

补肾活血方促进脂肪间充质干细胞类髓核分化的作用机制

郭泽华^{1,2}, 李兆勇², 陈龙², 段嘉豪^{1,2}, 蒋浩波^{1,2}, 陈光学^{1,2}, 苏友贤^{1,2}, 刘恩旭^{1,2}, 杨少锋²

https://doi.org/10.12307/2024.188

投稿日期: 2023-07-10

采用日期: 2023-08-09

修回日期: 2023-09-04

在线日期: 2023-09-20

中图分类号:

R459.9; R318; R274.3

文章编号:

2095-4344(2024)25-03974-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 补肾活血方促进脂肪间充质干细胞存活、增殖和类髓核分化

从腰椎间盘突出症患者的退变分级为Ⅲ级的髓核组织、皮下脂肪组织标本中分别提取人退变髓核细胞、人脂肪间充质干细胞, 构建共培养体系

叔丁基过氧化氢诱导氧化损伤模型

补肾活血方含药血清或无药血清干预

对照组

模型组

无药血清组

含药血清组

★细胞形态观察, 甲苯胺蓝染色, 细胞外基质基因及蛋白表达;

★细胞毒性、活性氧水平、细胞衰老情况。

文题释义:

间充质干细胞:在一定条件下能够分化为椎间盘细胞, 同时分泌多种营养因子, 促进组织稳态以及免疫调节, 这些特性对于促进椎间盘组织修复具有重要意义。

细胞共培养:采用Transwell小室将2种细胞进行非接触式共培养, 小室允许细胞培养液及细胞因子在上、下两层之间进行交换, 并且能够防止大分子物质通过, 可方便观察细胞的生长状态及检测相关蛋白的表达水平。

摘要

背景:干细胞移植是防治椎间盘退变的新思路, 但移植后的干细胞如何顺利存活、增殖、分化, 并恢复髓核细胞功能, 是目前亟需克服的重点和难点。

目的:探讨补肾活血方对脂肪间充质干细胞存活、增殖、类髓核分化的影响。

方法:采用Transwell小室构建人脂肪间充质干细胞和人退变髓核细胞共培养模型。实验分为对照组、模型组、含药血清组、无药血清组, 除对照组外, 其余各组均用50 μmol/L叔丁基过氧化氢干预24 h, 然后含药血清组和无药血清组分别予以含体积分数20%补肾活血方含药血清或无药血清的DMEM低糖完全培养液干预48 h, 取下层脂肪间充质干细胞, 甲苯胺蓝染色法观察蛋白聚糖合成水平, Real-Time PCR法检测Ⅱ型胶原、蛋白聚糖、SOX9的mRNA表达, Western blot法检测SOX9的蛋白表达, 乳酸脱氢酶法检测细胞毒性, 流式细胞术检测细胞活性氧水平, β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况。

结果与结论:①与对照组相比, 模型组坏死脱落细胞比例增加, 甲苯胺蓝染色变浅, Ⅱ型胶原、蛋白聚糖、SOX9 mRNA和SOX9蛋白表达水平下降($P < 0.05$); 与模型组相比, 补肾活血方含药血清可显著减轻细胞损伤并促进Ⅱ型胶原、蛋白聚糖、SOX9 mRNA和SOX9蛋白表达($P < 0.05$), 但无药血清组改善不明显($P > 0.05$); ②与对照组相比, 模型组细胞毒性、活性氧水平、细胞衰老水平显著增加; 与模型组相比, 补肾活血方干预后共培养体系微环境得到明显改善($P < 0.05$), 无药血清对共培养体系微环境改善作用不明显($P > 0.05$); ③结果表明, 补肾活血方可以促进脂肪间充质干细胞存活、增殖、类髓核分化。

关键词:脂肪间充质干细胞; 髓核细胞; 共培养; 椎间盘退变; 补肾活血方; 氧化损伤

Action mechanism of *Bushenhuoxue* decoction on promoting nucleus pulposus-like differentiation of adipose-derived stem cells

