

细胞衰老与椎间盘退变的相关性研究进展

张广智^{1,2}, 武作龙^{1,2}, 贺学岗^{1,2}, 高一诚^{1,2}, 郭旭东^{1,2}, 王以典^{1,2}, 刘明强^{1,2},
朱大学^{1,2}, 康学文^{1,2*}

(1. 兰州大学第二医院 骨科, 中国甘肃 兰州 730030; 2. 甘肃省骨关节疾病研究重点实验室, 中国甘肃 兰州 730030)

摘要: 椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是导致下腰痛的主要原因之一, 严重降低患者生活质量, 并给家庭带来沉重的经济负担。细胞衰老是驱动 IDD 的关键因素, 而炎症反应、氧化应激、线粒体功能障碍、端粒缩短、DNA 损伤、营养剥夺、机械负荷异常和表观遗传学改变介导了椎间盘细胞的衰老进程。因此, 本文主要就 IDD 进程中椎间盘细胞衰老的相关因素进行综述, 为后续相关研究提供参考。

关键词: 细胞衰老; 髓核细胞; 纤维环细胞; 软骨终板细胞; 椎间盘退变(IDD)

中图分类号: Q593+.6, R681.5+3

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2021)01-0058-06

Research Progress on Correlation Between Cell Senescence and Intervertebral Disc Degeneration

ZHANG Guang-zhi^{1,2}, WU Zuo-long^{1,2}, HE Xue-gang^{1,2}, GAO Yi-cheng^{1,2},
GUO Xu-dong^{1,2}, WANG Yi-dian^{1,2}, LIU Ming-qiang^{1,2}, ZHU Da-xue^{1,2},
KANG Xue-wen^{1,2*}

(1. Department of Orthopaedics, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu, China; 2. Key Laboratory of Osteoarthritis of Gansu Province, Lanzhou 730030, Gansu, China)

Abstract: Intervertebral disc degeneration (IDD) is one of the main causes of low back pain, which seriously reduces the patients' quality of life and imposes a heavy economic burden on their families. Cell senescence is the key factor driving IDD, and many factors, including inflammatory response, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, telomere shortening, DNA damage, nutrition deprivation, abnormal mechanical load and epigenetic changes, mediate the senescence process of intervertebral disc cells. Herein, the factors related to intervertebral disc cell senescence in the process of IDD are summarized for the subsequent research.

Key words: cell senescence; nucleus pulposus cells; anulus fibrosus cells; cartilage endplate cells; intervertebral disc degeneration (IDD)

(*Life Science Research*, 2021, 25(1): 058-063)

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是一种常见的肌肉骨骼系统退行性疾病, 也是导致慢性腰背部疼痛的主要原因, 严重影响患者的生活质量, 给家庭和社会造成极大的经济负担^[1]。据估计, 约 20%的青少年有轻度的 IDD, 并且 80%的人在一生中出现过背部疼痛症状^[2]。IDD

的具体发病机制目前仍不完全清楚, 现有的研究认为, IDD 是一种细胞介导的复杂过程, 最终导致椎间盘功能和结构的改变^[3]。其中, 细胞衰老被认为是导致 IDD 的主要原因之一, 而炎症反应、氧化应激、线粒体功能障碍、端粒缩短和 DNA 损伤、营养剥夺、机械负荷异常和表观遗传学改变参

收稿日期: 2020-04-07; 修回日期: 2020-04-22

基金项目: 脊柱疾患疼痛机制研究及治疗甘肃省国际科技合作基地项目(甘科外[2017]2 号-34); 兰州大学创新创业培育项目(excy201906)

作者简介: 张广智(1990—), 男, 甘肃临洮人, 硕士研究生, 主要从事脊柱外科方面的研究, E-mail: zhanggz18@lzu.edu.cn; *通信作者: 康学文(1968—), 男, 甘肃兰州人, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事脊柱外科方面的研究, E-mail: ery_kangxw@lzu.edu.cn。

与了椎间盘细胞的衰老进程,最终导致 IDD 的发生发展^[4]。目前,关于细胞衰老与 IDD 的研究多集中在椎间盘髓核(nucleus pulposus, NP)细胞、纤维环(anulus fibrosus, AF)细胞和软骨终板(cartilage endplate, CEP)细胞。本文就这方面研究进展作一综述,为后续相关研究提供参考。

