

本文引用: 段嘉豪, 李兆勇, 陈 龙, 刘恩旭, 李硕夫, 杨 雷, 杨少锋. 脂肪间充质干细胞修复氧化损伤髓核细胞机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(8): 1408-1414.

脂肪间充质干细胞修复氧化损伤髓核细胞机制研究

段嘉豪, 李兆勇, 陈 龙, 刘恩旭, 李硕夫, 杨 雷, 杨少锋*

湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

[摘要] **目的** 探究脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cell, ADSC)修复氧化损伤髓核细胞(nucleus pulposus cell, NPC)的作用机制。**方法** 实验分为 NPC 组、ADSC 组、NPC+ADSC 组、H₂O₂+NPC+ADSC 组、H₂O₂+NPC 组 5 组。采用 H₂O₂ 构建 NPC 氧化损伤模型;SA-β-Gal 染色分析 NPC 衰老程度;流式细胞仪检测 NPC 氧化损伤水平;Western blot 检测 ADSC 中 Collagen II、Aggrecan 蛋白表达水平,以及 NPC 中 Collagen II、p53、p21、TGF-β1、Smad2、p-Smad2 蛋白表达水平;qPCR 检测 ADSC 中 Collagen II、Aggrecan mRNA 表达水平,以及 NPC 中 Collagen II、p53、p21、TGF-β1、Smad2 mRNA 表达。**结果** 与 H₂O₂+NPC 组相比较,H₂O₂+NPC+ADSC 组的 NPC 衰老数量减少($P<0.05$),NPC 氧化损伤减轻($P<0.05$),p53、p21 蛋白和基因表达下降($P<0.05$),Collagen II、TGF-β1、p-Smad2 蛋白和基因表达升高($P<0.05$)。与 ADSC 组相比,NPC+ADSC 组 Collagen II、Aggrecan 基因和蛋白表达升高($P<0.05$)。**结论** ADSC 与 NPC 共培养不仅可以促进 ADSC 类髓核化,而且 ADSC 可修复氧化损伤的 NPC,抑制其衰老,该过程可能与调控 TGF-β1/Smad2 信号通路有关。

[关键词] 脂肪间充质干细胞;髓核细胞;氧化损伤;细胞衰老;TGF-β1/Smad2 信号通路

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.08.010

Mechanism of adipose-derived mesenchymal stem cells repairing oxidatively damaged nucleus pulposus cells

DUAN Jiahao, LI Zhaoyong, CHEN Long, LIU Enxu, LI Shuofu, YANG Lei, YANG Shaofeng*

The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of adipose-derived mesenchymal stem cell (ADSC) repairing oxidatively damaged nucleus pulposus cell (NPC). **Methods** Five groups were divided as NPC group, ADSC group, NPC+ADSC group, H₂O₂+NPC+ADSC group, and H₂O₂+NPC group. Hydrogen peroxide (H₂O₂) was used to construct the oxidative damage model of NPC; SA-β-Gal staining was performed to analyze the degree of senescence in NPC; flow cytometer was used to determine the level of oxidative damage in NPC; Western blot was used to check the protein expressions of Collagen II and Aggrecan in ADSC, and the protein expressions of Collagen II, p53, p21, TGF-β1, Smad2, and p-Smad2 in NPC; qPCR was carried out to determine the mRNA expressions of Collagen II and Aggrecan in ADSC, and the mRNA expressions of Collagen II, p53, p21, TGF-β1, and Smad2 in NPC. **Results** Compared with H₂O₂+NPC group, H₂O₂+NPC+ADSC group showed a reduced number of senescent NPC ($P<0.05$), attenuated oxidative damage to NPC ($P<0.05$), decreased protein and mRNA expressions of p53 and p21 ($P<0.05$), and elevated protein and mRNA expressions of Collagen II, TGF-β1, and p-Smad2 ($P<0.05$). Compared with ADSC group, the protein and mRNA

[收稿日期]2023-03-27

[基金项目]国家自然科学基金项目(82174402);湖南省自然科学基金项目(2023JJ60345;2023JJ60342);湖南省教育厅科学研究项目(21C0233);湖南省卫健委科研计划项目(202204074858);湖南省研究生科研创新课题项目(CX20220807);湖南中医药大学校级项目(2021XJJ041)。

[第一作者]段嘉豪,男,博士研究生,研究方向:脊柱脊髓相关疾病的诊治。

[通信作者]* 杨少锋,男,博士,教授,主任医师,博士研究生导师,博士,E-mail:574996585@qq.com。

expressions of Collagen II and Aggrecan were elevated in NPC+ADSC group ($P<0.05$). **Conclusion** Co-culture of ADSC and NPC can promote ADSC-like myelination, and ADSC can repair oxidatively damaged NPC and inhibit their senescence, which may be related to the regulation of TGF- β 1/Smad2 pathway.

