

综述

椎间盘髓核细胞老化的微环境因素研究现状

Current state of research in the microenvironment-derived senescence-inducing stresses for intervertebral disc nucleus pulposus cell senescence

康新桂, 吴小涛, 时睿, 蔡峰, 王锋

(东南大学附属中大医院脊柱外科中心 210009 南京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.04.15

中图分类号: Q813.1, R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2016)-04-0370-05

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)继发的脊柱不稳与椎管狭窄是引起腰腿痛的主要原因^[1]。老化的髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)在退变的椎间盘组织中广泛聚集, 这些老化的 NPCs 能诱导并加速 IDD^[2]。与细胞程序性凋亡不同, 老化细胞仍有代谢活性, 却停止分裂增殖, 同时上调炎症因子和基质降解酶的表达, 通过形成老化分泌表型(senescent-associated secretory phenotypes, SASP)来恶化邻近细胞生存的微环境^[2]。髓核组织中的 NPCs 面临缺氧、营养匮乏、高渗、偏酸以及周期性力学负荷等微环境因素刺激^[3]。与此同时, 遗传背景、椎间盘损伤、氧化应激、糖尿病、长期吸烟、肥胖等因素与 IDD 密切相关^[1-4]。这些因素极有可能通过恶化椎间盘局部微环境诱导或加速 NPCs 老化, 破坏内环境稳态并最终导致 IDD。笔者查阅了 NPCs 老化研究的相关文献, 从年龄增加、低氧、营养匮乏、机械应力、DNA 损伤等角度综述 NPCs 老化的微环境因素。

1 NPCs 的老化现象

细胞老化是指细胞经历多次有丝分裂或遭受特定应激损伤后不可逆的增殖停滞状态^[5]。目前认为细胞连续性分裂后, 染色体端粒渐进性缩短, 可通过激活 p53-p21-pRB 途径形成复制性老化(replicative senescence, RS), 而 p16INK4a-pRB 途径主要介导非依赖端粒长度的应激诱导的过早老化(stress induced premature senescence, SIPS)^[5]。老化细胞上调老化相关 β -半乳糖苷酶(senescent-associated β -galactosidase, SA- β -gal)活性, 因此可通过 SA- β -gal 染色来定位与量化细胞老化^[2]。但需指出的是, 一些自噬激活与生长接触抑制的细胞能非特异性上调 SA- β -gal 活性。因此细胞老化应依据细胞停滞在 G1-S 过渡期、细胞增殖相关标记物匮乏、端粒长度缩短、端粒酶活性降

低、老化相关因子 p53、p21、pRB 和 p16 激活等来综合评价^[2,4]。

2006 年 Roberts 等^[2]首次在人椎间盘组织中检测到 SA- β -gal 阳性的 NPCs, 并发现突出椎间盘中细胞老化率(8.5%)显著高于相对正常(1.5%)以及脊柱侧凸患者的椎间盘(0)。目前所报道的退变椎间盘内的整体老化率差异较大, 这可能是老化检测方法、样本大小以及免疫阳性判断标准不同所致^[2]。但大部分研究发现, 随着 IDD 退变等级的增加, NPCs 老化率或老化指标的表达均呈上升趋势, 老化的 NPCs 倾向于丛性聚集^[2]。在体外诱导 NPCs 老化的过程中, 也观察到类似的老化细胞聚集现象。老化细胞的丛性聚集可能与以下因素有关: (1) 细胞丛内的细胞大多上调应激相关性蛋白, 提示局部椎间盘组织在遭受更多的应激损伤或退变诱导因素后, NPCs 逐渐发生 SIPS; (2) 早期 IDD 发生时, 细胞代偿性通过自我复制来修复退变, 在形成细胞丛的同时加速了 RS 的形成; (3) 老化的 NPCs 通过特定的 SASP 恶化邻近正常细胞的生存微环境, 从而由中心向外周逐渐形成老化细胞的丛性聚集。

