

髓核细胞退变模型建立的研究进展

李亚雄, 韩硕, 刘勇

摘要 髓核细胞(NPCs)退变模型对研究椎间盘退变(IVDD)病理机制和治疗策略有着重要意义。对于退变严重的NPCs,往往较难贴壁生长,而轻度退变的细胞,虽可体外培养,但难有显著的实验结果,因此通过不同的诱导手段构建有效的退变细胞模型,不仅可以提升实验的可信度,更能增加实验数据的说服力。目前有较多诱导NPCs退变的方法,但模型建立缺乏统一标准,且无系统性的总结。因此,本文将从诱导NPCs退变的方式、方法、模型效果评价指标等方面展开综述,并从物理、化学和生物工程等方面对不同建模方式进行了分类总结,旨在为筛选、评价有效的退变细胞模型建立方法,探究IVDD治疗机制等研究提供参考。

关键词 椎间盘退变;细胞模型;髓核细胞;方法

中图分类号 R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20220197

本文引用格式:李亚雄, 韩硕, 刘勇. 髓核细胞退变模型建立的研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2024, 19(1): 41-44.

作者单位

青岛大学附属医院
山东 青岛 266000

收稿日期

2022-03-05

通讯作者

刘勇

liuyongdr20@163.
com

椎间盘退行性疾病(intervertebral disc degeneration, IVDD)是临床上常见的慢性病和多发病,其引起以颈肩痛、腰腿痛为主要表现的一系列临床综合征,给家庭造成沉重的经济负担,严重影响患者的日常生活^[1]。IVDD与衰老、遗传易感性、体重、高负荷工作和吸烟等因素直接相关^[2]。对椎间盘(intervertebral disc, IVD)髓核细胞学、生物学等研究的深入及免疫学、分子生物学等技术的进展,使人们对IVDD的治疗提出新的思维,力图从细胞、分子、基因的层面改变IVD退变的自然史,延缓或逆转IVD退变,从而减少IVDD的发生^[3]。但是IVD退变是一个复杂且精密的过程,包括了髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)增殖、凋亡、衰老、自噬等相关基因的差异化表达;调控信号通路的细胞因子所介导的促炎与抗炎过程失衡以及细胞外基质合成代谢与分解代谢的紊乱等^[4]。因此针对不同病理原因和研究方向建立可控性强、符合人类病理生理特征的细胞模型有助于更加清晰地阐明相关病理机制。本文首次对NPCs退变模型的建立方法进行总结,为合理地选择建模方式及探索IVD退变表型和致病途径等研究提供参考。

1 通过物理方法建立NPCs退变模型

IVD由髓核、终板及纤维环构成,中心部分的髓核呈凝胶状,能有效地保持水分,且具有较强的柔韧性^[5],上下两层终板具有渗透作用是NPCs代谢营养物质主要途径,外部由交错分布的弹性蛋白和I型胶原构成的纤维环具有较强的张力^[6],这些结构让IVD不但能提供支撑作用,也保证了脊柱的灵活性,但这也使得NPCs暴露在各种机械应力中,包括压缩、剪切应力、静水压力和张力^[7]。这些因素的长期持续影响,会引起IVD结构和生化组成发生一系列病理变化,从而导致IVDD^[8]。针对不同发病机制,选择不同的建模方式尤为重要,据此部分研究

