

## • 基础研究 •

## DR5、DcR2 在腰椎间盘突出中的表达及其意义

马斌,牛涛,胡有谷,陈伯华

[摘要] 目的 观察 DR5、DcR2 在腰椎间盘突出组织中的表达分布及其意义。方法采用免疫组化技术检测腰椎间盘突出症 60 例、正常成人腰椎间盘突出 22 例(8 例);实时荧光定量 RT-PCR 技术检测腰椎间盘突出症 30 例、正常成人椎间盘突出 9 例(3 例)中 DR5 和 DcR2 的表达。结果 免疫组化检测显示,腰椎间盘突出症患者 DR5 细胞阳性率为 41.60%;正常腰椎间盘突出组细胞阳性率为 26.09%,两者间的差异有非常高度显著性意义( $P=0.001$ );DR5 mRNA 定量分析进一步支持免疫组化结果( $P=0.025$ )。DcR2 蛋白和 mRNA 表达两组间的差异无显著性意义。结论 腰椎间盘突出组织中存在 DR5/TRAIL 诱导的凋亡途径。

[关键词] 腰椎;椎间盘;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体

**Expression of DR5 and DcR2 in Human Lumbar Intervertebral Disc** MA Bin, NIU Tao, HU You-gu, et al. The Department of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Qingdao Medical College, Qingdao 266003, Shandong, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of DR5 and DcR2 protein and mRNA in lumbar intervertebral disc (LID) of patients with prolapse of LID and normal controls. **Methods** The expression and distribution of DR5 and DcR2 protein were immunostained in prolapsed LIDs of 60 patients and 22 normal LIDs of 8 normal controls. In parallel, mRNA of DR5 and DcR2 was quantified by real time fluorescent reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in prolapsed LIDs of 30 patients and 9 normal LIDs of 3 normal controls. **Results** The positive rates of DR5 protein in prolapsed IVDs and normal IVDs were 41.60% and 26.09% respectively. There were a significant difference between the two groups ( $P=0.001$ ). Further similar evidences were obtained by quantification of DR5 mRNA ( $P=0.025$ ). There was no difference in the expression of DcR2 protein and mRNA between the two groups. **Conclusion** The apoptosis pathway induced by DR5/tumor necrotic factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) maybe exists in LID tissues.

**Key words:** lumbar vertebrae; intervertebral disc; tumor necrotic factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL); TRAIL receptor

[中图分类号] R681.5 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)06-0535-02

[本文著录格式] 马斌,牛涛,胡有谷,等. DR5、DcR2 在腰椎间盘突出中的表达及其意义[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(6): 535-536.

新近发现的肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrotic factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)及其受体(TRAIL receptor, TRAIL-R)在凋亡中的作用,引起了广大学者的重视。但有关其在椎间盘组织中表达情况的报道较少。本研究观察椎间盘组织中 TRAIL-R——死亡受体 5(death receptor 5, DR5)和死亡诱骗受体 2(decoy receptor 2, DcR2)的表达情况,意在探讨 DR5/TRAIL 凋亡途径与腰椎间盘突出细胞凋亡间的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 取材及分组** 标本分为 2 组:①实验组( $n=60$ ):取自腰椎间盘突出症患者经手术摘除的椎间盘组织( $L_3-L_4$  节段 2 例、 $L_4-L_5$  节段 34 例、 $L_5-S_1$  节段 24 例),患者为男性 31 例、女性 29 例,年龄 18~68 岁,平均 45 岁,病史 7 d~18 年,平均 16 周;包含型突出椎间盘 40 例、非包含型突出椎间盘 20 例;②对照组( $n=22$ ):取自 8 位非正常死亡正常成人,均身体健康且无腰椎间盘突出病史,其中男性 7 例、女性 1 例,年龄 18~22 岁,平均 19 岁,共获得椎间盘组织 22 个( $L_3-L_4$  节段 7 个、 $L_4-L_5$  节

段 8 个、 $L_5-S_1$  节段 7 个)。所取标本均包括髓核和纤维环,生理盐水冲洗血迹,送往病理科石蜡包埋。实验组 30 个、对照组取自 3 名正常成人的 9 个椎间盘组织封闭于 EP 管内,冻存于  $-70^\circ\text{C}$  超低温冰箱中,用于 RT-PCR 检测。

**1.2 PV6000 两步法免疫组织化学染色** 1 抗为兔抗人多克隆抗体(DR5 稀释浓度 1:80;DcR2 稀释浓度 1:200,英国 Abcam 公司)。所有标本均在同一条件下采用 PV6000 两步免疫组织化学染色法检测。DR5 阳性对照选用经病理诊断为肺癌的病理石蜡切片(DcR2 选用子宫颈癌切片),用 PBS 代替 1 抗作为阴性对照,细胞浆内出现棕黄色颗粒样物质为阳性。

