

# Caspase-9 抑制剂对 SD 大鼠椎间盘 软骨终板细胞凋亡的影响

卢伟<sup>1</sup>, 李德芳<sup>1</sup>, 朱斌<sup>2</sup>, 吴靖平<sup>1</sup>

(1. 复旦大学附属金山医院骨科, 上海 201508; 2. 安徽医科大学第二附属医院骨科, 合肥 230601)

**【摘要】** 目的 探讨 caspase-9 抑制剂对低胎牛血清培养诱导的大鼠椎间盘软骨终板细胞凋亡影响的研究。方法 取 3 月龄 SD 大鼠椎间盘软骨终板, 序贯消化法获取细胞原代培养, 以 1% FBS 培养 48 h 为诱导凋亡条件。实验分为 1% FBS 凋亡组、caspase-9 抑制剂组(Z-LEHD-FMK)及 DMSO 对照组, 分别处理细胞 48 h, 后经流式细胞仪检测细胞凋亡率、Western blot 检测 procaspase-9, active caspase-9 及 active caspase-3 的表达。结果 流式细胞仪检测显示, caspase-9 抑制剂组细胞凋亡率(26.3 ± 2.56)% 与 1% FBS 组(40.8 ± 0.84)% 及 DMSO 组(40.2 ± 1.56)% 相比凋亡率较低, 有显著统计学差异( $P < 0.05$ ); Western blot 检测 caspase-9 抑制剂组 active caspase-9 及 active caspase-3 较 1% FBS 凋亡组及 DMSO 对照组表达均明显减少, 有显著统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 Caspase-9 抑制剂能明显抑制低胎牛血清培养诱导的大鼠椎间盘软骨终板细胞凋亡, 有望成为治疗椎间盘退变的新型药物。

**【关键词】** caspase-9 抑制剂; 胎牛血清; 软骨终板; 凋亡

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0017-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.004

## Effect of caspase-9 inhibitor on apoptosis in cartilage endplate chondrocytes in rat vertebrae

LU Wei<sup>1</sup>, LI De-fang<sup>1</sup>, ZHU Bin<sup>2</sup>, WU Jing-ping<sup>1</sup>

(1. Department of Orthopedics, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508, China;

2. Department of Orthopedics, the Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 200032, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the effect of caspase-9 inhibitor on low fetal bovine serum (FBS)-induced apoptosis in cartilage endplate chondrocytes in SD rat vertebrae. **Methods** Disc cartilage endplates were obtained from 3-month old SD rats and subjected to sequential digestion to harvest chondrocytes for primary culture, and apoptosis was induced by 1% FBS for 48 hours. Three groups of chondrocytes were treated by 1% FBS, caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK) and DMSO, respectively. After 48 hours, apoptosis was detected by DAPI staining and flow cytometry. The expression of procaspase-9, active caspase-9 and active caspase-3 was monitored by Western blot. **Results** Compared with the 1% FBS group (40.8 ± 0.84)% and DMSO group (40.2 ± 1.56)%, the apoptosis rate of the caspase-9 inhibitor group (26.3 ± 2.56)% was significantly lower ( $P < 0.05$ ). The expressions of active caspase-9 and active caspase-3 in the caspase-9 inhibitor group were significantly lower than those in the other two groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Caspase-9 inhibitor can inhibit low FBS-induced apoptosis in cartilage endplate chondrocytes of rat vertebrae, and might become a new drug for the treatment of disc degeneration.