[**Keywords**] adipose-derived mesenchymal stem cells; nucleus pulposus cells; oxidative damage; cell senescence; TGF- β 1/Smad2

下腰痛(low back pain, LBP)是临床常见病、多发病。流行病学调查显示,80%的人一生中至少会出现一次下腰痛,造成了巨大的社会问题和经济负担^[1]。椎间盘退变(intervertebral discs degeneration, IDD)是公认导致下腰痛的主要原因^[2],其典型表现为髓核细胞(nucleus pulposus cell, NPC)衰老和死亡增加、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解、蛋白聚糖和II型胶原蛋白合成减少,炎症因子浸润、酸性环境增强等微环境恶化^[3]。因此,如何防治IDD具有重要的现实意义。

目前,用于治疗IDD所引起腰背痛的经典方法是手术切除椎间盘以减轻疼痛^[4],但手术并不能修复或减缓潜在的退行性病变。相比于单纯的机械性切除椎间盘,生物修复椎间盘具有恢复退变椎间盘生物功能、缓解病变、降低并发症等优点^[5-7]。因此,细胞治疗是一种有潜力的修复IDD的治疗方法。

相较于其他干细胞,脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cell, ADSC)因其来源丰富、易获取、无免疫排斥等优点成为修复退变椎间盘的理想候选细胞^[8],可分泌生物活性因子以调节炎症,且具有分化为NPC的潜力^[9]。TGF- β /Smad通路是IDD的经典信号通路,TGF- β 1信号传导在IDD中发挥着重要调节作用^[10]。本研究通过建立NPC氧化损伤模型,使用Transwell小室与ADSC共培养,探究ADSC类髓核化表现以及对NPC氧化损伤修复机制,旨在为相关实验研究及临床应用提供一定的参考价值。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

普诺赛人椎间盘髓核细胞完全培养基、PBS缓冲液(武汉普诺赛生命科技有限公司;批号:CM-H097、PB180327);成人ADSC完全培养基(海星生物科技有限公司;批号:ADHX-C101);0.25%胰酶消化液(北京索莱宝科技有限公司;批号:SL6020-100 mL);细胞培养皿、细胞培养瓶(贝兰伯;批号:CCD06-060A、CCB06-205);Costar Transwell小室

(MERCK,批号:3412);30%过氧化氢(上海国药集团,批号:10011208);MTT试剂盒、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒、ROS检测试剂盒(碧云天,批号:C0602、C0009S、S0033);TGF- β 1抗体、Collagen II抗体、过氧化酶山羊抗兔IgG二抗、 β -actin抗体(Protein tech公司,批号:21898-1-AP、28459-1-AP、SA00001-2、66009-1-Ig);Aggrecan抗体、p-Smad2抗体、Smad2抗体(Abcam公司,批号:ab36861、ab188334、ab40855);p53抗体、p21抗体(CTS公司,批号:#2527、#2947);ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号:Q711-02);超净工作台、生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司,型号:SW-CJ-1FD、BSC-1300 II A2);倒置生物显微镜(德国徕卡,型号:DMI 1);二氧化碳培养箱(新加坡ESCO,型号:CCL-170B-8);冷冻离心机(美国CENTURION,型号:K2015R);荧光定量RCP仪(美国Thermo Fisher,型号:PIKOREAL96);多功能酶标仪(瑞士Tecan,型号:Spark 20M);电泳仪、凝胶成像仪(美国Bio-Rad,型号:PowerPac Basic、Chemi-DocXRS+)。

1.2 细胞来源

成人ADSC(海星生物科技有限公司,批号:20210113S1);人椎间盘NPC(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:CP-H097)。

1.3 细胞培养及NPC氧化损伤模型

细胞融合至80%~90%用胰酶消化传至下1代,按1:2进行传代,3~5 d换液1次,第3代开始进行实验操作。分别使用不同浓度(0、100、200、300、400、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 H_2O_2 造模,24 h后MTT法评价其对NPC抑制率,确定细胞毒性,计算半抑制浓度,选出 H_2O_2 构建NPC氧化损伤模型的最佳浓度。

1.4 Transwell小室ADSC/NPC共培养体系的构建及实验分组

采用孔径0.4 μm 的Transwell小室6孔板建立细胞共培养体系,胰酶消化后将第3代ADSC置于上层的Transwell小室内,加入ADSC培养基,待ADSC贴壁后,下层接种第3代NPC。细胞接种密度 2×10^5 ,接种比例为1:1^[11]。将实验分为5组,分别为

