

# 腰椎肥厚黄韧带中细胞凋亡及凋亡因子caspase-3、fas、p53的表达 · 研究原著 ·

张方新, 康朋, 王起腾, 张晓, 刘伟, 杨红涛, 艾尔肯·阿木冬(新疆医科大学第六临床医学院/第六附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000)

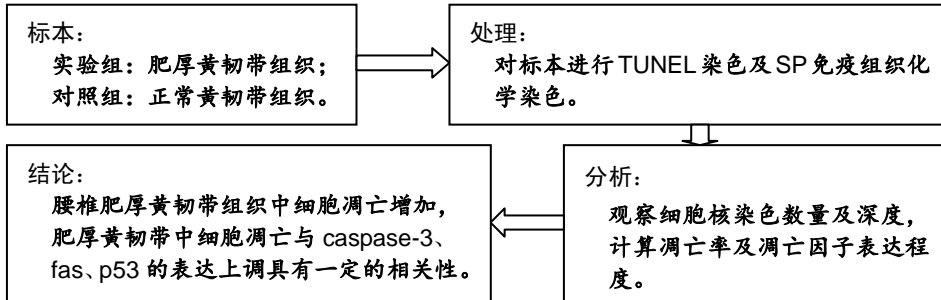
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2498

ORCID: 0000-0002-0539-5510(张方新)

文章快速阅读:

### 文章特点一

- (1)研究肥厚黄韧带组织中 caspase-3, Fas, P53 等凋亡相关因子的表达情况,
- (2)从分子水平探究腰椎黄韧带肥厚的发生发展相关机制, 为通过生物学方法延缓黄韧带组织细胞的凋亡提供基础。



张方新, 男, 1993 年生, 山东省聊城市人, 汉族, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事脊柱与创伤研究。

通讯作者: 艾尔肯·阿木冬, 博士, 副教授, 主任医师, 新疆医科大学第六附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

文献标识码:A

投稿日期: 2019-08-17

送审日期: 2019-08-22

采用日期: 2019-09-18

在线日期: 2019-11-30



### 文题释义:

**黄韧带:** 由左右两部分组成, 韧带上下分别附着于上位椎板的前下方, 下位椎板的上缘, 连接椎弓板, 参与围成椎管, 控制脊柱过度前屈, 维持脊柱稳定。黄韧带肥厚可造成椎管管腔减小及椎间孔狭窄, 硬膜囊和脊神经根的压迫, 从而产生临床症状。

**免疫组织化学技术:** 是用标记的特异性抗体(或抗原)对组织内的抗原(或抗体)的分布进行定位、定性、定量检测, 经过组织化学呈色反应在组织原位显示抗原(或抗体), 如各种蛋白质、多肽、磷脂和多糖等成分的一门技术。

### 摘要

**背景:** 腰椎管狭窄症是造成老年人步态紊乱和腰腿痛的关键原因之一, 黄韧带肥厚是导致腰椎管狭窄症的主要病理机制, 目前关于黄韧带的影像学及病理研究较多, 关于细胞凋亡的研究较少。

**目的:** 检测肥厚黄韧带组织中的细胞凋亡率及凋亡因子 caspase-3、fas、p53 的表达, 为深入了解黄韧带退变的机制提供实验依据。

**方法:** 实验组 50 个经 MRI 及术后测量证实肥厚黄韧带标本(L<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>)来自 50 例腰椎管狭窄症行后路减压手术自愿捐赠的患者, 男 22 例, 女 28 例, 年龄 32-74 岁, 平均 54.46 岁; 对照组 30 个经 MRI 及术后测量证实非肥厚黄韧带标本(L<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>)来自 30 例腰椎间盘突出症行手术及腰椎爆裂骨折行手术患者, 男 19 例, 女 11 例, 年龄 19-67 岁, 平均 47.27 岁。采用 TUNEL 染色法检测黄韧带中的凋亡细胞率, 用 SP 免疫组织化学法检测 caspase-3、fas、p53 的表达。研究通过了新疆医科大学第六附属医院伦理委员会批准, 伦理编号为 LFYLLSJ2016007。

**结果与结论:** ①TUNEL 染色示实验组的平均凋亡细胞率高于对照组[(37.80±3.04)%、(13.18±1.34)%、t=41.83, P < 0.001]; ②SP 免疫组织化学染色示实验组 caspase-3、fas、p53 阳性表达率均为 100%, 对照组 caspase-3、fas、p53 阳性表达率为 13.3%、16.7%、10%, 两组比较差异均有统计学意义(P < 0.001)。结果表明, 腰椎肥厚黄韧带组织中细胞凋亡增加, 肥厚黄韧带中细胞凋亡与 caspase-3、fas、p53 的表达上调具有一定的相关性。