1 椎间盘结构和功能概述

作为连接椎体的关节,椎间盘是脊柱承载系统中最为关键的部分,其主要作用是传递和吸收作用在脊柱轴向的压缩应力并保持脊柱的多轴灵活性,因此,是人体中较早发生退行性改变的组织^[5]。健康的椎间盘由中央凝胶状的 NP、外周包裹髓核的 AF 及连接上下椎体的 CEP 共同构成^[6]。NP 主要由富含 II 型胶原蛋白、弹性蛋白和蛋白聚糖的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)组成,在脊柱受力过程中主要起抵消和传递轴向压力载荷作用。AF 的 ECM 主要由相互交替的 I 型胶原纤维组成,主要功能是在脊柱弯曲或扭曲过程中防止髓核在压力作用下突出。CEP 是厚度均匀的透明软骨组织,其 ECM 主要由蛋白聚糖和胶原纤维组成。由于椎间盘是无血管无神经的组织,CEP 在椎间盘的营养供应中起重要作用,椎间盘通过 CEP 以扩散的方式交换营养物质和代谢废物,从而维持其正常的结构和功能^[7]。此外,在正常椎间盘中,许多生长因子和细胞因子使 ECM 的合成和分解保持动态平衡^[8]。因此,各种原因导致的椎间盘功能和结构的异常终将导致 IDD。

2 细胞衰老的特征

早在 1961 年, Hayflick 等^[9]就发现正常人成纤维细胞在连续传代后出现增殖能力受到限制,并首次提出“细胞衰老”这一概念。细胞衰老是指细胞处于不可逆性的增殖停滞状态,细胞周期永久性停滞在 G0/G1 期,形态上表现为形状变大、胞质内色素堆积和空泡形成,线粒体数量减少,胞核增大、核膜内陷和染色质固缩等,最终导致细胞死亡^[10-11]。衰老细胞的另一个重要特征就是分泌多种炎症因子、趋化因子、生长因子和组织重建蛋白酶等,组成衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)。这些因子广泛参与炎症反应、细胞增殖和迁移等多种生物学过程,其作用十分广泛。细胞衰老主要分为两种类型,即细胞复制性衰老和细胞过早性衰老。细胞

在连续复制过程中导致端粒缩短引起的衰老称为复制性衰老,而由炎症反应、氧化应激、DNA 损伤和线粒体功能障碍等外源性压力诱导的细胞衰老称为细胞过早性衰老。当细胞出现衰老后,衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)特异性表达升高,且 p53、p21、p16 等细胞周期抑制蛋白表达上调,它们是鉴定细胞衰老的主要标志物^[12]。

3 椎间盘细胞衰老与 IDD

当椎间盘 NP 细胞、AF 细胞和 CEP 细胞发生衰老后局部代谢状态发生改变,表现为合成代谢降低、分解代谢加强,导致 ECM 降解增加、NP 含水量下降、AF 弹性降低及 CEP 钙化增加,最终导致脊柱稳定性下降、椎间盘塌陷、椎体滑脱、骨赘形成、AF 撕裂及 NP 组织突出等一系列病理改变^[8]。相关研究表明,在 IDD 患者的 NP 和 AF 组织中 SA- β -gal 染色呈阳性的细胞数量显著增多,且这种阳性细胞数量与椎间盘磁共振下 Pfirrmann 分级呈正相关,而与 Ki67 阳性细胞(增殖细胞)的数量呈负相关^[13-15],提示椎间盘细胞衰老水平与 IDD 严重程度正相关。最近研究表明,炎症反应、氧化应激、线粒体功能障碍、端粒缩短和 DNA 损伤、营养剥夺及机械负荷异常等因素介导了细胞衰老相关的 IDD 发展。

3.1 炎症反应

炎症反应通常被认为是机体应对感染或组织损伤后的一种病理过程,越来越多的证据表明炎症是 IDD 进程中的关键因素^[16-17]。随着 IDD 进展,退变椎间盘中各种促炎细胞因子的水平显著增加,包括白细胞介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、IL-1 β 、IL-6、IL-17 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等^[18-25](表 1),这些炎症因子在局部产生自身免疫炎症反应并使椎间盘 ECM 的分解代谢增强,从而导致椎间盘功能紊乱和结构改变。相关研究表明,在变性椎间盘中 IL-1 β 的水平增加,且随着 IDD 的严重程度而增加;IL-1 β 不仅能直接抑制 ECM 合成,而且还形成一个正反馈回路,刺激其他炎症介质的释放和基质金属蛋白酶的合成,进而导致椎间盘局部分解代谢增强^[16]。体外实验证实,用 IL-1 β 刺激人 NP 和 AF 细胞后,IL-6、IL-8 和 IL-17 的水平均显著增加。可见,IL-1 β 可通过促进 IL-6、IL-8 和 IL-17 的释放而充当炎症级联事件的关键引发剂^[18]。Chen 等^[19]用

酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)方法检测了腰椎间盘突出症患者的血清 IL-21 浓度,发现其较椎间盘未突出患者明显增加。Gorth 等^[20]通过研究 IL-1 在年龄相关IDD中的作用发现,给予小鼠 *IL-1 α/β* 双基因敲除(IL-1KO)后,血液中炎症因子 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、IL-5 和 IL-15 的浓度显著降低。重要的是,这些炎症介质参与椎间盘细胞衰老进程。Markova 等^[21]研究发现, TNF- α 增加了体外培养牛椎间盘细胞中 SA- β -gal 染色阳性细胞的数量,并导致ECM从合成代谢转变为分解代谢。同样,在用 TNF- α 和 IL-1 β 处理大鼠 NP 细胞后, SA- β -gal 阳性细胞数量也显著增加^[22]。此外,一些炎症因子如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等对长入椎间盘的窦椎神经末梢产生炎性刺激,进而引发神经根性疼痛的临床症状^[4]。以上研究表明,炎症因子是强大的促细胞衰老因子,是导致 IDD 的关键因素之一,也是导致慢性腰背痛的重要原因。

