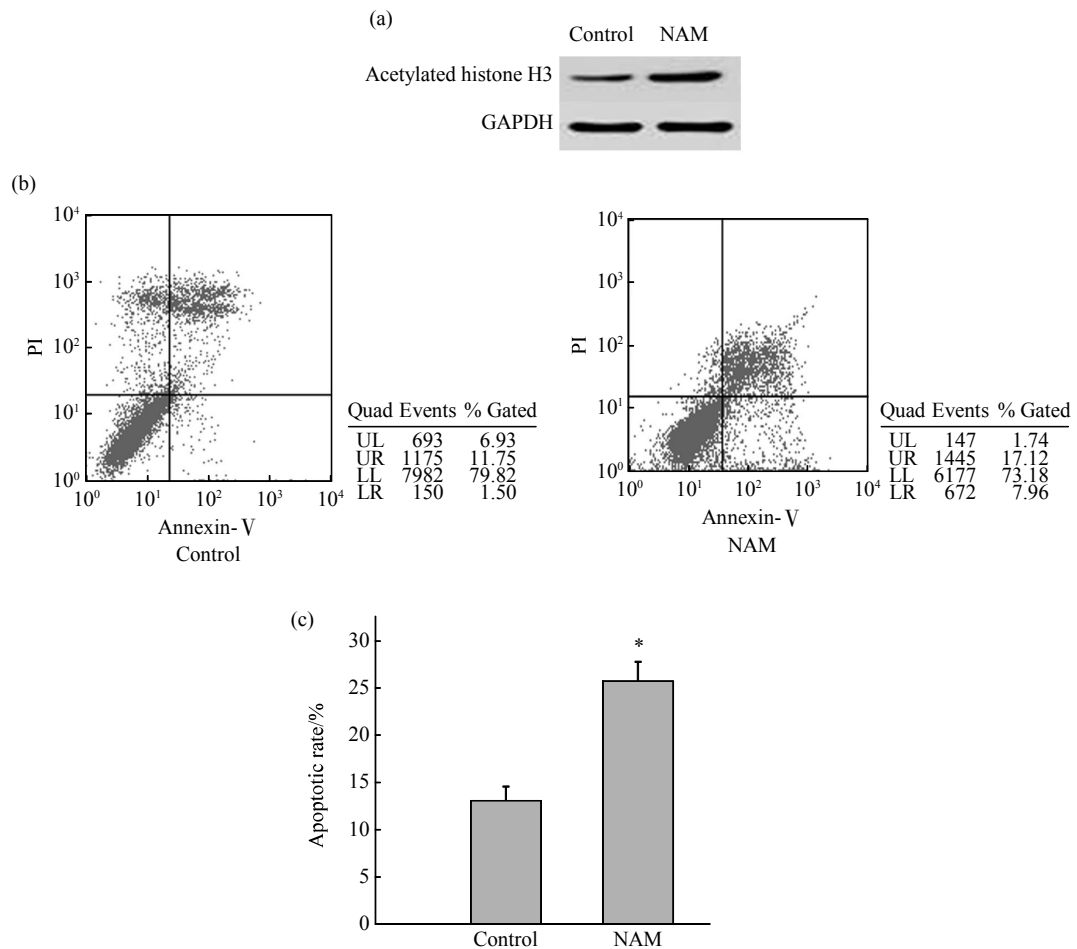


Fig. 3 Effects of SIRT1 inhibitor, nicotinamide (NAM), on apoptosis of degenerative human NP cells
Cells were treated with NAM (7 mmol/L) for 48 h. (a) The levels of acetylated histone H3 in total cell lysates were analyzed by Western blot analysis. (b) The apoptotic percentage of degenerative NP cells measured by flow cytometry. x-Axis represents annexin V staining and y-axis represents PI staining. (c) The cells in early-stage(annexinV + and PI -) and late-stage(annexinV + and PI +) apoptosis were defined as apoptotic. Data represents $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. *Significant difference with respect to control ($P < 0.05$).