**【Key words】** Caspase-9 inhibitor; Fetal bovine serum; Cartilage endplate; Apoptosis Chondrocytes; Vertebra; Rat

[基金项目]上海市卫生局科研项目(编号:2009-35)。

[作者简介]卢伟(1985年-),男,骨科硕士在读,研究方向为椎间盘退变预防与治疗,E-mail: doctor\_weilu@163.com

[通讯作者]吴靖平,主任医师,硕士生导师,研究方向为椎间盘退变预防与治疗,E-mail: wu\_j\_p@hotmail.com

椎间盘退变是一系列脊柱退行性疾病(如椎间盘突出症、椎管狭窄症、腰椎滑脱症等)发生的前提条件和病理基础,脊柱退行性疾病是骨科常见病、多发病<sup>[1]</sup>。研究表明软骨终板退变是导致椎间盘退变的始动因素<sup>[2]</sup>。凋亡目前被认为是软骨终板退变发生的关键因素,这一过程主要由含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)的激活介导的。应用低胎牛血清法培养大鼠椎间盘软骨终板细胞可诱导软骨终板细胞凋亡并建立椎间盘软骨终板细胞凋亡体外模型<sup>[3]</sup>。模型的建立为探讨凋亡机制以及探索治疗椎间盘退变的新方法提供了条件。本研究采用 caspase-9 抑制剂 Z-LEHD-FMK(氟甲基酮)进行抑制 caspase-9 活化实验,初步探讨低胎牛血清培养椎间盘软骨终板细胞凋亡机制并寻求新的椎间盘退变的药物治疗方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂与仪器

DMEM 高糖型培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、双抗(Gibco 公司,美国);caspase-9 抑制剂 Z-LEHD-FMK(R&D Systems,美国);二甲基亚砜 DMSO(Sigma 公司,美国);Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒(KeyGEN BioTech,中国);caspase-3、8 抗体(CST 公司,美国);BCA 试剂盒(碧云天公司,中国)。

培养瓶、6 孔及 96 孔细胞培养板(Corning 公司,美国);二氧化碳细胞培养箱、超净工作台(上海力申科学仪器有限公司,中国);倒置相差显微镜(Olympus 公司,日本);FACScan 流式细胞仪(BD 公司,美国)。

#### 1.1.2 实验动物

清洁级 SD 大鼠 20 只,12 周龄,雌雄不限,体重 230 ~ 260 g,来源于上海市公共卫生临床中心【SCXK(沪)2010-0024】。无菌手术在上海市公共卫生临床中心实验动物科学部屏障动物实验设施进行【SYXK(沪)2010-0098】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 SD 大鼠椎间盘软骨终板细胞的分离与培养

12 周龄 SD 大鼠,雌雄不限,水合氯醛腹腔麻醉后颈椎脱臼法处死,常规消毒,无菌条件下取下整个腰椎,解剖显微镜下剥离包裹脊柱的筋膜和肌肉显露

椎间盘,将脊柱标本用预先准备的无菌 PBS 液洗涤 3 遍,分离软骨终板,放入盛有 PBS 液的锥形瓶中,剪碎成 0.3 ~ 0.5 mm<sup>3</sup> 的组织块,移入 15 mL 离心管中,用含双抗的 PBS 液冲洗软骨终板 3 次。采用序贯消化法获取软骨终板细胞。用预先配制好的完全培养基 DMEM(含有 10% FBS、1% 双抗)重悬沉淀物,将细胞团吹打成单个细胞后用 0.22 μm 滤网过滤,收集滤液,1000 r/min 离心 5 min,弃上清;加入完全 DMEM 液 3 mL 清洗离心(1000 r/min,5 min)去上清液,重复 3 次。加入适量(约 6 ~ 8 mL)含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养液,以约 2 × 10<sup>4</sup> 的密度接种于培养瓶中,将培养板置于含 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的细胞培养箱中培养,每 3 天换液一次,倒置显微镜观察细胞贴壁及生长情况。细胞融合为单层时,进行传代,用 0.25% 胰蛋白酶消化,收获细胞制成细胞悬液,按 2 × 10<sup>5</sup>/mL 接种于新的六孔培养板中。

#### 1.2.2 建立低胎牛血清椎间盘软骨终板细胞凋亡模型

按照李德芳等<sup>[3]</sup>的方法建立低胎牛血清椎间盘软骨终板细胞凋亡模型。接种于 6 孔培养板中的软骨终板细胞,用 DMEM + 10% FBS + 1% 双抗培养基 2 mL,5% CO<sub>2</sub>、95% 湿润空气、37℃,24 h 后换液,改用含 1% FBS 的培养基进行培养。随机进入各实验分组。