NPC 组、ADSC 组、NPC+ADSC 组、 H_2O_2 +NPC+ADSC 组、 H_2O_2 +NPC 组。其中 NPC+ADSC 组、 H_2O_2 +NPC+ADSC 组接种于 Transwell 小室,NPC 组、ADSC 组、 H_2O_2 +NPC 组接种于普通 6 孔板。

1.5 观察指标

1.5.1 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测 按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$,细胞消化收集后,悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 37°C 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒混匀一下,使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。上流式仪检测,用 FITC 通道收集信号。

1.5.2 SA- β -Gal 染色分析 吸除细胞培养液,用 PBS 洗涤 1 次,加入 $500 \mu\text{L}$ β -半乳糖苷酶染色固定液,室温固定 15 min。吸除细胞固定液,用 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 3 分钟。吸除 PBS,每孔加入 $500 \mu\text{L}$ 染色工作液。 37°C 孵育过夜,保鲜膜封住 24 孔板防止蒸发,普通光学显微镜下观察,各组随机采取 3 个视野进行统计分析。

1.5.3 Western blot 检测 ADSC 中 Collagen II、Aggrecan 及 NPC 中 Collagen II、p53、p21、TGF- β 1、Smad2、p-Smad2 蛋白表达 收集细胞,加入 $100 \mu\text{L}$ RIPA 裂解液,冰上裂解液 15 min, $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 15 min,离心半径 9 cm,取上清转移至新的 1.5 mL 离心管中,测定蛋白总含量。SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭,加入一抗 Collagen II (1:500);Aggrecan、P53 (1:1 000);P21 (1:1 000);TGF- β 1 (1:2 000);Smad2 (1:4 000);p-Smad2 (1:2 000), 4°C 孵育一抗过夜,次日取出膜,于室温摇床用 PBST 洗涤 3 次,加入二抗于室温摇床孵育 1 h,再次洗膜 3 次,使用 ECL 化学发光液显色曝光、摄像。

1.5.4 qPCR 检测 ADSC 中 Collagen II、Aggrecan 及 NPC 中 Collagen II、p53、p21、TGF- β 1、Smad2 mRNA 表达 收集 ADSC 和 NPC,通过 Trizol 法提取总 RNA,以总 RNA 为模板,逆转录 cDNA 加入扩增反应体系,在 NCBI 上搜索目的基因的序列,运用 Primer 5 软件进行引物设计,引物由金斯瑞生物科技股份有限公司合成,以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算,相关引物序列信息见表 1。

表 1 基因引物序列表

基因名称	引物序列(5'-3')	长度/bp
Collagen II	正向:AAGGATGTGTGGAAGCCGGA	100
	反向: TGAGGCAGTCTTTTCACGTCT	
Aggrecan	正向: TGCCGTGGGTGACAAGGACAG	185
	反向: GCCAGCGTAGCATTGTGAGATT	
TGFB1	正向: CAGCAACAATTCTGGCGATACCT	140
	反向: CGCTAAGCGCAAAGCCCTCAAT	
Smad2	正向: CCACGGTAGAAATGACAAGAA	227
	反向: AACAGACTGAGCCAGAAGAGC	
p21	正向: GAGGCCGTGAGCGATGGAA	238
	反向: AGCGAGGCACAAGGTACAAGACA	
p53	正向: CTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCC	118 bp
	反向: CAGTGCTCGCTTAGTGCTCCCT	
β -actin	正向: GGCACCCAGCACAATGAAGA	125 bp
	反向: ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

1.6 统计学方法

本实验采用 GraphPad Prism 9.0 进行数据分析和统计,所有实验至少重复 3 次,采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,两组比较采用 Student's *t* 检验,多组比较采用 Turkey's *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人源 ADSC 和 NPC 细胞形态学及鉴定

为避免提取原代时细胞污染,同时为提高细胞纯度和活性,已购买人源 ADSC 和 NPC,其中 ADSC 形态呈纺锤形,NPC 形态呈长梭形,详见图 1。

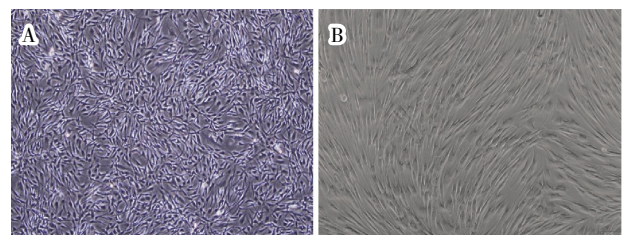


图 1 显微镜下 ADSC(A)和 NPC(B)的形态观察($\times 40$)

