DOI:10.16016/j.2097-0927.202310058

YAP 通过促进自噬抑制髓核细胞胞外基质分解代谢

易威威[1],唐秋雨[1],陶白龙[2],李开庭[1],王大武[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:康复医学科[1],实验研究中心[2]

[摘要] **目的** 探讨 YAP 对椎间盘髓核细胞的作用及其可能机制。**方法** 收集重庆医科大学附属第一医院 2021 年 3 月至 2022 年 7 月接受腰椎手术患者的相对正常和退变的椎间盘组织,采用免疫组化和 Western blot 检测 YAP 在人椎间盘髓核组织中的表达差异。体外培养人原代髓核细胞,通过 IL-1β 处理诱导髓核细胞退变,将实验分为对照组、IL-1β 组、IL-1β+LV-YAP 组、IL-1β+YAP-siRNA 组和 IL-1β+LV-YAP+3-MA 组。采用 Western blot 检测细胞外基质分解代谢及自噬水平变化。最后建立大鼠椎间盘退变模型,利用 MRI、阿利新蓝染色及免疫组化检测 YAP 和 LC3 的表达及椎间盘退变情况。**结果** YAP 在退变椎间盘组织的表达水平明显低于相对正常的椎间盘组织($P<0.05$)。体外细胞实验结果显示,IL-1β+LV-YAP 组显著提高 IL-1β 诱导的髓核细胞中 Collagen Ⅱ、Aggrecan 和 LC3-Ⅱ的蛋白表达($P<0.05$),降低 MMP-3 和 MMP-13 的蛋白表达($P<0.05$),而 IL-1β+YAP-siRNA 组则表现出完全相反的作用。而予以自噬抑制剂 3-MA 预处理后明显降低 IL-1β+LV-YAP 组中 GFP-LC3 阳性颗粒数量和 Collagen Ⅱ、Aggrecan、LC3-Ⅱ蛋白表达($P<0.05$),且提高 MMP-3 和 MMP-13 的蛋白表达($P<0.05$)。进一步在体内构建大鼠椎间盘退变模型,YAP 过表达促进 LC3 表达和抑制椎间盘退变。**结论** YAP 过表达通过促进人髓核细胞自噬抑制细胞外基质降解,从而延缓椎间盘退变。

[关键词] YAP;椎间盘退变;自噬;细胞外基质;髓核细胞

[中图法分类号] R341; R363.21; R681.53 [文献标志码] A

YAP inhibits extracellular matrix catabolism of nucleus pulposus cells by promoting autophagy

YI Weiwei[1], TANG Qiuyu[1], TAO Bailong[2], LI Kaiting[1], WANG Dawu[1] [1]Department of Rehabilitation Medicine, [2]Experimental Research Center, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Yes-associated protein (YAP) on intervertebral disc nucleus pulposus cells and its possible mechanism. **Methods** The relatively normal and degenerative intervertebral disc tissues of patients who underwent lumbar surgery in our hospital from March 2021 to July 2022 were harvested, and then the expression of YAP in the tissues were detected by immunohistochemistry assay and Western blotting. Human primary nucleus pulposus cells were isolated and primarily cultured, and treated with IL-1β to induce degeneration. Then the cells was divided into control group, IL-1β group, IL-1β+LV-YAP group, IL-1β+YAP-siRNA group, and IL-1β+LV-YAP+3-MA group. Western blot analysis was used to detect the expression of the proteins related to extracellular matrix catabolism and autophagy in each group. Finally, a rat model of disc degeneration was established, and the expression of YAP and LC3 and disc degeneration were observed with MRI, Alcian blue staining and immunohistochemistry. **Results** The

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82102537);重庆市自然科学基金(CSTB2022NSCQ-MSX0064, CSTB2022BSXM-JCX0058)

[通信作者] 王大武,E-mail: wangdawu66@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

expression level of YAP was significantly lower in the degraded disc tissues than the relatively normal disc tissues ($P<0.05$). The IL-1β+LV-YAP group had significantly increased protein levels of Collagen Ⅱ, Aggrecan, and LC3-Ⅱ ($P<0.05$), and decreased levels of MMP-3 and MMP-13 ($P<0.05$) when compared with the cells after IL-1β treatment, whereas the IL-1β+YAP-siRNA group showed the exact opposite effects. What's more, pretreatment with autophagy inhibitor 3-MA resulted in decreased number of GFP-LC3 positive particles and protein levels of Collagen Ⅱ, Aggrecan and LC3-Ⅱ ($P<0.05$), and increased protein expression of MMP-3 and MMP-13 ($P<0.05$) in comparison with the conditions in the IL-1β+LV-YAP group. Furthermore, YAP overexpression promoted LC3 expression and inhibited disc degeneration in rat model of disc degeneration. **Conclusion** YAP overexpression can inhibit extracellular matrix degradation by promoting autophagy in human nucleus pulposus cells and thus delaying disc degeneration.