者选择一些物理方法来诱导NPCs退变(高压、张力、高渗、低氧等)。2012年Ding等^[9]选择加压法构建NPCs退变模型,他们制作了一个密封性良好的加压装置,压缩含5%CO₂的空气提供1.0 MPa的压力值,诱导兔NPCs退变,通过设置不同的压缩时长,得出了机械压缩导致的IVDD部分病理原因来自线粒体损伤的结论,后续实验证明添加骨髓间充质干细胞共培养可抑制压缩诱导的NPCs凋亡^[10]。2019年Yang等^[11]使用Flexercell张力系统(一种可循环拉伸系统)提供超细胞生理张力20%的循环拉力(CMT)构建NPCs退变模型。利用该模型研究发现异常的机械应激促进NPCs凋亡,加速IDD的发生,而自噬有助于逆转凋亡。无论轴向加压还是横向拉伸,当生物应力超过NPCs的生理膨胀压时,凋亡通路被激活,多聚糖蛋白基因表达下调^[12],静水压增高,渗透压升高,由于渗透压的改变是生物应力作用下的二次变化,一些团队已经研究渗透压对NPCs生物学的影响。如2014年Dong等^[13]通过升高培养液渗透压构建了兔NPCs退变模型,并研究发现高渗透压激活兔NPCs p38MAPK、JNK1/2和ERK1/2通路,激活的p38MAPK和JNK1/2通路诱导NPCs凋亡,而ERK1/2通路有利于细胞存活。当然,氧含量变化与NPCs退变也密切相关,2016年Choi等^[14]通过调节培养箱的氧气浓度,将正常21%氧含量调节至1%(5%CO₂, 94%N₂)培养细胞24 h,成功诱导NPCs退变。此外降低培养基pH值,营造酸性环境也可用于构建NPCs退变模型^[15]。

物理建模方式简单、可控性强,对细胞损伤较小,接近自然退变的NPCs,构建的模型适用于探索病理机制方面的研究,但目前建模方式仍不全面,例如辐射法、紫外线照射、电流刺激、低温诱导法等其他细胞模型建模方法目前没有应用。

2 通过化学方法建立NPCs退变模型

炎症反应是IVD退变发生的重要病理机制,促炎细胞因子的过表达可以破坏IVD的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)稳态,并使IVD维持向退行性和分解代谢状态转变^[16]。化学方法构建NPCs退变模型是利用化学试剂、药物等方式模拟腰椎间病理初期炎症环境,从而建立细胞模型。

2006年Aota等^[17]研究发现牛的NPCs Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)对细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的结合敏感,TLR是核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路的重要调节因子与细胞炎症和退化状态密切相关^[18]。2013年kim等^[19]在此基础上利用LPS诱导牛NPCs建立退变模型,并证明抑制MyD88通路可有效抗炎和抗分解代谢作用。白介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)^[20]、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[21]等作为重要的促炎因子也可通过NF- κ B信号通路参与细胞分化、凋亡,常用来诱导NPCs退变。

部分应激源也可用于构建NPCs退变模型,这类应激源具有较强氧化性,能破坏细胞内正常的氧化还原状态,通过刺激细胞产生损伤核酸、蛋白质、脂质等有害分子,发挥毒性作用,模拟IVD内氧化应激状态。2019年Tang等^[22]使用过氧化氢(H_2O_2)构建小鼠NPCs退变模型,研究Nrf2在NPCs退变中的作用,发现Nrf2k可通过反馈激活自噬来减缓氧化应激导致的NPCs变性。叔丁基过氧化氢(tert-Butyl Hydroperoxide, t-BHP)也可用于构建NPCs退变模型^[23]。2016年陈等^[24]证明二甲双胍可通过自噬刺激抑制t-BHP诱导的NPCs的凋亡和衰老。近些年血管紧张素II(Angiotensin II, Ang II)也被用于诱导NPCs退变^[25], AT1受体(G蛋白偶联受体)是Ang II的主要生物学介质, Ang II与AT1的结合会促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生、促炎细胞因子和M1巨噬细胞的积累,从而引起NPCs变性^[26]。此外晚期氧化蛋白产物(advanced oxidation protein products, AOPP)^[27]、基质细胞衍生因子(stromal cell-derived factor, SDF-1)^[28]、聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)^[29]、硝普钠(nitroprusside, SNP)^[30]、氯化钴(cobalt chloride, $CoCl_2$)^[31]等也可以用于构建NPCs退变模型。