2.4 SIRT1-siRNA 转染促进退变髓核细胞的凋亡率
当 SIRT1-siRNA 转染退变髓核细胞后, Western blot 检测 SIRT1 蛋白表达明显下降(图 4a). 流式细胞仪检测显示, 与 NC-siRNA 转染相比, SIRT1-siRNA 转染后凋亡率明显增加(图 4b 和 d). 为了明确 SIRT1-siRNA 转染是否增加退变髓核细胞对 TNF α 的敏感性, 在 SIRT1-siRNA 转染后, 继续用 TNF α 干扰处理髓核细胞, 证实 SIRT1-siRNA 转染能明显增加 TNF α 对细胞的凋亡诱导(图 4c 和 d).

2.5 白藜芦醇(SIRT1 激动剂)抑制退变髓核细胞的凋亡率
为了进一步证实 SIRT1 对髓核细胞凋亡的调节, 我们应用白藜芦醇处理退变髓核细胞. 如图 5a 所示, 白藜芦醇处理能降低髓核细胞乙酰化组蛋白 H3 的表达, 发挥了 SIRT1 激动剂的作用, 同时, 也降低了髓核细胞的凋亡率(图 5b 和 e). 同时, 我们用 TNF α (图 5c 和 e)或用低营养(含 0.5% FBS 培养基)(图 5d 和 e)进行凋亡诱导, 白藜芦醇处理能降低退变髓核细胞的凋亡敏感性.

