

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.08.001

• 基础研究 •

NF- κ B 信号通路参与高糖在椎间盘退行性变中影响及其作用的研究 *朱文峰 王云浩 于召龙 李秋园 田纪伟^Δ

(上海交通大学附属第一人民医院骨科 上海 200080)

摘要 目的: 近来研究发现,椎间盘退变与代谢性疾病,尤其是与糖尿病具有明显的相关性,但具体机制尚未有深入研究。本实验拟探究高糖微环境诱导椎间盘退行性变及其对 NF- κ B 信号通路的影响,为进一步揭示高糖诱导椎间盘髓核细胞退变的机制提供研究基础,为延缓、阻止糖尿病椎间盘退变和治疗糖尿病相关腰痛疾病带来新的策略和方法。**方法:** 1、高糖微环境与 IVDD 的关系:使用 5.5 mmol/L、15 mmol/L、30 mmol/L、100 mmol/L 不同浓度葡萄糖培养基培养髓核细胞,RT-PCR 检测髓核细胞 MMP-3、MMP-13、Aggrecan、CollagenII 的表达;2、NF- κ B 信号通路参与高糖微环境调控 IVDD 进展:Bay11-7082 抑制 NF- κ B 信号通路激活,再使用 RT-PCR、Western Blot 检测髓核细胞 MMP-3、MMP-13、Aggrecan、CollagenII 和 NF- κ B 的表达。**结果:** RT-PCR 检测显示,在不同葡萄糖浓度下,Aggrecan、CollagenII 随浓度升高表达减少,MMP-3、MMP-13 随浓度升高表达增加。RT-PCR、Western Blot 检测显示,使用 Bay11-7082 可使高糖组中 Aggrecan、CollagenII 表达增加,MMP-3、MMP-13 表达减少。**结论:** 高糖微环境诱导椎间盘退行性变发病,且 NF- κ B 信号通路参与高糖微环境诱导椎间盘退行性变发病。

关键词: 椎间盘退行性变;高糖微环境;NF- κ B 信号通路

中图分类号: R-33; R681.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)08-1401-05

The Study of High Glucose Promoting Intervertebral Disc Degeneration through NF-kappa B Signaling Pathway*

ZHU Wen-feng, WANG Yun-hao, YU Zhao-long, LI Qiu-yuan, TIAN Ji-wei^Δ

(Department of Orthopedics, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: Recently, some researches show that intervertebral disc degeneration is significantly related to metabolic diseases, especially diabetes, but the specific mechanism has not been further studied. This study aims to the role of high glucose microenvironment and NF-kappa B signaling pathway in IVDD and to explore the mechanism of high glucose-induced degeneration of nucleus pulposus cells through NF-kappa B signaling pathway. It may provide a new strategy and method for preventing and treating diabetic-related low back pain. **Methods:** Nucleus pulposus cells was cultured in 5.5 mmol/L, 15 mmol/L, 30 mmol/L and 100 mmol/L glucose medium and the expression of MMP-3, MMP-13, Aggrecan and CollagenII in nucleus pulposus cells was detected by RT-PCR. Bay11-7082 was used to inhibit the activation of NF-kappa B signaling pathway and the expression of MMP-3, MMP-13, Aggrecan, CollagenII and NF-kappa B in nucleus pulposus cells was detected by RT-PCR and Western Blot. **Results:** RT-PCR showed that at different concentration, the expression of Aggrecan and CollagenII decreased with the increasing of concentration, while the expression of MMP-3 and MMP-13 increased with the increasing of concentration. RT-PCR and Western Blot showed that after using Bay11-7082, the expression of Aggrecan and CollagenII increased and the expression of MMP-3 and MMP-13 decreased in the high glucose group. **Conclusions:** High glucose microenvironment is correlated with intervertebral disc degeneration. High glucose microenvironment induces intervertebral disc degeneration by mediating NF-kappa B signaling pathway.