3.2 氧化应激

氧化应激是导致椎间盘细胞衰老的主要原因之一,随着 IDD 的发展,椎间盘中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平显著增加,包括超氧阴离子(O₂ \cdot^-)、羟基自由基(\cdot OH)、过氧化氢(H₂O₂)和一氧化氮(NO),它们是细胞氧化代谢的副产物^[26-27]。NP 细胞是椎间盘中最重要的功能性细胞,已被证明是无厌氧的,在体内进行有氧代谢,而 ROS 是其主要的代谢副产物^[12]。过量 ROS 介导的氧化应激通过各种信号通路加速椎间盘的变性,包括核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路、丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein ki-

nase, MAPK)通路和 PI3K-Akt 信号通路等^[28-30]。Patil 等^[31]通过研究亚致死浓度 H₂O₂ 介导的氧化应激诱导的大鼠 NP 细胞过早衰老的过程,发现当细胞长期暴露于这种亚致死性氧化应激时,它们会变成衰老细胞,失去增殖能力,但仍具有活细胞的功能,表现为大的细胞畸形,细胞周期停滞在 G0/G1 期,同时衰老相关信号通路(p53-p21-pRb 和 p16-pRb 信号通路)激活, SA- β -gal 染色阳性。以上研究表明,氧化应激在 NP 细胞衰老中起着至关重要的作用。

AF 位于椎间盘的周缘部,由内、外层呈同心圆排列的纤维构成,内层是纤维软骨带,外层主要为胶原纤维。坚固的 AF 包围着内部柔软的 NP, AF 最重要的功能可能是通过液压密封 NP 细胞并使施加在椎间盘上的任何压力均匀化从而限制 NP 的突出,各种原因引起的 AF 降解都会导致其功能丧失,引起 NP 突出,从而引发腰背疼痛和神经损伤等一系列临床症状^[32]。有研究表明,与正常的椎间盘相比,IDD 患者中的 AF 细胞凋亡增加,而氧化应激在 AF 细胞凋亡中扮演重要的作用^[33]。此外,AF 细胞中过量 ROS 与 TNF- α 之间形成的正反馈回路也参与 IDD 的发展^[34]。然而,在氧化应激条件下,AF 细胞的衰老是否参与其凋亡过程,目前未见相关文献报道,值得未来进一步研究。

3.3 线粒体功能障碍

线粒体是真核细胞内具有双层膜结构的细胞器,由线粒体内膜包裹的线粒体基质含有完成三羧酸循环以及氧化还原反应的重要组分,其通过氧化磷酸化过程产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),从而保证细胞的正常功能^[35]。ATP 是

表 1 椎间盘退变后主要促炎因子的变化
Table 1 Major variations in proinflammatory factors after IDD

Proinflammatory cytokines	Major variations	References
IL-1 α	Upregulation in degenerated intervertebral disc	[18]
IL-1 β	Upregulation in degenerated and herniated intervertebral disc	[23]
IL-2	Upregulation in degenerated NP cells	[18]
IL-4	Upregulation in degenerated NP cells	[18]
IL-5	Decreases in global <i>IL-1α/β</i> double knockout (IL-1KO) mice	[20]
IL-6	Upregulation in degenerated NP cells	[24]
IL-8	Upregulation in degenerated and herniated intervertebral disc	[25]
IL-10	Upregulation in degenerated NP cells	[18]
IL-15	Decreases in global <i>IL-1α/β</i> double knockout (IL-1KO) mice	[20]
IL-17	Upregulation in degenerated NP cells	[24]
IL-21	Upregulation in degenerated and herniated intervertebral disc	[19]
IFN- γ	Decreases in global <i>IL-1α/β</i> double knockout (IL-1KO) mice	[20]
TNF- α	Upregulation in degenerated and herniated intervertebral disc	[18]
TGF- β 1	Increases in degenerated NP tissues	[18]

细胞最主要的能量来源,但在 ATP 产生的同时也会产生 ROS 来介导氧化应激^[36]。随着年龄的增长,线粒体 DNA 损伤加剧,导致线粒体功能障碍和异常的电子泄漏,从而增加 ROS 的产生,同时细胞氧化还原平衡能力的降低导致 ROS 对细胞的氧化损害增加,进而介导细胞衰老。相反,线粒体呼吸链解耦联可减少 H₂O₂ 的产生,从而延迟细胞的复制性衰老^[12]。