2.2 NPC 造模浓度及氧化损伤水平

H_2O_2 对 NPC 的 $IC_{50}=122 \mu\text{mol/L}$,选择 $100 \mu\text{mol/L}$ 为造模浓度,在造模 24 h 后对各组的 ROS 水平进行检测,与 H_2O_2 +NPC 组相比, H_2O_2 +NPC+ADSC 组荧光强度降低($P<0.05$)。详见图 2。

2.3 NPC 衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色分析

与 H_2O_2 +NPC 组相比, H_2O_2 +NPC+ADSC 组中 NPC 的衰老数量减少($P<0.05$)。详见图 3。

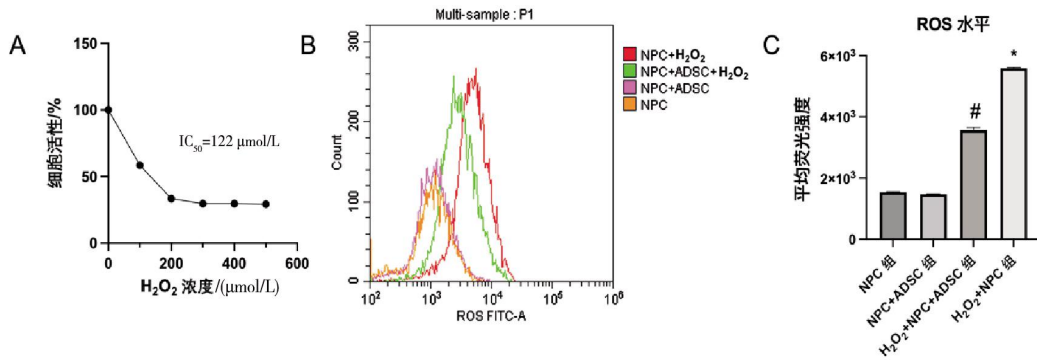


图2 NPC的氧化损伤水平检测

注:A. MTT法检测H₂O₂作用于NPC的IC₅₀浓度;B-C.流式细胞仪检测各组的荧光强度;与NPC组比较,**P*<0.05;与H₂O₂+NPC组比较,#*P*<0.05。

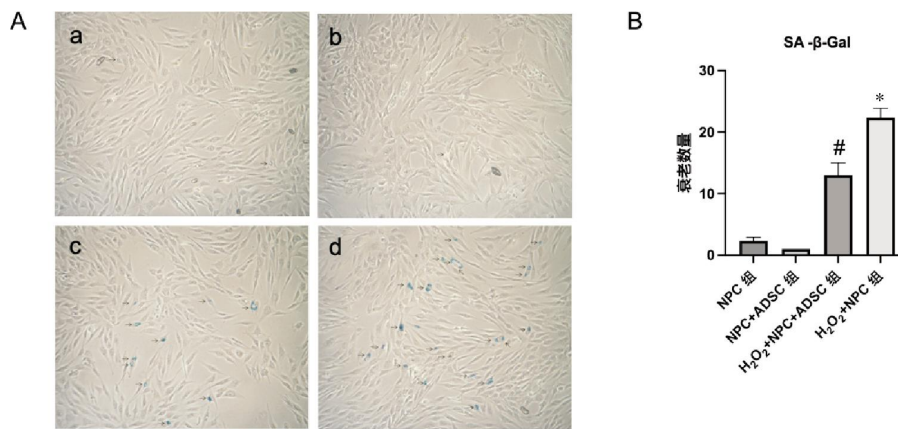


图3 β-半乳糖苷酶染色分析

注:A.NPC镜下视野;B.NPC衰老数量比较。a.NPC组;b.NPC+ADSC组;c.H₂O₂+NPC+ADSC组;d.H₂O₂+NPC组;与NPC组比较,**P*<0.05;与H₂O₂+NPC组比较,#*P*<0.05。

2.4 Western blot 检测各组 ADSC 中 Aggrecan 和 Collagen II 蛋白表达差异

与 ADSC 组相比,NPC+ADSC 组中 ADSC 的 Aggrecan 和 Collagen II 蛋白含量明显升高(*P*<0.05)。详见图4。

2.5 Western blot 检测各组 NPC 中 Collagen II、p21、p53、TGF-β1、Smad2、p-Smad2 蛋白表达差异

与 H₂O₂+NPC 组相比,H₂O₂+NPC+ADSC 组 Colla

gen II 蛋白表达水平增加(*P*<0.05),p53、p21 蛋白表达水平降低(*P*<0.05),TGF-β1、p-Samd2 蛋白表达水平增加(*P*<0.05)。详见图5。