#### 1.2.3 实验分组

随机分为 3 组:A 组为 1% FBS 凋亡组;B 组为 caspase-9 抑制剂组,即在用 1% FBS 诱导凋亡同时向培养基中加入 caspase-9 抑制剂 Z-LEHD-FMK,使其终浓度为 50 μmol/L;C 组为 DMSO 对照组,因 caspase-9 抑制剂在配制时需用 DMSO 作为溶剂,而 DMSO 本身是对细胞有毒性的化学物质,为排除 DMSO 对试验的干扰,增此一组,在用 1% FBS 诱导凋亡同时向培养基中加入 DMSO,使 DMSO 终浓度亦为 50 μmol/L。

#### 1.2.4 流式细胞仪检测软骨终板细胞凋亡率

采用 annexin V-FITC 联合 PI 法进行。检测结果判断:正常活细胞 annexin V、PI 均低染;凋亡细胞 annexin V 高染、PI 低染;坏死细胞 annexin V、PI 均高染。培养 48 h 后,收集各孔培养基的上清液(其中包含漂浮细胞),贴壁的细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集,二者混合后进行离心弃上清,孵育 an-

nexin V-FITC 与 PI 染色剂,上机 FACSscan 进行凋亡率检测。本实验中“凋亡”细胞包括早期和晚期凋亡细胞,实验独立重复三次。

1.2.5 Western blot 检测 caspase-9 和 caspase-3 的表达

培养 48 h 后,收集各孔培养基的上清液(其中包含漂浮细胞),贴壁细胞胰酶消化收集,二者混合后进行离心弃上清。每孔加入 RIPA 裂解液 100  $\mu$ L 冰上裂解 30 min,不断吹打,收集裂解液 4 $^{\circ}$ C 离心取上清液,BCA 试剂盒定量。细胞蛋白上样量 50  $\mu$ g,12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),先行 SDS-PAGE 胶染色确定待测蛋白的表达。重复 SDS-PAGE 凝胶电泳,分离蛋白并转至 PVDF 膜上,室温下 5% 脱脂奶粉(含 1% Tween20)封闭 1h,此后在 4 $^{\circ}$ C 时孵育一抗 caspase-9 (1:500)、caspase-3 (1:3000)、PVDF 膜用 TBST 液清洗 3 遍后,室温下孵育辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠的二抗 1h,再次 TBST 清洗三遍后,采用增强型化学发光系统发光,曝光。以  $\beta$ -actin 作为内参。

1.2.6 统计学分析

采用 STATA 10.0 软件进行统计分析。所有的实验独立重复三次,数据分布以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,进行成对样本的独立 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨终板细胞凋亡率

流式细胞仪结果显示:1% FBS 凋亡组获得较好的诱导凋亡效果,平均凋亡率为 (40.8  $\pm$  0.84)%,DMSO 组凋亡率为 (40.2  $\pm$  1.56)%,与 1% FBS 组比较,DMSO 对细胞凋亡未产生明显影响 ( $P > 0.05$ );而 caspase-9 抑制剂组凋亡率为 (26.3  $\pm$  2.56)%,抑制剂组与 1% FBS 组及 DMSO 对照组比较凋亡率明显降低,差异有显著性 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。

2.2 凋亡相关蛋白的检测

Western blot 对凋亡相关蛋白的检测显示,在 1% FBS 凋亡组、DMSO 对照组以及 caspase-9 抑制剂组中,procaspase-9 表达均较高,1% FBS 凋亡组与 DMSO 对照组中的 active caspase-9 表达亦较高,但在 caspase-9 抑制剂组中的 active caspase-9 表达却较低(图 2)。进一步观察 caspase-3 的表达情况,结果发现各组 active caspase-3 均表达,但在 caspase-9 抑制剂组,其表达较 1% FBS 凋亡组和 DMSO 对照组灰度明显降低,差异有显著性 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。这说明加入 caspase-9 抑制剂能明显抑制 procaspase-9 活化为有功能的 active caspase-9,并且使凋亡执行者 caspase-3 的活化减少,从而抑制细胞的凋亡。