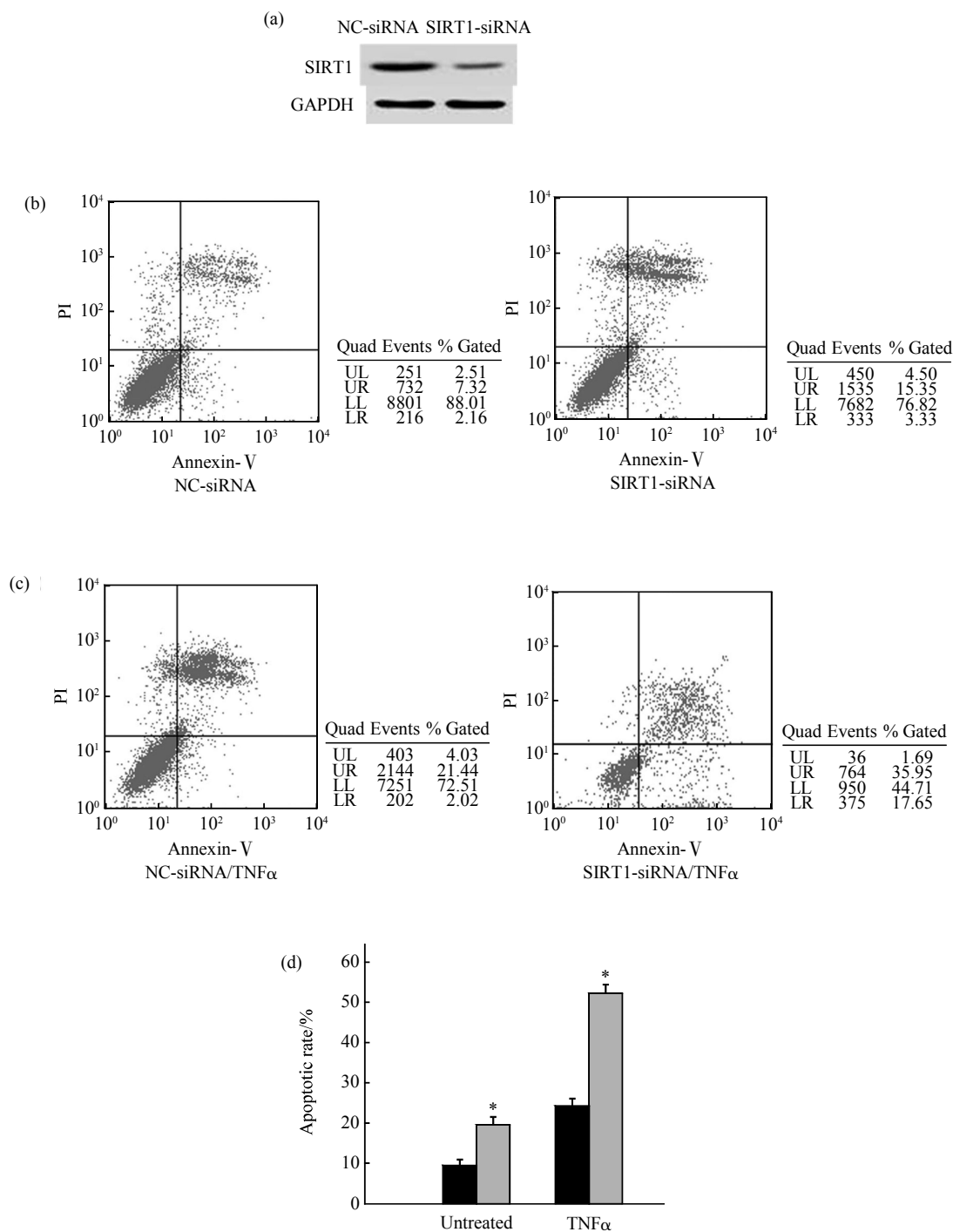


Fig. 4 Effects of SIRT1 siRNA transfection on apoptosis of degenerative human NP cells

Cells were transfected with negative control siRNA (NC-siRNA) or SIRT1-specific siRNA. Transfected degenerative NP cells were left untreated or treated with 12 $\mu\text{g/L}$ tumor necrosis factor α (TNF α) at 48 h after transfection. (a) The amounts of SIRT1 proteins were evaluated by Western blot analysis of total cell lysates. (b, c, and d) The apoptotic percentage of degenerative NP cells determined by flow cytometry. Data represents $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. ■: NC-siRNA; □: SIRT1-siRNA. * Significant difference with respect to NC-siRNA ($P < 0.05$).