椎间盘细胞线粒体功能受损参与 IDD 的发生发展^[37]。有研究表明,在大鼠 NP 细胞中 Progerin 蛋白的积累可以通过提高 ROS 水平,破坏线粒体膜电位,降低 ATP 产生以及改变线粒体酶复合物的活性,进而破坏线粒体的结构和功能,加速 IDD 进程^[38]。另有研究报道,衰老的 NP 细胞中与线粒体功能相关的基因(包括底物脱氢酶、细胞色素和底物载体的编码基因)的表达显著上调,表明在衰老的 NP 细胞中线粒体功能发生异常^[39]。Chen 等^[40]研究了骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)对 NP 细胞再生作用的影响,发现与 BMSC 共培养可降低 NP 细胞内的 ROS,并维持细胞线粒体膜电位和线粒体完整性,从而减轻压力诱导的 NP 细胞线粒体损伤。由此可见,线粒体功能在 IDD 过程中发挥着重要作用,线粒体衍生的 ROS 加速了椎间盘细胞氧化应激诱导的早衰,进而导致 IDD。因此,针对椎间盘细胞中线粒体功能障碍的机制研究有助于揭示椎间盘细胞衰老的潜在机制和 IDD 的发病机理。

3.4 端粒缩短和 DNA 损伤

哺乳动物的端粒由重复 DNA 片段(TTAGGG)组成,长度为 50~400 个核苷酸^[41]。由于 DNA 末端的不完全复制,在细胞复制过程中端粒长度逐渐缩短。有研究表明,随着 IDD 的发展,端粒长度逐渐缩短,端粒酶活性逐渐降低,同时衰老信号通路(p53-p21-Rb 和 p16-pRb 信号通路)激活,提示端粒缩短在 IDD 发生发展过程中触发了椎间盘细胞的复制性衰老^[4]。Jeong 等^[42]从接受椎间盘手术的不同年龄(35 岁、42 岁、55 岁、66 岁和 76 岁)患者中提取并培养人 NP 细胞,发现随着细胞的复制,不同年龄患者的 NP 细胞都表现出衰老特征,具体为 SA- β -gal 阳性细胞数量增加、端粒缩短、端粒酶活性降低及 p53-p21-pRb 和 p16-pRb 通路激活。Wu 等^[43]用慢病毒载体将端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)转入衰老的人 NP 细胞中,发现随着细胞的复制,

端粒长度得以维持,端粒酶活性得到恢复,细胞衰老得到延缓,同时细胞增殖速率有所提高。以上研究结果表明,端粒长度的保持及端粒酶活性的维持在细胞复制性衰老中发挥重要的作用,而基于载体导入的基因治疗可能是未来治疗 IDD 的方向之一。

DNA 损伤是指物理或化学因素引起的细胞内 DNA 双链的破坏,导致基因突变、染色体重排,严重者导致遗传信息丢失、细胞周期停滞和凋亡等^[44]。研究表明,端粒缩短常引起细胞内 DNA 损伤反应,而细胞损伤是细胞衰老的内在触发因素^[4]。有研究报道,电离辐射通过导致细胞内 DNA 损伤进而增加野生型小鼠 NP 组织中 p16 阳性细胞的数量^[45]。Nasto 等^[46]将成年野生型和 DNA 修复基因 *Erc1* 缺陷的小鼠暴露于电离辐射中,以诱导 DNA 损伤并研究其对椎间盘结构的影响,结果发现在 *Erc1* 缺陷的小鼠椎间盘中,细胞衰老和凋亡均明显增加。因此,各种因素导致的 DNA 损伤引起的椎间盘细胞衰老是介导 IDD 发生发展的重要因素之一。

3.5 营养剥夺

细胞营养的减少被认为是 IDD 的另一重要原因。现有研究已经证明,血清饥饿会抑制人工培养椎间盘细胞的增殖,并增加其衰老速率,而给予高浓度血清可增加 NP 细胞的增殖速率^[47]。多种血清来源的生长因子可增强椎间盘细胞的增殖,包括胰岛素样生长因子(insulin like growth factor, IGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)等^[48-50]。此外,由于椎间盘组织的无血管性,CEP 对椎间盘营养供应至关重要,大多数营养物质通过其扩散以滋养椎间盘细胞,从而维持椎间盘正常的结构和功能^[51]。在 CEP 退化的病理过程中,CEP 细胞的凋亡和钙化阻断了椎间盘的营养供应,从而加速了椎间盘细胞的衰老,最终导致 IDD^[4]。因此,椎间盘正常营养的供应对维持其正常功能十分重要,而 CEP 的变性可能是导致椎间盘细胞衰老的原因之一。

3.6 机械载荷异常

人类的脊柱承受多方向的机械载荷,包括轴向、径向和圆周方向的压缩、拉伸与剪切力,而机械载荷异常是 IDD 的危险因素之一^[4]。研究表明,肥胖引起的脊柱机械负荷增加是 IDD 发生发展