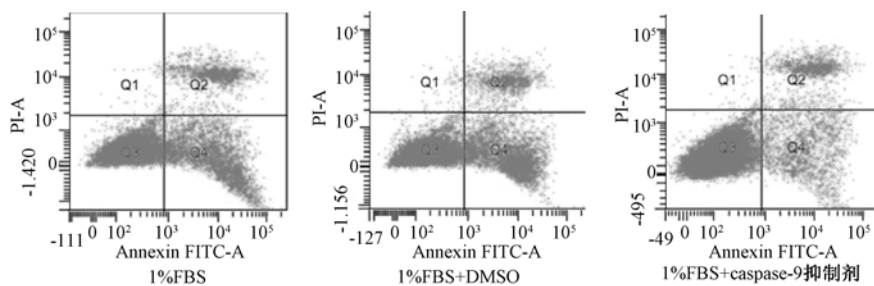


图 1 流式细胞仪检测软骨终板细胞凋亡率

Fig.1 Apoptosis rate of cartilage endplate chondrocytes detected by flow cytometry

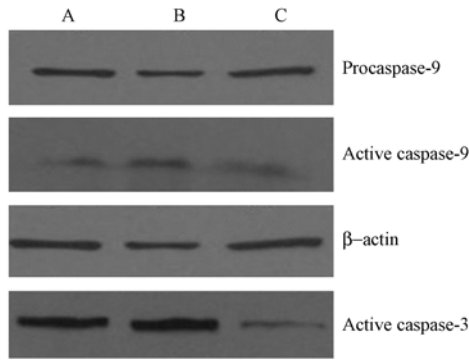
表 1 caspase-3 表达灰度分析

Tab.1 Analysis of the expression of caspase-3

| 组别 Groups      | $\beta$ -actin | Active caspase-3 | 比值 Ratio |
|----------------|----------------|------------------|----------|
| 1% FBS 凋亡组     | 7536.229       | 12425.640        | 1.648    |
| DMSO 对照组       | 8274.362       | 11569.426        | 1.398    |
| Caspase-9 抑制剂组 | 11089.660      | 709.496          | 0.063 *  |

注 FBS 凋亡组及 DMSO 对照组比较, \*  $P < 0.05$

Note: \* Compared with 1% FBS apoptosis group and DMSO control group,  $P < 0.05$



注: A:1% FBS 凋亡组;B:DMSO 对照组;C:Caspase-9 抑制剂组。

图 2 各组的 caspases 表达的变化

Note. A. 1% FBS apoptosis group. B. DMSO control group. C. caspase-9 inhibitor group

Fig. 2 Changes of expression of caspases in the chondrocytes of rat vertebrae.

### 3 讨论

椎间盘退变引起的椎间盘突出是临床上的常见病和多发病,显著影响患者的生活质量并伴有高致残率。临床上尚无有效的治疗椎间盘退变方法,仅在其产生神经压迫或脊柱不稳定时采用手术方法予以病变椎间盘切除和固定,虽然在一定程度上可缓解临床症状,但不能恢复椎间隙高度和承载应力能力。目前针对椎间盘退变修复的实验研究包括:注射生长因子、转基因、细胞移植等方法促进基质再生,修复受损的椎间盘基质<sup>[4,5]</sup>,但仍需解决如生长因子在体内半衰期短、转基因的生物安全、细胞获取等方面的问题,至今仍未取得满意的结果。如何通过早期抑制椎间盘退变,从根本上防治椎间盘退行性病变的发生发展,还需要探索椎间盘退变的机制以及寻求治疗的新方法。

凋亡,又称细胞程序性死亡,是指有核细胞在一定条件下启动自身内部机制,通过内源性 DNA 内切酶的激活而发生的细胞自然死亡过程,它通常伴有细胞核内染色质聚集、DNA 断裂及凋亡小体形成等病理变化<sup>[6]</sup>。细胞内外的刺激因素,如相应配体结合死亡受体、紫外线照射、电离辐射、抗癌药物、生长因子缺乏、过度表达某些癌基因或抑癌基因均可以引起细胞发生凋亡,凋亡后期的共同途径是 caspase 的激活<sup>[7]</sup>。caspase 是一类与凋亡密切相关的蛋白水解酶家族,以 caspase 前体酶原的形式存在于细胞中,是细胞凋亡的核心成分。目前已发现 14 种,分启动 caspase (如 caspase-8, 9) 和效应 caspase (如