化学建模方式多样,建模时间短,易获取,在研究炎症、氧化应激、自噬等与IVDD的关系中应用较多,但对细胞有不同程度的损伤,合理的诱导剂量对建模的成败尤为重要。

3 通过生物或生物工程方法建立NPCs退变模型

改变营养环境、增加复制代数、基因敲除、微生物共培养等方式也可用于构建NPCs退变模型。2018年Wang等^[32]将正常小鼠的NPCs置于高糖环境中培养72 h成功构建NPCs退变模型。2017年Chang等^[33]利用去糖培养基同样成功诱导NPCs退变。去氨基酸、去血清^[34,35]等方式也可用于构建NPCs退变模型。2019年Gong等^[36]利用细胞反复传代方式构建了退变模型,证明BMP-7通过激活PI3K/Akt通路,减轻传代诱导的人IVDNP细胞衰老。2020年Kong等^[37]通过下调正常小鼠NP细胞 $hsa_circ_0059955$ 基因,诱导NP细胞凋亡和细胞周期阻滞,构建了退变细胞模型。2020年He等^[38]发现痤疮丙酸杆菌(*P.*

acnes)通过NLRP3依赖通路的焦亡激活诱导NPCs退变。

生物或生物工程方式所构建出细胞模型稳定性相对较差,目前应用面不广,在今后应用中需进一步探索最适条件,优化改良诱导方法。

无论是物理方法、化学方法,还是生物或生物工程方法都是通过模拟NPCs外在刺激条件的改变来达到诱导细胞退变的目的,引起细胞退变的部分机制存在交叉重叠,如物理方法中低氧诱导法会使细胞产生氧化应激而发生退变,与化学建模方法中利用应激源刺激NPCs退变途径相似。生物诱导法中微生物共培养构建NPCs退变模型的部分原因可能是微生物刺激细胞发生了炎症反应,这与化学方法中利用炎症因子构建细胞退变模型机制部分重叠。虽然不同的诱导方法中可能存在相同的机制,但IVDD的发生发展过程涉及多因素多阶段,而不同方法构建的体外模型可以模拟特定病变的关键部位或阶段,这有利于全面详尽地研究致病原因和病理机制。

4 模型效果评价指标

选择不同的方式构建NPCs退变模型后,需要对造模是否成功、细胞活性状态、细胞损伤程度等进一步评价。形态观察是较为直观的检测方式,退变细胞会出现肿胀、扁平、细胞核体积减小,黏附松散呈线型半贴壁状态。利用透射电镜观察亚细胞结构,细胞核皱缩、大量凋亡小体、染色质浓缩、细胞质内较多含致密物小囊泡出现^[39],通过细胞形态判断建模好坏并没有量化标准,因此并不能单独作为评价指标,常需配合MTT、CCK8、TUNEL、流式细胞术等进一步评估细胞活性。

II型胶原蛋白、聚蛋白多糖、细胞基质降解酶(MMP3、MMP13、ADAMTS4、ADAMTS5)等常作为NPCs退变的重要检测指标。II型胶原蛋白及聚蛋白多糖由NPCs产生,在维持IVD柔韧性及抗压功能中发挥重要作用,其含量减少改变了IVD生物力学结构的完整性,破坏了ECM的代谢平衡是IVD退变的始动因素。在病理条件刺激下,炎症相关通路被激活,基质降解酶被促进分泌,其主要功能便是降解NPCs中II型胶原蛋白及聚蛋白多糖。在退变NPCs中,II型胶原蛋白、聚蛋白多糖含量降低,细胞基质降解酶含量升高,改变程度与细胞退变程度相关。