Key words: Intervertebral disc degeneration; High glucose microenvironment; NF- κ B signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R681.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)08-1401-05

前言

腰痛是当代社会中的常见疾患,而椎间盘退变(Intervertebral Disc Degeneration, IVDD)是该症状的最主要的原因^[1]。70%至

85%的人曾患腰痛,且首次发作后再次发作的概率很高^[2]。椎间盘退变是导致腰痛最主要的原因之一,其基本病理特征是髓核(Nucleus pulposus, NP)细胞的衰老与凋亡、细胞外基质的降解、椎间盘进行性的纤维化^[3]。椎间盘退变主要表现为椎间盘细

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81572169)

作者简介:朱文峰(1982-),男,硕士,研究方向:椎间盘退行性变, E-mail: pansophic@163.com

^Δ 通讯作者:田纪伟(1965-),男,博士生导师,主任医师,研究方向:椎间盘退行性变, E-mail: tjw609@163.com

(收稿日期:2019-09-28 接受日期:2019-10-23)

胞外基质聚蛋白聚糖和水分含量减少及胶原蛋白成分变化(I型胶原增多,II型胶原减少)^[4]。目前学者普遍认为椎间盘退变中可能有多种因素共同参与作用^[5]。椎间盘退变的因素有很多,包括年龄、椎间盘营养代谢状况、生物力学因素、椎间盘退变相关细胞因子的作用、降解酶对椎间盘的破坏、椎间盘细胞过度凋亡等等^[6-8]。

近有学者研究发现,椎间盘退变与代谢性疾病,尤其是糖尿病具有较强相关性^[9]。Jhawar等在前瞻性研究中发现,在与腰椎间盘突出症相关的危险因素中,糖尿病的相对风险系数为1.52,高于吸烟、高血压、高血脂等危险因素^[10]。Liu等研究发现,糖尿病病程大于十年是导致椎间盘突出症的高危因素。Robinson等研究发现糖尿病患者的椎间盘中聚蛋白聚糖的含量降低,故其椎间盘突出症的发生率高于非糖尿病患者^[11]。虽然较多报道糖尿病与椎间盘退变有较强相关性,但其发病机制,尤其是高糖微环境诱导椎间盘退变机制仍未有深入研究。

核转录因子 κ B(Nuclear factor-kappa B,NF- κ B)是一组结构相似的转录蛋白复合物,退变椎间盘组织中转录因子NF- κ B的表达水平显著高于正常椎间盘组织,研究表明NF- κ B信号通路的激活及移位到细胞核发挥基因转录调控作用,会加速椎间盘退变的进程^[12,13]。相反,使用NF- κ B信号通路阻滞剂抑制NF- κ B信号通路的活化,则可以减缓椎间盘的退变^[14]。NF- κ B信号通路是否参与高糖微环境诱导髓核细胞退变,目前还未见相关研究。

本实验拟探究高糖微环境诱导椎间盘退行性变及NF- κ B信号通路是否参与了高糖诱导椎间盘退变,为进一步揭示高糖诱导椎间盘髓核细胞退变的机制提供实验基础,也或为延缓、阻止糖尿病椎间盘退变和治疗糖尿病相关腰痛疾病带来新的策略和方法。

1 材料方法

1.1 研究对象

本文章使用椎间盘组织均由上海交通大学附属第一人民医院脊柱外科提供,取自2019年1月至3月间行手术治疗的腰椎间盘突出患者。椎间盘标本13例,其中男性6例,女性7例,年龄平均(57.36 $\pm$ 6.73)岁。本研究均获患者本人及家属知情同意,并通过了上海交通大学附属第一人民医院伦理委员会批准,所有标本获取均在对患者及家属予以详尽的告知,签署知情同意后在进行。

1.2 实验材料

D-(+)-葡萄糖(BBI公司)、DMEM-F12培养基(Gibco公司)、细胞培养用胎牛血清(Sigma公司)、0.25%胰蛋白酶(Gibco公司)、青霉素链霉素双抗(Gibco公司)、TRIzol RNA分离试剂(Thermo公司)、RNA引物(上海生工)、TB Green™ Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒(TaKaRa公司)、GAPDH兔抗人抗体(CST公司)、MMP3兔抗人抗体(CST公司)、MMP13兔抗人抗体(CST公司)、CollagenII兔抗人抗体(Abcam公司)、Aggrecan兔抗人抗体(Abcam公司)、NF- κ B P65兔抗人抗体(Abcam公司)、ECL发光试剂(Pierce Biotechnology公司)。