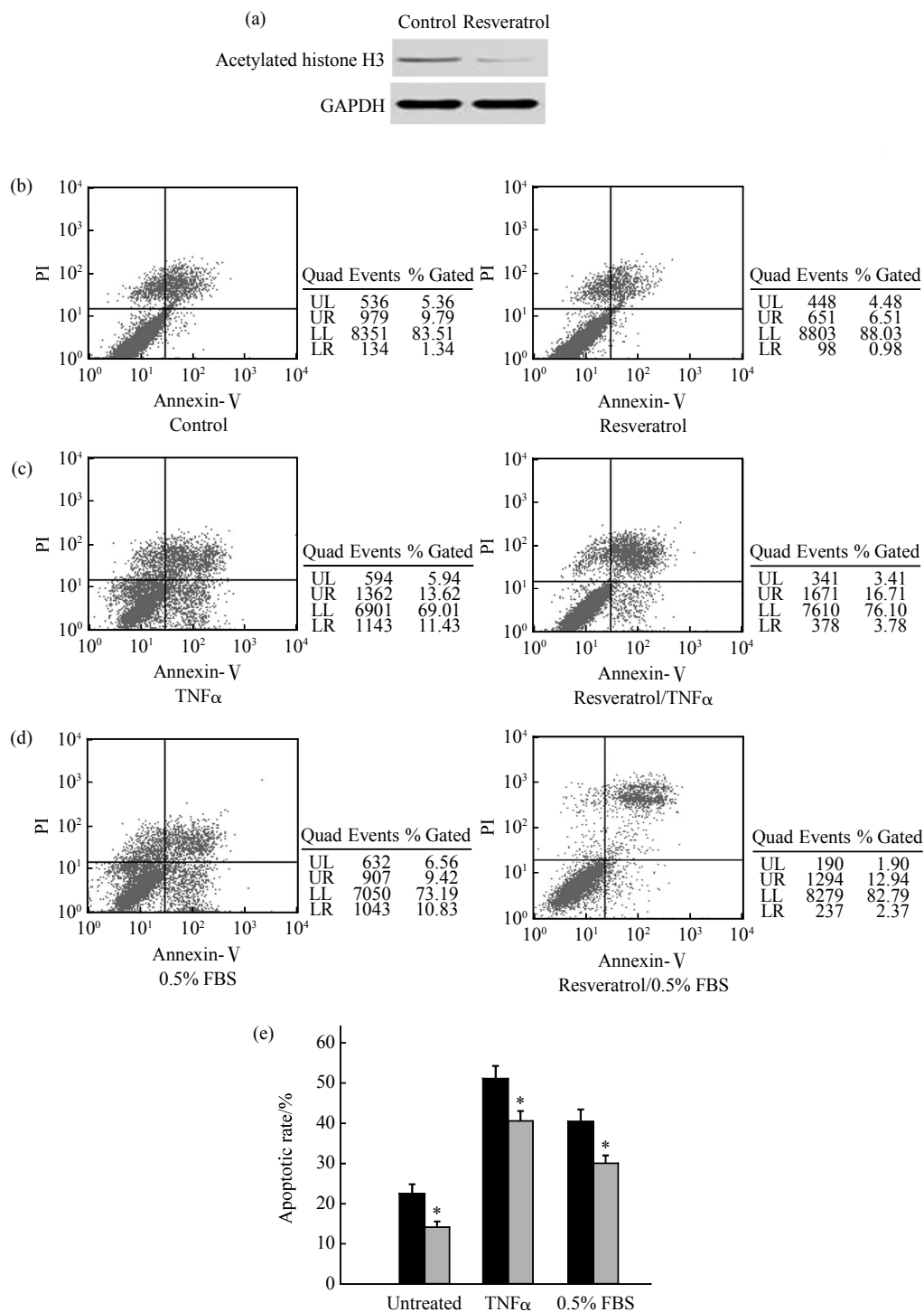


Fig. 5 Effects of SIRT1 activator, resveratrol, on apoptosis of degenerative human NP cells

Cells were treated with resveratrol (8 μ mol/L) for 48 h. (a) The levels of acetylated histone H3 in total cell lysates were analyzed by Western blot analysis. (b, c, and e) Cells were pretreated with resveratrol (8 μ mol/L) for 48 h, and then treated with or without TNF α (12 μ g/L) for 12 h, and the percentage of apoptotic cells was analysed. (d and e) Degenerative NP cells treated with resveratrol was also cultured under low serum culture medium (0.5% fetal bovine serum FBS), and the percentage of apoptotic cells was analysed. Data represents $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. *Significant difference with respect to control ($P < 0.05$). ■: Control; □: Resveratrol.

2.6 SIRT1 增加 Akt 磷酸化促进退变髓核细胞生存

为了阐明 SIRT1 参与调节髓核细胞凋亡的分

子机制, Western blot 方法分析了凋亡相关因子的表达. 由于 caspase-3 是细胞凋亡的关键执行者, 故首先检查活化 caspase-3 的表达情况. 如图 6a 和 c

所示, 与对照相比, 当白藜芦醇处理后, 细胞活化 caspase-3 蛋白的表达明显降低, 但继续用磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)

的抑制剂 LY294002 处理, 则活化 caspase-3 的表达又上升. 当 SIRT1-siRNA 转染退变髓核细胞后, 与阴性对照用 NC-siRNA 相比, 能大大增加活化