Guo Zehua^{1,2}, Li Zhaoyong², Chen Long², Duan Jiahao^{1,2}, Jiang Haobo^{1,2}, Chen Guangxue^{1,2}, Su Youxian^{1,2}, Liu Enxu^{1,2}, Yang Shaofeng²

¹Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China; ²First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Guo Zehua, Master candidate, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China; First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Corresponding author: Yang Shaofeng, PhD, Chief physician, First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

¹湖南中医药大学, 湖南省长沙市 410208; ²湖南中医药大学第一附属医院, 湖南省长沙市 410007

第一作者:郭泽华, 男, 1997年生, 湖南省郴州市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事脊柱与脊髓损伤方面的研究。

通讯作者:杨少锋, 博士, 主任医师, 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南省长沙市 410007

https://orcid.org/0009-0003-8944-6411(郭泽华)

基金资助:国家自然科学基金(82174402), 项目负责人: 杨少锋; 湖南省自然科学基金(2023JJ40504), 项目负责人: 李兆勇; 长沙市自然科学基金(kq2208203), 项目负责人: 李兆勇; 湖南中医药大学校级科研基金与联合基金(2021XJJ041), 项目负责人: 陈龙

引用本文:郭泽华, 李兆勇, 陈龙, 段嘉豪, 蒋浩波, 陈光学, 苏友贤, 刘恩旭, 杨少锋. 补肾活血方促进脂肪间充质干细胞类髓核分化的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(25):3974-3980.



Abstract

BACKGROUND: Stem cell transplantation is a new way to prevent and cure intervertebral disc degeneration. However, whether the transplanted stem cells can survive, proliferate, differentiate, and restore the function of nucleus pulposus cells after transplantation, is the key and difficult point to overcome.

OBJECTIVE: To explore the effects of *Bushenhuoxue* decoction on survival, proliferation, and nucleus pulposus-like differentiation of adipose-derived stem cells.

METHODS: A Transwell chamber was used to construct a co-culture model of human adipose-derived stem cells and human degenerative nucleus pulposus cells. The experiment was divided into control group, model group, drug-containing serum group, and drug-free serum group. Except for the control group, the co-culture system of other groups was treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ tert-butyl hydrogen peroxide for 24 hours. The drug-containing serum group and drug-free serum group were treated with DMEM low-glucose complete culture medium containing drug-containing serum of *Bushenhuoxue* decoction or drug-free serum with 20% volume fraction for 48 hours. The sublayer adipose-derived stem cells were taken. Toluidine blue staining was used to detect proteoglycan synthesis levels. Real-time PCR method was used to detect mRNA expression of type II collagen, proteoglycan and SRY-box transcription factor 9. The protein expression of SOX9 was detected by western blot assay. Lactate dehydrogenase assay was used to detect cytotoxicity. Flow cytometry was used to detect reactive oxygen species, and β -galactosidase staining was used to detect cell senescence.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the control group, the proportion of necrotic cells in the model group increased; toluidine blue staining became lighter, and the expression levels of type II collagen, proteoglycan, SOX9 mRNA and SOX9 protein decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the drug-containing serum of *Bushenhuoxue* decoction could significantly reduce cell injury and promote the expression of type II collagen, proteoglycan, SOX9 mRNA, and SOX9 protein ($P < 0.05$), but the improvement in the drug-free serum group was not significant ($P > 0.05$). (2) Compared with the control group, the contents of cytotoxicity, reactive oxygen species, and cell senescence in the model group were significantly increased. Compared with the model group, the microenvironment of the coculture system was significantly improved by drug-containing serum of *Bushenhuoxue* decoction ($P < 0.05$), while drug-free serum had no significant effect on the microenvironment of the co-culture system ($P > 0.05$). (3) The results show that *Bushenhuoxue* decoction can promote the survival, proliferation, and nucleus pulposus-like differentiation of adipose-derived stem cells.