1.3 髓核原代细胞提取与培养

将收集的椎间盘组织用PBS洗涤3遍清除杂质,并通过

机械性分离将纤维环组织剔除,分离出髓核组织,并将其剪成约0.5 mm $\times$ 0.5 mm $\times$ 0.5 mm小块。采用0.25%胰蛋白酶37℃恒温震荡水浴箱消化30 min,加入等体积含10%血清的DMEM-F12培养基终止消化,离心后弃上清液。加入0.2%的II型胶原酶,37℃恒温震荡水浴箱消化3 h至组织块消失。加入等体积含10%FBS的DMEM-F12培养基终止消化,离心后弃上清液。加入含10%FBS的DMEM-F12培养基进行髓核细胞培养,当髓核细胞达到70%~80%汇合后,使用胰蛋白酶消化,1:2传代。取第2、3代髓核细胞进行实验。

1.4 高糖微环境诱导髓核细胞退变

配置葡萄糖浓度为5.5 mmol/L、15 mmol/L、30 mmol/L、100 mmol/L的DMEM-F12培养基。将细胞接种于6孔板,待长至70%~80%时,分别更换浓度为5.5 mmol/L、15 mmol/L、30 mmol/L、100 mmol/L不同浓度葡萄糖DMEM-F12培养基。其中,5.5 mmol为正常血糖浓度,故作为对照组,其余组均为高糖组。培养48 h后,通过RT-PCR检测Aggrecan、CollagenII、MMP3、MMP13表达。

1.5 Bay11-7082抑制NF- κ B信号通路

将细胞接种于6孔板,待长至70%~80%时,共分三组。其中,第3组使用NF- κ B通路抑制剂Bay11-7082预处理1 h。1 h后,1-3组分别更换浓度为5.5 mmol/L、30 mmol/L、30 mmol/L不同浓度葡萄糖DMEM-F12培养基。以第1组,即5.5 mmol/L葡萄糖培养基组为对照组;第2组,即仅用30 mmol/L葡萄糖培养基培养,为高糖组;第3组,即使用Bay11-7082预处理组,为NF- κ B信号通路抑制组。培养48 h后,通过RT-PCR检测Aggrecan、CollagenII、MMP3、MMP13。WB检测MMP3、MMP13、NF- κ B表达。

1.6 RT-PCR实验

使用TRIzol法提取髓核细胞总RNA,通过逆转录试剂盒合成cDNA,并将合成的cDNA模板进行PCR扩增反应。Aggrecan上游引物:5-CTCCAGTCTCATTCTCAACCTC-3,Aggrecan下游引物:5-CAAGAACAGCATTGCCTATCTG-3;CollagenII上游引物:5-GATAACAGTCTTGCCCCACTTA-3,CollagenII下游引物:5-GGTGTGGA-GTTCCTGATG-TTGGTC-3;MMP3上游引物:5-AGCCTGGAGAATGTGAGTGAGGAGTC-3,MMP3下游引物:5-CACTTTATGCTTCCTGATGACG-3;MMP13上游引物:5-TCTGGCGTTTTTGGAT-GTTTAG-3,MMP13下游引物:5-TCTGGCGTTTTTGGATGTTTAG-3。按照95℃预变性30 s、95℃变性5 s以及60℃退火30 s为1个循环周期,总共进行40个循环。于每个循环周期时进行荧光检测。使用ABI StepOne软件进行数据收集,并计算各组Aggrecan、CollagenII、MMP3、MMP13表达水平。

1.7 WB实验

使用RIPA裂解液法裂解细胞,超声后取上清获得细胞蛋白。于100℃高温下进行蛋白变性。配制好分离胶与浓缩胶后,取变性后的蛋白依次上样。当样品在浓缩胶中时,维持电泳恒压为60 V,时间约为30-40 min。待样品进入分离胶后,改变并维持电泳恒压120 V,在约1 h后,待样品煮开,接近凝胶底部时结束电泳。电泳后,使用半干法转膜,转膜时调节电压10 V,