[**Key words**] YAP; intervertebral disc degeneration; autophagy; extracellular matrix; nucleus pulposus cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82102537) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2022NSCQ-MSX0064, CSTB2022BSXM-JCX0058). Corresponding author: WANG Dawu, E-mail: wangdawu66@163.com

椎间盘退变是导致下背部疼痛最常见的原因,影响数百万人的生活质量,给社会造成巨大的经济损失[1]。椎间盘退变的病因复杂,其中细胞外基质的丢失、机械性损伤、髓核细胞过度凋亡、炎症等在椎间盘退变的发生发展中起着非常重要的作用[2]。椎间盘由髓核组织、纤维环和软骨终板组成。髓核细胞产生细胞外基质,主要由Ⅱ型胶原(Collagen Ⅱ)和聚蛋白多糖(Aggrecan)组成。在椎间盘退变过程中,细胞外基质的生成减少,基质金属蛋白酶(MMP)升高,从而导致椎间盘退变。

YAP(Yes-associated protein)蛋白是一种关键的机械信号传感器,是Hippo信号通路的下游效应分子,具有调节细胞增殖、分化、凋亡,参与组织生长、发育和修复的功能[3-4]。DENG等[5]报道YAP在骨关节炎进展过程中减缓软骨退变。此外,有报道称,过表达YAP可逆转PMMA诱导的髓核细胞变性[6]。因此,YAP可能与椎间盘退变密切相关。

自噬是一种保守的细胞自我保护机制,可以通过改善各种类型的细胞应激来维持细胞的自稳定性。自噬是免疫、感染、炎症、肿瘤、心血管和神经退行性疾病发生的重要机制,同时自噬与椎间盘退变密切相关[7-8]。许多研究表明,自噬减缓椎间盘细胞外基质退变[9-10]。YAP参与自噬的调控[11]。研究报道,YAP/TAZ的下调通过促进自噬抑制类风湿关节炎成纤维细胞滑膜细胞的迁移和侵袭[12]。然而,YAP在椎间盘退变中的作用及与自噬的关系目前还尚不清楚。本研究拟探讨YAP对人髓核细胞退变的作用及自噬可能的分子机制,以期为椎间盘退变性疾病的预防和治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本的获取 人髓核组织来自2021年3月至2022年7月重庆医科大学附属第一医院骨科接受腰椎手术患者。相对正常的椎间盘组织取自5例腰椎骨折患者(正常组),年龄27~35岁;椎间盘退变的椎间盘组织取自8例椎间盘退变病患者(退变组),年龄48~80岁。根据术前MRI检测结果,采用Pfirrmann分级评价椎间盘退变的程度[13],其中退变组为Ⅲ~Ⅳ级,正常组为0~Ⅰ级。本研究经重庆医科大学伦理委员会批准(2020-150)。

1.1.2 动物 雄性Sprague-Dawley大鼠购自重庆医科大学实验动物中心,由重庆医科大学动物房代养。

1.1.3 试剂 主要有DMEM/F12培养基(HyClone,USA),胎牛血清(Gibco,USA),Ⅱ型胶原酶(Sigma,USA),YAP抗体、MMP-3抗体、MMP-13抗体、Aggrecan抗体(CST,USA),Collagen Ⅱ抗体(Abcam,USA),LC3抗体(Sigma,USA),LV-YAP、LV-NC慢病毒、YAP-siRNA、negative control-siRNA以及siRNA专用转染试剂(Invitrogen,USA)。

1.2 方法

1.2.1 原代髓核细胞培养 将在术中取得的无菌髓核组织置于冰盒保存,并立即带回实验室处理,反复洗涤髓核组织,将其剪碎成1 mm^3小块,转移到15 mL无菌离心管中。离心管中加入0.25%胰酶,置于37 ℃培养箱中作用30 min。然后在离心管中加入2 g/L Ⅱ型胶原酶,在37 ℃培养箱中作用4 h。将离心管中的混合物通过200目过滤器进行过滤。细胞悬液在含

20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养。细胞培养至 80%~90%融合后进行传代。

1.2.2 药物、病毒转染以及分组 将培养的原代髓核细胞分为 5 组:对照组、IL-1β 组、IL-1β+LV-YAP 组、IL-1β+YAP-siRNA 组和 IL-1β+ LV-YAP+3-MA 组。对照组不做处理;IL-1β 组采用 10 ng/mL IL-1β 处理髓核细胞 24 h;IL-1β+LV-YAP 组和 IL-1β+YAP-siRNA 组分别向髓核细胞中转染适量的过表达慢病毒 LV-YAP 或敲低慢病毒 YAP-siRNA 处理 48 h 后,再予以 10 ng/mL IL-1β 处理髓核细胞 24 h;IL-1β+LV-YAP+3-MA 组向髓核细胞中转染过表达慢病毒 LV-YAP 处理 48 h 后,予以 5 mmol/L 自噬抑制剂 3-MA 预处理 2 h,再予以 10 ng/mL IL-1β 处理髓核细胞 24 h。

1.2.3 GFP-LC3 转染 将髓核细胞接种于共聚焦皿中。髓核细胞培养 24 h 后,加入腺病毒 GFP-LC3(中国汉恒生物)孵育 24 h。DAPI 在室温下染色 20 min。使用激光共聚焦显微镜(TCS-SP5,德国)捕获图像。绿色荧光点的数量表示自噬的水平。