每张切片随机选取髓核和纤维环区域各 10 个高倍镜视野,分别记数每个视野的阳性细胞数及总细胞数,再将 10 个高倍镜视野细胞数相加,得出每个样本髓核、纤维环细胞阳性表达率(总阳性细胞数/总细胞数),总体细胞阳性率=(髓核+纤维环)总阳性细胞数/(髓核+纤维环)总细胞数。

**1.3 实时荧光定量 RT-PCR** 按照 TRNzo1-A+试剂(北京天根生化公司)说明书提取总 RNA,三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参,引物和 Taqman 探针(上海生工合成)序列见表 1,按照 TaKaRa 荧光定量试剂盒(大连宝生物公司)说明书将提取的 RNA 反转录为 cDNA。反转录条件如下:37℃水浴 15 min,85℃热水灭酶 5 s。再以 cDNA 为模板,上下游引物、探针为引导,在 ABI 7500 Re-

作者单位:青岛大学医学院附属医院脊柱外科,山东青岛市 266003。作者简介:马斌(1982-),男,山西高平市人,硕士研究生,主要研究方向:脊柱外科。通讯作者:陈伯华(1957-),男,山东青岛市人,主任医师,博士,主要研究方向:脊柱外科。

al- Time PCR 仪上进行扩增。扩增条件如下:95℃ 10 s,95℃ 5 s,60℃ 45 s,扩增 40 个循环。由计算机得到 CT 值,运用公式  $2^{-\Delta\Delta CT}$  得到 DR5 和 DcR2 的相对表达量。

表 1 DR5、DcR2 和 GAPDH 的引物及探针序列

	DR5	DcR2	GAPDH
上游引物	5'-AGCAGAGCCA ACAGGTGTCA-3'	5'-TGTGGTTGTG GTTGGCTTTTG-3'	5'-CTTAGCACC CCTGGCCAAG-3'
下游引物	5'-AGGGCACCAAG TCTGCAAAGT-3'	5'-GGGTGGGCTG CAAGTATCTGT-3'	5'-GATGTTCTGG AGAGCCCCG-3'
Taqm 探针	5'-TCAGAGGAGGAGG CTGCTGGTTCCA-3'	5'-TCAAAGGCATCTG CTCAGGTGGTGG-3'	5'-CATGCCATCACTG CCACCCAGAAG-3'
扩增长度	170bp	194bp	150bp

1.4 统计学处理 用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学处理,采用两独立样本 *t* 检验和方差分析。如果方差不齐,采用非参

数统计。  
2 结果  
2.1 DR5 蛋白在各组的表达情况 实验组阳性表达率高于对照组( $P=0.001$ ),见表 2 及封三图 2.1~图 2.4。  
2.2 DcR2 蛋白在各组的表达情况 实验组与对照组间 DcR2 蛋白的表达无显著性差异( $P>0.05$ ),见表 2 及封三图 2.5~图 2.8。  
2.3 mRNA 的阳性表达情况 实验组与对照组均检测到 DR5 以及 DcR2 mRNA 的表达,实验组 DR5 mRNA 的表达高于对照组( $P<0.05$ ),但 DcR2 mRNA 的表达与对照组比较无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 2 DR5 和 DcR2 在实验组与对照组的表达情况( $\bar{x}\pm s$ )

组别	DR5 细胞阳性率(%)			DcR2 细胞阳性率(%)		
	髓核	纤维环	总体	髓核	纤维环	总体
实验组	50.16±24.01	28.04±12.39	41.60±17.16	30.21±24.45	13.87±14.75	24.30±16.47
对照组	35.86±30.53	13.09±7.28	26.09±18.19	22.55±26.22	14.46±15.71	18.31±20.97
<i>t</i>	2.218	5.437	3.577	1.234	-0.42	1.137
<i>P</i>	0.029	0.000	0.001	0.221	0.966	0.259

3 讨论

TRAIL 是肿瘤坏死因子(tumor necrotic factor,TNF)超家族成员之一。TRAIL 有 4 种与其特异结合的膜受体—TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3 和 TRAIL-R4。TRAIL-R2 亦称 DR5,与 TRAIL 结合后,可引起细胞凋亡。TRAIL-R1 亦称 DR4,与 TRAIL-R2 作用类似,与 TRAIL 结合后可诱导细胞凋亡。TRAIL-R4 亦称 DcR2,因其可以和 TRAIL 结合,但并不下传 TRAIL 介导的死亡信号,故被称为诱骗受体。TRAIL-R3 亦称 DcR1,为另一种诱骗受体,不能介导 TRAIL 的凋亡信号。配体依赖型受体 DR5 经 TRAIL 活化后,DR5 胞浆内的死亡结构域与 Fas 相关死亡域蛋白的死亡结构域相偶联后,形成死亡诱导信号复合体。随后,Fas 相关死亡域蛋白通过和 caspase-8 的相互作用,导致 caspase-8 形成寡聚体,并驱使其自身活化。活化的 caspase-8 进一步活化 caspase-3、caspase-7 等,使细胞 DNA 断裂,最终导致细胞发生凋亡<sup>[1,2]</sup>。DcR2 的胞内区仅有一段被截短的 DD,因此不能传递 TRAIL 介导的死亡信号<sup>[3]</sup>。