90 min。快速封闭液室温封闭 15 min 后,一抗 4 ℃ 条件下温育,过夜。16 h 后,TBST 洗膜 3 次,二抗于摇床上,室温条件下放置 1 h。TBST 洗膜 3 次后 ECL 显影。

1.8 统计学分析

实验数据通过 SPSS19.0 软件进行统计学分析,用均数±标准差表示计量资料,采用单因素方差分析进行多组间比较, $P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养髓核细胞形态

原代髓核细胞提取培养后,可于倒置显微镜下见大小不等、形态略不规则的悬浮细胞。在提取 4~6 天后,倒置显微镜下可见少量细胞开始贴壁。贴壁细胞形态为团簇状生长、类圆形的细胞。提取 1~2 周左右,可见髓核细胞呈现三角形、短梭形、多角形改变。髓核细胞胞核较前也略变大,核仁更加明显,其伪足探出,呈片状,互相连接。

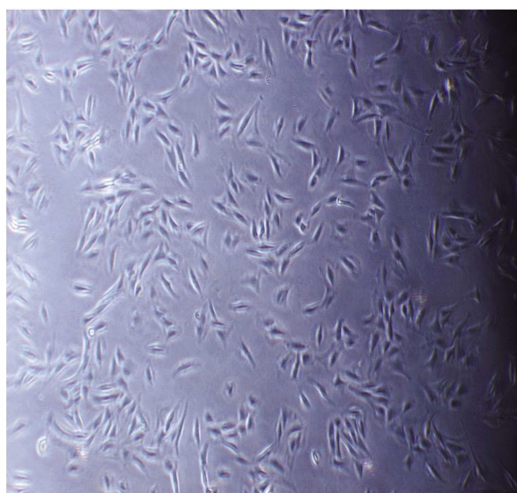


图 1 培养的原代髓核细胞

Fig.1 Cultured primary nucleus pulposus cells

2.2 RT-PCR 检测高糖微环境诱导髓核细胞退变中 AggreCan、CollagenII、MMP3、MMP13 表达

采用 RT-PCR 分别检测不同浓度葡萄糖培养后髓核细胞中 AggreCan、CollagenII、MMP3、MMP13 表达,结果见图 2。

AggreCan、CollagenII 表达量随葡萄糖浓度升高而降低,且差异有统计学意义($P<0.05$),说明高糖微环境抑制髓核细胞中 AggreCan、CollagenII 的表达。MMP3、MMP13 表达量随葡萄糖浓度升高而升高,且差异有统计学意义($P<0.05$),说明高糖微环境促进髓核细胞中 MMP3、MMP13 的表达。

根据以上结果可以得出,随葡萄糖浓度升高,AggreCan、CollagenII 表达降低,MMP3、MMP13 表达升高。高糖微环境增加金属蛋白酶表达,促进细胞外基质分解,进而诱导髓核细胞退变。

2.3 RT-PCR 检测 Bay11-7082 抑制 NF- κ B 信号通路后髓核细胞中 AggreCan、CollagenII、MMP3、MMP13 表达

采用 RT-PCR 分别检测 Bay11-7082 抑制 NF- κ B 信号通路后髓核细胞中 AggreCan、CollagenII、MMP3、MMP13 表达,结果见图 3。