2.6 qPCR 检测 ADSC 细胞中 Aggrecan、Collagen II mRNA 及 NPC 细胞中 Collagen II、p21、p53、TGF-β1、Smad2 mRNA 表达水平

与 ADSC 组相比,NPC+ADSC 组中 ADSC 的 Aggrecan 和 Collagen II mRNA 表达量升高(*P*<0.05);

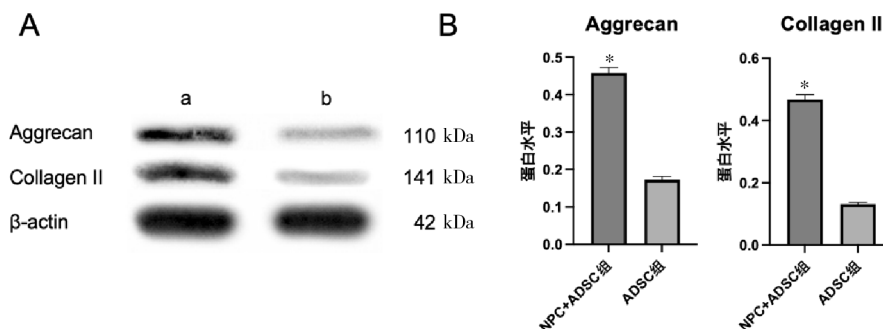


图4 各组 ADSC 中蛋白电泳条带图(A)和蛋白表达水平(B)

注:a. NPC+ADSC 组;b. ADSC 组;与 ADSC 组比较,**P*<0.05。

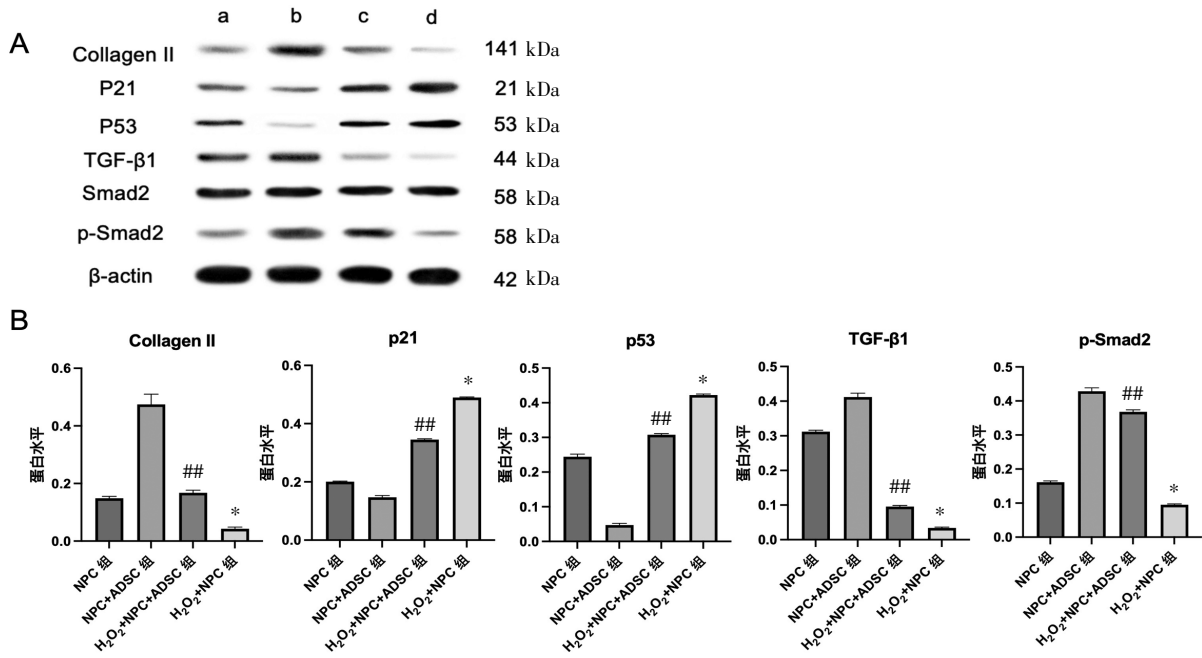


图5 各组 NPC 中蛋白电泳条带图(A)和蛋白表达水平(B)

注:a. NPC组;b. NPC+ADSC组;c. H₂O₂+NPC+ADSC组;d. H₂O₂+NPC组;与NPC组比较,*P<0.05;与H₂O₂+NPC组比较,#P<0.01。

