DOI:10.16016/j.2097-0927.202203143

锌指蛋白 A20 对 LPS 刺激时人退变髓核细胞衰老与凋亡的影响

唐 盼,刘 渤 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院骨科

[摘要] **目的** 探究人退变髓核细胞中锌指蛋白 A20 对衰老及凋亡的影响。**方法** 提取并培养人退变髓核细胞,小干扰 RNA(siRNA)降低 A20 表达,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为炎症诱导因素,设置对照组、LPS 组、siRNA-A20 组、siRNA-A20+LPS 组。通过 Western blot 检测 A20、P21、P16、BAX、BID、BCL2、P65、p-P65 蛋白表达量。细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色试剂盒检测 β-半乳糖苷酶。应用 AnnexinV-PI 双标法及 TUNEL 染色检测细胞凋亡,观察锌指蛋白 A20 对髓核细胞衰老及凋亡的影响。应用咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)进行挽救实验,检测 A20、P21、P16、BAX、BID、BCL2、P65、P-P65 蛋白表达量,探索下调锌指蛋白 A20 诱导细胞衰老及凋亡可能通路。**结果** 与对照组相比,LPS 组 P21、P16 蛋白表达量无明显变化,siRNA-A20 组及 siRNA-A20+LPS 组 P21、P16 蛋白表达明显增加($P<0.05$),β-半乳糖苷酶染色实验显示着色阳性细胞数显著增多($P<0.05$)。Annexin V-PI 双标法凋亡结果显示,单纯 LPS 刺激及单纯 siRNA-A20 处理组中细胞凋亡占比高于对照组($P<0.05$),但低于 siRNA-A20+LPS 组($P<0.05$),TUNEL 染色结果与 Annexin V-PI 双标法结果一致($P<0.05$)。凋亡相关蛋白 BAX、BID 在 siRNA-A20+LPS 中显著增加($P<0.05$),BCL2 则明显降低($P<0.05$),P-P65 蛋白表达量在 siRNA-A20+LPS 组明显上升($P<0.05$)。与 siRAN-A20+LPS 组相比,应用 CAPE 预处理后 P-P65、P21、P16、BID、BAX 蛋白表达量明显下降($P<0.05$),BCL2 上升($P<0.05$)。**结论** 下调锌指蛋白 A20,LPS 过度激活 NF-κB 信号通路诱导人退变髓核细胞衰老与凋亡。

[关键词] 锌指蛋白 A20;人退变髓核细胞;衰老;凋亡
[中图法分类号] R322.72; R329.25; R341 [文献标志码] A

Effects of zinc finger protein A20 on senescence and apoptosis of human degenerative nucleus pulposus cells stimulated by lipopolysaccharide

TANG Pan, LIU Bo Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] Objective To explore the effect of zinc finger protein A20 on senescence and apoptosis in human degenerative nucleus pulposus cells. Methods Human degenerative nucleus pulposus cells were extracted and cultured. Small interference RNA (siRNA) decreased the expression of A20. Lipopolysaccharide (LPS) was used as an inflammatory inducing factor. Control group, LPS group, siRNA-A20 group and siRNA-A20+LPS group were set up. The protein expression levels of A20, P21, P16, BAX, BID, BCL2, P65 and P-P65 were detected by Western blotting. β-galactosidase was detected by aging β-galactosidase staining kit, and Annexin V-PI double labeling and TUNEL staining was employed to detect apoptosis and to explore the effect of zinc finger protein A20 on senescence and apoptosis of nucleus pulposus cells. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) was used in rescue experiment, and the protein expression levels of A20, P21, P16, BAX, BID, BCL2, P65 and P-P65 were detected to explore the possible pathway of cell senescence and apoptosis induced by down-regulation of zinc finger protein A20. Results Compared with the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81572202)
[通信作者] 刘 渤,E-mail:boliu@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

control group, there was no significant change in protein levels of P21 and P16 in LPS group, but P21 and P16 increased significantly in siRNA-A20 group and siRNA-A20+LPS group ($P<0.05$). β-galactosidase staining test showed that the number of positive cells increased significantly in siRNA-A20 treated groups ($P<0.05$). The proportion of apoptosis in LPS group and siRNA-A20 group was higher than that of control group ($P<0.05$), but lower than that of siRNA-A20+LPS group ($P<0.05$). The result of TUNEL staining was consistent with that of AnnexinV-PI double labeling ($P<0.05$). Apoptosis related protein BID and BAX increased ($P<0.05$), and BCL2 decreased in siRNA-A20+LPS group ($P<0.05$), while P-P65 increased significantly in siRNA-A20+LPS group ($P<0.05$). Compared with siRNA-A20+LPS group, through the pretreatment of CAPE, protein levels of P-P65, P21, P16, BID and BAX decreased ($P<0.05$), and the protein levels of BCL2 increased ($P<0.05$). **Conclusion** Through down-regulation of zinc finger protein A20, LPS induces senescence and apoptosis of human degenerative nucleus pulposus cells through NF-κB signal pathway.