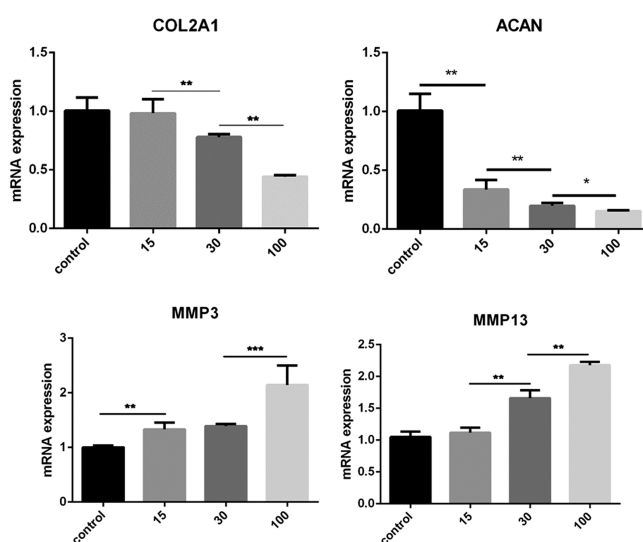


图 2 PCR 检测高糖微环境下 COL2A1、AggreCan、MMP-3、MMP-13 表达

Fig.2 PCR analysis expression of COL2A1, AggreCan, MMP-3, MMP-13 in high glucose

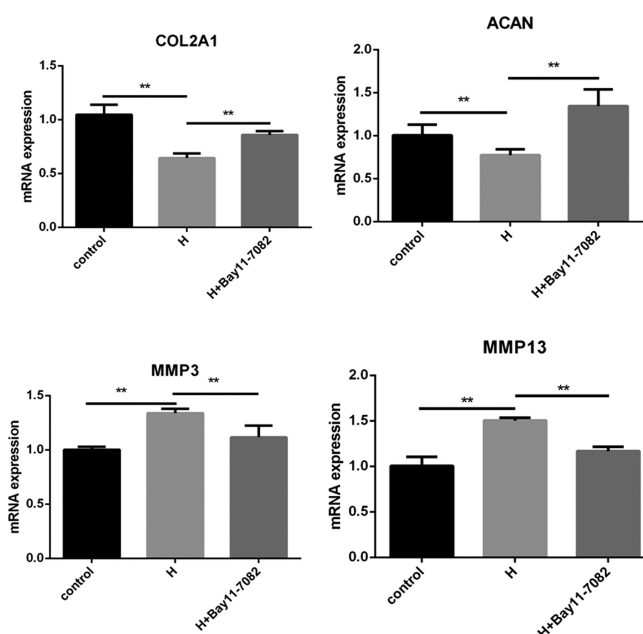


图 3 PCR 检测 bay11-7082 培养髓核细胞后 COL2A1、ACAN、MMP-3、MMP-13 表达

Fig.3 PCR analysis expression of COL2A1, ACAN, MMP-3, MMP-13 after using bay11-7082

AggreCan、CollagenII 表达量在高糖组较对照组降低,且差异有统计学意义($P<0.05$),证明高糖微环境抑制髓核细胞中 AggreCan、CollagenII 的表达。在 Bay11-7082 组较高糖组升高,且差异有统计学意义($P<0.05$),证明抑制 NF- κ B 信号通路,可以缓解高糖微环境所诱导的 AggreCan、CollagenII 表达减少,进而抑制髓核细胞退变。

MMP3、MMP13 表达量在高糖组较对照组升高,且差异有统计学意义($P<0.05$),证明高糖微环境促进髓核细胞中 MMP3、MMP13 的表达。在 Bay11-7082 组较高糖组降低,且差异有统计学意义($P<0.05$),证明抑制 NF- κ B 信号通路,可以减少高糖微环境所诱导的 MMP3、MMP13 表达升高,进而抑制髓

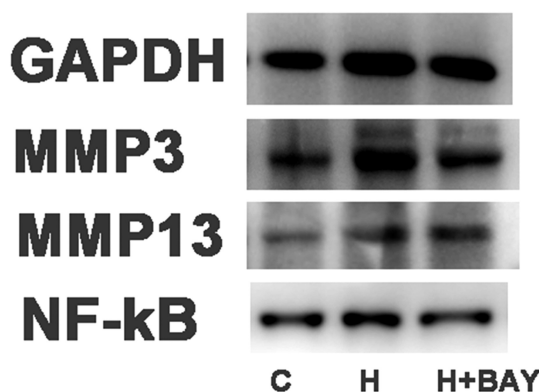


图4 Western Blot 检测 Bay11-7082 培养髓核细胞 MMP-3、MMP-13、NF-κB 表达

Fig.4 Western Blot analysis expression of MMP-3, MMP-13, NF-κB after using bay11-7082