此外一些凋亡相关的标志性蛋白含量高低也可用于评价细胞退变程度。 β -半乳糖苷酶(senescence-associated beta-galactosidase, SA- β -Gal)被发现仅出现在退变衰老细胞的细胞中,并随细胞退变逐步积累,其可水解 β -半乳糖苷为单糖,在酸性条件下进行SA- β -Gal测定时,会出现蓝色染色沉淀物,通过镜下观察沉淀物颜色的深浅可进一步评估细胞退变情况^[40]。Caspase-3、Bcl-2、Bax三种蛋白与细胞凋亡关系密切^[41]。Caspase是一类存在于细胞质中的半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶,与线虫的自杀基因CED-3同源,在细胞衰老退变过程中发挥重要作用^[42]。BCL-2包含Bcl-2 α 和Bcl-2 β 两种蛋白,其中Bcl-2 α 为线粒体膜的整合蛋白,在抗细胞凋亡中发挥作用。Bax蛋白在未接收凋亡刺激时为非活性状态,激活后可破坏线粒体膜的完整性,拮抗BCL-2功能而发挥促凋亡作用。NPCs退变模型建立

效果可通过上述指标的含量变化来进行评估。

细胞氧化能力也可用于评估细胞退变情况,过氧化状态常导致细胞功能障碍诱发退变,丙二醛(malondialdehyde,MDA)是过氧化产物之一,含量的高低提示细胞的损伤退变程度。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、去乙酰化酶(Sirtuin 1,SIRT1)等与抗氧化相关。这些酶类含量水平的高低反映了细胞内的氧化状态,可为构建NPCs退变模型的检测指标。

保证细胞存活率的同时能成功地构建退变模型是评价造模方式的关键指标,最佳的诱导退变方式不仅要有最小的细胞毒性或最低的损伤,又能极大地满足对实验模型的需求。这使得需要在相同的方式中去尝试不同的作用变量,如强度、浓度、时间等,利用评价指标筛选出最佳处理条件。本文从物理、化学和生物工程等方面对不同建模方式进行了分类总结,对同一处理方式不同处理条件下结果进行对比,筛选出当前研究常用方式的最佳处理条件,见表1。

IVD退变,导致的疼痛和下肢功能异常^[51],在现代社会中已经成为一个严重的社会问题,造成了巨大经济负担,传统的手术和药物治疗并不能从根本上达到治疗目的,从细胞、分子、基因的层面改变IVD退变是多数科研工作者的研究目的,由于体外实验具有可控性和易得性的特点,而NPCs退变模型又是研究IVDD发生必不可少的步骤,因此选择可靠、可行和适当的建模方法对探索IVDD病因病机具有重要意义。

5 总结与展望

IVDD是多因素且复杂的过程,外在力学和内在理化性质的改变是引起退变的两大核心要素。各种动物和细胞模型为深入研究和攻克IVDD机制提供了巨大帮助,细胞模型相对于动物模型存在造模周期短、经济、效果明显更能模拟体内环境等优点。在构建NPCs退变模型中,物理建模方式能更加贴近自然退变的NPCs,可控性强,生物和化学建模方式能模拟病理环境较快捷构建出符合要求模型,但单一因素诱导的NPCs体外模型,难以符合IVDD的病因和病机的复杂性,其次化学药剂和微生物是通过对细胞不同程度损伤引起的快速退变,这与自然环

境中退变细胞存在较大差异,复制型造模方式虽然对细胞损伤最小,但模型稳定性差,极易凋亡。

综上所述,尽管体外模型不能够完全模拟IVDD病因和病理机制,但随着对这些体外模型深入的研究,研究者可以针对表型或致病途径,合理地选择模型。在未来进一步优化细胞模型的构建方式和评价标准,可通过与自然退变细胞差异化分析,构建出适合的模型进行病理研究或药物筛选,为探究IVDD的机制及治疗策略提供材料和基础数据。

参考文献

[1] Meucci RD, Fassa AG, Faria N. Prevalence of chronic low back pain: Systematic review [J]. Rev Saude Publica, 2015, 49: 1.

[2] Parreira P, Maher CG, Steffens D, et al. Risk factors for low back pain and sciatica: an umbrella review [J]. Spine J, 2018, 18: 1715-1721.