的危险因素, 体重指数的增加改变了椎间盘的生物力学, 最终导致椎间盘间隙的变窄和椎间盘细胞分解代谢的增强^[52]。Feng 等^[53]发现 NP 细胞长时间暴露于周期性机械张力下可诱导其过早性衰老。Liang 等^[54]通过前肢截肢技术诱导大鼠直立行走来模拟人类的直立姿势, 发现长时间的直立姿势会导致 NP 组织胶原蛋白结构紊乱, AF 出现裂隙和椎间盘高度降低, 同时 ECM 分解增强。另外, 长时间的直立姿势上调了椎间盘细胞衰老相关基因(包括 *p16*、*p27*、*p19ARF*、*p27KIP*、*RB*、*PTEN* 和 *R-AGE*)的表达。Ao 等^[55]基于实验性小鼠的疏水性, 将实验组小鼠放置在含水深度约 5 mm 的空间内以诱导其双足站立姿势(每天 6 h), 而对照组正常饲养, 10 周后发现实验组小鼠椎间盘退变程度明显加重。以上研究表明, 机械负荷异常导致椎间盘细胞的衰老, 从而加速 IDD 的发展进程。

3.7 表观遗传学改变

表观遗传学是研究 DNA 序列不变的前提下, 基因表达可遗传的改变的一门遗传学分支学科, 其研究对象主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 RNA 编辑等, 这些变化是通过环境与基因组的相互作用来调控基因的特异性表达, 使其产生永久性改变, 在疾病的发生发展中发挥重要作用^[56]。Ikuno 等^[57]研究表明, 在 IDD 晚期, DNA 甲基化程度明显加重。Yang 等^[58]报道, miR-143-5p 在退变的 NP 细胞中高表达, 并且在 NP 细胞中加入 miR-143-5p 特异性抑制剂后, 细胞增殖增加, 凋亡下降, 且 SA- β -gal 染色阳性细胞数量显著减少。遗憾的是, 关于表观遗传学改变在 IDD 中的研究仍处于起步阶段, 具体机制仍需要大量的研究来证明。

4 结语和展望

综上所述, 在 IDD 发生发展过程中, 细胞衰老是导致 IDD 进展的重要因素, 而炎症反应、氧化应激、线粒体功能障碍、端粒缩短、DNA 损伤、营养剥夺、机械负荷异常和表观遗传学改变是导致椎间盘细胞衰老的常见原因。因此, 降低细胞衰老水平可以减轻椎间盘退变程度。然而, IDD 是一个缓慢进展的过程, 其具体机制仍不完全明确。目前, 国内外许多学者利用动物模型并在细胞水平进行相关实验研究, 均无法完全模拟人体内 IDD 进程中椎间盘功能和结构的具体改变, 这也使得现有的研究成果难以解释其复杂的机制。此外, 关于 IDD 的研究目前多集中在 NP 组织, 而在

AF 和 CEP 层面的研究仍然很少, 对于这方面的研究也是未来非常有前途的方向之一。总的来讲, 椎间盘细胞衰老研究的不断深入和抗衰老策略的持续开发, 必将为这种慢性疾病提供新的治疗契机。

参考文献(References):

- [1] ZHANG T W, LI Z F, DONG J, *et al.* The circadian rhythm in intervertebral disc degeneration: an autophagy connection[J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 2020, 52(1): 31–40.
- [2] YANG S, ZHANG F, MA J, *et al.* Intervertebral disc ageing and degeneration: the antiapoptotic effect of oestrogen[J]. *Ageing Research Reviews*, 2020, 57: 100978.
- [3] RIDER S M, MIZUNO S, KANG J D. Molecular mechanisms of intervertebral disc degeneration[J]. *Spine Surgery and Related Research*, 2019, 3(1): 1–11.
- [4] FENG C, LIU H, YANG M, *et al.* Disc cell senescence in intervertebral disc degeneration: causes and molecular pathways[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(13): 1674–1684.
- [5] CHEPURIN D, CHAMILI U, SHELDRIK K, *et al.* Bony stress in the lumbar spine is associated with intervertebral disc degeneration and low back pain: a retrospective case-control MRI study of patients under 25 years of age[J]. *European Spine Journal*, 2019, 28(11): 2470–2477.
- [6] BOWLES R D, SETTON L A. Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair[J]. *Biomaterials*, 2017, 129: 54–67.
- [7] SAMPARA P, BANALA R R, VEMURI S K, *et al.* Understanding the molecular biology of intervertebral disc degeneration and potential gene therapy strategies for regeneration: a review[J]. *Gene Therapy*, 2018, 25(2): 67–82.
- [8] STITH S, JAGIELSKI M, FLEISCHMANN A, *et al.* Degeneration of lumbar intervertebral discs: characterization of annulus fibrosus tissue and cells of different degeneration grades[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(6): 2165.
- [9] HAYFLICK L, MOORHEAD P S. The serial cultivation of human diploid cell strains[J]. *Experimental Cell Research*, 1961, 25: 585–621.
- [10] SIKORA E, BIELAK-ZMIJEWSKA A, MOSIENIAK G. Cellular senescence in ageing, age-related disease and longevity[J]. *Current Vascular Pharmacology*, 2014, 12(5): 698–706.
- [11] CALCINOTTO A, KOHLI J, ZAGATO E, *et al.* Cellular senescence: aging, cancer, and injury[J]. *Physiological Reviews*, 2019, 99(2): 1047–1078.
- [12] FENG C, ZHANG Y, YANG M, *et al.* Oxygen-sensing Nox4 generates genotoxic ROS to induce premature senescence of nucleus pulposus cells through MAPK and NF- κ B pathways[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2017: 7426458.
- [13] LI Z, CHEN S, CHEN S, *et al.* Moderate activation of Wnt/beta-catenin signaling promotes the survival of rat nucleus pulposus cells via regulating apoptosis, autophagy, and senescence[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(8): 12519–12533.
- [14] NOVAIS E J, DIEKMAN B O, SHAPIRO I M, *et al.* p16^{INK4a} deletion in cells of the intervertebral disc affects their matrix homeostasis and senescence associated secretory phenotype without altering onset of senescence[J]. *Matrix Biology*, 2019, 82: 54–70.
- [15] CHE Y J, GUO J B, LIANG T, *et al.* Assessment of changes in the micro-nano environment of intervertebral disc degeneration based on Pfirrmann grade[J]. *Spine Journal*, 2019, 19(7): 1242–1253.