2 NPCs 老化的诱发因素

2.1 年龄增加

年龄增加所累积的细胞复制与端粒长度缩短是 RS 的基础^[5]。体外研究发现, 人 NPCs 经长期连续传代培养后, 端粒长度缩短, 端粒酶活性降低, p53-p21-pRB 通路及 p16INK4a-pRB 通路被激活^[6]。此外, 从老年患者椎间盘分离提取的 NPCs 在体外传代培养后, 能更早发生老化^[2]。对椎间盘标本研究也发现, 随着供者年龄增长, NPCs 端粒酶活性降低, 端粒长度缩短^[4,6]。但截至目前只有一项研究提示人退变椎间盘内 NPCs 老化率与年龄呈正相关^[9], 多数研究^[2,6]发现 NPCs 老化率与患者年龄无显著相关。与此类似, SIPS 标记物 p16 及微囊蛋白(caveolin)-1 等也与椎间盘供者年龄无相关或弱相关^[6]。鉴于体内环境下 NPCs 的自然增殖速度极其缓慢, 年龄增加所引起的 RS 可能不是退变椎间盘内老化细胞聚集的主要原因。

2.2 低血管化特性

第一作者简介: 男(1989-), 在读硕士, 研究方向: 脊柱外科基础与临床

电话: (025)83262331 E-mail: xinguikang@163.com

通讯作者: 王锋 E-mail: wangfengspine@163.com

椎间盘的滋养血管只局限于软骨终板表面和外层纤维环,因此 NPCs 面临一个相对缺氧、营养匮乏以及生长因子稀少的生存微环境^[9]。大量体外研究已证实,NPCs 稳定表达低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor,HIF)-1 α 并耐受缺氧培养^[7]。而在常氧环境(20% O₂)下,人NPCs上调氧化应激并产生更多的氧自由基(reactive oxygen species,ROS)^[8]。与之类似,低糖培养时,大鼠NPCs增殖良好并形成较大的细胞丛^[9];而高糖环境下,纤维环细胞合成更多的ROS,并激活p16INK4a-pRB信号通路而加速NPCs老化^[10]。上述研究提示,椎间盘细胞能很好地耐受局部低氧和低糖供应的微环境,这与椎间盘细胞优先使用无氧糖酵解供能紧密相关

与低氧和低糖不同,血清剥夺的牛NPCs显著加速老化^[9],提示生长因子匮乏可能是NPCs老化的主要物质基础。因循环系统中的绝大多数大分子无法进入低血管化的椎间盘内,原位NPCs可能主要依靠内源性生长因子的自分泌或旁分泌来维持活性及功能^[11]。而随着年龄的增加,转化生长因子(transforming growth factor,TGF)- β 、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor,IGF)-1等生长因子在椎间盘内表达显著下降^[11]。

尽管椎间盘内缺乏血供,但氧化应激指标随着椎间盘老化与退变而显著上调^[5,8]。鉴于高糖诱发椎间盘细胞产生ROS并激活p16INK4a-pRB通路而加速老化,糖尿病患者退变椎间盘内上调的氧化应激反应可能与高糖代谢有关^[10]。而非糖尿病患者的椎间盘可能在破裂、突出或再血管化过程中,因葡萄糖及氧气的供应上调而产生氧化应激^[7]。与此推论相一致的是,细胞老化在纤维环穿刺诱导的IDD模型以及人突出椎间盘内显著上调^[2]。

2.3 机械应力

作为椎体间的连接装置,椎间盘需承受压缩、屈伸、扭转等力学负载^[12,13]。有研究发现,强度1MPa、频次0.2Hz的动态压缩力是椎间盘所能承受的最佳生理性负荷^[14]。强度增加、频次紊乱以及力学负载过久都能导致椎间盘病理性改变与损害^[12-14]。特别是压缩合并扭转^[13]、侧弯^[15]、屈曲^[16]等复合受力更易诱导IDD。Xing等^[17]在去前肢诱导的大鼠IDD模型中发现,大鼠持久站立所增加的脊柱轴向负荷能够显著上调p16的表达,诱导并加速NPCs老化。