[3] Jin L, Shimmer A L, Li X. The challenge and advancement of annulus fibrosus tissue engineering[J]. Eur Spine J, 2013, 22: 1090-1100.

[4] Jiang L, Yuan F, Yin X, et al. Responses and adaptations of intervertebral disc cells to microenvironmental stress: a possible central role of autophagy in the adaptive mechanism[J]. Connect Tissue Res, 2014, 55: 311-321.

[5] Kos N, Gradisnik L, Velnar T. A brief review of the degenerative intervertebral disc disease[J]. Med Arch, 2019, 73: 421..

[6] Vergroesen PPA, Kingma I, Emanuel KS, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23: 1057-1070.

[7] Nerurkar NL, Elliott DM, Mauck RL. Mechanical design criteria for intervertebral disc tissue engineering[J]. J Biomech, 2010, 43: 1017-1030.

[8] Johannessen W, Elliott DM. Effects of degeneration on the biphasic material properties of human nucleus pulposus in confined compression[J]. Spine, 2005, 30: E724-E729.

[9] Ding F, Shao ZW, Yang SH, et al. Role of mitochondrial pathway in compression-induced apoptosis of nucleus pulposus cells[J]. Apoptosis, 2012, 17: 579-590.

[10] Chen S, Zhao L, Deng X, et al. Mesenchymal stem cells protect nucleus pulposus cells from compression-induced apoptosis by inhibiting the mitochondrial pathway[J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 9843120.

[11] Yang M, Feng C, Zhang Y, et al. Autophagy protects nucleus pulposus cells from cyclic mechanical tension induced apoptosis[J]. Int J Mol Med, 2019, 44: 750-758.

[12] Court C, Colliou OK, Chin JR, et al. The effect of static in vivo bending on the murine intervertebral disc[J]. Spine J, 2001, 1: 239-245.

[13] Dong ZH, Wang DC, Liu TT, et al. The roles of MAPKs in rabbit

表1 构建髓核细胞退变模型的常见方式及最佳处理条件

构建方式类型	构建方法	最佳条件	参考文献
空气压缩法	细胞置于加压装置中,提高气压,构建NPCs退变模型	压强:1 MPa;处理时长 36 ~ 48 h	[9,17]
循环张力拉伸法	细胞培养于 BioFlex™ 培养板中,利用 Flexercell 张力系统,周期性拉伸刺激细胞,构建NPCs退变模型	拉伸度:20%;频率:1 HZ; 处理时长:4 ~ 6 h	[14,11]
低氧诱导法	通过降低培养箱中氧气含量,构建NPCs退变模型	氧含量:1%;处理时长 24 h	[14,44]
高渗透诱导法	通过提高培养液渗透压,构建NPCs退变模型	渗透压:550 mOsm/kg;处理时长:3 ~ 7 d	[13,45]
LPS 诱导法	通过向培养液中添加 LPS,构建NPCs退变模型	浓度:10 µg/mL;处理时长 48 h	[17,46]
IL-1β 诱导法	通过向培养液中添加 IL-1β,构建NPCs退变模型	浓度:10 ng/mL;处理时长 24 h	[20,47]
H ₂ O ₂ 诱导法	通过向培养液中添加 H ₂ O ₂ ,构建NPCs退变模型	剂量:400 µmol;处理时长 24 h	[48,49]
TBHP 诱导法	通过向培养液中添加 TBHP,构建NPCs退变模型	剂量:50 µmol;处理时长 24 h	[23,50]
复制法	通过反复多次传代,构建NPCs退变模型	传代次数:6代	[36]
基因敲除法	通过敲定特殊基因,构建构建NPCs退变模型	基因名称:hsa_circ_0059955	[37]
生物诱导法	通过与维生物共培养,构建构建NPCs退变模型	微生物:痤疮丙酸杆菌(P. acnes)	[38]

nucleus pulposus cell apoptosis induced by high osmolality[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18: 2835-2845.