[**Key words**] zinc finger protein A20; human degenerative nucleus pulposus cells; senescence; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81572202). Corresponding author: LIU Bo, E-mail: boliu@hospital.cqmu.edu.cn

椎间盘退变是年龄相关性疾病,并在遗传因素、吸烟、感染、异常力学负荷、椎体终板营养物质的运输减少等诱因刺激下进行性加重。异常炎症被认为是椎间盘退变的重要原因,胞外诱因刺激下,髓核细胞产生促炎症因子如 IL-1β 和 TNF-α,经过 NF-κB 及 MAPK 通路激活如 P65、ERK、JUNK 等内信号分子,促进靶基因的转录,引起联级的扩大炎症反应,促使髓核细胞发生不可逆的改变,并伴随过度的髓核细胞凋亡、衰老、自噬改变。此外,炎性通路的激活促进金属基质蛋白酶表达增加,如 MMP3、MMP13、ADAMTS4、ADAMTS5,导致胞外亲水基质的减少以及纤维环结构的破坏,从而导致椎间盘退变甚至髓核突出,造成慢性疼痛,严重影响患者生活质量[1-2]。

锌指蛋白 A20 是一种内源性保护蛋白,其可通过 A20 自身的去 K-63 泛素酶及 K-48 泛素酶对同一底物实行去泛素化及泛素化实现负反馈地抑制 NF-κB 炎症信号通路的传导,在炎症疾病领域受到密切关注[3-4]。本课题组的前期研究揭示,A20 对髓核细胞具有内源性的保护作用,减弱 LPS 刺激引起的炎症信号 NF-κB 过度激活、传导及相关亲水基质的分解[5-6],但在人退变椎间盘髓核细胞中锌指蛋白 A20 对细胞衰老及凋亡影响不明确。因此本实验拟使用小干扰 RNA 降低 A20 表达,LPS 作为炎症刺激因素,探究 A20 对细胞衰老及凋亡的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人退变椎间盘髓核组织 实验所用标本均来自于重庆医科大学附属第一医院骨科,并获得伦理委员会批准(2016-059),且术前与患者签署知情同意书。收集 2020 年 6 月至 2021 年 12 月住院患者术中常规切除的退变椎间盘组织。标本来自 20 例患者,男性 9 例,女性 11 例,年龄(42.10±12.07)岁。患者术前症状、体征和影像学检查确诊为腰椎间盘突出症,经保守治疗无效,Pfirrmann 分级均为 Grade Ⅲ~Ⅴ。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 细胞培养液(以色列 BI 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),Ⅱ型胶原酶和 LPS(美国 Sigma 公司),兔抗人 P21 多克隆、兔抗人 P16 多克隆(中国万类生物科技公司),兔抗人 BCL2 单克隆、兔抗人 BID 单克隆、兔抗人 BAX 单克隆(美国 Abcam 公司),兔抗人 P-P65 单克隆、兔抗人 TNFAIP3 单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司),兔抗人 P65 多克隆抗体、羊抗兔二抗(中国博士德公司),CAPE(中国美仑生物公司),一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光,中国碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 髓核细胞的提取及培养 将患者术中切除并废弃的退变髓核组织用 50 mL 离心管收集,放置冰上。用已高温高压消毒的眼科剪及眼科镊小心分离混入髓核组织中的破碎骨片、肌肉及部分纤维环。无菌 PBS 溶液仔细冲洗髓核组织,直至冲洗后的废液无明显变色,将髓核组织剪成 3~5 mm 长宽的碎片,夹入 15 mL 无菌离心管内,加入大约 2 倍体积 0.25%胰蛋白酶,充分混匀,放置于 37 ℃、5%CO_2 的细胞孵箱内消化 30 min,隔 10 min 摇匀 1 次。0.25%胰蛋白酶消化完毕后,1 200 r/min 离心 5 min,吸弃上清液,并加入 2 倍体积的 0.2%二型胶原酶,充分摇匀,消化 4 h,每隔 40~60 min 手动混匀 1 次。用一次性的 200 目细

胞筛过滤细胞悬液,并用无菌 PBS 溶液冲洗细胞筛,收集滤液,1 200 r/min 离心 8 min,弃上清,保留底部沉淀。加入完全培养基,充分重悬,转移至由透气孔的 T25 细胞培养瓶内,加完全培养基至 4 mL,放置细胞孵箱待其贴壁。髓核细胞大致 4 d 左右可见明显贴壁细胞形态,大约 20 d 融合度达 90%,进行传代,传至 P2 用于进行后续实验。

1.2.2 人小干扰 RNA-A20 的构建及转染 siRNA-A20 由北京擎科生物科技有限公司设计及合成,序列为 A20,正义链 5′-CUACUAAUGGGAUCAUUCATT-3′;反义链 5′-UGAAUGAUCCCAUUAGUAGTT-3′。提前将髓核细胞接种至 6 cm 的培养皿内,密度为 50%左右,待其充分贴壁约 24 h 后,进行小干扰 RNA 的转染。准备已消毒的 1.5 mL EP 管,各管内加入 100 μL 无血清及双抗的基础培养基,一半 EP 管加入 5 μL 转染试剂,一半加入适当的 siRNA,静止 5 min 后将其两两混匀,充分混匀后静止 20 min。吸弃培养基,用无菌 PBS 洗涤 2~3 次,加入无血清及无双抗的基础培养基饥饿大约 15 min。转染试剂及 siRNA 混合液缓慢加入上述的髓核细胞中,siRNA-A20 转染终浓度 100 nmol/L,放置细胞孵箱。转染 4~6 h,将含有转染混合物的细胞培养液吸出,并用 PBS 清洗 1~2 次,加入完全培养基继续培养 48 h,并观察其形态是否良好,用于后续实验。