核细胞退变。

根据以上结果可以得出,抑制 NF-κB 信号通路后,在高糖微环境下髓核细胞内 Aggrecan 表达增加,MMP3、MMP13 表达减少,说明 NF-κB 信号通路参与高糖微环境诱导髓核细胞退变,且通过抑制 NF-κB 信号通路可以缓解高糖微环境诱导的髓核细胞退变。

2.4 Western Blot 检测 MMP3、MMP13、NF-κB 的表达

采用 Western Blot 分别检测髓核细胞 MMP3、MMP13、NF-κB P65 的表达,结果见图4。高糖组相比对照组,MMP3、MMP13 表达增加,证明高糖微环境促进髓核细胞外基质分解,促进 IVDD 的发生发展。NF-κB 组相比高糖组,MMP3、MMP13 表达减少,证明抑制 NF-κB 信号通路组可以缓解高糖微环境所诱导的 MMP3、MMP13 表达,进而缓解 IVDD。

3 讨论

IVDD 发病机制纷繁多样,加深对其机制研究,尤其是高糖诱导 IVDD 机制研究是当今脊柱外科的迫切需求,也对 IVDD 预防与治疗提供重要的依据。本实验研究,发现高糖微环境可诱导髓核细胞内 MMP-3、MMP-13 表达增加,且随着葡萄糖浓度的增加,MMP-3、MMP-13 表达量相应增加。高糖微环境通过上调 MMPs 表达,促进细胞外基质降解,最终导致椎间盘退变的发生与发展。这些表明,高糖微环境可诱导 IVDD 发生发展,是 IVDD 发病的诱因之一,可以为 IVDD 的治疗提供新的靶点与医疗方案。

高糖微环境引起的代谢紊乱导致细胞外基质(ECM)糖蛋白之间合成及其降解的不平衡^[15,16]。ECM 主要由胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白和蛋白多糖组成^[17]。椎间盘退变通常被认为是细胞外基质(ECM)分解代谢增加的结果。椎间盘退变与 ECM 大分子的蛋白水解降解有关,导致大的结构改变。这些变化包括纤维环结构破坏,髓核的脱水和纤维化,软骨终板的钙化^[18]。髓核蛋白多糖基质的丢失和非聚集性蛋白多糖分解产物浓度的增加降低了 ECM 的吸水性能,导致水分含量降低。髓核细胞的这些变化导致纤维环异常,导致 ECM 进一步降解,最终导致椎间盘结构失效^[19]。其中基质金属蛋白酶(MMPs)在 ECM 的降解中发挥重要作用,被认为是 IVDD 的主要分解代谢酶^[20]。

最近研究表明,基质金属蛋白酶通常以非活性形式分泌,需要激活,其中涉及许多调节激活蛋白,其中许多尚不清楚。这种多层次的调节确保了各种 MMPs 在生长、组织修复和重塑中的适当的时间和空间酶活性。一般认为 MMPs 表达和活性的失调是导致 IVDD 细胞外基质分解代谢增加的原因^[21]。Liu 研究发现,17β-雌二醇通过下调 MMP-3、MMP13,减少 MMPs 降解 ECM 的作用,促进二型胶原增加,进而抑制大鼠椎间盘退变进一步发展^[22]。Ye 则探讨,沉默 SHOX2 基因,增加 MMP-3 表达,MMPs 降解细胞外基质作用增加,CollagenII、Aggrecan 降解增加,髓核细胞增殖减少、自噬增加,导致椎间盘退变^[23]。