与 H₂O₂+NPC 组相比,H₂O₂+NPC+ADSC 组 NPC 中的 Collagen II mRNA 表达量增加(P<0.05),p53、p21 mRNA 表达量减少(P<0.05),TGF-β1、Smad2 mRNA 表达量增加(P<0.05)。详见图 6。

3 讨论

IDD 是一个复杂的细胞介导的过程^[12],炎症、氧化应激、线粒体功能障碍、异常机械负荷、端粒缩短、

DNA 损伤和营养不良等因素都会导致椎间盘细胞衰老和死亡,最终导致 IDD^[13]。其中氧化应激是由于椎间盘细胞内线粒体和过氧化物酶体代谢异常,过量的 ROS 产生从而引发 NPC 衰老和凋亡^[14],而 ECM 降解会增加 NPC 内的 ROS,TGF-β1/Smad 通路被抑制,同时加剧氧化应激诱导的细胞衰老,上调 NPC 中 p53 和 p21 的表达^[15],从而恶性循环,加速 IDD。

TGF-β1 是 NPC 内重要的生长因子,TGF-β1

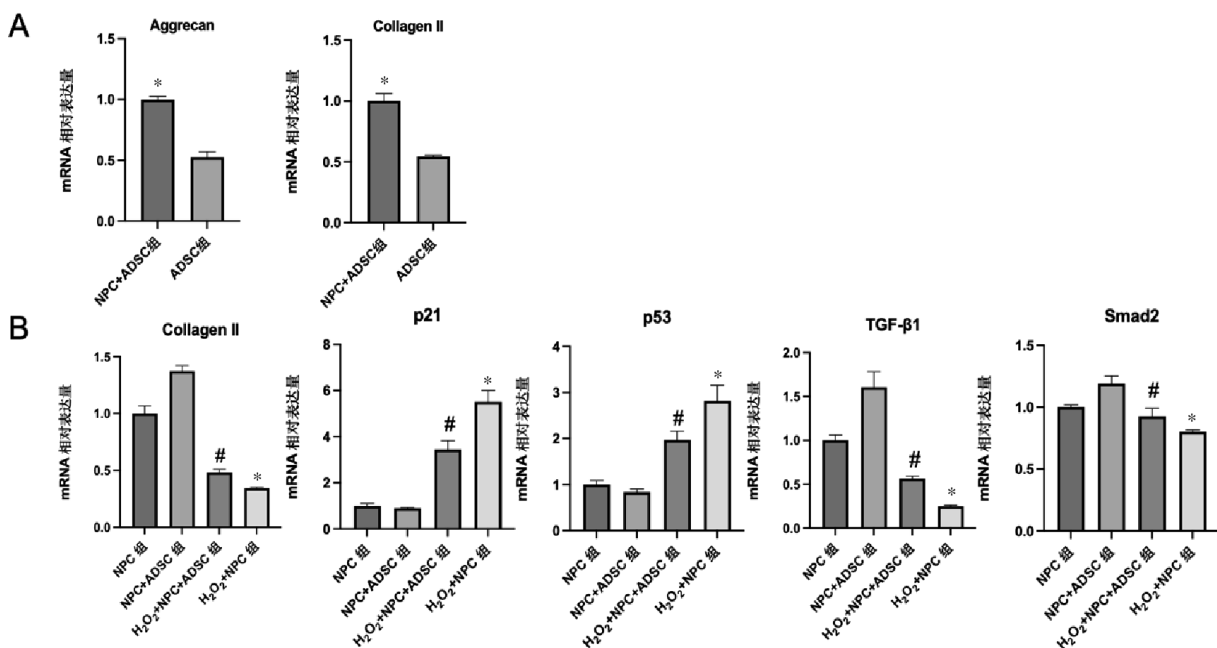


图6 各组 ADSC(A)和 NPC(B)中 mRNA 表达水平

注:A. ADSC组比较,*P<0.05;B.与NPC组比较,*P<0.05;与H₂O₂+NPC组比较,#P<0.05。

不仅可促进 ADSC 类髓核化^[16],而且还可抑制 NPC 纤维化^[17],其可与细胞膜上受体结合,使 Smad2、Smad3 磷酸化与 Smad4 结合进入细胞核调控靶基因的表达^[18]。YANG 等^[19]通过检测正常和退变人椎间盘组织中 TGF- β 1 含量,发现在正常椎间盘组织中 TGF- β 1 是显著高于退变组织中的 TGF- β 1。KRETOVA 等^[20]实验表明 TGF- β 通过 NF1/Smad4 复合物途径,抑制氧化应激损伤、DNA 损伤和炎症反应。DNA 末端的不完全复制是细胞衰老首要原因,从而激活 p53-p21 通路诱发复制性衰老^[21]。KIM 等^[22]通过手术获得不同程度退变的髓核标本发现随着年龄的增长和椎间盘退变的进展,p53-p21 通路被激活,SA- β -Gal 表达加强,端粒缩短,端粒酶活性降低,衰老特征越发明显。p53、p21 是 NPC 内衰老标志物,当 NPC 氧化应激后,TGF- β 1/Smad 通路受到抑制,而另一分支 p53-p21 通路激活^[23],两者在不同程度上加速 Aggrecan 和 Collagen II 降解,导致 NPC 衰老。

Aggrecan 和 Collagen II 是髓核组织中的主要成分,共同维持椎间盘机械强度和弹性^[24],随着年龄的增长,Aggrecan 和 Collagen II 含量减少,ECM 降解,椎间盘内微环境恶化,加剧了 IDD 发展^[25]。RAGETLY 等^[26]发现通过 Collagen II 诱导可改善间充质干细胞的黏附和软骨生成能力。LU 等^[27]发现 Collagen II 通过调节 Rho A/Rock 信号通路可使 ADSC 向软骨细胞分化。

中医学将 IDD 归属于“腰痛”或“痹病”范畴。早在《素问·脉要精微论》中就有对其论述:“腰者,肾之府,转摇不能,肾将惫矣。”人至中年,元气渐衰、五脏不荣是腰痛病的主要病因病机,而外伤、劳损形成血瘀实邪为常见诱因,肾脏虚损,经脉困阻,气血运行不畅,而造成筋骨失养,故肾虚血瘀是 IDD 的基本病机。再生医学中干细胞经过诱导能使其向特定的细胞增殖、分化,从精的繁衍生命、化血化气、濡养脏腑等功能角度来看,干细胞的特性与中医中肾精的功能十分贴合^[28];也有学者认为,干细胞并非是单纯肾精,而是以肾精为主,脏腑经络、气血髓等共同构成的多层次结构^[29]。因此,在中医理论的指导下可推测 ADSC 治疗氧化损伤 NPC 可能起到了补肾益精、活血化瘀的功效。

本文从 NPC 氧化应激后衰老的角度阐述与 ADSC 共培养机制,旨在 ADSC 治疗 IDD 提供实验