caspase-3, 7) 两类,分别参与凋亡的启动和执行过程。在整个凋亡通路中,最终都是激活效应 caspase-3 而执行凋亡<sup>[8,9]</sup>。近年来的研究结果显示凋亡与椎间盘退变关系密切<sup>[10]</sup>,研究发现,椎间盘退变的重要因素是软骨细胞凋亡,且目前研究表明凋亡是椎间盘软骨终板内细胞数量减少的主要原因,并在椎间盘软骨终板退变过程中起重要作用<sup>[11,12]</sup>。在凋亡 caspase 级联反应过程中,caspase-3 处于核心地位,是细胞凋亡的主要效应因子和最重要的凋亡执行者,是细胞凋亡发生的关键步骤及一切凋亡信号传导的共同通路<sup>[13]</sup>。如此关键的因子,针对其进行干预一定要非常小心,因为生物体的凋亡过程是新陈代谢的重要过程,与许多疾病的发生有直接或间接的关系,如肿瘤、自身免疫性疾病等<sup>[14,15]</sup>,若对 caspase-3 进行抑制,则包括细胞生理性凋亡在内一起抑制,可能导致细胞无限增殖,引起肿瘤等疾病。目前有研究表明,软骨终板细胞凋亡可能主要经线粒体途径<sup>[16]</sup>(由 caspase-9 起始),所以我们利用抑制剂抑制线粒体途径启动 caspase-9,从而避免完全抑制凋亡导致其他疾病的发生。

由于 caspase 蛋白水解酶家族是凋亡过程的中心环节,因此对 caspase 抑制剂的研究有着重要的理论和实际意义。目前已知的 caspase 抑制剂主要包括:病毒及内源性的 caspase 抑制剂、人工合成 caspase 抑制剂。在体外实验中,多数 caspase 抑制剂受到细胞膜通透性的限制,不能进入细胞发挥作用。人工合成 caspase-9 抑制剂 Z-LEHD-FMK(氟甲基酮),它是一种能不可逆地抑制 caspase-9 活性的人工合成短肽化合物,分子量小,特异性较高,并且连接 FMK 基团,因 FMK 衍生物能形成通透性较高的 P1 天冬氨酸的甲基脂类,对细胞膜具有高通透性,在较低浓度即发挥很好抑制作用<sup>[17-19]</sup>,适合于体外实验研究。

在此基础上,本实验利用低胎牛血清法建立的椎间盘软骨终板细胞凋亡体外模型<sup>[3]</sup>,该模型是一种非细胞损伤的模拟椎间盘退变时内环境变化(低营养供给)的细胞凋亡模型,它具有较好的可重复性、易于操作、经济,且能完成从细胞分子水平对椎间盘退变细胞改变进行定性、定量分析。实验应用 caspase-9 抑制剂 Z-LEHD-FMK(氟甲基酮),对体外低浓度胎牛血清培养条件下的椎间盘软骨终板细胞进行干预,利用流式细胞仪及 Western blot 技术检测细胞培养后凋亡率的变化以及凋亡相关蛋白的表达

情况。流式细胞仪显示 caspase-9 抑制剂组与 1% FBS 凋亡组及 DMSO 对照组比较凋亡明显降低,有显著统计学差异( $P < 0.05$ )。Western blot 显示在 caspase-9 抑制剂组中, active caspase-9 表达较其他两组低,并且 caspase-9 抑制剂组中 active caspase-3 表达灰度较其他两组明显较低( $P < 0.05$ )。结果表明抑制 caspase-9 的激活能明显降低胎牛血清培养条件下诱导的软骨终板细胞凋亡。