### 关键词:

腰椎; 黄韧带; 黄韧带肥厚; 细胞凋亡; caspase-3; fas; p53

中图分类号: R496; R686; R318

### 基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2016D01C220), 项目负责人: 艾尔肯·阿木冬

Zhang Fangxin, Master candidate, The Sixth Clinical Medical College/The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Aierken·Amudong, MD, Associate professor, Chief physician, The Sixth Clinical Medical College/The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

## Apoptosis and expression of apoptotic factors caspase-3, fas and p53 in lumbar ligamentum flavum

Zhang Fangxin, Kang Peng, Wang Qiteng, Zhang Xiao, Liu Wei, Yang Hongtao, Aierken·Amudong (The Sixth Clinical Medical College/The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Lumbar spinal stenosis is one of the key causes of gait disorder and low back pain in the older adults. Hypertrophy of the ligamentum flavum is the main pathological mechanism leading to lumbar spinal stenosis. Although there are numerous imaging and pathological studies on the ligamentum flavum, little is reported on cell apoptosis.

**OBJECTIVE:** To detect the apoptotic rate and the expression of caspase-3, fas and p53 in the hypertrophic ligamentum flavum, providing experimental evidence for understanding the mechanism underlying degeneration of the ligamentum flavum.

**METHODS:** In experimental group, 50 hypertrophic ligamentum flavum specimens (L<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>) confirmed by MRI and postoperative measurement were obtained from 50 patients with lumbar spinal stenosis who underwent posterior decompression surgery. There were 22 males and 28 females, aged from 32 to 74 years old, with an average of 54.46 years old. In control group, 30 non-hypertrophic ligamentum flavum specimens (L<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>) confirmed by MRI and postoperative measurement were obtained from 30 patients with lumbar disc herniation undergoing surgery and lumbar burst fractures. There were 19 males and 11 females, aged 19-67 years, with an average of 47.27 years old. The apoptotic rate in the ligamentum flavum was detected by TUNEL staining, and the expression of caspase-3, fas and p53 was detected by SP immunohistochemistry. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, with approval No. LFYLLSJ2016007.

**RESULTS AND CONCLUSION:** TUNEL results showed that the average apoptotic rate of the experimental group was (37.80±3.04)%, which was significantly higher than that of the control group [(13.18±1.34)%; *t*=41.83, *P*<0.001]. The immunohistochemical staining of SP revealed that the positive expression percentages of caspase-3, fas and p53 in the ligamentum flavum were all 100% in the experimental group, while the positive percentages were 13.3%, 16.7%, and 10% in the control group, respectively. There was a significant difference between the two groups (*P*<0.001). These findings indicate that cell apoptosis in the hypertrophic ligamentum flavum is increased and has a certain correlation with the up-regulation of caspase-3, fas and p53.

**Key words:** lumbar vertebra; ligamentum flavum; ligamentum flavum hypertrophy; apoptosis; caspase-3; fas; p53

**Funding:** the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2016D01C220 (to AA)

## 0 引言 Introduction

腰椎管狭窄症可导致腰部及下肢的疼痛和麻木, 其主要病理变化为腰椎骨与软组织(椎体、小关节突、椎板、黄韧带、椎间盘等)的形态及组织结构的变化, 导致中央椎管、侧隐窝、神经孔狭窄, 使神经根和马尾神经受到刺激或压迫, 从而产生一系列的临床症状。现今临床上对于退变引起的下腰痛多先采用保守治疗, 对于通过正规保守治疗症状不能缓解者采用手术治疗。应用最广泛的手术是减压和脊柱融合术, 近年来这两类手术技术取得了长足的进步, 微创外科技术的应用使创伤越来越小且确实、有效地缓解了症状<sup>[1]</sup>。但是, 减压后必然导致椎间关节结构、形态、功能异常和不稳定, 融合后亦加速邻近节段的退变, 远期优良率在70%左右, 疗效并不理想。为提供更好的治疗方法就必须清楚退变的病因和确切发病机制, 目前为止并未发现良好的方法来延缓或者防止黄韧带肥厚与退变。