除直接引起细胞老化外,力学负荷还可通过如下方式加速NPCs老化:(1)病理性力学负载导致椎间盘结构损伤,破坏椎间盘组织完整性,甚至导致椎间盘突出^[6,12]。目前已证实过度侧弯^[15]、反复屈伸^[16]、屈曲合并扭转^[18]、压缩合并扭转^[13]、压缩合并侧弯^[15]、压缩合并屈曲^[16]等受力均显著增加椎间盘损伤与突出风险,而破损的椎间盘可上调氧化应激来加速老化。(2)过强的压缩^[13]、牵张^[19]或压缩合并扭转^[13]等力学作用可上调椎间盘内炎症因子的表达,促进基质分解代谢。作为重要的促老化因素,过度激活的促炎信号不仅自身加速细胞老化,同时通过降解细胞外基质组分及诱导血管侵入来上调氧化应激^[1,12]。(3)病理性力学

损伤与IDD间存在恶性循环关系^[12]。这种循环开始于非生理性力学负荷所诱导的合成与分解代谢失衡^[14],随后亲水性的细胞外基质含量减少,弱化了髓核组织对轴向压力的抵抗能力,随后软骨基质浸润到纤维环组织中,使得后者抵抗牵张力的性能减弱^[20]。因此,被生物力学破坏的退变椎间盘更容易遭受病理性力学负荷损伤,最终加速细胞老化及IDD^[6]。

2.4 DNA损伤

DNA损伤是细胞老化的主要诱导因素之一^[21]。异常的高渗、偏酸性环境因素能诱发DNA损伤^[8]。研究显示,DNA损伤修复缺陷鼠在过度的DNA损伤因素下将加速NPCs老化并显著诱导IDD^[21]。

正常椎间盘髓核组织内的高渗环境主要由带负电荷的糖胺聚糖侧链维持^[12]。一定程度的高渗环境有利于营养物质向椎间盘内弥散并抵御压力负荷^[12]。当NPCs感知高渗刺激后将激活转录因子弹性增强结合蛋白(tonicity enhancer binding protein,TonEBP)^[22],TonEBP作用于 β 1,3-葡萄糖醛基转移酶-I^[23]、水通道蛋白(aquaporin)^{2[24]}、聚集蛋白聚糖(aggrecan)^[25]的启动子并调控后者表达。尽管TonEBP的主要功能是合成与维持亲水性细胞外基质,但有研究发现高渗能刺激NPCs诱发DNA损伤反应并激活p53-p21-pRB通路,阻滞细胞周期递进^[5]。鉴于在aggrecan富集的正常髓核组织中老化细胞少有聚集,上述高渗诱发的DNA损伤在正常椎间盘内可能被年轻的正常椎间盘耐受。一旦凝胶状髓核组织开始纤维化或aggrecan含量减少,高渗诱导的增殖抑制效应减弱,NPCs通过上调增殖来自发修复IDD,因而潜在增加RS的风险^[1,2]。

除高渗因素外,与年龄增长相伴的ROS聚集是DNA损伤的另外一个因素^[5,8]。在糖尿病者^[10]和急性损伤^[7]的椎间盘内,低糖及低氧代谢紊乱可产生大量ROS^[12]。过度的压缩力也能诱导体外培养的NPCs合成ROS^[5]。鉴于老化细胞自身上调合成与分泌ROS,老化细胞的丛性聚集同样可以提高退变椎间盘组织内ROS含量^[5]。

作为DNA损伤的诱导因素之一,长期吸烟可加速NPCs老化并促进大鼠IDD^[12]。然而在吸烟诱导的IDD模型中,源于吸烟的DNA损伤只是加速IDD的诱因之一,其他退变因素,如尼古丁诱导血管收缩、炎症反应、氧化损伤可能起到更主要的退变诱导作用^[12]。有研究显示,端粒酶功能障碍可诱导SIPS^[5],由于NPCs低表达或不表达端粒酶^[4,6],端粒酶缺失是否通过易化NPCs的DNA损伤而加速老化有待深入探索。

2.5 β -连环蛋白(β -catenin)依赖的经典Wnt信号通路(Wnt/ β -catenin)激活

Wnt/ β -catenin是调控细胞增殖、分化、存活、老化的重要信号通路^[26]。该通路通过Wnt配体结合跨膜Wnt受体与低密度脂蛋白相关受体5/6而激活,激活后的 β -catenin稳定性增加并进入细胞核,通过募集诸多转录共刺激因子而启动 β -catenin下游靶基因的转录^[26]。在非椎间盘细胞