1.2.4 Western blot 检测 人髓核组织和处理后的髓核细胞蛋白在 RIPA 缓冲液中进行裂解。用 BCA 蛋白法测定蛋白质含量。通过 SDS-PAGE 对蛋白质进行分离,然后转移到 PVDF 膜上。取出 PVDF 膜放至 5%脱脂奶粉中封闭 1 h。然后,将 PVDF 膜与一抗在 4 ℃下孵育过夜。随后,将膜与相对应的二抗孵育。最后,加入 ECL 显影剂进行显影。

1.2.5 大鼠椎间盘退变模型建立及 MRI 检查 将 SD 大鼠通过简单随机法分为 3 组,每组 5 只:假手术组、穿刺组和穿刺+LV-YAP 组。采用腹腔注射对大鼠进行麻醉,假手术组用 30 号针针头垂直穿入皮下,但不穿入椎间盘。穿刺组将 30 号针针头插入大鼠的尾椎 6/7、7/8 椎间盘内,穿刺针保持与终板平行,穿刺进入椎间盘约 5 mm 的深度,穿刺成功后静置约 1 min。穿刺+LV-YAP 组为穿刺成功后 4 周采用微型注射器将 2 μL 的 LV-YAP(1.5 μg/μL)穿刺注射到原来标记的椎间盘内。术后 2 个月 MRI 检查椎间盘,采用 Pfirrmann 分级评价其退变程度。

1.2.6 免疫组化染色 从患者和大鼠获得的髓核组织样品用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片。患者和大鼠切片进行免疫组化染色,切片进行常规脱蜡、水化,高温修复后 5% BSA 封闭液室温阻断 20 min,加入适当浓度 YAP 和 LC3 抗体,4 ℃过夜。第 2 天复温洗涤后滴加山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗,DAB 显色,苏木精复染后脱水、封片、镜检。最后,利用 Image J 软件对结果进行分析。

1.2.7 阿利新蓝染色 从大鼠获得的髓核组织样品用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,然后进行常规脱蜡、水化后,按照说明书配置 Alcian 染色液,滴加 Alcian 染色液到髓核组织切片上,放入 37 ℃烘箱中 30 min,接着用自来水冲洗 5 min,用梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,最后光学显微镜观察并拍照。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 进行统计分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较采用 Student's t 检验或单因素方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 YAP 在正常和退变的椎间盘组织中的表达

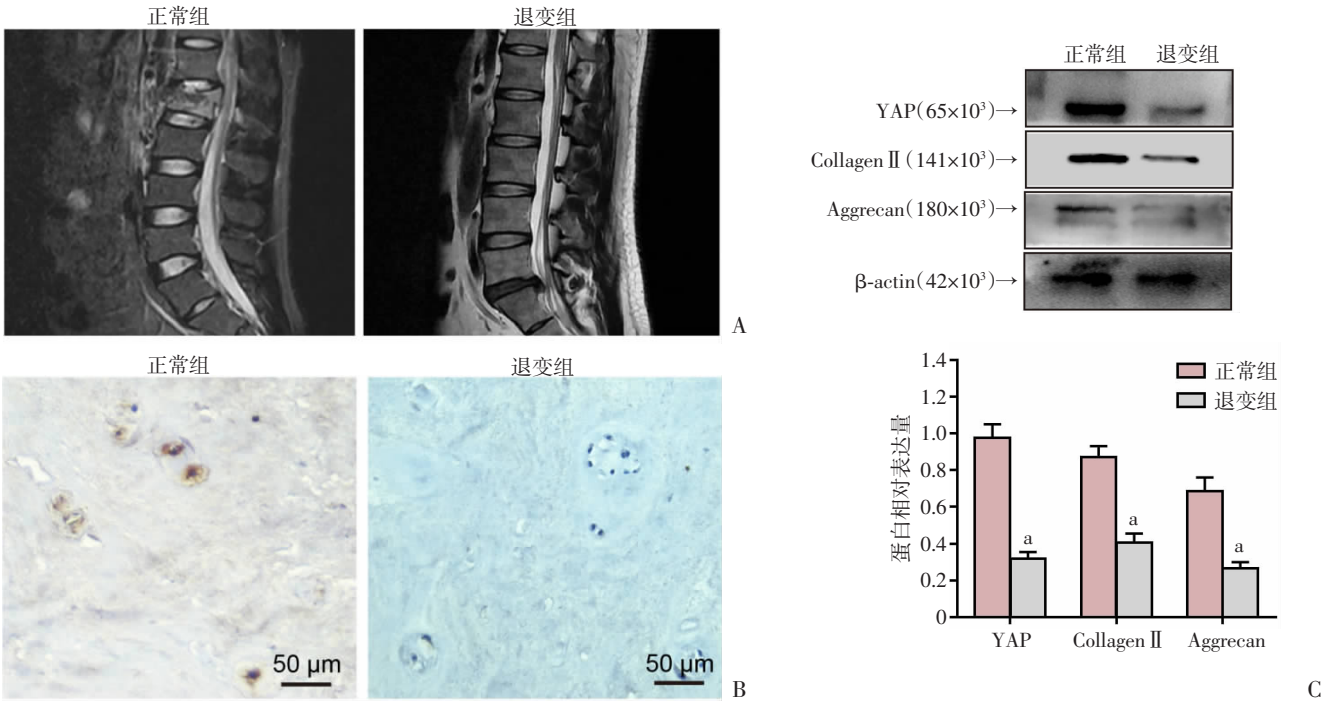
通过临床收集相对正常和退变的椎间盘组织(图 1A),进行免疫组化染色结果显示,相对正常椎间盘组织中 YAP 阳性表达率为(47.87± 3.51)%,高于退变的椎间盘组织[(12.36±2.43)%,$P<0.05$,图 1B]。同时,Western blot 结果也显示,退变的椎间盘组织中 YAP、Collagen Ⅱ及 Aggrecan 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$,图 1C)。这些结果表明,YAP 可能与椎间盘退变密切相关。