腰椎管狭窄症多伴有黄韧带的增生和肥厚, 从而加重其腰腿痛的症状。王伟敦等<sup>[2]</sup>通过影像学及病理解剖学研究发现黄韧带病变是造成腰椎管狭窄的常见原因。阚敏慧等<sup>[3-4]</sup>通过CT验证发现腰椎管狭窄症患者黄韧带明显比腰椎间盘突出症患者肥厚。目前关于黄韧带的影像学及病理研究较多, 关于细胞凋亡的研究较少, 此次研究通过TUNEL染色及SP免疫组织化学染色方法, 探讨凋亡基因caspase-3、fas、p53在黄韧带中的表达情况。

## 1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 病例对照研究。

1.2 时间及地点 实验于2018年4月至2019年2月在新疆医科大学第六附属医院及新疆医科大学中心实验室完成。

1.3 材料 兔抗人caspase-3单克隆抗体(Abcam公司, 英国, 编号ab184787), fas单克隆抗体(Abcam公司, 英国, 编号ab133619), p53单克隆抗体(Abcam公司, 英国, 编号ab28); In Situ Apoptosis Detection试剂盒(Abcam公司, 英国, 编号ab206386); 二抗山羊抗兔IgG(中衫金桥公司,

中国, 编号ab6722); LEICA DM4光学显微镜及成像系统(LEICA公司, 德国)。

1.4 对象 收集新疆医科大学第六附属医院2018年4月至2018年10月行腰椎后路减压融合内固定术及单纯开窗减压髓核摘除术的患者共80例。实验组50例经MRI及术后测量证实肥厚黄韧带组织, 均取自腰椎管狭窄症行手术减压的患者, 其中男22例, 女28例, 年龄32-74岁, 平均54.46岁。对照组30例正常黄韧带组织, 取自急性腰椎骨折和经MRI及术后测量证实无黄韧带肥厚的腰椎间盘突出症患者, 其中男19例, 女11例, 年龄19-67岁, 平均47.27岁。

**纳入标准:** ①黄韧带肥厚占主要因素的腰椎管狭窄症患者纳入实验组; ②单纯腰椎间盘突出症及爆裂骨折患者纳入对照组; ③患者或其父母均对该研究知情同意; ④影像学(CT、MRI等)检查支持诊断; ⑤初次行腰椎后路减压手术。

**排除标准:** ①有脑血管疾病等严重脑器质性疾病者; ②有高血压、糖尿病等严重躯体疾病者; ③其他肝脏疾病、传染病、以及患有其他恶性疾病及肿瘤患者; ④影像学(CT、MRI等)不支持的患者。

该研究通过了新疆医科大学第六附属医院伦理委员会批准, 伦理编号为LFYLLSJ2016007。

## 1.5 方法

1.5.1 标本来源处理方法 实验组肥厚黄韧带组织, 取自腰椎管狭窄症行手术减压的患者, 取材部位为L<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>, 黄韧带厚度4.5-8.0 mm(平均5.63 mm); 对照组正常黄韧带组织, 取自急性腰椎骨折和经MRI及术后测量证实无黄韧带肥厚的腰椎间盘突出症患者, 取材部位为L<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>, 黄韧带厚度2.3-4.0 mm(平均3.56 mm)。

1.5.2 TUNEL染色检测腰椎黄韧带标本中细胞凋亡 组织标本石蜡包埋, 切成4 mm切片, 置于65 °C恒温箱中烤片, 湿盒复温20 min, 脱蜡至水, PBS漂洗3 min×3次。蛋白酶K溶液100 μL/片, 室温湿盒内孵育20 min, PBS漂洗3 min×3次。体积分数3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液100 μL/片, 室温湿盒内孵育

5 min, PBS漂洗3 min×3次。TdT平衡缓冲液100 μL/片, 室温湿盒内孵育30 min。最后5 min冰上制备标记反应混合物40 μL/片, 盖上盖玻片37 °C湿盒孵育1.5 h, 去除盖玻片, PBS漂洗3 min×3次。滴加停止缓冲剂100 μL/片, 室温湿盒内孵育5 min, PBS漂洗3 min×3次。滴加阻塞缓冲剂100 μL/片, 室温湿盒内孵育10 min。最后5 min冰上配置1:25 Conjugate试剂100 μL/片, 室温湿盒内孵育30 min, PBS漂洗3 min×3次。滴加DAB显色液100 μL/片, 低倍光镜下控制染色时间, 显色后自来水冲洗。苏木素复染2 min, 1%盐酸乙醇分化1 s, PBS冲洗反蓝, 并通过梯度乙醇脱水, 二甲苯缸透明, 中性树胶封固, 观察标本。采用脱氧核苷酸末端转移酶(TdT)介导的原位缺口末端标记法(TUNEL法), 细胞核呈黄褐色者为阳性细胞, 即凋亡细胞。每例取5个400倍视野, 评估视野细胞中含凋亡细胞个数为凋亡指数(AI)。