[14] Choi H, Merceron C, Mangiavini L, et al. Hypoxia promotes noncanonical autophagy in nucleus pulposus cells independent of MTOR and HIF1A signaling[J]. *Autophagy*, 2016, 12: 1631-1646.

[15] Xie ZY, Chen L, Wang F, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in nucleus pulposus degeneration and attenuates low pH-induced apoptosis of rat nucleus pulposus cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36: 627-637.

[16] Lee S, Moon CS, Sul D, et al. Comparison of growth factor and cytokine expression in patients with degenerated disc disease and herniated nucleus pulposus[J]. *Clin Biochem*, 2009, 42: 1504-1511.

[17] Aota Y, An H S, Imai Y, et al. Comparison of cellular response in bovine intervertebral disc cells and articular chondrocytes: effects of lipopolysaccharide on proteoglycan metabolism[J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 326: 787-793.

[18] Narayanan KB, Park HH. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways[J]. *Apoptosis*, 2015, 20: 196-209.

[19] Kim JS, Ellman MB, Yan D, et al. Lactoferricin mediates anti-inflammatory and anti-catabolic effects via inhibition of IL-1 and LPS activity in the intervertebral disc[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228: 1884-1896.

[20] Zhang Y, He F, Chen Z, et al. Melatonin modulates IL-1 β -induced extracellular matrix remodeling in human nucleus pulposus cells and attenuates rat intervertebral disc degeneration and inflammation[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11: 10499.

[21] Guo Z, Gao WS, Wang YF, et al. MiR-502 suppresses TNF- α -induced nucleus pulposus cell apoptosis by targeting TARF2[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 5558369.

[22] Tang Z, Hu B, Zang F, et al. Nrf2 drives oxidative stress-induced autophagy in nucleus pulposus cells via a Keap1/Nrf2/p62 feedback loop to protect intervertebral disc from degeneration[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 510.

[23] Zhou J, Liu Q, Yang Z, et al. Rutin maintains redox balance to relieve oxidative stress induced by TBHP in nucleus pulposus cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2021, 57: 448-456.

[24] Chen D, Xia D, Pan Z, et al. Metformin protects against apoptosis and senescence in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in vivo[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2441-e2441.

[25] Sun K, Sun X, Sun J, et al. Tissue renin-angiotensin system (tRAS) induce intervertebral disc degeneration by activating oxidative stress and inflammatory reaction[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 3225439.

[26] Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, et al. Classical renin-angiotensin system in kidney physiology[J]. *Compr Physiol*, 2014, 4: 1201-1228.

[27] Xiang Q, Cheng Z, Wang J, et al. Alicin attenuated advanced oxidation protein product-induced oxidative stress and mitochondrial apoptosis in human nucleus pulposus cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6685043.

[28] Liu Z, Wang Z, Huang C, et al. Duhuo Jisheng Decoction inhibits SDF-1-induced inflammation and matrix degradation in human degenerative nucleus pulposus cells in vitro through the CXCR4/NF- κ B pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39: 912-922.

[29] Ge J, Yang H, Chen Y, et al. PMMA bone cement acts on the Hippo/YAP pathway to regulate CTGF and induce intervertebral disc degeneration[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, 5: 3293-3302.

[30] Li K, Li Y, Mi J, et al. Resveratrol protects against sodium nitroprusside induced nucleus pulposus cell apoptosis by scavenging ROS[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41: 2485-2492.

[31] Gao XX, Liu CH, Hu ZL, et al. The biological effect of cobalt chloride mimetic-hypoxia on nucleus pulposus cells and the comparability with physical hypoxia in vitro[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2021, 26: 799-812.

[32] Wang W, Li P, Xu J, et al. Resveratrol attenuates high glucose-induced nucleus pulposus cell apoptosis and senescence through activating the ROS-mediated PI3K/Akt pathway[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38: BSR20171454.