2.2 YAP 抑制人髓核细胞外基质的降解

通过使用 LV-YAP 和 YAP-siRNA 转染人髓核细胞。Western blot 结果显示,转染 LV-YAP 或 YAP-siRNA 可明显过表达或下调人髓核细胞中 YAP 蛋白的表达($P<0.05$,图 2A)。过表达 YAP 可显著提高 IL-1β 诱导的髓核细胞中 Collagen Ⅱ与 Aggrecan 的蛋白表达,同时降低 MMP-3 和 MMP-13 的蛋白表达($P<0.05$,图 2B)。然而,YAP 敲低则进一步加剧 IL-1β 诱导的髓核细胞外基质降解($P<0.05$,图 2B)。结果表明,YAP 过表达能抑制人髓核细胞外基质的降解。

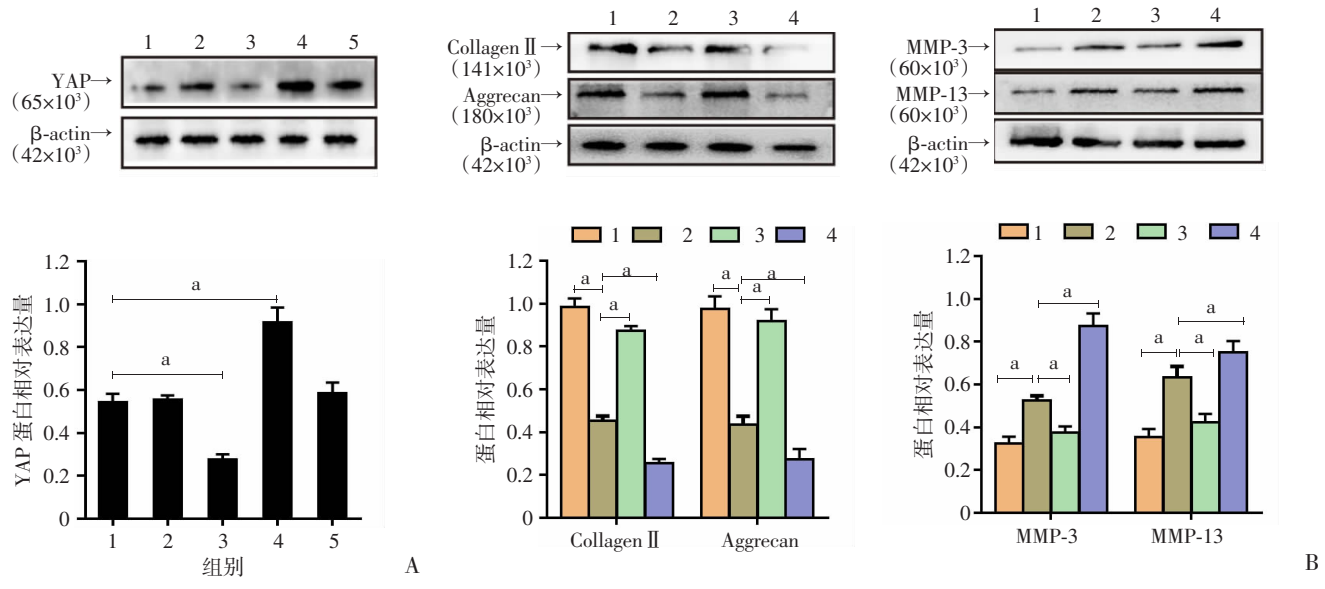
2.3 YAP 促进髓核细胞自噬抑制椎间盘退变

为进一步探讨自噬在 YAP 保护椎间盘退变中的作用,采用 Western blot 和 GFP-LC3 腺病毒转染检测髓核细胞的自噬水平。Western blot 结果显示,YAP 过表达显著增加 LC3-Ⅱ表达($P<0.05$,图 3A)。同样,YAP 过表达增加髓核细胞中 GFP-LC3 阳性颗粒数量(图 3B)。为进一步明确 YAP 诱导的自噬对髓核细胞外基质降解的影响,采用自噬抑制剂 3-MA 处理髓核细胞。3-MA 预处理后显著降低 LC3-Ⅱ蛋白表达,表明 3-MA 抑制 LV-YAP 诱导的自噬水平($P<0.05$,图 3C)。此外,与 IL-1β+LV-YAP 组相比,3-MA 预处理后 Collagen Ⅱ和 Aggrecan 蛋白表达明显降低,而 MMP-3 和 MMP-13 蛋白表达明显升高($P<0.05$,图 3C)。结果表明 YAP 通过促进自噬抑制髓核细胞外基质的降解。