**1.5.3 SP免疫组织化学染色检测腰椎黄韧带标本中凋亡因子的阳性表达** 组织标本进行石蜡包埋, 切成4 mm切片; 置于65 °C恒温箱中烤片, 湿盒复温20 min, 脱蜡至水, PBS漂洗3 min×3次; 用体积分数3% $H_2O_2$ 室温下孵育15 min灭活内源性过氧化物酶, PBS洗涤3 min×3次; 使用柠檬酸盐缓冲液行抗原修复, PBS洗涤3 min×3次; 羊血清封闭液进行封闭, 室温下孵育30 min; 将一抗(caspase-3、fas、p53单克隆抗体)加入切片中, 4 °C的冰箱中过夜, 室温下平衡30 min, PBS洗涤3 min×3次; 滴加二抗山羊抗兔IgG 100 μL/片, 37 °C保持30 min, PBS 3 min×3次; 滴加DAB显色液100 μL/片, 在室温下孵育, 低倍光镜下控制染色时间, 显色完成后自来水冲洗; 苏木素复染2 min, 1%盐酸乙醇分化1 s, PBS冲洗反蓝, 并通过梯度乙醇脱水; 二甲苯缸透明; 中性树胶封固, 观察标本。每例取5个400倍视野观察每个切片。

在每个视野中, 评估细胞数以确定阳性染色细胞的比例。计算5个视野的平均值。根据样品评分, 样品染色细胞百分比(0: <10%, 1: 10%–20%, 2: 20%–50%, 和3: >50%)和细胞的颜色强度(0: 无, 1: 淡黄色, 2: 棕黄色, 3: 棕色)。这2个分数的乘积用于分类表达水平, 当乘积≤2时表达被认为是阴性的, 乘积为3–5时为阳性, 当乘积是≥6时为强阳性。

**1.6 主要观察指标** ①黄韧带标本中细胞凋亡率; ②黄韧带标本中凋亡因子caspase-3、fas、p53的阳性表达。

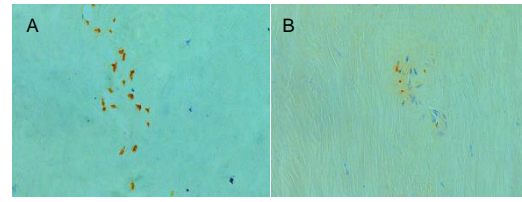
**1.7 统计学分析** 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 22.0进行统计分析。免疫组化阳性表达的组间差异采用卡方检验, 凋亡细胞率组间的均数比较采用t检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 参与者数量分析** 80例患者的腰椎黄韧带标本均进入结果分析。

**2.2 两组黄韧带标本的细胞凋亡情况** 黄韧带组织TUNEL染色结果见图1: 实验组表现为细胞稀疏, 细胞排列紊乱, 可见散在分布的棕黄着色细胞核, 并伴有细胞核

碎裂或染色质浓集; 对照组表现为细胞密集, 细胞排列规律, 可见少量阳性染色细胞。

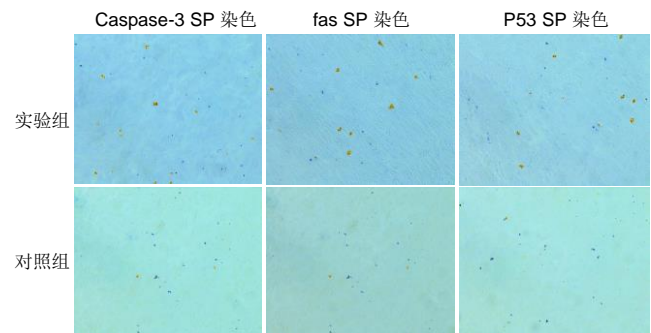


图注: 黄染为 TUNEL 表达阳性。实验组(图 A)肥厚黄韧带组织 TUNEL 染色阳性多于对照组(图 B)正常黄韧带组织, 表明肥厚黄韧带中细胞凋亡升高

图 1 两组腰椎黄韧带组织细胞凋亡对比(TUNEL 染色, ×400)  
Figure 1 Comparison of apoptosis in the lumbar ligamentum flavum between experimental and control groups (TUNEL staining, ×400)