1.2.3 实验设计及分组处理 为探索锌指蛋白 A20 在 LPS 刺激下对细胞凋亡及衰老影响,设置对照组、LPS 组、siRNA-A20 组、siRNA-A20+LPS 组。为明确下调锌指蛋白 A20 时 LPS 刺激诱导的细胞凋亡及衰老通过 NF-κB 通路实现,设置对照组、LPS 组、siRNA-A20 + LPS 组、siRNA-A20 + LPS + CAPE 组。siRNA-A20 转染终浓度 100 nmol/L,LPS 均为 200 μg/mL 处理 24 h,CAPE 为 2.5 μmol/L 预处理 2 h。

1.2.4 Western blot 检测相关蛋白表达 裂解各组细胞后,冰浴,4 ℃ 12 000 r /min 离心 15 min,收集上清并定容,BCA 法测定上清中蛋白浓度,加入 RIPA 稀释蛋白以平衡各组间蛋白浓度,以 1/4 蛋白体积上样缓冲液混合煮沸 15 min 后上样,恒压 80 V 进行电泳分离,恒流 250 mA 进行电转,将蛋白电转至 0.22 mm PVDF 膜。用快速封闭液对转好的膜封闭 30 min,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。一抗(1∶500) 4 ℃孵育 12 h,TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,二抗(1∶3 000) 室温孵育 1 h,TBST 洗涤 2 次,每次 15 min。显影,发光。用 Image J 软件处理。系统分析目标条带的光密度值。

1.2.5 β-半乳糖苷酶检测 对于 6 孔板中培养的细胞,吸除细胞培养液,用 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次,加入 1 mL 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 或 HBSS 洗涤细胞 3 次,每次 3 min。根据试剂盒说明书将 β-半乳糖苷酶染色液 A、B、C 及 X-Gal 溶液按照比例配置成染色工作液,每孔加入 1 mL 染色工作液。用 parafilm 或保鲜膜封住 6 孔板防止蒸发,在无 CO_2 孵育箱中 37 ℃孵育过夜,普通光学显微镜下观察,拍照并计数阳性细胞占比。

1.2.6 流式细胞仪 Annexin V-PI 双标法检测细胞凋亡 流式细胞仪 Annexin V-PI 双标法检测髓核细胞凋亡:髓核细胞培养和处理同前。用 PBS 洗涤 3 次,用无 EDTA 胰蛋白酶消化后,PBS 洗涤 3 次,1 000 r/min 离心 5 min,采用 Annexin V-PI 染料染色,流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.2.7 TUNEL 染色检测细胞凋亡 根据试剂盒说明书配制适当量的 TUNEL 检测液,充分混匀。用 PBS 或 HPBS 洗涤 2 次。在样品上加 50 μL TUNEL 检测液,37 ℃避光孵育 60 min。PBS 或 HPBS 洗涤 3 次。用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察,拍照并计数阳性细胞占比。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用单因素方差分析,各组间均值的两-两多重比较采用 LSD 法。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 人退变髓核组织选择及细胞培养

选择退变等级为 3 级或 4 级的髓核组织。提取原代细胞第 5 天,可见明显呈短梭状、聚集细胞贴壁,培养 21 d 可见细胞逐渐呈长梭形聚集,融合度达 85%以上,且细胞形态良好(图 1)。

2.2 下调 A20 促进衰老相关蛋白表达

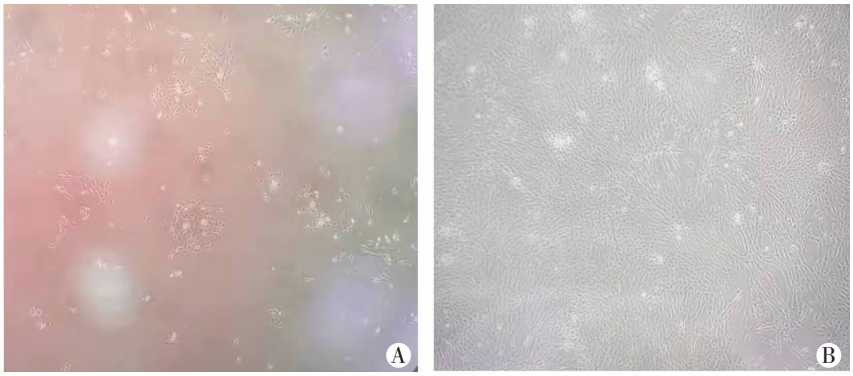
与对照组相比,LPS 组 P21、P16 蛋白表达无明显变化,siRNA-A20 组及 siRNA-A20+LPS 组 P21、P16 蛋白水平明显增加($P<0.05$),siRAN-A20+LPS 组 P16 及 P21 略高于 siRNA-A20,但差异无统计学意义。见图 2。