A:MRI 表现;B:免疫组化染色观察 YAP 的表达;C:Western blot 检测相关蛋白的表达及半定量分析 a:$P<0.05$,与正常组比较

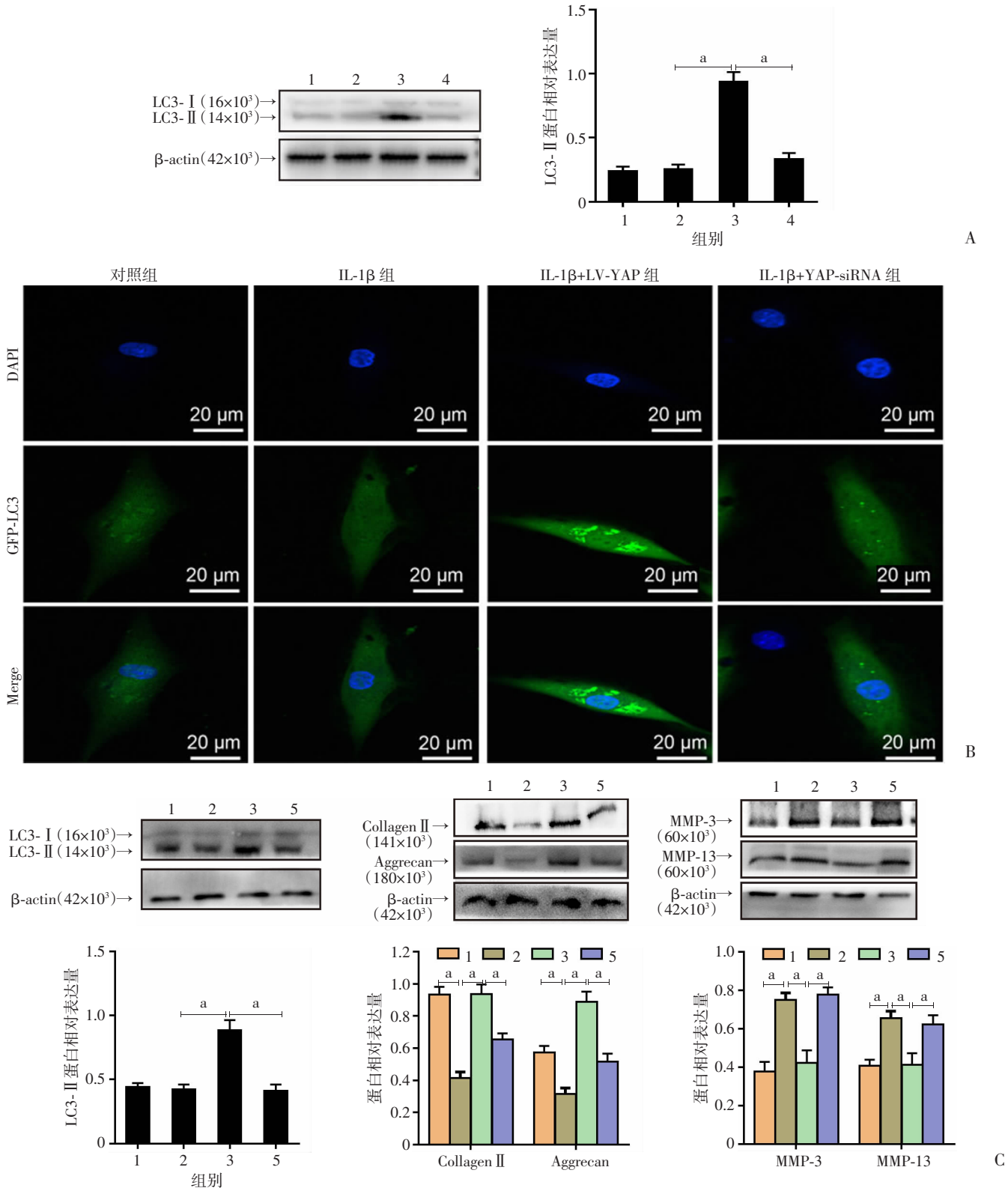
图 1 正常和退变椎间盘影像表现及其组织中 YAP 的表达



a:$P<0.05$

A:慢病毒转染 YAP 后蛋白表达及半定量分析 1: Control; 2: NC-siRNA; 3: YAP-siRNA; 4: LV-YAP; 5: LV-NC;B:转染 YAP 慢病毒后 Collagen Ⅱ、Aggrecan、MMP-3 和 MMP-13 的蛋白表达及半定量分析 1:对照组;2:IL-1β 组;3:IL-1β+LV-YAP 组;4:IL-1β+YAP-siRNA 组