依据,但本文存在一定局限性,对于造模浓度未做时间梯度;Smad 家族相关蛋白未全部检测;关于 NPC 衰老表型的发展,如细胞周期、炎症因子、趋化因子等^[30]仍有待阐明。目前,临床上干细胞注射疗法治疗 IDD 还处于开发阶段,其具有巨大的发展潜力^[31],但由于退变椎间盘内炎症、低氧、低 PH 值微环境影响干细胞移植功能^[32]。下一步团队将利用补肾活血的中药或复方含药血清对 ADSC 进行干预,观察是否能进一步促进 ADSC 类髓核化,修复氧化损伤后的 NPC;或是利用水凝胶包裹 ADSC 进行椎间盘内注射的在体实验,观察体内效果,以期能更好的治疗 IDD。

参考文献

- [1] URITS I, BURSHEIN A, SHARMA M, et al. Low back pain, a comprehensive review: Pathophysiology, diagnosis, and treatment[J]. *Current Pain and Headache Reports*, 2019, 23(3): 23.
- [2] 冯帅华, 徐无忌, 仇湘中, 等. 基于网络药理学研究六味地黄丸治疗腰椎间盘突出退变作用机制[J]. *陕西中医*, 2022, 43(9): 1301-1304.
- [3] YEE A, LAM M P, TAM V, et al. Fibrotic-like changes in degenerate human intervertebral discs revealed by quantitative proteomic analysis[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2016, 24(3): 503-513.
- [4] BINCH A L A, FITZGERALD J C, GROWNEY E A, et al. Cell-based strategies for IVD repair: Clinical progress and translational obstacles[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2021, 17(3): 158-175.
- [5] 周清, 阮狄克. 间充质干细胞修复椎间盘退变的研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2022, 32(6): 547-552.
- [6] 刘明强, 陈海伟, 张广智, 等. 外泌体治疗椎间盘退变的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(8): 831-836.
- [7] BHUJEL B, SHIN H E, CHOI D J, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and intervertebral disc regeneration: Review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(13): 7306.
- [8] DAI X J, GUAN Y Y, ZHANG Z Z, et al. Comparison of the differentiation abilities of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells toward nucleus pulposus-like cells in three-dimensional culture[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2021, 22(3): 1018.
- [9] VELIKONJA N K, URBAN J, FRÖHLICH M, et al. Cell sources for nucleus pulposus regeneration[J]. *European Spine Journal*, 2014, 23(3): 364-374.
- [10] CHEN S L, LEI L C, LI Z M, et al. Grem1 accelerates nucleus pulposus cell apoptosis and intervertebral disc degeneration