2.3 siRNA-A20 处理后 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞明显增加

与对照组相比,LPS 组阳性细胞占比无明显增加,siRNA-A20 组及 siRNA-A20+LPS 组阳性细胞占比明显增加($P<0.05$)。见图 3。

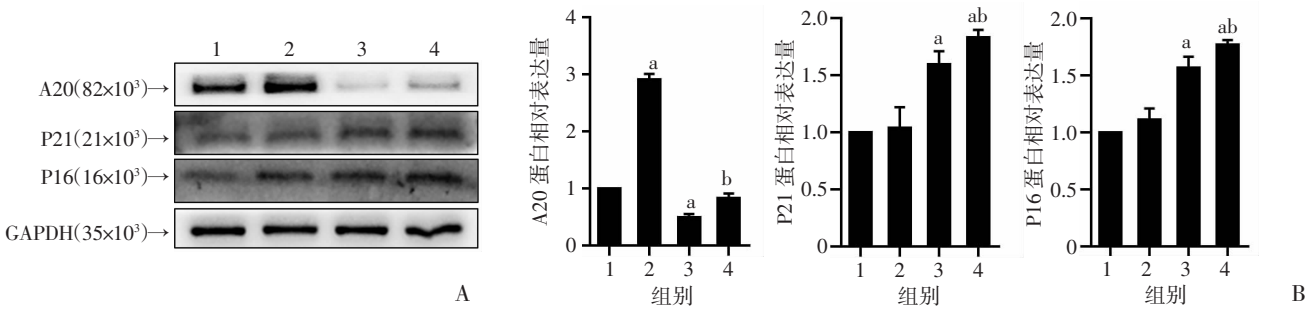
2.4 下调 A20 促进细胞凋亡相关蛋白表达

与对照组相比,LPS 组仅 BID 蛋白量增加($P<0.05$),BCL2、BAX 蛋白水平无明显差异;siRNA-A20 组蛋白表达与 LPS 组类似;siRNA-A20+LPS 组 BID 及 BAX 蛋白明显增加,BCL2 明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。



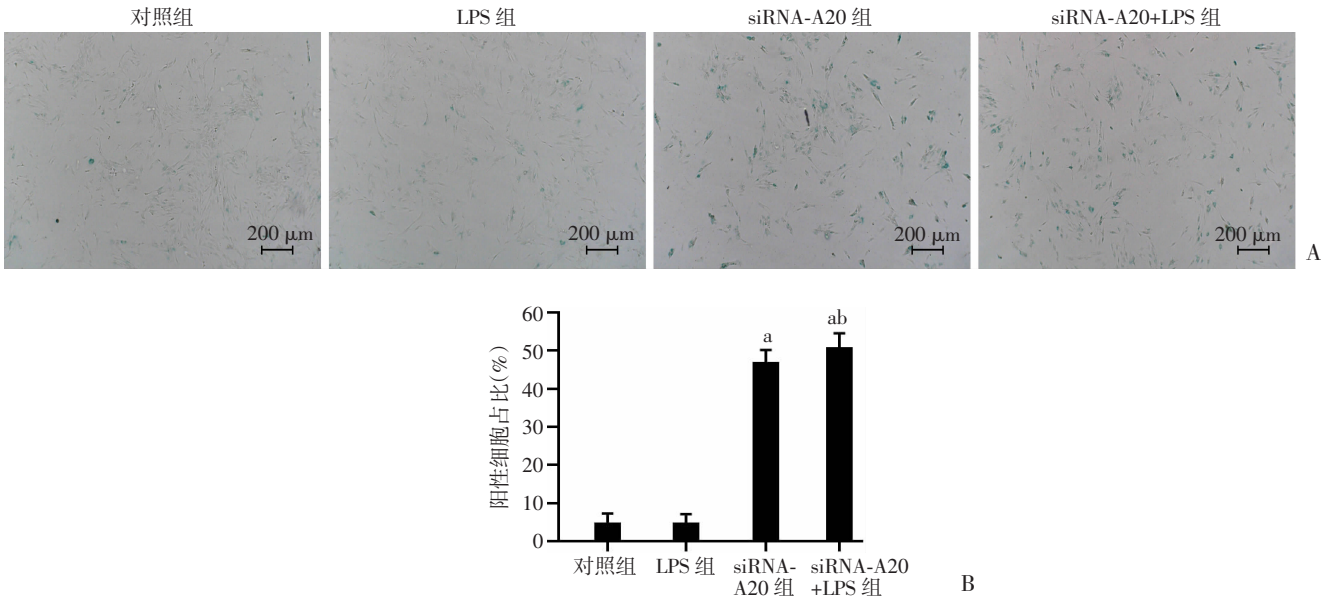
A:培养 5 d 的原代髓核细胞(×40);B:培养 21 d 的原代髓核细胞(×40)

图 1 退变髓核细胞培养



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析 1:对照组;2:LPS 组;3:siRNA-A20 组;4:siRNA-A20+LPS 组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 2 Western blot 检测衰老相关蛋白表达



A:β-半乳糖苷酶染色结果;B:各组阳性细胞占比 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 3 各组衰老染色阳性细胞占比