图 2 Western blot 检测 YAP 转染后的表达及对髓核细胞外基质相关蛋白表达的影响



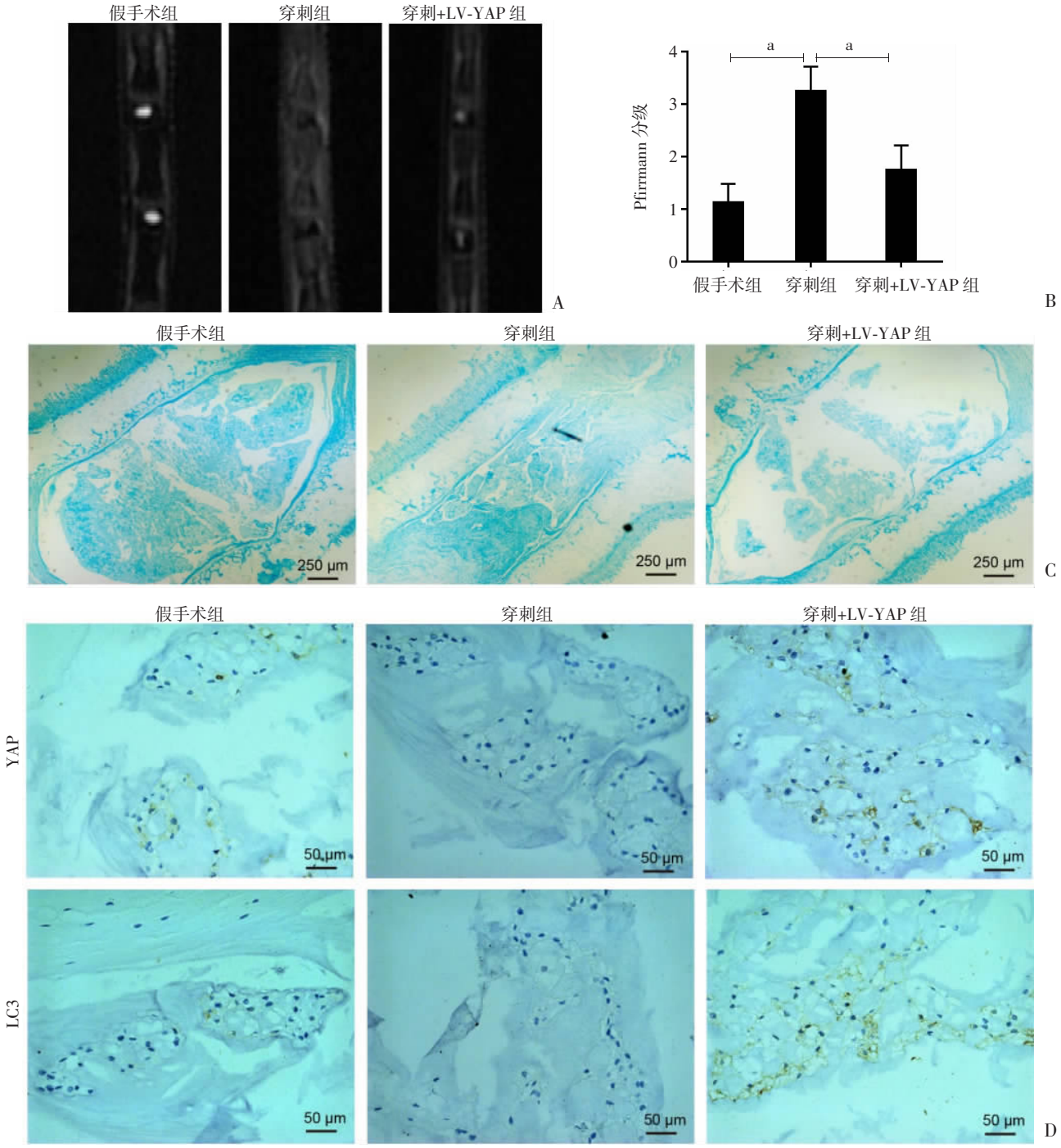
1:对照组;2:IL-1β 组;3:IL-1β+LV-YAP 组;4:IL-1β+YAP-siRNA 组;5:IL-1β+LV-YAP+3-MA 组;a:$P<0.05$

A:Western blot 检测 LC3 蛋白表达及半定量分析;B:共聚焦荧光显微镜检测 GFP-LC3 转染情况;C:Western blot 检测 LC3、Collagen Ⅱ、Aggrecan、MMP-3、MMP-13 的蛋白表达及半定量分析

图 3 YAP 促进人髓核细胞自噬及其对细胞外基质相关蛋白表达的影响

2.4 YAP 在体内抑制大鼠椎间盘退变

为了进一步在体内验证 YAP 在椎间盘退变中的作用,采用针刺法建立椎间盘退变的大鼠模型。MRI 检查结果显示,穿刺+LV-YAP 组的 T2 加权信号值明显高于穿刺组($P<0.05$,图 4A、B)。阿利新蓝染色结果显示,在穿刺组中,椎间盘的结构显示出明显退化特征,髓核细胞消失并被混乱的纤维组织取代,而予以 LV-YAP 转染处理后髓核细胞得以恢复(图 4C)。免疫组化染色结果显示,与假手术组相比,穿刺组 YAP 和 LC3 的表达降低。而与穿刺组相比,穿刺+LV-YAP 组 YAP 和 LC3 的表达明显增加(图 4D)。结果表明 YAP 在体内可能是通过激活自噬,减轻大鼠椎间盘退变。



A、B:MRI 观察大鼠椎间盘退变及退变程度定量分析 a:$P<0.05$;C:阿利新蓝染色观察大鼠椎间盘退变;D:免疫组化染色检测大鼠椎间盘 YAP 和 LC3 的表达