Key words: adipose-derived stem cell; nucleus pulposus cell; co-culture; intervertebral disc degeneration; *Bushenhuoxue* decoction; oxidative damage

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 82174402 (to YSF); Hunan Provincial Natural Science Foundation, No. 2023JJ40504 (to LZY); Changsha Natural Science Foundation, No. kq2208203 (to LZY); Hunan University of Chinese Medicine School-Level Scientific Research Fund and Joint Fund, No. 2021XJJ041 (to CL)

How to cite this article: GUO ZH, LI ZY, CHEN L, DUAN JH, JIANG HB, CHEN GX, SU YX, LIU EX, YANG SF. Action mechanism of *Bushenhuoxue* decoction on promoting nucleus pulposus-like differentiation of adipose-derived stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(25):3974-3980.

0 引言 Introduction

腰椎间盘突出症为临床常见疾病，其发病率高，不仅严重影响患者的生活质量，而且造成了巨大的社会及医疗负担^[1]。椎间盘退变是腰椎间盘突出症的主要病理基础之一^[2]，与遗传、机械负荷、感染、营养、衰老、昼夜节律等因素有关，其典型表现为髓核细胞衰老和死亡增加，以及细胞外基质 II 型胶原和蛋白聚糖合成减少^[3-4]。椎间盘髓核组织主要由髓核细胞和细胞外基质组成，其中细胞外基质主要由髓核细胞合成和分泌，因此，髓核细胞数量减少、功能异常在椎间盘退变中发挥着重要的作用^[5]。大量研究表明，椎间盘退变与氧化应激关系密切^[6-8]。当氧化应激发生时，椎间盘内的活性氧生成、代谢失衡，活性氧过度堆积，使得细胞外基质的稳态被破坏，引起炎症反应，导致椎间盘细胞坏死凋亡^[9]。临床对于椎间盘退变的治疗主要包括保守治疗及外科手术治疗，仅能减轻患者症状，而不是从根本上逆转椎间盘退变的病理改变^[10]。干细胞疗法是椎间盘退变治疗领域的新思路^[11]，其中脂肪间充质干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 因来源丰富、易于获取、无免疫排斥等优势成为干细胞移植种子细胞的理想选择^[12]。与髓核细胞共培养后，ADSCs 的细胞形态和基因表达水平均出现明显改变，表现出类髓核分化效应^[13]，但移植后的干细胞如何顺利存活、增殖、分化，并恢复髓核细胞功能，从而更有利于延缓椎间盘退变，是干细胞移植治疗椎间盘退变亟需克服的难点^[14]。

中医学将椎间盘退变归属于腰痛病或痹证范畴，人至中年，元气渐衰、五脏不荣是腰痛病的根本病因^[15]；此外，创伤、劳损形成血瘀实邪为常见诱因^[16]，故肾气亏虚、脉络瘀阻是椎间盘退变的基本病机。补肾活血法是肾虚血瘀型椎间盘退变的基本治法，补肾活血中药可显著降低椎间盘源性腰痛患者的疼痛评分及复发率^[17]。根据古方青娥丸加减而来的补肾

活血方由杜仲、补骨脂、怀牛膝、丹参、威灵仙、木瓜组成，该方可通过 Wnt 信号通路促进髓核细胞增殖和细胞外基质合成^[18]。

该实验拟在体外构建 ADSCs 和髓核细胞共培养氧化损伤模型，模拟体内退变椎间盘内微环境，并用补肾活血方含药血清进行干预，研究补肾活血方促进 ADSCs 存活、增殖、类髓核分化及恢复髓核细胞功能的作用，以期为临床治疗椎间盘退变提供新思路及实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞共培养实验。实验数据满足正态性分布和方差齐性，用单因素方差分析 (ANOVA)，组间两两比较采用 LSD 检验；不满足正态性分布和方差齐性，采用 Wilcoxon 秩和检验。