综上所述,在体外条件下,caspase-9 抑制剂能抑制低胎牛血清培养下诱导的椎间盘软骨终板细胞凋亡。从而为研究用抑制剂抑制 caspase 激活的方法逆转细胞凋亡及椎间盘退变提供了一个很有希望的研究方向,但人工合成 caspase 抑制剂真正应用到临床仍需克服以下问题:(1)具有一定的毒副作用,如 600 mmol/L 的 Z-VAD-FMK 能够导致培养的张氏肝细胞有丝分裂后期阻滞<sup>[20]</sup>; (2)代谢不稳定,体内广泛存在蛋白、多肽酶,肽类抑制剂作为其天然底物,会在体内迅速酶解、失活,不能以有效浓度持续足够长时间。这需要对于治疗的 caspase 抑制剂进行包装或改进以便于通过口服或其他途径用于临床治疗椎间盘退变。相信在不久的将来,随着相关研究的不断深入,caspase-9 抑制剂有望成为治疗椎间盘退变的一种有效方法。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] 黄宗强,刘尚礼,郑召民. 椎间盘退变的分子生物学研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(01):55-58.
- [ 2 ] Shirazi-Adl A, Taheri M, Urban J P. Analysis of cell viability in intervertebral disc: effect of endplate permeability on cell population [J]. J Biomech, 2010, 43(7):1330-1336.
- [ 3 ] 李德芳,吴靖平,朱斌,等. 大鼠椎间盘软骨终板细胞凋亡体外模型的建立 [J]. 中国矫形外科杂志, 2013(02):172-177.
- [ 4 ] Walsh A J, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs [J]. Spine (Phila Pa), 2004, 29(2):156-163.
- [ 5 ] Nishida K, Kang JD, Suh JK, et al. Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration [J]. Spine (Phila Pa), 1998, 23(22):2437-2442, 2443.
- [ 6 ] Goyeneche AA, Harmon JM, Telleria CM. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis [J]. Reproduction, 2006, 131(1):103-111.
- [ 7 ] Larsen BD, Rampalli S, Burns LE, et al. Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(9):4230-4235.
- [ 8 ] Kim KW, Ha KY, Lee JS, et al. The apoptotic effects of oxidative stress and antiapoptotic effects of caspase inhibitors on rat notochordal cells [J]. Spine (Phila Pa), 2007, 32(22):2443-2448.
- [ 9 ] Park JB, Park IC, Park SJ, et al. Anti-apoptotic effects of caspase inhibitors on rat intervertebral disc cells [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(4):771-779.
- [ 10 ] Zhao CQ, Jiang LS, Dai LY. Programmed cell death in intervertebral disc degeneration [J]. Apoptosis, 2006, 11(12):2079-2088.
- [ 11 ] Gruber HE, Hanley EJ. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls [J]. Spine (Phila Pa), 1998, 23(7):751-757.
- [ 12 ] Lotz JC, Chin JR. Intervertebral disc cell death is dependent on the magnitude and duration of spinal loading [J]. Spine (Phila Pa), 2000, 25(12):1477-1483.
- [ 13 ] Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system [J]. Immunity, 2009, 30(2):180-192.
- [ 14 ] Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30:87.
- [ 15 ] Nagata S. Apoptosis and autoimmune diseases [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1209:10-16.
- [ 16 ] Hirai T, Chagin AS, Kobayashi T, et al. Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signaling is required for maintenance of the growth plate in postnatal life [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(1):191-196.
- [ 17 ] Ekert P G, Silke J, Vaux DL. Inhibition of apoptosis and clonogenic survival of cells expressing crmA variants: optimal caspase substrates are not necessarily optimal inhibitors [J]. EMBO J, 1999, 18(2):330-338.
- [ 18 ] Gurevich RM, Regula KM, Kirshenbaum LA. Serpin protein CrmA suppresses hypoxia-mediated apoptosis of ventricular myocytes [J]. Circulation, 2001, 103(15):1984-1991.
- [ 19 ] Ekert P G, Silke J, Vaux D L. Caspase inhibitors [J]. Cell Death Differ, 1999, 6(11):1081-1086.
- [ 20 ] Swe M, Sit KH. zVAD-fmk and DEVD-cho induced late mitosis arrest and apoptotic expressions [J]. Apoptosis, 2000, 5(1):29-36.

[收稿日期] 2014-06-03