图 4 体内 YAP 转染后对大鼠椎间盘退变及 YAP 和 LC3 表达的影响

3 讨论

椎间盘退变是腰痛的主要原因,但椎间盘退变的分子机制尚不十分清楚。目前,普遍认为椎间盘退变是椎间盘生物力学改变、细胞过度凋亡、炎症因子增加、营养物质减少、基质降解酶增加等多种原因导致的椎间盘细胞长期、进行性破坏的结果[14-16]。YAP 是一种机械信号分子,能够检测到细胞形状变化引起的肌动蛋白细胞骨架的变化,并将机械信息传递给细胞核[17]。有报道称,在大鼠椎间盘退变过程中,YAP 表达逐渐降低[18]。然而,目前尚不清楚 YAP 是否也与人类椎间盘退变有关。在本研究中,免疫组化染色和 Western blot 结果显示,YAP 在人椎间盘退变中表达水平降低,表明 YAP 参与人椎间盘退变的过程。

YAP 是一种调节多种转录因子活性进而参与调控细胞功能的转录辅助激活因子,参与细胞增殖、凋亡、自噬和组织修复的调控[19-21]。椎间盘退变的主要病理特征是细胞外基质中Ⅱ型胶原蛋白和聚蛋白多糖合成减少,基质金属蛋白酶合成增加。研究发现,在骨关节炎发病过程中,YAP 可以抑制基质降解酶的表达和软骨降解[5]。此外,研究报道软骨素合酶 3 缺失可通过介导髓核细胞中的 YAP 激活导致自发性椎间盘退变[22]。同时研究发现 DNMT3B 通过 COX2-YAP 轴促进髓核细胞增殖和细胞外基质的合成[23]。本研究结果表明,过表达 YAP 可显著提高Ⅱ型胶原和聚蛋白多糖的表达,降低 MMP-3 和 MMP-13 的表达,这表明 YAP 能够抑制人髓核细胞细胞外基质的降解。

自噬是一种高度保守的细胞内分解代谢机制,通过清除细胞中不需要的蛋白质或分子来维持细胞稳态。自噬在多种退行性疾病的病理进展中起重要作用,如神经退行性、退行性骨关节炎、椎间盘退变等[24-26]。CHEN 等[27]报道褪黑素可通过激活自噬抑制椎间盘细胞外基质退变。研究表明,YAP 参与自噬过程的调控[28]。ZHAO 等[29]报道 YAP 通过上调 HMGB1 促进胶质瘤的自噬和进展。ZHOU 等[30]也报道 YAP 通过 RAC1-ROS- mTOR 通路促进肝癌多药耐药,抑制自噬相关细胞死亡。然而,椎间盘退变中 YAP 与自噬之间的关系尚不清楚。本研究结果表明,YAP 过表达显著增加髓核细胞自噬水平,而自噬是一把双刃剑。为了进一步评价 YAP 诱导的自噬对细胞外基质降解的影响,本研究采用自噬抑制剂 3-MA 处理髓核细胞。发现 3-MA 预处理显著加重 IL-1β+LV-YAP 组细胞外基质的降解,表明 YAP 通过诱导自噬抑制人髓核细胞外基质的降解。为了进一步证实 YAP 在体内椎间盘退变中的作用,通过建立大鼠椎间盘退变模型,然后在体内将过表达 YAP 慢病毒注射到退变的大鼠髓核组织中,因为慢病毒可以将稳定的基因整合到宿主基因组中,具有广泛的组织向性,转染后且不表达病毒蛋白,是一种高效、稳定的载体,广泛应用于椎间盘变性的基因治疗。体内通过 MRI、阿利新蓝及免疫组化检测结果表明,YAP 过表达可显著抑制大鼠椎间盘退变,同时促进椎间盘自噬。

综上所述,YAP 通过促进人髓核细胞的自噬,从而抑制 IL-1β 诱导的细胞外基质的降解,这说明 YAP 有望成为治疗椎间盘退变疾病的潜在靶点。但在 YAP 调控髓核细胞自噬的信号通路方面还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] WU T D, JIA X B, FENG H, *et al*. ACTG1 regulates intervertebral disc degeneration *via* the NF-κB-p65 and Akt pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 545: 54-61. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.01.057.

[2] ZHANG C, WANG F, XIE Z Y, *et al*. AMOT130 linking F-actin to YAP is involved in intervertebral disc degeneration [J]. Cell Prolif, 2018, 51(6): e12492. DOI: 10.1111/cpr.12492.

[3] PICCOLO S, DUPONT S, CORDENONSI M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond[J]. Physiol Rev, 2014, 94(4): 1287-1312. DOI: 10.1152/physrev.00005.2014.

[4] PEI T J, HUANG X, LONG Y, *et al*. Increased expression of YAP is associated with decreased cell autophagy in the eutopic endometrial stromal cells of endometriosis[J]. Mol Cell Endocrinol, 2019, 491: 110432. DOI: 10.1016/j.mce.2019.04.012.

[5] DENG Y J, LU J Q, LI W L, *et al*. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF-κB regulates osteoarthritic cartilage degradation[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4564. DOI: 10.1038/ s41467-018-07022-2.

[6] GE J, YANG H L, CHEN Y F, *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(7): 3293-3302. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.9b00146.

[7] GONG C Y, ZHANG H H. Autophagy as a potential therapeutic target in intervertebral disc degeneration[J]. Life Sci, 2021, 273: 119266. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119266.

[8] ZHANG S J, YANG W, WANG C, *et al*. Autophagy: a double-edged sword in intervertebral disk degeneration[J]. Clin Chimica Acta, 2016, 457: 27-35. DOI: 10.1016/j.cca.2016.03.016.