- [16] JIN H, WANG Q, WU J, *et al.* Baicalein inhibits the IL-1 β -induced inflammatory response in nucleus pulposus cells and attenuates disc degeneration *in vivo*[J]. *Inflammation*, 2019, 42(3): 1032-1044.
- [17] HAN Y, YUAN F, DENG C, *et al.* Metformin decreases LPS-induced inflammatory response in rabbit annulus fibrosus stem/progenitor cells by blocking HMGB1 release[J]. *Aging*, 2019, 11(22): 10252-10265.
- [18] CAI F, ZHU L, WANG F, *et al.* The paracrine effect of degenerated disc cells on healthy human nucleus pulposus cells is mediated by MAPK and NF- κ B pathways and can be reduced by TGF- β 1[J]. *DNA and Cell Biology*, 2017, 36(2): 143-158.
- [19] CHEN B, LIU Y, ZHANG Y, *et al.* IL-21 is positively associated with intervertebral disc degeneration by interaction with TNF- α through the JAK-STAT signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2017, 40(2): 612-622.
- [20] GORTH D J, SHAPIRO I M, RISBUD M V. A new understanding of the role of IL-1 in age-related intervertebral disc degeneration in a murine model[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2019, 34(8): 1531-1542.
- [21] MARKOVA D Z, KEPLER C K, ADDYA S, *et al.* An organ culture system to model early degenerative changes of the intervertebral disc II: profiling global gene expression changes[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2013, 15: R121.
- [22] LI X, LIN F, WU Y, *et al.* Resveratrol attenuates inflammation environment-induced nucleus pulposus cell senescence *in vitro*[J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(5): BSR20190126.
- [23] GU R, HUANG Z, LIU H, *et al.* Moracin attenuates LPS-induced inflammation in nucleus pulposus cells via Nrf2/HO-1 and NF- κ B/TGF- β pathway[J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(12): BSR20191673.
- [24] FENG C, HE J, ZHANG Y, *et al.* Collagen-derived N-acetylated proline-glycine-proline upregulates the expression of pro-inflammatory cytokines and extracellular matrix proteases in nucleus pulposus cells via the NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 40(1): 164-174.
- [25] MOUSER V H M, ARKESTEIJN I T M, VAN DIJK B G M, *et al.* Hypotonicity differentially affects inflammatory marker production by nucleus pulposus tissue in simulated disc degeneration versus herniation[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2019, 37(5): 1110-1116.
- [26] LIU Y, LIN J, WU X, *et al.* Aspirin-mediated attenuation of intervertebral disc degeneration by ameliorating reactive oxygen species *in vivo* and *in vitro*[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019: 7189854.
- [27] ZHANG G, DENG Y, XIE Q, *et al.* Sirtuins and intervertebral disc degeneration: roles in inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2020, 508: 33-42.
- [28] JIANG Y, DONG G, SONG Y. Nucleus pulposus cell senescence is alleviated by resveratrol through regulating the ROS/NF- κ B pathway under high-magnitude compression[J]. *Bioscience Reports*, 2018, 38(4): BSR20180670.
- [29] NAN L P, WANG F, RAN D, *et al.* Naringin alleviates H₂O₂-induced apoptosis via the PI3K/Akt pathway in rat nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells[J]. *Connective Tissue Research*, 2020, 61(6): 554-567.
- [30] ZHOU Z, WANG Y, LIU H, *et al.* PBN protects NP cells from AAPH-induced degenerative changes by inhibiting the ERK1/2 pathway[J]. *Connective Tissue Research*, 2020. DOI: 10.1080/03008207.2020.1743697.
- [31] PATIL P, FALABELLA M, SAEED A, *et al.* Oxidative stress-induced senescence markedly increases disc cell bioenergetics[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2019, 180: 97-106.
- [32] SEDIGHI M, HAGHNEGAHDAR A. Role of vitamin D3 in treatment of lumbar disc herniation-pain and sensory aspects: study protocol for a randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2014, 15: 373.
- [33] ZHANG F, ZHAO X, SHEN H, *et al.* Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration (review)[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2016, 37(6): 1439-1448.
- [34] SUZUKI S, FUJITA N, HOSOGANE N, *et al.* Excessive reactive oxygen species are therapeutic targets for intervertebral disc degeneration[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2015, 17: 316.
- [35] ANNESLEY S J, FISHER P R. Mitochondria in health and disease[J]. *Cells*, 2019, 8(7): 680.
- [36] MATSUHASHI T, SATO T, KANNO S I, *et al.* Mitochondrial acid 5 (MA-5) facilitates ATP synthase oligomerization and cell survival in various mitochondrial diseases[J]. *EBioMedicine*, 2017, 20: 27-38.
- [37] KANG L, LIU S, LI J, *et al.* The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ protects against intervertebral disc degeneration by ameliorating mitochondrial dysfunction and redox imbalance[J]. *Cell Proliferation*, 2020, 53(3): e12779.
- [38] XU X, WANG D, ZHENG C, *et al.* Progerin accumulation in nucleus pulposus cells impairs mitochondrial function and induces intervertebral disc degeneration and therapeutic effects of sulforaphane[J]. *Theranostics*, 2019, 9(8): 2252-2267.
- [39] HARTMAN R, PATIL P, TISHERMAN R, *et al.* Age-dependent changes in intervertebral disc cell mitochondria and bioenergetics[J]. *European Cells & Materials*, 2018, 36: 171-183.
- [40] 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 International*, 2017, 2017: 9843120.
- [41] DOKSANI Y. The response to DNA damage at telomeric repeats and its consequences for telomere function[J]. *Genes*, 2019, 10(4): 318.
- [42] JEONG S W, LEE J S, KIM K W. *In vitro* lifespan and senescence mechanisms of human nucleus pulposus chondrocytes[J]. *Spine Journal*, 2014, 4(3): 499-504.
- [43] WU J, WANG D, RUAN D, *et al.* Prolonged expansion of human nucleus pulposus cells expressing human telomerase reverse transcriptase mediated by lentiviral vector[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2014, 32(1): 159-166.
- [44] SRINIVAS U S, TAN B, VELLAYAPPAN B A, *et al.* ROS and the DNA damage response in cancer[J]. *Redox Biology*, 2019, 25: 101084.
- [45] KOUROUMALIS A, MAVROGONATOU E, SAVVIDOU O D, *et al.* Major traits of the senescent phenotype of nucleus pulposus intervertebral disc cells persist under the specific microenvironmental conditions of the tissue[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2019, 177: 118-127.
- [46] NASTO L A, WANG D, ROBINSON A R, *et al.* Genotoxic stress accelerates age-associated degenerative changes in intervertebral discs[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2013, 134(1-2): 35-42.
- [47] YURUBE T, BUCHSER W J, MOON H J, *et al.* Serum and nutrient deprivation increase autophagic flux in intervertebral disc annulus fibrosus cells: an *in vitro* experimental study[J]. *European Spine Journal*, 2019, 28(5): 993-1004.
- [48] LEHMANN T P, JAKUB G, HARASYMCZUK J, *et al.* Transforming growth factor beta mediates communication of co-cultured human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2018, 36(11): 3023-3032.
- [49] KUO Y J, WU L C, SUN J S, *et al.* Mechanical stress-induced apoptosis of nucleus pulposus cells: an *in vitro* and *in vivo* rat model[J]. *Journal of Orthopaedic Science*, 2014, 19(2): 313-322.