实验组和对照组细胞凋亡率分别为(37.80±3.04)%、(13.18±1.34)%, 经t检验组间差异有统计学意义( $t=41.83$ ,  $P < 0.001$ ), 表明肥厚黄韧带中细胞凋亡率升高。

**2.3 两组黄韧带标本中凋亡因子 caspase-3、fas、p53 的表达** SP免疫组织化学染色结果见图2。



图注: 黄染为阳性表达。实验组肥厚黄韧带组织 caspase-3、fas、p53 染色阳性多于对照组正常黄韧带组织, 表明肥厚黄韧带中凋亡因子表达升高

图 2 两组腰椎黄韧带组织凋亡因子 caspase-3、fas、p53 表达的对比(免疫组织化学染色, ×400)  
Figure 2 Comparison of caspase-3, fas, and p53 expression in the lumbar ligamentum flavum between experimental and control groups (immunohistochemistry staining, ×400)

**2.3.1 实验组** 肥厚黄韧带组织免疫组化染色情况多表现为细胞核染色呈棕黄色或棕褐色, 细胞排列紊乱, 正常形态结构消失, 胞核变小, 胞膜皱缩, 着色深。①caspase-3染色阴性为0例, 阳性为33例, 强阳性为17例, 阳性率为100%; ②fas染色阴性为0例, 阳性为32例, 强阳性为18例, 阳性率为100%; ③p53染色阴性为0例, 阳性为34例, 强阳性为16例, 阳性率为100%, 均表达阳性率高。

**2.3.2 对照组** 正常黄韧带组织免疫组化染色情况多表现为细胞核染色呈淡黄色或棕黄色, 细胞排列规律, 细胞形态正常, 着色较浅。①caspase-3染色阴性为26例, 阳性4例, 强阳性为0例, 阳性率为13.3%; ②fas染色阴性为25例, 阳性5例, 强阳性为0例, 阳性率为16.7%; ③p53染色阴性为27例, 阳性3例, 强阳性为0例, 阳性率为10%, 均表达阳性率较低。

实验组和对照组凋亡因子caspase-3、fas、p53阳性表达强度经卡方检验, 差异均有统计学意义( $\chi^2=64.78$ ,  $\chi^2=61.55$ ,  $\chi^2=68.24$ ,  $P < 0.001$ ), 说明凋亡因子表达上调与肥厚黄韧带细胞凋亡具有一定的相关性。见表1。

表1 两组腰椎黄韧带凋亡因子表达等级比较

Table 1 Comparison of expression levels of apoptotic factors in the ligamentum flavum between experimental and control groups

凋亡因子	组别	n	分级			阳性率	$\chi^2$ 值	P值
			-	+	++			
caspase-3	实验组	50	0	33	17	100%	64.78	<0.001
	对照组	30	26	4	0	13.3%		
fas	实验组	50	0	32	18	100%	61.55	<0.001
	对照组	30	25	5	0	16.7%		
p53	实验组	50	0	34	16	100%	68.24	<0.001
	对照组	30	27	3	0	10%		