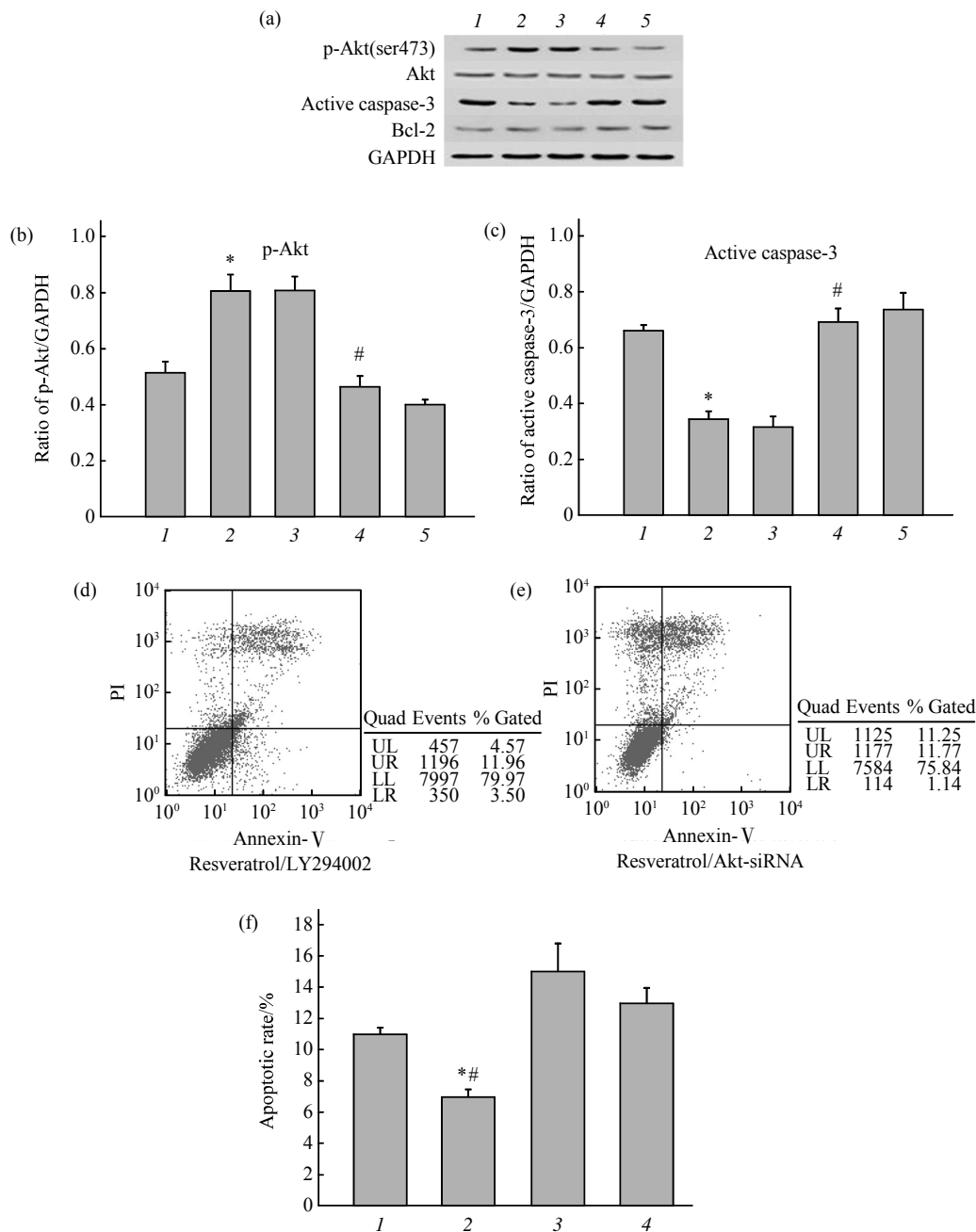


Fig. 6 Phosphorylated Akt (p-Akt), Akt, active caspase-3, Bcl-2 in human degenerative NP cells detected by Western blotting

(a) The amounts of phosphorylation of Akt at Ser473 were increased by treated with resveratrol. Treatment with resveratrol + LY294002 (10 μ mol/L) or SIRT1 siRNA inhibited phosphorylation of Akt at Ser473. Conversely, resveratrol attenuated active caspase-3, and resveratrol + LY294002 (10 μ mol/L) or SIRT1 siRNA activated caspase-3. Different treatment did not cause obvious changes in the amount of Bcl-2 in total cell lysates. 1: Control; 2: Resveratrol; 3: NC-siRNA; 4: SIRT1-siRNA; 5: Resveratrol/LY294002. (b and c) The relative density of p-Akt and active caspase-3 is expressed as the ratio (p-Akt/GAPDH, active caspase-3/GAPDH). 1: Control; 2: Resveratrol; 3: NC-siRNA; 4: SIRT1-siRNA; 5: Resveratrol/LY294002. (d, e, and f) (see also Figure 5b) Apoptotic rate was measured by flow cytometry after treatment with resveratrol + LY294002 or Akt-siRNA. Data represents $\bar{x} \pm s$ of three separate experiments. *Significant difference with respect to control or resveratrol + LY294002 group ($P < 0.05$). #Significant difference with respect to NC-siRNA group ($P < 0.05$). *#Significant difference with respect to control, resveratrol + LY294002 or Akt-siRNA group ($P < 0.05$). 1: Control; 2: Resveratrol; 3: Resveratrol/LY294002; 4: Resveratrol/Akt-siRNA.

caspase-3 的表达. 我们也分析了与线粒体相关的凋亡相关因子 Bcl-2 的表达, 意外的是, 各种处理均未发现显著的差异(图 6a).