有研究表明,高糖微环境可以介导 NF-κB 信号通路的激活^[24,25]。Panahi 的实验结果显示,在 HepG2 细胞中,高糖微环境激活 NF-κB、MAPK 信号通路,诱导炎症反应^[26]。Stan 发现,高糖微环境同样激活 NF-κB、MAPK 信号通路,增加 u937 细胞系抵抗素基因表达和蛋白质生成^[27]。同时一些研究表明,在 IVDD 发病过程中,NF-κB p65 的表达显著增强,NF-κB 信号通路激活^[28]。BAY 11-7082 是一种 NF-κB 信号通路抑制剂,具有抑制 TNFα 诱导的 IκBα 磷酸化的作用,可以完全性并且特异性地解除 NF-κB DNA 结合^[29]。在大鼠椎间盘退变模型中,Zhang 使用 BAY 11-7082 抑制 NF-κB 与核苷酸结合结构域样受体蛋白 3 的激活,缓解椎间盘突出的神经根性疼痛^[30]。Zhang 研究发现,使用 NF-κB 特异性抑制剂 BAY 11-7082 显著抑制 IL-1β 诱导的 NF-κB 活化^[31]。因此,通过使用 BAY 11-7082,可抑制高糖微环境介导 NF-κB 信号通路的激活,进而缓解 IVDD。

本研究发现髓核细胞 Aggrecan、CollagenII 在高糖组中表达显著低于其在对照组中表达,而其在 NF-κB 通路抑制组中表达又显著高于其在高糖组中的表达;MMP-3、MMP-13 在高糖组中表达显著高于其在对照组中表达,而其在 NF-κB 通路抑制组中表达又显著低于其在高糖组中的表达。NF-κB 抑制逆转了高糖微环境诱导的 MMP-3、MMP-13、Aggrecan 和 CollagenII 表达的变化。这些发现表明 NF-κB 信号通路是 IVDD 发生的重要信号通路,是高糖微环境诱导 IVDD 发生的关键介质,是缓解椎间盘退行性疾病的治疗靶点。

综上所述,高浓度葡萄糖可抑制髓核细胞的生长,并通过抑制基质合成及增加基质降解两条途径来减少髓核细胞胞外基质含量,从而导致椎间盘的退变;这一变化可能与 NF-κB 信号通路有密切关系。未来可以针对这一方向展开进一步研究,从而明确高糖微环境对髓核细胞基质代谢调控的具体作用机制,也可能寻找到治疗糖尿病相关椎间盘退变的关键治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Urits I, Burshtein 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] Ng S K, Cicuttini F M, Davis S R, et al. Poor general health and lower levels of vitality are associated with persistent, high-intensity low back pain and disability in community-based women: A prospective cohort study [J]. Maturitas, 2018, 113: 7-12
- [3] Wallach C J, Sobajima S, Watanabe Y, et al. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs [J]. Spine, 2003, 28(20): 2200-2206