### 3 讨论 Discussion

SAKAMAKI等<sup>[5]</sup>通过磁共振横向放射学研究表明, 腰椎管狭窄症组黄韧带厚度的平均值为4.44 mm, 非腰椎管狭窄症组厚度均值为2.44 mm, 随着年龄的增长黄韧带的厚度逐渐增加, L<sub>4</sub>-L<sub>5</sub>的增厚在30-39岁患者中已经开始, 总厚度多大于3.5 mm, 且增厚值高于L<sub>2</sub>-L<sub>3</sub>、L<sub>5</sub>-S<sub>1</sub>。此次研究通过影像学及术后标本测量大于4 mm作为实验组, 通过免疫组织化学染色及TUNEL染色法对比两组细胞凋亡率及凋亡因子的表达差异。ALTINKAYA等<sup>[6]</sup>研究表明脊柱水平、椎间盘突出、椎间盘退变、腰椎管狭窄、衰老、体质量指数等均与黄韧带增厚有关, 而性别和疼痛程度与黄韧带的厚度无关。ABBAS等<sup>[7]</sup>发现黄韧带的肥厚具有年龄依赖性。周纲等<sup>[8]</sup>通过CT对比测量患者腰椎黄韧带厚度, 发现性别与黄韧带的厚度无明显相关, 而性别有一定的相关性, 随着年龄的增长及体质量指数的增加, 会导致黄韧带的增厚, 故此次研究没有进行年龄、性别及体质量等因素的分析研究。研究发现, 机械应力及组织炎症反应的累积, 造成纤维化(瘢痕形成)的不断增多, 进而导致黄韧带肥厚, 机械应力能增加黄韧带细胞的成骨分化速率, 并可能通过骨形态发生蛋白(BMP)-Smad1和Src-p38MAPK信号通路而造成黄韧带的肥厚发生<sup>[9-11]</sup>。蒋玉权等<sup>[12]</sup>研究发现碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子 $\beta$ 1在腰椎黄韧带肥厚形成过程中有重要作用, 引起黄韧带肥厚的主要胶原产物为I型胶原蛋白。实验表明转化生长因子 $\beta$ 的表达与黄韧带的肥厚密切相关, 通过适当的检测转化生长因子 $\beta$ 表达水平可以用来预测黄韧带肥厚的进展<sup>[13-15]</sup>。导致黄韧带肥厚研究主要有炎症反应、力学因素、细胞因子、代谢异常及多种蛋白质的改变, 关于凋亡因素研究相关报道较少。此次研究通过TUNEL染色观察到肥厚黄韧带组织染色表现为细胞稀疏, 细胞排列紊乱, 可见散在分布的棕黄着色细胞核, 并伴有细胞核碎裂或染色质浓集, 实验组和对照组凋亡细胞率对比差异有统计学意义, 肥厚黄韧带中细胞凋亡率升高。

研究证实细胞凋亡在机体发育和许多生理、病理过程中均起着重要作用, 人们对于凋亡的研究一直具有很高的热情。对于人类黄韧带细胞的凋亡事实由NAKAMA等<sup>[16]</sup>通过生理学研究证明, 并通过免疫组化检测活化的caspase-3, 还观察到活化的caspase-3免疫反应存在于其中。Caspase是一类天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶, 在人类细胞中Caspase的超量表达和激活均会引起细胞凋亡, 因此又称死亡蛋白酶, 它以依赖线粒体和非依赖线粒体2条途径促进细胞凋亡<sup>[17]</sup>。赵英伦等<sup>[18]</sup>在腰椎间盘突出症患者血清中通过酶联免疫吸附实验证实了caspase-3和caspase-9可通过表达上调促进细胞凋亡过程, 且突出节段越多表达量越高。此次研究通过免疫组化方法观察到肥厚黄韧带的细胞染色情况多表现为细胞核染色呈棕黄色或棕褐色, 细胞排列紊乱, 正常形态结构消失, 胞核变小, 胞膜皱缩, 着色深, 且caspase-3表达高于对照组, 可能肥厚黄韧带组织中caspase-3的表达与黄韧带细胞凋亡具有一定的相关性。

Fas蛋白又称为Apo-1或CD95, 属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)/神经生长因子受体(NGFR)家族成员, 广泛存在于多种组织细胞。一般认为, Fas蛋白分子中至少有3个与凋亡诱导功能密切相关的结构域: EXT、“死亡”域(DD)和调控区(RR)<sup>[19]</sup>。PARK等<sup>[20-21]</sup>首次在腰椎间盘突出细胞内发现Fas分子的表达, 并进一步研究证实存在退变的腰椎间盘中存在Fas分子表达上调的现象, 为后续Fas凋亡途径在椎间盘中的研究奠定了基础。李小川等<sup>[22]</sup>表明了Fas/FasL系统是椎间盘细胞凋亡的主要途径。吕浩然等<sup>[23]</sup>试验表明在腰椎退变软骨终板的凋亡中基质降解酶MMP、fas均具有高表达, 推测MMP类蛋白酶对细胞外基质的降解和Fas介导的细胞凋亡具有相互协同作用, 促进了椎间盘的退变过程。此次研究观察到肥厚黄韧带的细胞染色多表现为细胞核染色呈棕黄色或棕褐色, 细胞排列相对紊乱, 正常形态结构消失, 胞膜皱缩, 着色深, 黄染比例及染色程度高于对照组, 可能肥厚黄韧带组织中fas的表达与黄韧带细胞凋亡具有一定的相关性。