2.5　下调锌指蛋白 A20 表达量 LPS 可明显诱导细胞凋亡

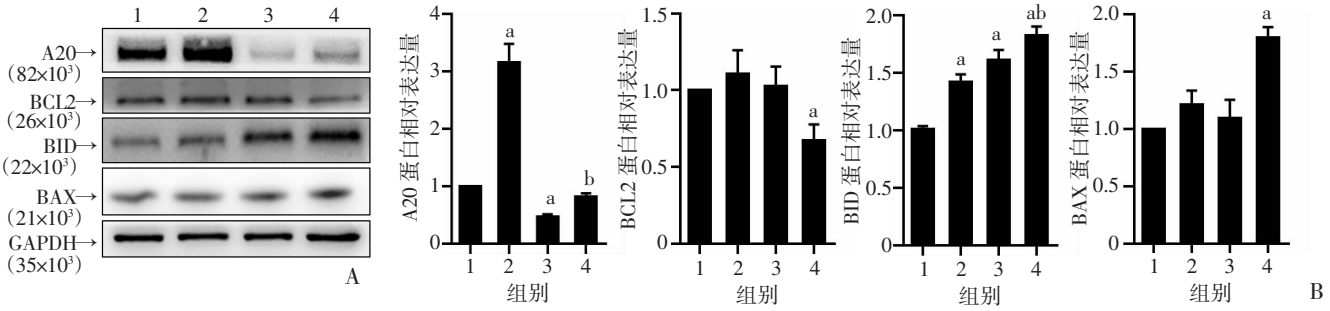
单纯 LPS 刺激及单纯 siRNA-A20 处理组中细胞凋亡明显高于对照组($P<0.05$),但两组间无统计学差异;siRNA-A20+LPS 组细胞凋亡显著增加,高于二者单独作用对细胞凋亡影响($P<0.05$,图 5)。TUNEL 染色中,LPS 组及 siRNA-A20 组阳性细胞占比明显高于对照组($P<0.05$),但明显低于 siRNA-A20+LPS 组($P<0.05$,图 6)。

2.6　下调 A20 表达量 LPS 刺激可明显增加 NF-κB 通路活性

与对照组相比,p-P65 蛋白水平在 LPS 组中增加($P<0.05$),在 siRNA-A20+LPS 组中显著上升($P<0.05$),在 siRAN-A20 组中无明显差异(图 7)。

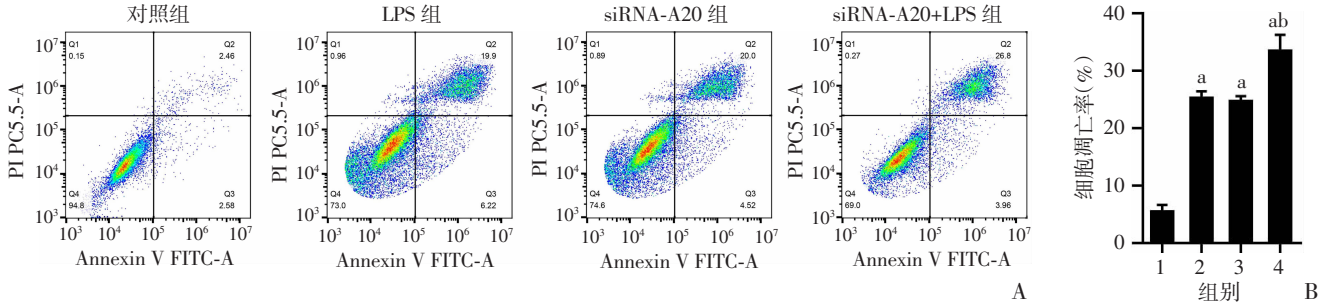
2.7　CAPE 预处理后衰老及凋亡相关蛋白表达量的变化

与 siRNA-A20+LPS 组相比,CAPE 预处理后,p-P65、P21、P16、BID、BAX 蛋白表达降低($P<0.05$),BCL2 蛋白表达增加($P<0.05$),A20 及 P65 蛋白水平无明显变化(图 8)。



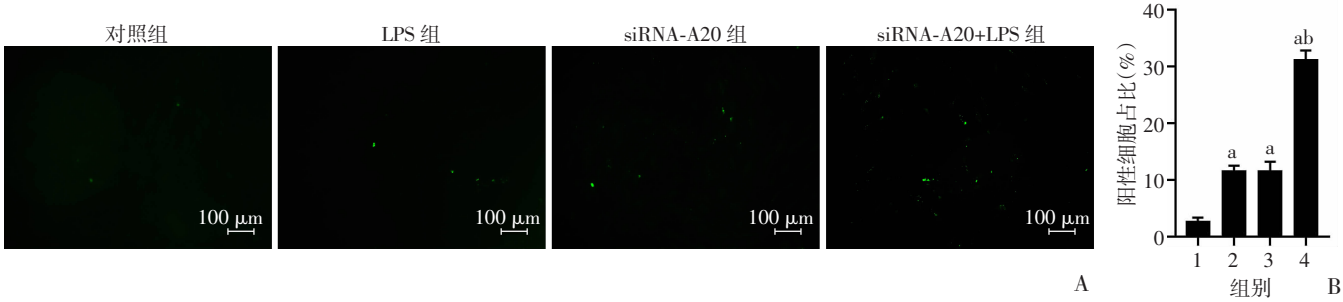
A:Western blot 检测结果;B:半定量分析　1:对照组;2:LPS 组;3:siRNA-A20 组;4:siRNA-A20+LPS 组　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 4　各组 A20、BCL2、BID、BAX 蛋白量表达分析