[9] ZHANG Y, HE F, CHEN Z, *et al*. Melatonin modulates IL-1β-induced extracellular matrix remodeling in human nucleus pulposus cells and attenuates rat intervertebral disc degeneration and inflammation[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(22): 10499-10512. DOI: 10.18632/aging.102472.

[10] CHEN J, MA Y F, YANG Z J, *et al*. TNFAIP3 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.

[11] WANG D Y, HE J X, HUANG B Y, *et al*. Emerging role of the Hippo pathway in autophagy[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(10): 880. DOI: 10.1038/s41419-020-03069-6.

[12] ZHOU W, SHEN Q, WANG H, *et al*. Knockdown of YAP/TAZ inhibits the migration and invasion of fibroblast synovial cells in rheumatoid arthritis by regulating autophagy[J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 9510594. DOI: 10.1155/2020/9510594.

[13] PFIRRMANN C W A, METZDORF A, ZANETTI M, *et al*. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2001, 26(17): 1873-1878. DOI: 10.1097/00007632-200109010-00011.

[14] DOWDELL J, ERWIN M, CHOMA T, *et al*. Intervertebral disk degeneration and repair[J]. Neurosurgery, 2017, 80(3S): S46-S54. DOI: 10.1093/neuros/nyw078.

[15] YANG S D, ZHANG F, MA J T, *et al*. Intervertebral disc ageing and degeneration: the antiapoptotic effect of oestrogen[J]. Ageing Res Rev, 2020, 57: 100978. DOI: 10.1016/j.arr.2019.100978.

[16] 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.

[17] PUTS R, RIKEIT P, RUSCHKE K, *et al*. Functional regulation of YAP mechanosensitive transcriptional coactivator by Focused Low-Intensity Pulsed Ultrasound (FLIPUS) enhances proliferation of murine mesenchymal precursors[J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0206041. DOI: 10.1371/journal.pone.0206041.

[18] ZHANG C, WANG F, XIE Z Y, *et al*. Dysregulation of YAP by the Hippo pathway is involved in intervertebral disc degeneration, cell contact inhibition, and cell senescence[J]. Oncotarget, 2018, 9(2): 2175-2192. DOI: 10.18632/oncotarget.23299.

[19] CHEN W, BAI Y X, PATEL C, *et al*. Autophagy promotes triple negative breast cancer metastasis *via* YAP nuclear localization[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 520(2): 263-268. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.09.133.

[20] MOYA I M, HALDER G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(4): 211-226. DOI: 10.1038/s41580-018-0086-y.

[21] ZHU J, ZHAO B X, XIONG P G, *et al*. Curcumin induces autophagy *via* inhibition of Yes-associated protein (YAP) in human colon cancer cells[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 7035-7042. DOI: 10.12659/MSM.910650.

[22] WEI L X, CAO P, XU C, *et al*. Chondroitin synthase-3 regulates nucleus pulposus degeneration through actin-induced YAP signaling[J]. FASEB J, 2020, 34(12): 16581-16600. DOI: 10.1096/fj.202001021R.

[23] LUO Z Q, MA Y C, DI T N, *et al*. DNMT3B decreases extracellular matrix degradation and alleviates intervertebral disc degeneration through TRPA1 methylation to inhibit the COX2/YAP axis[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(16): 20258-20276. DOI: 10.18632/aging.203410.

[24] CORTI O, BLOMGREN K, POLETTI A, *et al*. Autophagy in neurodegeneration: new insights underpinning therapy for neurological diseases[J]. J Neurochem, 2020, 154(4): 354-371. DOI: 10.1111/jnc.15002.

[25] DUAN R, XIE H, LIU Z Z. The role of autophagy in osteoarthritis[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 608388. DOI: 10.3389/fcell.2020.608388.

[26] ZHANG T W, LI Z F, DONG J, *et al*. The circadian rhythm in intervertebral disc degeneration: an autophagy connection[J]. Exp Mol Med, 2020, 52(1): 31-40. DOI: 10.1038/s12276-019-0372-6.

[27] CHEN F, LIU H, WANG X, *et al*. Melatonin activates autophagy *via* the NF-κB signaling pathway to prevent extracellular matrix degeneration in intervertebral disc[J]. Osteoarthr Cartilage, 2020, 28(8): 1121-1132. DOI: 10.1016/j.joca.2020.05.011.

[28] TOTARO A, ZHUANG Q Y, PANCIERA T, *et al*. Cell phenotypic plasticity requires autophagic flux driven by YAP/TAZ mechanotransduction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(36): 17848-17857. DOI: 10.1073/pnas.1908228116.

[29] ZHAO M, ZHANG Y, JIANG Y, *et al*. YAP promotes autophagy and progression of gliomas *via* upregulating HMGB1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 99. DOI: 10.1186/s13046-021-01897-8.

[30] ZHOU Y, WANG Y B, ZHOU W H, *et al*. YAP promotes multi-drug resistance and inhibits autophagy-related cell death in hepatocellular carcinoma *via* the RAC1-ROS-mTOR pathway[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 179. DOI: 10.1186/s12935-019-0898-7.

(**收稿**:2023-10-13;**修回**:2023-11-26)

(编辑 张 维)