1.2 时间及地点 实验于 2023-02-01/05-30 在湖南中医药大学医学院血管生物学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF 级健康 4-6 周龄雄性 SD 大鼠 10 只，体质量 200 g 左右，由湖南中医药大学实验动物中心代购，质量合格证编号：ZS-202211220012。实验方案经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准，批准号为 LLBH-202111250003。

1.3.2 实验试剂及仪器 叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, T-BHP) 溶液、TESCA 缓冲液、II 型胶原酶 (美国 Sigma)；0.25% 胰蛋白酶溶液、特级胎牛血清、DMEM 低糖培养基、PBS (武汉普诺赛)；CD34 antibody-PE、CD45 antibody-PE、CD90 antibody-PE、CD105 antibody-PE (赛默飞世尔)；CCK-8 试剂盒、乳酸脱氢酶比色法测试盒 (武汉伊莱瑞特)；Transwell 细胞培养小室 (孔径 0.4 μm ，美国康宁)；

甲苯胺蓝染色液、胶原酶 I (北京索莱宝); RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、10%SDS 溶液、HRP 山羊抗兔二抗 (中国 Abiowell); SOX9 一抗 (美国 Proteintech); Trizol (美国 Thermo); mRNA 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (北京康为世纪); PCR 引物由北京擎科设计合成; β -半乳糖苷酶染色试剂盒、活性氧试剂盒 (碧云天); 荧光定量 RCP 仪 (美国 Thermo); 多功能酶标分析仪 (深圳汇松); 台式冷冻离心机 (湖南湘仪); 流式细胞仪 (Beckman); 超净工作台 (北京亚泰隆)。

1.4 方法

1.4.1 退变髓核细胞、ADSCs 的提取及体外培养 选取湖南中医药大学第一附属医院脊柱科收治的符合手术指征的腰椎间盘突出症患者 1 例, 经患者知情同意, 于术中摘取 L_{4/5} 节段、Pfarrmann 退变分级为 III 级的髓核组织、皮下脂肪组织标本进行实验 (研究经湖南中医药大学第一附属医院医学研究伦理委员会批准, 伦理号 HN-LL-KY-2022-033-01)。术中摘取髓核组织后, 生理盐水清洗 2 遍以去除血迹, 迅速将组织转移至实验室。在无菌工作台内, 髓核组织经 PBS 充分漂洗后剪碎至 1 mm³ 小块, 在 0.1% II 型胶原酶消化液中 37 °C 消化 60 min; 消化液 1 000 r/min 离心 5 min, 用含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素 / 链霉素的 DMEM 低糖完全培养液重悬细胞。所得细胞充分混匀后接种于 25 cm² 常规细胞培养瓶, 置于体积分数 5% CO₂、37 °C 培养箱培养, 整个过程严格无菌操作。此后密切关注细胞生长情况, 当细胞汇合至 80%–90% 时, 消化进行传代培养。脂肪组织以 0.2% I 型胶原酶消化液 37 °C 消化 30–45 min, 余操作基本同髓核组织。选取第 2, 3 代 ADSCs、髓核细胞进行后续实验。

人退变髓核细胞、人脂肪间充质干细胞的培养及鉴定

细胞种类	髓核细胞	脂肪间充质干细胞
细胞来源	人退变髓核组织	人脂肪组织
原代培养方法	胰酶消化法	胰酶消化法
培养基介绍	DMEM 低糖培养基	DMEM 低糖培养基
添加材料	体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素 / 链霉素	体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素 / 链霉素
原代培养时间	原代细胞培养 1 周后, 更换培养液, 之后每 3 d 换液 1 次	原代细胞培养 1 周后, 更换培养液, 之后每 3 d 换液 1 次
细胞传代	细胞汇合至 80%–90% 时, 消化进行传代	细胞汇合至 80%–90% 时, 消化进行传代
细胞鉴定	形态学观察及甲苯胺蓝染色	流式细胞术
伦理学批准	经湖南中医药大学第一附属医院医学研究伦理委员会批准	经湖南中医药大学第一附属医院医学研究伦理委员会批准