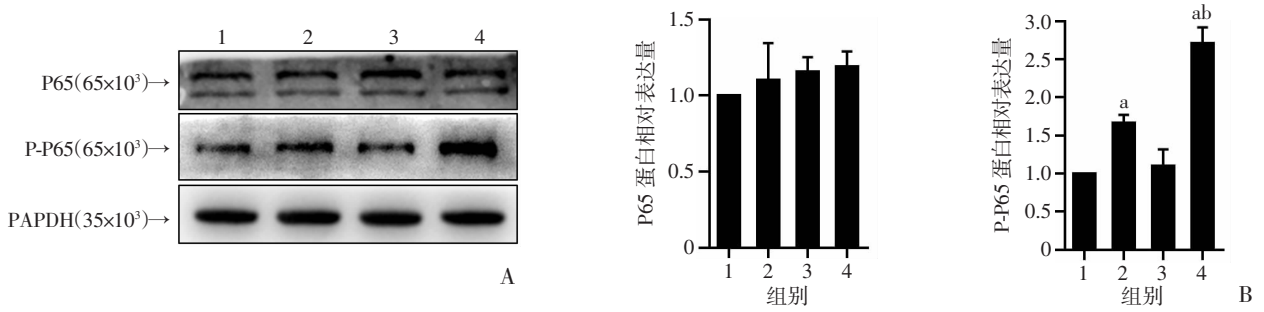
A:流式细胞仪检测结果;B:细胞凋亡率　1:对照组;2:LPS 组;3:siRNA-A20 组;4:siRNA-A20+LPS 组　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 5　各组细胞凋亡率分析



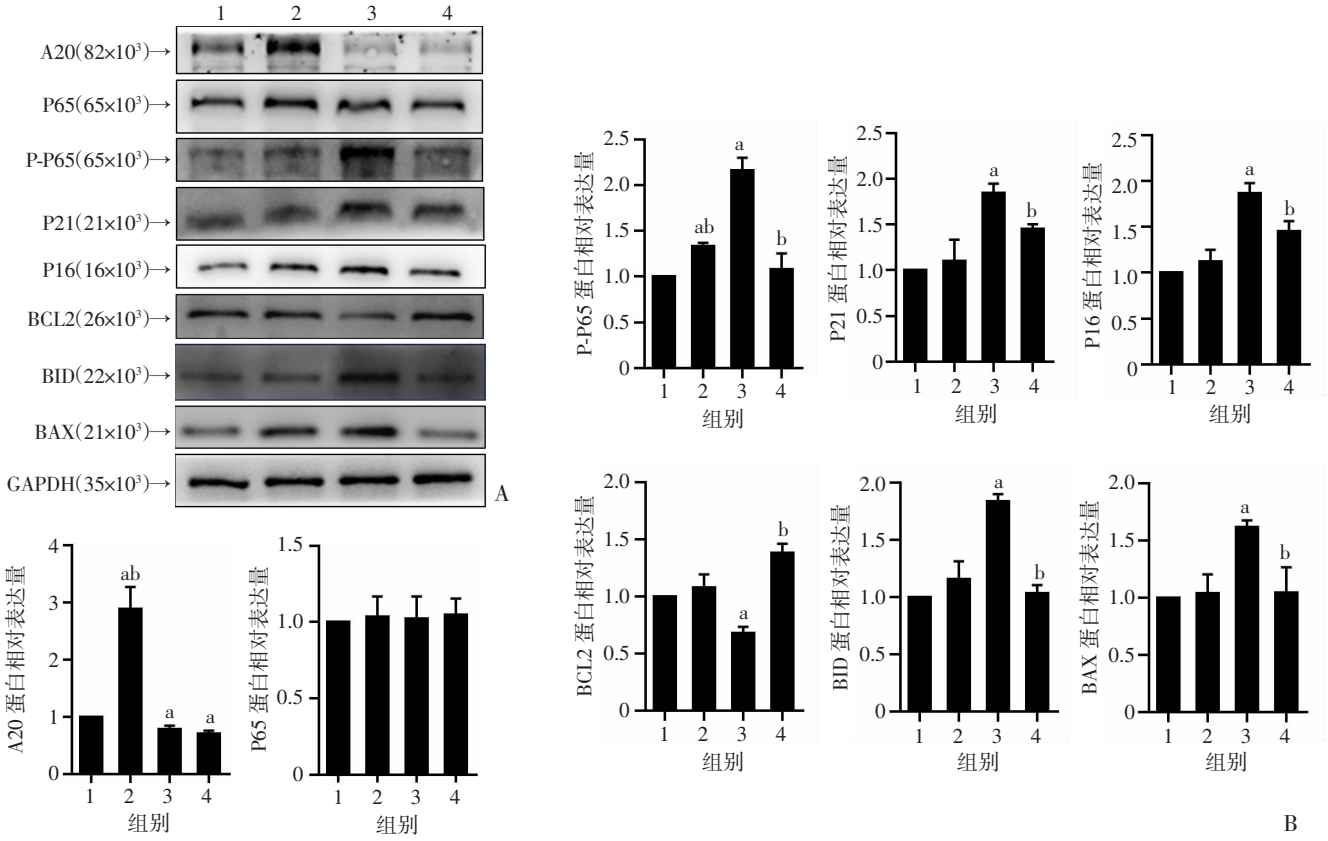
A:TUNEL 染色结果;B:阳性细胞占比　1:对照组;2:LPS 组;3:siRNA-A20 组;4:siRNA-A20+LPS 组　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 6　TUNEL 染色检测细胞凋亡差异