内已证实,激活的 Wnt/ β -catenin 可诱导 DNA 损伤并促进 ROS 合成,从而与 p53-p21-pRB 及 p16INK4a-pRB 老化途径广泛交通^[27]。

大鼠椎间盘内 Wnt/ β -catenin 在胚胎及出生早期高表达^[28],随着椎间盘的发育与成熟逐渐减弱甚至失活^[29],而在老化与退变的椎间盘中 Wnt/ β -catenin 会被再次激活^[30]。通过研究软骨发育不良犬的椎间盘发现,Wnt/ β -catenin 的激活有利于维持脊索细胞表型及活性^[29]。而在大鼠软骨样 NPCs 中,氯化锂能激活 Wnt/ β -catenin,诱导 NPCs 老化并抑制其增殖^[31]。由此可见,Wnt/ β -catenin 能维持脊索细胞含量并参与髓核结构的早期形成,脊索细胞内 Wnt/ β -catenin 减弱促其转变成软骨样 NPCs,而 Wnt/ β -catenin 在软骨样 NPCs 的上调又加速了细胞老化。目前关于 Wnt/ β -catenin 在椎间盘发育、老化、退变进程中如何被动态而精细的调控仍知之甚少。

研究显示,动态或静态压缩力可促进脊索细胞向软骨样 NPCs 转变^[20]。鉴于脊索细胞的活性需要 Wnt/ β -catenin 来持续^[29],过度的压缩受力可能通过降低 Wnt/ β -catenin 活性而消耗髓核组织中的脊索细胞。基于此观点,人椎间盘脊索细胞的过早消失^[20]可能与直立行走及长久直立姿势所引起的椎间盘内压上升有关。Hiyma 等^[26]发现大鼠 NPCs 中 Wnt/ β -catenin 与肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)- α 之间存在正反馈调节,因此随着 IDD 而上调的 TNF- α 及其受体潜在激活 Wnt/ β -catenin 而诱导细胞老化。最新研究显示,NPCs 中的 Wnt/ β -catenin 可与 TGF- β ^[32]、caveolin-1^[29]交通,同时对缺氧环境产生应答^[33]。由此可见,IDD 过程中软骨样 NPCs 内 Wnt/ β -catenin 的再次激活可能与 caveolin-1 的表达上调^[29]、TGF- β 的信号降低^[32]以及椎间盘损伤后局部氧张力的改变^[7]紧密相关。

上述关于 NPCs 老化诱发因素的研究结果表明,年龄

增加、椎间盘独特的低血管化特性、机械应力损伤、DNA 损伤、Wnt/ β -catenin 激活与 NPCs 老化存在复杂多元的关系网(图 1)。年龄增加、低血管化特性改变、机械应力损伤、Wnt/ β -catenin 激活等均可上调 ROS,进而激活 p16INK4a-pRB 老化途径引起细胞老化。病理性力学负荷所引起的椎间盘结构损伤可通过上调炎症因子、诱导血管侵入等途径改变椎间盘低血管化特性。年龄增加所引起的端粒长度缩短、端粒酶活性降低,高渗、偏酸微环境引起的 DNA 损伤,Wnt/ β -catenin 激活等因素又可通过激活 p53-p21-pRB 通路来阻滞细胞周期递进。