p53基因对防止细胞增生和保持DNA受损基因组的完整性有重要作用, p53基因因其表达产物即分子质量53 kD的磷酸递传的凋亡信号后, 主要经内源性和外源性2种途径引发细胞程序性死亡<sup>[24]</sup>。LU等<sup>[25]</sup>通过免疫组化研究表明血管内皮生长因子和p53基因协同表达在退行性椎间盘组织中, 共同作用于新生血管和浸润, 可加速椎间盘组织变性。YURUBE等<sup>[26]</sup>通过鼠尾模型模拟人类椎间盘衰老和变性中的脊索细胞消失和凋亡细胞死亡, 持续的静态压迫通过死亡-受体途径诱导细胞凋亡的瞬时活化, 并通过p53介导的椎间盘细胞中的线粒体途径持续激活细胞凋亡。此次研究发现实验组肥厚黄韧带多表现为细胞核染色呈棕黄色或棕褐色, 细胞排列紊乱, 正常形态结构消失, 胞核变小, 胞膜皱缩, 表明p53表达高于对照组, 可能肥厚黄韧带组织中p53的表达与黄韧带细胞凋亡具有一定的相关性。

黄韧带位于相邻的椎弓板之间, 前面构成椎管后壁, 后面与棘间韧带相邻, 主要作用是限制脊柱过度前屈和维

持人体直立姿势，它是脊柱后部的重要连接结构，主要由弹性纤维、胶原纤维、网状纤维及基质4种成分构成，其中弹性纤维所占比例达75%左右<sup>[27]</sup>。随着年龄的增加，黄韧带易出现肥大、钙化和骨化等退变反应，黄韧带退变肥厚是导致腰椎管狭窄症的重要因素之一。对于黄韧带的凋亡相关研究报道不多，此次研究通过TUNEL染色及免疫组化方法得出肥厚黄韧带组织中细胞凋亡增加，caspase-3、fas和p53的表达与黄韧带细胞凋亡具有一定的相关性。LIANG等<sup>[28]</sup>通过建立了一个永生髓核(NP)细胞系稳定转染重组人端粒酶逆转录酶(hTERT)基因延长复制能力，发现这些细胞可以通过20多个世代，基因没有显著变化且II型胶原和聚集蛋白聚糖的表达水平无显著变化，进一步证实NP细胞中hTERT的过度表达不仅可以预防血清饥饿引起的细胞凋亡和G<sub>1</sub>细胞周期停滞，也可以抑制基因caspase-3、Fas和p53的表达，它可能为通过调节凋亡基因的表达治疗椎间盘退变提供新的治疗策略。此次研究没有继续研究控制凋亡的相关方法，那么黄韧带的退变凋亡是否也可以通过基因的调控来预防及减缓，可能成为今后治疗腰椎管狭窄症的重要研究领域。

**致谢:** 感谢新疆医科大学第六附属医院、新疆医科大学的老师及实验工作人员提供的帮助。

**作者贡献:** 实验设计与实施由第一作者和通讯作者完成，所有作者参与实验标本的收集及数据统计分析等工作，参与者均接受过正规培训。

**经费支持:** 该文章接受了“新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2016D01C220)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该研究通过了新疆医科大学第六附属医院伦理委员会批准，伦理编号为 LFYLLSJ2016007。