- [8] 赵建成. 植物学[M]. 北京: 科学出版社(ZHAO Jian-cheng. Botany[M]. Beijing: Science Press), 2013: 201.
- [9] 王建书. 植物学[M]. 2 版. 北京: 中国农业科学技术出版社(WANG Jian-shu. Botany[M]. 2nd ed. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press), 2013: 225.
- [10] 叶创兴, 朱念德, 廖文波, 等. 植物学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社(YE Chuang-xing, ZHU Nian-de, LIAO Wen-bo, *et al.* Botany[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press), 2014: 240.
- [11] 张宪省. 植物学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社(ZHANG Xian-sheng. Botany[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press), 2014: 197.
- [12] 吴相钰, 陈守良, 葛明德. 陈阅增普通生物学[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社(WU Xiang-yu, CHEN Shou-liang, GE Ming-de. Chen Yuezheng General Biology[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press), 2014: 400-401.
- [13] 马炜梁. 植物学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社(MA Wei-liang. Botany[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press), 2015: 187.
- [14] 王文和, 关雪莲. 植物学[M]. 北京: 中国林业出版社(WANG Wen-he, GUAN Xue-lian. Botany[M]. Beijing: China Forestry Press), 2015: 256.
- [15] 周云龙, 刘全儒. 植物生物学[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社(ZHOU Yun-long, LIU Quan-ru. Plant Biology[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press), 2016: 320.
- [16] 贺学礼. 植物学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社(HE Xue-li. Botany[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press), 2016: 202.
- [17] 杨世杰, 汪矛, 张志翔. 植物生物学[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社(YANG Shi-jie, WANG Mao, ZHANG Zhi-xiang. Plant Biology[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press), 2017: 257.
- [18] 朱诚. 植物学[M]. 北京: 北京师范大学出版社(ZHU Cheng. Botany[M]. Beijing: Beijing Normal University Press), 2017: 326.
- [19] 强胜. 植物学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社(QIANG Sheng. Botany[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press), 2017: 249.
- [20] 金银根. 植物学[M]. 3 版. 北京: 科学出版社(JIN Yin-gen. Botany[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press), 2018: 65.
- [21] SPICHTER R E, SAVOLAINEN V, FIGEAT M, *et al.* Systematic Botany of Flowering Plants: A New Phylogenetic Approach to Angiosperms of the Temperate and Tropical Regions[M]. Enfield, NH: Science Publishers, 2004: 58.
- [22] EVERT R F, EICHHORN S E. Raven Biology of Plants[M]. 8th ed. New York: W.H.Freeman and Company, 2013: 436-437, 455-456.
- [23] POORT R J, VISSCHER H, DILCHER D L. Zoidogamy in fossil gymnosperms: the centenary of a concept, with special reference to prepollen of late Paleozoic conifers[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1996, 93(21): 11713-11717.
- [24] JOHRI B M. Haustorial role of pollen tubes[J]. Annals of Botany, 1992, 70: 471-475.
- [25] WU C S, CHAW S M, HUANG Y Y. Chloroplast phylogenomics indicates that *Ginkgo biloba* is sister to cycads[J]. Genome Biology and Evolution, 2013, 5(1): 243-254.
- [26] SIMPSON M G. Plant Systematics[M]. 2nd ed. Burlington: Academic Press, 2010: 136.
- [27] HENRY R J. Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plants[M]. Trowbridge: Cromwell Press, 2005: 27.
- [28] HACKENBERG D, TWELL D. The evolution and patterning of male gametophyte development[J]. Current Topics in Developmental Biology, 2019, 131: 257-298.
- [29] SINGH V, PANDE P C, JAIN D K. A Textbook of Botany: Diversity of Systematics of Seed Plants[M]. Meerut: Rastogi Publications, 2009: 8.
- [30] BERG L R. Introductory Botany: Plants, People, and the Environment[M]. 2nd ed. Belmont: Thomson Learning Academic Resource Center, 2008: 478.
- [31] ZHANG J, HUANG Q, ZHONG S, *et al.* Sperm cells are passive cargo of the pollen tube in plant fertilization[J]. Nature Plants, 2017, 3: 17079.