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析 1:对照组;2:LPS 组;3:siRNA-A20 组;4:siRNA-A20+LPS 组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 7 各组 P65 及 P-P65 蛋白表达水平差异



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析 1:对照组;2:LPS 组;3:siRNA-A20+LPS 组;4:siRNA-A20+LPS+CAPE 组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 siRNA-A20+LPS 组比较

图 8 CAPE 预处理后衰老及凋亡相关蛋白表达量的变化

3 讨论

应用 siRNA-A20 处理髓核细胞后,衰老相关蛋白 P21、P16 明显增加,且 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞占比显著提高,提示细胞衰老程度提升。年龄相关性疾病中,细胞衰老占据着重要影响,可由一系列内在和外在的伤害引起,包括致癌激活、氧化和遗传毒性应激、线粒体功能障碍、辐射或化疗药物[7]。在退变的椎间盘中,髓核处于炎性微环境的刺激下,易诱导髓核细胞及其祖细胞的衰老。此外,衰老细胞可产生的衰老相关分泌表型(SAPA)影响周围细胞,加之异常的炎症环境促使正常功能髓核细胞急剧减少,加速髓核组织中干细胞的耗竭,导致椎间盘退变[8-9]。抑制精氨酸酶Ⅱ可减少 IL-1β 诱导的细胞衰老及凋亡,其机制涉及对 NF-κB 炎症信号通路的抑制[10]。彭鑫等[11]研究显示,siRNA-A20+TNF-α 可明显诱导大鼠髓核细胞的

衰老,其机制可能涉及 NF-κB 通路的过度激活。但在本实验中单纯 siRNA-A20 处理后,细胞衰老明显增加,联合 LPS 刺激后,P-P65 虽明显上升,但 P21、P16 及阳性细胞占比与 siRNA-A20 组无统计学差异。两实验所得结果差异可能与细胞种属及分组不同有关,并且本课题组前期研究提示单纯下调 A20 可能减弱髓核细胞自噬[5-6],因此 A20 调节细胞衰老的机制还有待深入探索。

本研究结果表明,LPS 或 siRNA-A20 处理时,可诱导细胞凋亡,且 siRNA-A20+LPS 组凋亡细胞占比显著升高,并伴随着 BID、BAX 表达量增加,BCL2 下降。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,是正常生长发育的一部分,也在多种疾病中存在,主要分为依赖线粒体的内源性途径及依赖死亡配体受体的外源性途径,但最终都通过 Caspase 家族蛋白发挥作用[12]。髓核组织处于 IL-1β、TNF-α 高表达的微环境[1-2],这些炎性刺激可通过细胞外 Fas 受体、肿瘤坏死因子受体 1 及肿瘤坏死因子相关配体 1 诱导外源性的细胞凋亡,并且在炎性因子的作用下,细胞内 NF-κB、MAPK 等多种信号通路激活,导致了内源性的凋亡发生——线粒体途径凋亡[13-14]。在本实验中,siRNA-A20+LPS 组线粒体凋亡途径相关蛋白 BID、BAX、BCL2 明显改变。BCL2 及 BID 是线粒体凋亡途径的重要蛋白,可激活 BAX、BAK,促使线粒体外膜通透性增加,释放细胞色素 C,Caspase 家族激活,诱导细胞凋亡[12, 15]。因此,猜测 siRNA-A20+LPS 处理时,凋亡可能通过该途径实现。

髓核细胞中,cortistatin、SS-31 均可抑制炎症刺激诱导的 NF-κB 激活、线粒体损伤及凋亡[13, 16],sirt 6 可通过抑制 mTOR 磷酸化提升髓核细胞自噬流量,阻碍细胞衰老及 IL-1β 诱导凋亡[17],从而延缓椎间盘退变。本研究中,下调锌指蛋白 A20 的表达,LPS 可明显诱导细胞衰老及凋亡,造成髓核细胞的损伤。给予 NF-κB 抑制剂 CAPE 预处理后,可明显减少衰老及凋亡相关蛋白的表达,提示 siRNA-A20+LPS 诱导的细胞衰老及凋亡可能通过 NF-κB 通路实现,并且在本课题组前期研究中也已证明过表达锌指蛋白 A20 可延缓 LPS 诱导的髓核细胞退变,因此 A20 在延缓椎间盘的退变中相当重要[6, 18-19]。

综上所述,本研究显示锌指蛋白 A20 在人退变髓核细胞中同时具有抗细胞凋亡及衰老作用,且在 LPS 刺激下更凸显出 A20 蛋白对细胞的保护效果,该作用通过抑制 NF-κB 实现。此外,下调 A20 后 LPS 刺激下线粒体凋亡通路蛋白明显增加,提示锌指蛋白 A20 的抗凋亡作用可能通过保护线粒体实现,为进一步研究 A20 对髓核细胞的内源性保护作用提供可靠方向。本研究再次证明锌指蛋白 A20 对髓核细胞退变的保护作用,并且提示了凋亡可能的作用机制,但在椎间盘退变中 A20 具体保护机制仍不明确,需进一步探究。

参考文献:

[1] WANG Y J, CHE M X, XIN J G, *et al*. The role of IL-1β and TNF-α in intervertebral disc degeneration[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110660. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110660.