**知情同意问题:** 所有试验标本来源均获得患者或其父母知情同意。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过新疆医科大学生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] ANDRESEN AK, ERNST C, ANDERSEN M. Lumbar spinal stenosis. Ugeskr Laeger. 2016;178(41): pii: V04160245.
- [2] 王伟敦, 倪斌, 于沈敏. 腰椎管狭窄症与黄韧带的病理关系研究分析[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(10): 664-666.
- [3] 阙敏慧, 程爱国, 杜宁. CT横断面测量分析腰椎管狭窄症与黄韧带肥厚的关系[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(52): 9756-9759.
- [4] 阙敏慧, 王小锐, 程爱国. 黄韧带肥厚与腰椎管狭窄症关系的研究[J]. 天津医药, 2011, 39(3): 202-204.
- [5] SAKAMAKI T, SAIRYO K, SAKAI T, et al. Measurements of ligamentum flavum thickening at lumbar spine using MRI. Arch Orthop Trauma Surg. 2009;129(10):1415-1419.
- [6] ALTINKAYA N, YILDIRIM T, DEMIR S, et al. Factors associated with the thickness of the ligamentum flavum: is ligamentum flavum thickening due to hypertrophy or buckling? Spine. 2011;36(16):E1093-1097.
- [7] ABBAS J, HAMOUD K, MASHARAWI YM, et al. Ligamentum Flavum Thickness in Normal and Stenotic Lumbar Spines. Spine. 2010; 35(12): 1225-1230.
- [8] 周纲, 张玉坤, 黄卫民. 中国新疆地区腰椎管狭窄患者腰椎黄韧带肥厚的危险因素分析: 回顾性、单中心、病例分析[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(19): 2993-2998.
- [9] SAIRYO K, BIYANI A, GOEL VK, et al. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue. Spine. 2007;32(11):340-347.
- [10] HAYASHI K, SUZUKI A, ABDULLAH AHMADI S, et al. Mechanical stress induces elastic fibre disruption and cartilage matrix increase in ligamentum flavum. Sci Rep. 2017;7(1):13092.
- [11] SHUNZHI Y, ZHONGHAI L, NING Y. Mechanical stress affects the osteogenic differentiation of human ligamentum flavum cells via the BMP Smad1 signaling pathway. Mol Med Rep. 2017;16(5):7692-7698.
- [12] 蒋玉权, 刘继春, 叶晓健, 等. 肥厚腰椎黄韧带中成纤维细胞生长因子、转化生长因子及结缔组织生长因子的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(46): 7452-7457.
- [13] HUR JW, BAE T, YE S, et al. Myofibroblast in the ligamentum flavum hypertrophic activity. Eur Spine J. 2017; 26:2021-2030.
- [14] LÖHR M, HAMPL JA, LEE JY, et al. Hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum is associated with inflammation-related TGF-β expression. Acta Neurochir(Wien). 2011;153(1):134-141.
- [15] AMUDONG A, MUHEREMU A, ABUDOUREXITI T. Hypertrophy of the ligamentum flavum and expression of transforming growth factor beta. Int Med Res. 2017;45(6):2036-2041.
- [16] NAKAMA S, KIKUCHI M, YASHIRO T, et al. Regional difference in the appearance of apoptotic cell death in the ligamentum flavum of the human cervical spine. Med Mol Morphol. 2005;38(3):173-180.
- [17] LIU J, YAO Y, DING H, et al. Oxymatrine triggers apoptosis by regulating Bcl-2 family proteins and activating caspase-3/caspase-9 pathway in human leukemia HL 60 cells. Tumor Biology. 2014;35(6):5409-5415.
- [18] 赵英伦, 马元, 莫森, 等. 腰椎间盘突出症患者血清中Caspase-3和Caspase-9活性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2): 13-15.
- [19] 叶君健, 林金贵. 退变腰椎间盘组织细胞凋亡及相关基因Fas和Bcl-2蛋白的表达[J]. 福建医科大学学报, 2007, 41(6): 506-508.
- [20] PARK JB, KIM K, HAN C, et al. Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue. Spine. 2001;26(2):142-146.
- [21] PARK JB, CHANG H, KIM KW. Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue. Spine. 2001;26(6):618-621.
- [22] 李小川, 李雷, 王欢, 等. Fas/FasL基因在退变腰椎间盘组织中的表达及诱导凋亡作用[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(24): 1718-1720.
- [23] 吕浩然, 刘尚礼, 黄东生, 等. Fas在退变的兔椎间盘终板凋亡中的表达及作用通路研究[J]. 中华实验外科杂志, 2016, (1): 195-197.
- [24] 孙廷哲, 陈春, 沈萍萍. 细胞凋亡中p53转录依赖与非依赖性调控[J]. 中国细胞生物学学报, 2008, 30(3): 301-306.
- [25] LU XY, DING XH, ZHONG LJ, et al. Expression and significance of VEGF and p53 in degenerate intervertebral disc tissue. Asian Pac J Trop Med. 2013;6(1):79-81.
- [26] TAKASHI Y, HIROAKI H, KENICHIRO K, et al. Notochordal cell disappearance and modes of apoptotic cell death in a rat tail static compression-induced disc degeneration model. Arthritis Res Ther. 2014;16(1): R31.
- [27] KOSAKA H, SAIRYO K, BIYANI A, et al. Pathomechanism of loss of elasticity and hypertrophy of lumbar ligamentum flavum in elderly patients with lumbar spinal canal stenosis. Spine. 2007;25(4):2805-2811.
- [28] LIANG W, YE D, DAI L, et al. Overexpression of hTERT extends replicative capacity of human nucleus pulposus cells, and protects against serum starvation-induced apoptosis and cell cycle arrest. Cell Biochem. 2012;113:2112-2121.