由于 PI3K/Akt 是有关细胞生存和凋亡的信号通路, 我们分析是否参与 SIRT1 对退变髓核细胞的凋亡调节. Western blot 证实, 当白藜芦醇处理后细胞的 Akt(Ser473)磷酸化表达明显增加, 但继续用 LY294002 处理则抑制了白藜芦醇对 Akt 的磷酸化作用(图 6a 和 b). SIRT1-siRNA 转染则较 NC-siRNA 显著抑制了 Akt 的磷酸化. 各种处理对总的 Akt 无明显影响(图 6a). 为了进一步证实 PI3K/Akt 参与 SIRT1 对髓核细胞凋亡的调节, 当白藜芦醇联合 LY294002(图 5b, 6d, 6f)处理或 Akt-siRNA 转染(图 5b, 6e, 6f)则明显抑制了白藜芦醇对凋亡的抑制作用, 以上结果表明 SIRT1 是通过 Akt 信号促进髓核细胞生存.

3 讨 论

SIRT1 是依赖 NAD⁺ 的组蛋白去乙酰化酶, 而且对一些非组蛋白也能发挥去乙酰化作用, 既往研究证实, 能通过限制热量摄入, 介导基因沉默, 调节细胞增殖、分化、凋亡及衰老等多种细胞功能^[5-9, 19-20]. 但对椎间盘髓核细胞的作用目前未见报道.

为了首先探讨椎间盘髓核中 SIRT1 表达是否随着年龄及退变的增加而降低, 本研究采用临床诊断“腰椎间盘突出症”中老年患者行髓核摘除、植骨、内固定术中获取的髓核为退变的髓核组织, 而获取完全正常的人椎间盘进行实验室研究非常困难, 故我们采用来自于临床青壮年腰椎骨折病人术中髓核组织视作相对正常的髓核组织, 但必须是创伤后 24 h 内急诊减压、椎体间融合、内固定术获取的髓核, 这样尽量减少创伤对椎间盘的炎症反应. 事实证明这种对照是可行的. 通过髓核组织的免疫组化、培养的髓核细胞的荧光定量 PCR 及 Western blot 分析, 结果显示在腰椎间盘突出症的退变髓核中 SIRT1 基因及蛋白质水平表达均明显降低. 同时, 我们也发现并证实以往的一些研究^[21-24], 即在退变的髓核细胞中基质 COL2A1、聚集蛋白聚糖(aggrecan)蛋白是下降的, 起基质降解作用的 MMP 是高表达.

我们在探讨了椎间盘髓核的 SIRT1 表达情况后, 继续分析 SIRT1 是否对椎间盘髓核细胞的凋

亡有调节作用. 通过对退变髓核及 LVF 患者髓核组织的 TUNEL 检测, 我们发现在退变髓核组织中凋亡率明显增加, 这也符合并证实以往的研究报道^[2-4, 25-26]. 由于我们发现在退变的髓核细胞中, SIRT1 与细胞的凋亡率成反向关系, 于是推测 SIRT1 可能促进髓核细胞的生存, 抑制髓核细胞的凋亡. 实验结果的确如此, 当用 SIRT1 的激动剂白藜芦醇处理后, 髓核细胞的活化 caspase-3 及凋亡率均显著下降. 相反, SIRT1 抑制剂 NAM 处理或 SIRT1-siRNA 转染后则活化 caspase-3 及凋亡率增加, 同时能增加髓核细胞对 TNF α 的敏感性. 这些结果提示 SIRT1 能抑制人椎间盘髓核细胞的凋亡, 类似于保护软骨细胞的作用^[12-13, 27-28].