[2] RISBUD M V, SHAPIRO I M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content[J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(1): 44-56. DOI: 10.1038/nrrheum.2013.160.

[3] SHEMBADE N, MA A, HARHAJ E W. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes[J]. Science, 2010, 327(5969): 1135-1139. DOI: 10.1126/science.1182364.

[4] BOONE D L, TURER E E, LEE E G, *et al*. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses[J]. Nat Immunol, 2004, 5(10): 1052-1060. DOI: 10.1038/ni1110.

[5] ZHANG Y, YI W W, XIA H Q, *et al*. A20 regulates inflammation through autophagy mediated by NF-κB pathway in human nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 549: 179-186. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.02.115.

[6] CHEN J, MA Y F, YANG Z J, *et al*. $TNFAIP_3$ ameliorates the degeneration of inflammatory human nucleus pulposus cells by inhibiting mTOR signaling and promoting autophagy[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(23): 24242-24254. DOI: 10.18632/aging.104160.

[7] HERRANZ N, GIL J. Mechanisms and functions of cellular senescence[J]. J Clin Invest, 2018, 128(4): 1238-1246. DOI: 10.1172/JCI95148.

[8] MANNARINO M, CHERIF H, LI L, *et al*. Toll-like receptor 2 induced senescence in intervertebral disc cells of patients with back pain can be attenuated by o-vanillin[J]. Arthritis Res Ther, 2021, 23(1): 117. DOI: 10.1186/s13075-021-02504-z.

[9] MA K, CHEN S, LI Z, *et al*. Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration[J]. Osteoarthri Cartilage, 2019, 27(1): 41-48. DOI: 10.1016/j.joca.2018.08.021.

[10] LI F D, SUN X F, ZHENG B, *et al*. Arginase II promotes intervertebral disc degeneration through exacerbating senescence and apoptosis caused by oxidative stress and inflammation *via* the NF-κB pathway[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 737809. DOI: 10.3389/fcell.2021.737809.

[11] 彭鑫, 张聪, 王锋, 等. A20 介导 TNF-α 炎症微环境下髓核细胞衰老的机制研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2019, 29(9): 834-840. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2019.09.09.
PENG X, ZHANG C, WANG F, *et al*. Mechanism research of senescence of NP cells mediated by A20 in TNF-α inflammation microenvironment[J]. Chin J Spine Spinal Cord, 2019, 29(9): 834-840. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2019.09.09.

[12] MCARTHUR K, CHAPPAZ S, KILE B T. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage[J]. Blood, 2018, 131(6): 605-610. DOI: 10.1182/blood-2017-11-742684.

[13] PENG X, WANG K, ZHANG C, *et al*. The mitochondrial antioxidant SS-31 attenuated lipopolysaccharide-induced apoptosis and pyroptosis of nucleus pulposus cells via scavenging mitochondrial ROS and maintaining the stability of mitochondrial dynamics[J]. Free Radic Res, 2021, 55(11/12): 1080-1093. DOI: 10.1080/10715762.2021.2018426.

[14] ZHANG X B, HU Y C, CHENG P, *et al*. Targeted therapy for intervertebral disc degeneration: inhibiting apoptosis is a promising treatment strategy[J]. Int J Med Sci, 2021, 18(13): 2799-2813. DOI: 10.7150/ijms.59171.

[15] KAUFMANN T, STRASSER A, JOST P J. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP[J]. Cell Death Differ, 2012, 19(1): 42-50. DOI: 10.1038/cdd.2011.121.

[16] ZHAO Y P, QIU C, WANG W H, *et al*. Cortistatin protects against intervertebral disc degeneration through targeting mitochondrial ROS-dependent NLRP3 inflammasome activation[J]. Theranostics, 2020, 10(15): 7015-7033. DOI: 10.7150/thno.45359.

[17] CHEN J, XIE J J, JIN M Y, *et al*. Sirt6 overexpression suppresses senescence and apoptosis of nucleus pulposus cells by inducing autophagy in a model of intervertebral disc degeneration[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 56. DOI: 10.1038/s41419-017-0085-5.

[18] 张野, 夏辉强, 易威威, 等. 锌指蛋白 A20 对兔腰椎间盘退变影响的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2021, 35(3): 366-374.
ZHANG Y, XIA H Q, YI W W, *et al*. Experimental study on the effect of zinc finger protein A20 on lumbar intervertebral disc degeneration in rabbits[J]. Chin J Repar Reconstr Surg, 2021, 35(3): 366-374.

[19] 蓝海洋, 杨智杰, 夏辉强, 等. 锌指蛋白 A20 对内毒素刺激时人椎间盘髓核细胞炎症及退变的影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(6): 543-548. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201810110.
LAN H Y, YANG Z J, XIA H Q, *et al*. Effects of zinc finger protein A20 over-expression on inflammatory response and degeneration of human intervertebral disc nucleus pulposus cells stimulated with lipopolysaccharide[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(6): 543-548. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201810110.

(**收稿**:2022-03-16;**修回**:2022-05-11)
(编辑 张 维)