(上接第 63 页)

- [50] HÄCKEL S, ZOLFAGHAR M, DU J, *et al.* Fibrin-hyaluronic acid hydrogel (RegenoGel) with fibroblast growth factor-18 for *in vitro* 3D culture of human and bovine nucleus pulposus cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(20): 5036.
- [51] SHENG B, YUAN Y, LIU X, *et al.* Protective effect of estrogen against intervertebral disc degeneration is attenuated by miR-221 through targeting estrogen receptor alpha[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2018, 50(4): 345-354.
- [52] RUIZ-FERNÁNDEZ C, FRANCISCO V, PINO J, *et al.* Molecular relationships among obesity, inflammation and intervertebral disc degeneration: are adipokines the common link?[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(8): 2030.
- [53] 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]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 41(6): 3316-3326.
- [54] LIANG Q Q, CUI X J, XI Z J, *et al.* Prolonged upright posture induces degenerative changes in intervertebral discs of rat cervical spine[J]. Spine, 2011, 36(1): E14-E19.
- [55] AO X, WANG L, SHAO Y, *et al.* Development and characterization of a novel bipedal standing mouse model of intervertebral disc and facet joint degeneration[J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2019, 477(6): 1492-1504.
- [56] CAVALLI G, HEARD E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease[J]. Nature, 2019, 571(7766): 489-499.
- [57] IKUNO A, AKEDA K, TAKEBAYASHI S I, *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation profile identifies differentially methylated loci associated with human intervertebral disc degeneration[J]. PLoS One, 2019, 14(9): e222188.
- [58] YANG Q, GUO X P, CHENG Y L, *et al.* MicroRNA-143-5p targeting eEF2 gene mediates intervertebral disc degeneration through the AMPK signaling pathway[J]. Arthritis Research & Therapy, 2019, 21: 97.