为了进一步探讨 SIRT1 对髓核细胞发挥保护作用的分子机制, 我们研究了 PI3K/Akt 通路. 既往研究证实 PI3K/Akt 是通过细胞外信号刺激介导细胞增殖及生存的主要信号途径^[29], 而且 PI3K/Akt 能促进髓核细胞外基质基因的合成^[30]. 故推测 PI3K/Akt 通路可能涉及 SIRT1 对髓核细胞的抗凋亡作用. 的确, 当用白藜芦醇处理细胞后, 磷酸化 Akt 的表达明显增加, 而联合 PI3K 抑制剂 LY294002 处理, 则逆转了白藜芦醇对髓核细胞 Akt 的磷酸化作用. 而 SIRT1-siRNA 转染明显抑制了 Akt 的磷酸化. 同时, 在白藜芦醇联合 LY294002 或 Akt-siRNA 处理, 阻止了白藜芦醇的髓核细胞保护作用, 凋亡率上升.

Bcl-2 是与线粒体相关的抗凋亡蛋白, 但意外的是, 髓核细胞在经过各种处理后提取的总蛋白中 Bcl-2 的表达未发现明显差异, 本研究未继续深入提取线粒体部分蛋白质进行对照检测, 尚需要加以完善.

本研究的另一个不足是: 因为退变髓核细胞的增殖能力差, SIRT1 表达质粒进行转染因效率极低未成功, 而用 SIRT1 的激动剂白藜芦醇进行代替研究, 从一定程度上影响了 SIRT1 作用的确切性, 需要继续探索安全、高效的转染途径. 另外, 为了更准确阐述 SIRT1 对髓核细胞的作用机制, 需要深入研究 PI3K/Akt 通路上下游分子激活情况.

总结全文, SIRT1 是人退变髓核细胞凋亡的重要调节器, 能通过 Akt 信号通路发挥对髓核细胞的抗凋亡作用, 这一结论为进一步深入研究探讨 SIRT1 与退变性椎间盘疾病的内在关系打下基础.