3 老化 NPCs 的病理生理功能

细胞老化是机体清除受损或异常细胞的基本机制之一,而过度或过早的细胞老化常导致退变性疾病。首先,老化细胞停止分裂增殖,因此老化细胞的聚集潜在减少活力细胞数量并下调基质合成代谢。研究显示,退变椎间盘内老化指标的上调与细胞增殖指标的下调显著相关^[4]。其次,老化细胞上调炎症因子的表达而形成 SASP^[2]。目前已证实人 NPCs 中 p16INK4a-pRB 老化信号的激活与基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMP)-13、带有血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶家族(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs,ADAMTs)-5 的上调密切相关^[6],而在激活 Wnt/ β -catenin 的大鼠老化 NPCs 中 MMP-3、MMP-7、MMP-9、MMP-10、TNF- α 表达增加^[6]。由此可见,老化细胞的聚集潜在促进基质分解代谢,同时上调局部炎症反应而进一步恶化椎间盘微环境。此外,尽管细胞老化后可通过驱化免疫细胞来清除受损细胞,且在退变椎间盘中炎性细胞与趋化因子表达上调^[34]。然而在 IDD 早期,低血管化的椎间盘将阻碍免疫细胞浸润,从而阻碍老化细胞的清除^[4]。随着 IDD 的进一步发展,尽管椎间盘完整性遭破坏后可促进白

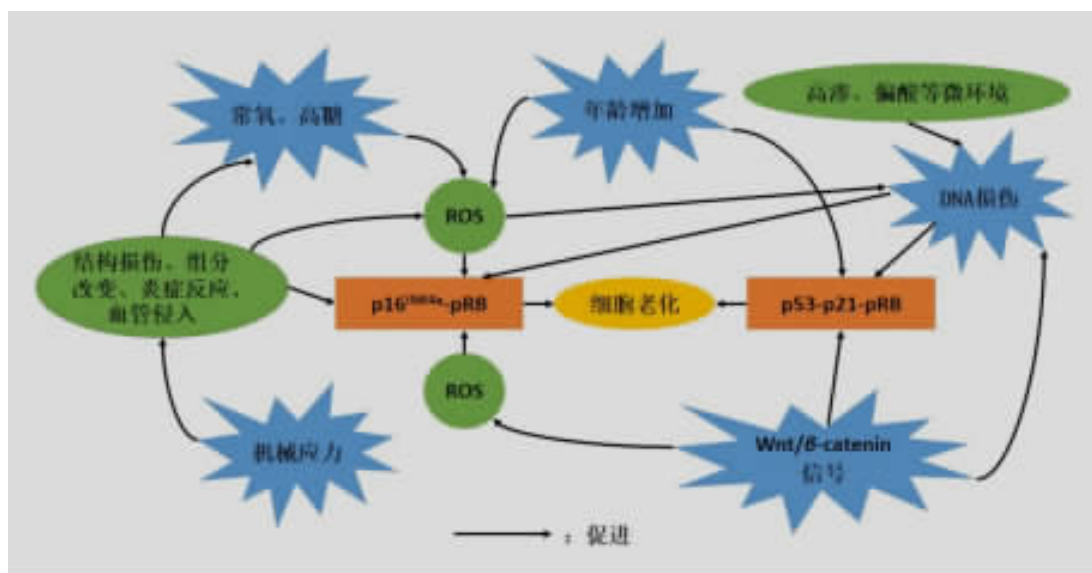


图 1 椎间盘 NPCs 老化的诱导因素示意图

细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞浸润^[1],但目前仍无证据表明老化的 NPCs 可被上述免疫细胞清除。与之相反,有研究显示浸润的细胞可能通过放大炎症反应加速 IDD,并诱发椎间盘源性疼痛^[1]。

4 细胞老化的治疗与预防

长期以来,细胞老化被认为是不可逆的细胞生长抑制。随着老化信号机制的研究深入,目前认为细胞老化是一个从早期老化向完全及终末期老化演变的动态过程。若在老化形成早期及时清除老化诱导因素,受损的细胞完全可能再次进入细胞周期,恢复增殖活性^[35]。生长因子注射疗法可有效抑制老化信号并缓解 NPCs 老化^[11],但纤维环穿刺及经椎弓根注射疗法均能破坏椎间盘完整性^[36]。口服抗炎药物能降低糖尿病大鼠椎间盘中 ROS 表达^[37],但软骨终板对大分子向椎间盘内弥散具有屏障作用^[11],通过循环系统向椎间盘内给药来拮抗老化可能效率低下。因此,这些抗老化策略应用到临床仍有很大难度。戒烟、维持合适体重、控制血糖等可通过降低椎间盘内氧化应激来缓解细胞老化^[10,12],这些旨在避免或弱化老化加速因素的教育指导可能对 IDD 患者更有意义。