[33] Chang H, Cai F, Zhang Y, et al. Early-stage autophagy protects nucleus pulposus cells from glucose deprivation-induced degeneration via the p-eIF2 α /ATF4 pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 529-535.

[34] 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[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113: 2112-2121.

[35] Liu J, Yuan C, Pu L, et al. Nutrient deprivation induces apoptosis of nucleus pulposus cells via activation of the BNIP3/AIF signalling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16: 7253-7260.

[36] Gong C, Pan W, Hu W, et al. Bone morphogenetic protein-7 retards cell subculture-induced senescence of human nucleus pulposus cells through activating the PI3K/Akt pathway[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39: BSR20182312.

[37] Kong D, Gu R, Zhang C, et al. Knockdown of hsa_circ_0059955 induces apoptosis and cell cycle arrest in nucleus pulposus cells via inhibiting itchy E3 ubiquitin protein ligase[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3951.

[38] He D, Zhou M, Bai Z, et al. Propionibacterium acnes induces intervertebral disc degeneration by promoting nucleus pulposus cell pyroptosis via NLRP3-dependent pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526: 772-779.

[39] Chen S, Zhao L, Deng X, et al. Mesenchymal stem cells protect nucleus pulposus cells from compression-induced apoptosis by inhibiting the mitochondrial pathway[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 9843120.

[40] Feng C, Yang M, Zhang Y, et al. Cyclic mechanical tension reinforces DNA damage and activates the p53-p21-Rb pathway to induce premature senescence of nucleus pulposus cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41: 3316-3326.

[41] Sun Y, Wang X, Fu G, et al. MicroRNA-199a-5p accelerates nucleus pulposus cell apoptosis and IVDD by inhibiting SIRT1-mediated deacetylation of p21[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 24: 634-645.

[42] Gröbner S, Adkins I, Schulz S, et al. Catalytically active Yersinia outer protein P induces cleavage of RIP and caspase-8 at the level of the DISC independently of death receptors in dendritic cells[J]. *Apoptosis*, 2007, 12: 1813-1825.

[43] Zhang YH, Zhao CQ, Jiang LS, et al. Cyclic stretch-induced apoptosis in rat annulus fibrosus cells is mediated in part by endoplasmic reticulum stress through nitric oxide production[J]. *Eur Spine J*, 2011, 20: 1233-1243.

[44] He R, Wang Z, Cui M, et al. HIF1A Alleviates compression-induced apoptosis of nucleus pulposus derived stem cells via upregulating autophagy[J]. *Autophagy*, 2021, 17: 3338-3360.

[45] Jiao S, Li J, Liu B, et al. Nucleus pulposus cell apoptosis is attenuated by CDMP-2 through regulating oxidative damage under the hyperosmotic environment[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38: BSR20181176.

[46] Kong L, Sun M, Jiang Z, et al. MicroRNA-194 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc by targeting TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 3056-3067.

[47] Zheng S, Ma J, Zhao X, et al. Ganoderic Acid A Attenuates IL-1 β -Induced Inflammation in Human Nucleus Pulposus Cells Through Inhibiting the NF- κ B Pathway[J]. *Inflammation*, 2022, 45: 851-862.

[48] Tang Z, Hu B, Zang F, et al. Nrf2 drives oxidative stress-induced autophagy in nucleus pulposus cells via a Keap1/Nrf2/p62 feedback loop to protect intervertebral disc from degeneration[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 1-12.

[49] Xia C, Zeng Z, Fang B, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration via anti-oxidant and anti-inflammatory effects[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 143: 1-15.

[50] Gao Z, Lin Y, Zhang P, et al. Sinomenine ameliorates intervertebral disc degeneration via inhibition of apoptosis and autophagy in vitro and in vivo[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11: 5956.

[51] 任绪艳, 杜艳艳, 刘华. 腰椎间盘突出症患者步态特征及相关机制研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14: 247-249.

(本文编辑:王晶)