2331-2337

- [4] Zhu Q, Gao X, Levene H B, et al. Influences of Nutrition Supply and Pathways on the Degenerative Patterns in Human Intervertebral Disc [J]. *Spine*, 2016, 41(7): 568-576
- [5] Kroeber M W, Unglaub F, Wang H, et al. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration[J]. *Spine*, 2002, 27(23): 2684-2690
- [6] Akyol S, Eraslan B S, Etyemez H, et al. Catabolic cytokine expressions in patients with degenerative disc disease [J]. *Turkish neurosurgery*, 2010, 20(4): 492-499
- [7] Hanaei S, Abdollahzade S, Khoshnevisan A, et al. Genetic aspects of intervertebral disc degeneration[J]. *Reviews in the neurosciences*, 2015, 26(5): 581-606
- [8] Ito K, Creemers L. Mechanisms of intervertebral disk degeneration/injury and pain: a review[J]. *Global spine journal*, 2013, 3(3): 145-152
- [9] Teraguchi M, Yoshimura N, Hashizume H, et al. Metabolic Syndrome Components Are Associated with Intervertebral Disc Degeneration: The Wakayama Spine Study[J]. *PloS one*, 2016, 11(2): e0147565
- [10] Jhavar B S, Fuchs C S, Colditz G A, et al. Cardiovascular risk factors for physician-diagnosed lumbar disc herniation[J]. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*, 2006, 6(6): 684-691
- [11] Robinson D, Mirovsky Y, Halperin N, et al. Changes in proteoglycans of intervertebral disc in diabetic patients. A possible cause of increased back pain[J]. *Spine*, 1998, 23(8): 849-855
- [12] Sun Z, Yin Z, Liu C, et al. The Changes in the Expression of NF- κ B in a Degenerative Human Intervertebral Disc model [J]. *Cell biochemistry and biophysics*, 2015, 72(1): 115-122
- [13] Ma T, Guo C J, Zhao X, et al. The effect of curcumin on NF-kappaB expression in rat with lumbar intervertebral disc degeneration [J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2015, 19(7): 1305-1314
- [14] Nasto L A, Seo H Y, Robinson A R, et al. ISSLS prize winner: inhibition of NF-kappaB activity ameliorates age-associated disc degeneration in a mouse model of accelerated aging [J]. *Spine*, 2012, 37(21): 1819-1825
- [15] Atkinson J M, Pullen N, Johnson T S. An inhibitor of thrombin activated fibrinolysis inhibitor (TAFI) can reduce extracellular matrix accumulation in an in vitro model of glucose induced ECM expansion [J]. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 2013, 32(5): 277-287
- [16] Chen B, Li Y, Liu Y, et al. circLRP6 regulates high glucose-induced proliferation, oxidative stress, ECM accumulation, and inflammation in mesangial cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 21249-21259
- [17] Padhi A, Nain A S. ECM in Differentiation: A Review of Matrix Structure, Composition and Mechanical Properties [J]. *Annals of biomedical engineering*, 2019
- [18] 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
- [19] Vo N V, Hartman R A, Patil P R, et al. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs [J]. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 2016, 34(8): 1289-1306
- [20] Wang W J, Yu X H, Wang C, et al. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration[J]. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2015, 448: 238-246
- [21] Zhang W L, Chen Y F, Meng H Z, et al. Role of miR-155 in the regulation of MMP-16 expression in intervertebral disc degeneration [J]. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 2017, 35(6): 1323-1334
- [22] Liu S, Yang S D, Huo X W, et al. 17beta-Estradiol inhibits intervertebral disc degeneration by down-regulating MMP-3 and MMP-13 and up-regulating type II collagen in a rat model[J]. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 2018, 46(sup2): 182-191
- [23] Ye F, Wang H, Zheng Z, et al. Role of SHOX2 in the development of intervertebral disc degeneration [J]. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 2017, 35(5): 1047-1057
- [24] Tsai K H, Wang W J, Lin C W, et al. NADPH oxidase-derived superoxide anion-induced apoptosis is mediated via the JNK-dependent activation of NF-kappaB in cardiomyocytes exposed to high glucose[J]. *Journal of cellular physiology*, 2012, 227(4): 1347-1357
- [25] Kang D Y, Sp N, Do Park K, et al. Silibinin inhibits in vitro ketosis by regulating HMGCS2 and NF-kB: elucidation of signaling molecule relationship under ketotic conditions[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2019, 55(5): 368-375
- [26] Panahi G, Pasalar P, Zare M, et al. High glucose induces inflammatory responses in HepG2 cells via the oxidative stress-mediated activation of NF-kappaB, and MAPK pathways in HepG2 cells[J]. *The Journal of Metabolic Diseases*, 2018, 124(5): 468-474
- [27] Stan D, Calin M, Manduteanu I, et al. High glucose induces enhanced expression of resistin in human U937 monocyte-like cell line by MAPK- and NF-kB-dependent mechanisms; the modulating effect of insulin[J]. *Cell and tissue research*, 2011, 343(2): 379-387
- [28] Basu R, Whitley S K, Bhaumik S, et al. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance [J]. *Nature immunology*, 2015, 16(3): 286-295
- [29] Melisi D, Chiao P J. NF-kappa B as a target for cancer therapy[J]. *Expert opinion on therapeutic targets*, 2007, 11(2): 133-144
- [30] Zhang A, Wang K, Ding L, et al. Bay11-7082 attenuates neuropathic pain via inhibition of nuclear factor-kappa B and nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 inflammasome activation in dorsal root ganglions in a rat model of lumbar disc herniation [J]. *Journal of pain research*, 2017, 10: 375-382
- [31] Zhang H, Huang Y, Wang S, et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to bone erosion in collagen-induced arthritis by differentiating to osteoclasts [J]. *Journal of autoimmunity*, 2015, 65: 82-89