5 展望

为深入认识细胞老化的病因与病理生理功能,一些敲除 p53^[38]、p21^[39]等老化信号的模型鼠为探索 NPCs 老化的形成与治疗提供了便利。此外,大量全基因组关联研究显示 CDKN2A-CDKN2B 基因多态性与阿尔茨海默病、2 型糖尿病、动脉粥样硬化等老化相关性疾病紧密相关^[40],这种基因多态性是否与 IDD 的发生发展存在关联有待进一步研究。近年来,发育性老化的信号与功能备受关注^[41],细胞老化是否参与调控脊索形成髓核组织以及轴旁中胚层发育成纤维环组织与软骨终板的过程^[42],值得探讨。

6 参考文献

- Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content [J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(1): 44-56.
- Roberts S, Evans EH, Kletsas D, et al. Senescence in human intervertebral discs[J]. Eur Spine, 2006, 15(Suppl 3): 312-316.
- Potier E, Ito K. Can notochordal cells promote bone marrow stromal cell potential for nucleus pulposus enrichment? a simplified in vitro system[J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(23-24): 3241-3251.
- Kim KW, Chung HN, Ha KY, et al. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs[J]. Spine J, 2009, 9(8): 658-666.
- Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(5): 961-976.

- Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(3): R45.
- Fujita N, Chiba K, Shapiro IM, et al. HIF-1 α and HIF-2 α degradation is differentially regulated in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(2): 401-412.
- Nasto LA, Robinson AR, Ngo K, et al. Mitochondrial-derived reactive oxygen species (ROS) play a causal role in aging-related intervertebral disc degeneration[J]. J Orthop Res, 2013, 31(7): 1150-1157.
- Johnson WE, Stephan S, Roberts S. The influence of serum, glucose and oxygen on intervertebral disc cell growth in vitro: implications for degenerative disc disease [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(2): R46.
- Park JS, Park JB, Park IJ, et al. Accelerated premature stress-induced senescence of young annulus fibrosus cells of rats by high glucose-induced oxidative stress[J]. Int Orthop, 2014, 38(6): 1311-1320.
- Masuda K, Oegema TR Jr, An HS. Growth factors and treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2004, 29(23): 2757-2769.
- Vergroesen PP, Kingma I, Emanuel KS, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(7): 1057-1070.
- Chan SC, Walser J, Kappeli P, et al. Region specific response of intervertebral disc cells to complex dynamic loading: an organ culture study using a dynamic torsion-compression bioreactor[J]. PloS One, 2013, 8(8): e72489.
- Maclean JJ, Lee CR, Alini M, et al. Anabolic and catabolic mRNA levels of the intervertebral disc vary with the magnitude and frequency of in vivo dynamic compression [J]. J Orthop Res, 2004, 22(6): 1193-1200.
- Walter BA, Korecki CL, Purmessur D, et al. Complex loading affects intervertebral disc mechanics and biology [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(8): 1011-1018.
- Aghan JP, McGill SM. Intervertebral disc herniation: studies on a porcine model exposed to highly repetitive flexion/extension motion with compressive force [J]. Clin Biomech (Bristol, Avon), 2001, 16(1): 28-37.
- Xing QJ, Liang QQ, Bian Q, et al. Leg amputation accelerates senescence of rat lumbar intervertebral discs[J]. Spine, 2010, 35(23): E1253-1261.
- Veres SP, Robertson PA, Broom ND. The influence of torsion on disc herniation when combined with flexion[J]. Eur Spine J, 2010, 19(9): 1468-1478.
- Gawri R, Rosenzweig DH, Krock E, et al. High mechanical strain of primary intervertebral disc cells promotes secretion of inflammatory factors associated with disc degeneration and pain[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(1): R21.

20. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. The notochordal cell in the nucleus pulposus: a review in the context of tissue engineering[J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(4): 667-677.
21. Nasto LA, Wang D, Rnson AR, et al. Genotoxic stress accelerates age-associated degenerative changes in intervertebral discs[J]. *Mech Ageing Dev*, 2013, 134(1-2): 35-42.
22. Tsai TT, Danielson KG, Guttapalli A, et al. TonEBP/OREBP is a regulator of nucleus pulposus cell function and survival in the intervertebral disc[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(35): 25416-25424.
23. Hiyama A, Gajghate S, Sakai D, et al. Activation of TonEBP by calcium controls β 1, 3-glucuronosyltransferase-I expression, a key regulator of glycosaminoglycan synthesis in cells of the intervertebral disc[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(15): 9824-9834.
24. Gajghate S, Hiyama A, Shah M, et al. Osmolarity and intracellular calcium regulate aquaporin2 expression through TonEBP in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(6): 992-1001.
25. Johnson ZI, Shapiro IM, Risbud MV. Extracellular osmolarity regulates matrix homeostasis in the intervertebral disc and articular cartilage: evolving role of TonEBP[J]. *Matrix Biol*, 2014, 40: 10-16.
26. Hiyama A, Yokoyama K, Nukaga T, et al. A complex interaction between Wnt signaling and TNF- α in nucleus pulposus cells [J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(6): R189.
27. Gu Z, Tan W, Feng G, et al. Wnt/ β -catenin signaling mediates the senescence of bone marrow-mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients through the p53/p21 pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 387(1-2): 27-37.
28. Dahia CL, Mahoney EJ, Durrani AA, et al. Intercellular signaling pathways active during intervertebral disc growth, differentiation, and aging[J]. *Spine*, 2009, 34(5): 456-462.
29. Smolders LA, Meij BP, Onis D, et al. Gene expression profiling of early intervertebral disc degeneration reveals a down-regulation of canonical Wnt signaling and caveolin-1 expression: implications for development of regenerative strategies [J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(1): R23.
30. Holguin N, Aguilar R, Harland RA, et al. The aging mouse partially models the aging human spine: lumbar and coccygeal disc height, composition, mechanical properties, and Wnt signaling in young and old mice [J]. *J Appl Physiol*, 1985, 2014, 116(12): 1551-1560.
31. Hiyama A, Sakai D, Risbud MV, et al. Enhancement of intervertebral disc cell senescence by WNT/ β -catenin signaling -induced matrix metalloproteinase expression [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(10): 3036-3047.
32. Hiyama A, Sakai D, Tanaka M, et al. The relationship between the Wnt/ β -catenin and TGF- β /BMP signals in the intervertebral disc cell[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(5): 1139-1148.
33. Hiyama A, Arai F, Sakai D, et al. The effects of oxygen tension and antiaging factor Klotho on Wnt signaling in nucleus pulposus cells[J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(3): R105.
34. Phillips KL, Chiverton N, Michael AL, et al. The cytokine and chemokine expression profile of nucleus pulposus cells: implications for degeneration and regeneration of the intervertebral disc[J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(6): R213.
35. Sage J, Miller AL, Perez-Mancera PA, et al. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry[J]. *Nature*, 2003, 424(6945): 223-228.
36. Vadala G, De Strobel F, Bernardini M, et al. The transpedicular approach for the study of intervertebral disc regeneration strategies: in vivo characterization[J]. *Eur Spine J*, 2013, 22(Suppl 6): S972-978.
37. Illien-Junger S, Grosjean F, Laudier DM, et al. Combined anti-inflammatory and anti-AGE drug treatments have a protective effect on intervertebral discs in mice with diabetes [J]. *PloS One*, 2013, 8(5): e64302.
38. Mercer J, Bennett M. The role of p53 in atherosclerosis[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(17): 1907-1909.
39. Khanna AK. Enhanced susceptibility of cyclin kinase inhibitor p21 knockout mice to high fat diet induced atherosclerosis[J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16: 66.
40. Jeck WR, Siebold AP, Sharpless NE. Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases [J]. *Aging Cell*, 2012, 11(5): 727-731.
41. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning[J]. *Cell*, 2013, 155(5): 1119-1130.
42. Chan WC, Au TY, Tam V, et al. Coming together is a beginning: the making of an intervertebral disc[J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2014, 102(1): 83-100.

(收稿日期:2015-10-27 末次修回日期:2016-02-05)

(本文编辑 卢庆霞)