TRAIL 在大部分正常组织均有表达<sup>[4]</sup>,如脾脏、前列腺、肺、胎盘、胰腺、肾、外周血等。牛涛等用免疫组化方法对从 20 例非正常死亡的身体健康且无椎间盘突出家族史者(年龄 18~25 岁)体内获得的 31 个腰椎间盘突出标本进行研究,发现在正常椎间盘组织髓核、纤维环及软骨终板中均存在 TRAIL 的表达,其中髓核中的 TRAIL 表达高于纤维环及软骨终板,纤维环中的表达最低,差异有统计学意义<sup>[5]</sup>。TRAIL 在正常椎间盘组织的不同部位存在区域性分布,提示在正常椎间盘组织中可能存在由 DR4、DR5/TRAIL 诱导的凋亡途径。

目前,对 TRAIL-R 的研究多集中在肿瘤领域,而在椎间盘的研究中未见报道。本实验结果表明,突出退变的腰椎间盘突出 DR5 阳性表达率高于正常腰椎间盘突出组织;DR5 主要集中在椎间盘髓核细胞中表达,纤维环细胞较髓核细胞表达少。这可能是由于突出椎间盘髓核细胞中低氧、低糖及酸性环境影响其代谢率及基质的产生和细胞的存活率<sup>[6]</sup>,因此在突出椎间盘细胞中 DR5 表达较正常高。

研究表明,通过提高 DcR2 的表达可以抑制 TRAIL 介导的细胞凋亡作用<sup>[7,8]</sup>,其作用机制有如下几种:①竞争性 with TRAIL 结合;②在 DR5 介导的死亡诱导信号复合体形成后,DcR2 可以抑制死亡诱导信号复合体活化 caspase-8、caspase-10 的过程;③DcR2 可以抑制 DR4 介导的死亡诱导信号复合体形成<sup>[3]</sup>。突出椎间盘组织中 DR5 的表达量高于正常椎间盘组织,而 DcR2 的表达水平在突出和正常椎间盘组织中的差异无统计学意义。此结果提示,在 DcR2 表达相同的情况下,高水平的 DR5 表达可以引起突出椎间盘细胞的凋亡,DR5 在椎间盘细胞凋亡的发生、发展中起重要作用,即退变椎间盘的细胞凋亡主要因 DR5 表达量增加所致,而非 DcR2 表达量改变所致。

简而言之,本研究显示 DR5 和 DcR2 mRNA 及其蛋白在椎间盘细胞中表达,提示腰椎间盘组织中可能存在 DR5/TRAIL 诱导的凋亡途径。

[参考文献]  
[1]Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. Immunity, 1995, 3(6):673—682.  
[2]Thorburn A. Death receptor-induced cell killing[J]. Cell Signal, 2004, 16(2):139—144.  
[3]Mérino D, Lalaoui N, Morizot A, et al. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2 [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(19):7046—7055.  
[4]Bodmer JL, Holler N, Reynard S, et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8 [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(4):241—243.  
[5]牛涛,陈伯华,胡有谷. TRAIL 在正常椎间盘细胞中的分布及表达 [J]. 青岛大学医学院学报, 2007, 43(3):265—266.  
[6]Bibby SR, Urban JP. Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells [J]. Eur Spine J, 2004, 13(8):695—701.  
[7]Clancy L, Mruk K, Archer K, et al. Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(50):18099—18104.  
[8]Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, et al. TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL [J]. Haematologica, 2005, 90(5):612—624.  
(收稿日期:2008-02-28 修回日期:2008-05-20)



图1.5 正常对照组脑干Ret免疫反应  
阳性细胞少量表达 (200×)

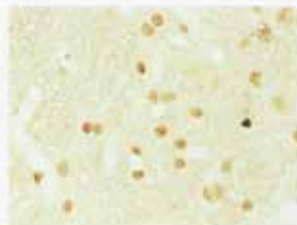


图1.6 脑损伤后4h脑干Ret免疫反应  
阳性表达细胞数明显增多 (200×)



图2.1 突出椎间盘阳性表达DR5的  
髓核细胞 (400×)



图2.2 正常椎间盘阳性表达DR5的  
髓核细胞 (400×)



图2.3 突出椎间盘阳性表达DR5的  
纤维环细胞 (400×)



图2.4 正常椎间盘阳性表达DR5的  
纤维环细胞 (400×)



图2.5 突出椎间盘阳性表达DcR2的  
髓核细胞 (400×)



图2.6 正常椎间盘阳性表达DcR2的  
髓核细胞 (400×)



图2.7 突出椎间盘阳性表达DcR2的  
纤维环细胞 (400×)



图2.8 正常椎间盘阳性表达DcR2的  
纤维环细胞 (400×)

图1.1~1.6 正文见P526~527;

图2.1~2.8 正文见P535~536;

图3.1~3.2 正文见P553~554.