- tion by inhibiting TGF- β -mediated Smad2/3 phosphorylation[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2022, 54(4): 518–530.
- [11] HAN Z H, WANG Q G, WU X M, et al. Comprehensive RNA expression profile of therapeutic adipose-derived mesenchymal stem cells co-cultured with degenerative nucleus pulposus cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2021, 23(3): 185.
- [12] MIWA S, KASHYAP S, CHINI E, et al. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2022, 132(13): e158447.
- [13] CHEN H W, ZHANG G Z, LIU M Q, et al. Natural products of pharmacology and mechanisms in nucleus pulposus cells and intervertebral disc degeneration[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2021, 2021: 9963677.
- [14] CAO G S, YANG S D, CAO J Y, et al. The role of oxidative stress in intervertebral disc degeneration[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 2166817.
- [15] XIANG Q, ZHAO Y Z, LIN J L, et al. The Nrf2 antioxidant defense system in intervertebral disc degeneration: Molecular insights[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2022, 54(8): 1067–1075.
- [16] OSHIMORI N, FUCHS E. The harmonies played by TGF- β in stem cell biology[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(6): 751–764.
- [17] SUN Y, LYU M M, LU Q J, et al. Current perspectives on nucleus pulposus fibrosis in disc degeneration and repair[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(12): 6612.
- [18] ZOU M L, CHEN Z H, TENG Y Y, et al. The smad dependent TGF- β and BMP signaling pathway in bone remodeling and therapies[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 593310.
- [19] YANG H L, CAO C, WU C S, et al. TGF- β 1 suppresses inflammation in cell therapy for intervertebral disc degeneration [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13254.
- [20] KRETOVA M, SABOVA L, HODNY Z, et al. TGF- β /NF1/Smad4-mediated suppression of ANT2 contributes to oxidative stress in cellular senescence[J]. *Cellular Signalling*, 2014, 26(12): 2903–2911.
- [21] CHEN Q Z, SUN X L, LUO X L, et al. PIK3R3 inhibits cell senescence through p53/p21 signaling[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(9): 798.
- [22] KIM K W, CHUNG H N, HA K Y, et al. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs[J]. *The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society*, 2009, 9(8): 658–666.
- [23] SAMARAKOON R, HIGGINS S P, HIGGINS C E, et al. The TGF- β 1/p53/PAI-1 signaling axis in vascular senescence: Role of caveolin-1[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(8): 341.
- [24] RISBUD M V, SHAPIRO I M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: Pain and disc content[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2014, 10(1): 44–56.
- [25] FIANI B, COVARRUBIAS C, JARRAH R. Genetic predictors of early-onset spinal intervertebral disc degeneration: Part one of two[J]. *Cureus*, 2021, 13(5): e15182.
- [26] RAGETLY G, GRIFFON D J, CHUNG Y S. The effect of type II collagen coating of chitosan fibrous scaffolds on mesenchymal stem cell adhesion and chondrogenesis[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(10): 3988–3997.
- [27] LU Z F, DOULABI B Z, HUANG C L, et al. Collagen type II enhances chondrogenesis in adipose tissue-derived stem cells by affecting cell shape[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2010, 16(1): 81–90.
- [28] 王旭杰, 王妙然, 张蕊, 等. “先天之精”干细胞与中医学理论相关性探析[J]. *西部中医药*, 2022, 35(6): 60–63.
- [29] 温昊天, 隋华, 李琦, 等. 干细胞与中医理论关系的思考[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4): 1422–1424.
- [30] XIN J G, WANG Y J, ZHENG Z, et al. Treatment of intervertebral disc degeneration[J]. *Orthopaedic Surgery*, 2022, 14(7): 1271–1280.
- [31] XIA Y L, YANG R H, HOU Y L, et al. Application of mesenchymal stem cell-derived exosomes from different sources in intervertebral disc degeneration[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 1019437.
- [32] YU L, LIU Y, WU J X, et al. Genipin cross-linked decellularized nucleus pulposus hydrogel-like cell delivery system induces differentiation of ADSCs and retards intervertebral disc degeneration[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 807883.

(本文编辑 苏维)