参 考 文 献

- [1] Takahashi K, Aoki Y, Ohtori S. Resolving discogenic pain. *Eur Spine J*, 2008, **17** (Suppl 4): 428–431
- [2] Gruber H E, Hanley E N Jr. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine*, 1998, **23**(7): 751–757
- [3] Zhao C Q, Jiang L S, Dai L Y. Programmed cell death in intervertebral disc degeneration. *Apoptosis*, 2006, **11** (12): 2079–2088
- [4] Bibby S R, Jones D A, Lee R B, *et al.* The pathophysiology of the intervertebral disc. *Joint Bone Spine*, 2001, **68**(6): 537–542
- [5] Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 2007, **404**(1): 1–13
- [6] Cohen H Y, Miller C, Bitterman K J, *et al.* Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*, 2004, **305**(5682): 390–392
- [7] Imai S, Armstrong C M, Kaeberlein M, *et al.* Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 2000, **403**(6771): 795–800
- [8] Longo V D, Kennedy B K. Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell*, 2006, **126**(2): 257–268
- [9] Saunders L R, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, 2007, **26**(37): 5489–5504
- [10] Alcendor R R, Gao S, Zhai P, *et al.* Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*, 2007, **100**(10): 1512–1521
- [11] Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science*, 2004, **305**(5686): 1010–1013
- [12] Takayama K, Ishida K, Matsushita T, *et al.* SIRT1 regulation of apoptosis of human chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2009, **60** (9): 2731–2740
- [13] Gagarina V, Gabay O, Dvir-Ginzberg M, *et al.* SirT1 enhances survival of human osteoarthritic chondrocytes by repressing protein tyrosine phosphatase 1B and activating the insulin-like growth factor receptor pathway. *Arthritis Rheum*, 2010, **62**(5): 1383–1392
- [14] Ota H, Eto M, Kano M R, *et al.* Induction of endothelial nitric oxide synthase, SIRT1, and catalase by statins inhibits endothelial senescence through the Akt pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, **30**(11): 2205–2211
- [15] Ohguchi K, Itoh T, Akao Y, *et al.* SIRT1 modulates expression of matrix metalloproteinases in human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol*, 2010, **163**(4): 689–694
- [16] Dvir-Ginzberg M, Gagarina V, Lee E J, *et al.* Regulation of cartilage-specific gene expression in human chondrocytes by SirT1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem*, 2008, **283**(52): 36300–36310
- [17] Pfirrmann C W, Metzendorf A, Zanetti M, *et al.* Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine*, 2001, **26**(17): 1873–1878
- [18] Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, *et al.* Human anulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype. *Spine*, 2005, **30**(24): 2743–2748
- [19] Qin W, Yang T, Ho L, *et al.* Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem*, 2006, **281**(31): 21745–21754
- [20] Smith B C, Denu J M. Sirtuins caught in the act. *Structure*, 2006, **14**(8): 1207–1208
- [21] Buckwalter J A. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine*, 1995, **20**(11): 1307–1314
- [22] Antoniou J, Steffen T, Nelson F, *et al.* The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest*, 1996, **98**(4): 996–1003
- [23] Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y, *et al.* Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 human intervertebral discs. *Spine*, 1996, **21**(1): 1–8
- [24] Le Maitre C L, Freemont A J, Hoyland J A. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. *J Pathol*, 2004, **204**(1): 47–54
- [25] Gruber H E, Johnson T L, Leslie K, *et al.* Autologous intervertebral disc cell implantation: a model using *Psammomys obesus*, the sand rat. *Spine*, 2002, **27**(15): 1626–1633
- [26] Hohaus C, Ganey T M, Minkus Y, *et al.* Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease. *Eur Spine J*, 2008, **17**(Suppl 4): 492–503
- [27] Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, *et al.* Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes *in vitro*. *Biochem Pharmacol*, 2008, **75**(3): 677–687
- [28] Dave M, Attur M, Palmer G, *et al.* The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis *via* effects on mitochondrial polarization and ATP production. *Arthritis Rheum*, 2008, **58** (9): 2786–2797
- [29] Parcellier A, Tintignac L A, Zhuravleva E, *et al.* PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal*, 2008, **20**(1): 21–30
- [30] Cheng C C, Uchiyama Y, Hiyama A, *et al.* PI3K/AKT regulates aggrecan gene expression by modulating Sox9 expression and activity in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *J Cell Physiol*, 2009, **221**(3): 668–676

Sirtuin 1 Maintains Survival *via* PKB Signaling in Degenerative Human Disc Nucleus Pulposus Cells*

WANG Da-Wu, HU Zhen-Ming**, HAO Jie, HE Bin, GAN Qiang, ZHONG Xiao-Ming, SHEN Jie-Liang, FANG Ji

(Department of Orthopedic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Many studies have demonstrated that Sirtuin 1, an NAD⁺-dependent deacetylase, reduces apoptosis in several different cells. However, the role of Sirtuin 1 in apoptosis of disc nucleus pulposus (NP) cells remains unclear. The present study was performed to determine whether degenerative human NP would express Sirtuin 1, and to investigate the role of Sirtuin 1 in NP cells apoptosis. Here we show that Sirtuin 1 mRNA and protein levels in disc NP from patients (< 25 years) with lumbar vertebra fracture (LVF) are greater than those in degenerative disc NP from patients (> 55 years) with lumbar disc herniation (LDH). The rate of apoptosis was far fewer in resveratrol-treated NP cells than that in siRNA transfected or nicotinamide-treated NP cells. We also tried to explore the signaling molecules that mediate the protective property of Sirtuin 1 by Western blot and inhibitor analysis. After Sirtuin 1 siRNA transfected, NP cells decreased phosphorylation of Akt, while resveratrol phosphorylated Akt. Treatment with LY294002 or Akt siRNA increased the rate of apoptosis. Our results indicate that Sirtuin 1 plays a critical role in survival of degenerative human NP cells through the Akt anti-apoptotic signaling pathway.

Key words Sirtuin 1, nucleus pulposus cells, survival, PKB signaling, intervertebral disc, degenerative disc disease

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00484

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81171751).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-89011479, E-mail: zhenminghu62@yahoo.com.cn

Received: October 26, 2011 Accepted: February 3, 2012