1.4.2 补肾活血方含药血清、无药血清制备 补肾活血方由杜仲 15 g、补骨脂 10 g、怀牛膝 10 g、丹参 12 g、威灵仙 10 g、木瓜 9 g 组成, 所用中药由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供, 蒸馏法浓缩药物至 1.5 g/mL。采用随机数

字表法将 10 只雄性 SD 大鼠随机分为补肾活血方组、对照组, 每组 5 只。补肾活血方中药汤剂参考人体剂量 (66 g/d), 并按人 (60 kg) 和大鼠 (200 g) 体表面积折算有效剂量, 大鼠 3 倍有效剂量约为 7.35 g/(kg·d), 故补肾活血方组大鼠灌胃补肾活血方 2.8 mL/d, 对照组大鼠灌胃生理盐水 2.8 mL/d, 每天分 2 次给药, 共灌胃 1 周, 末次给药 1 h 后, 无菌条件下腹腔麻醉, 经腹主动脉采血, 4 °C 静置 2 h 后 3 500 r/min 离心 20 min, 取上层血清 56 °C 灭活 30 min, 过滤除菌, 分装, -20 °C 保存备用。

1.4.3 CCK-8 法检测细胞活性 分别取对数期生长的髓核细胞、ADSCs, 消化接种至 96 孔板, 细胞浓度为 5×10⁷ L⁻¹, 每孔 100 μ L, 根据 T-BHP 浓度 (0, 25, 50, 100, 250, 500 μ mol/L) 共设置 6 组, 每组设置 5 个复孔, 分别用 T-BHP 干预 2 种细胞 24 h 后加入 CCK-8 工作液, 1–4 h 后用酶标仪在 450 nm 波长处读数。

为了检测补肾活血方含药血清的最佳体积分数, 分别将对数期生长的髓核细胞、ADSCs 按上述方法接种至 96 孔板内, 根据补肾活血方含药血清体积分数 (0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%) 共设置 6 组, 每组设置 5 个复孔, 分别用含药血清干预 2 种细胞 48 h 后加入 CCK-8 工作液, 1–4 h 后用酶标仪在 450 nm 波长处读数。

1.4.4 退变髓核细胞和 ADSCs 共培养体系的构建和实验分组 采用孔径 0.4 μ m 的 Transwell 小室建立细胞共培养体系, 第 3 代髓核细胞置于 Transwell 上室, ADSCs 置于 Transwell 下室。上室及下室均接种 300 μ L 细胞, 细胞浓度均为 1.5×10⁸ L⁻¹, 待上室及下室细胞均融合至 80%–90% 后 (约 48 h), 进一步给予相应处理。细胞分组如下: ①对照组: 正常共培养 24 h, 随后换液继续培养 48 h; ②模型组: 加入含 50 μ mol/L T-BHP 的 DMEM 低糖完全培养液同时处理上下室细胞 24 h, 随后更换含体积分数 20% 无药血清 (对照组大鼠血清) 的 DMEM 低糖完全培养液干预 48 h; ③无药血清组: 加入含 50 μ mol/L T-BHP 的 DMEM 低糖完全培养液同时处理上下室细胞 24 h, 随后更换含体积分数 20% 无药血清 (对照组大鼠血清) 的 DMEM 低糖完全培养液干预 48 h; ④含药血清组: 加入含 50 μ mol/L T-BHP 的 DMEM 低糖完全培养液同时处理上下室细胞 24 h, 随后更换含体积分数 20% 补肾活血方含药血清 (补肾活血方组大鼠血清) 的 DMEM 低糖完全培养液干预 48 h。各组细胞处理完毕后, 取下层 ADSCs 进行检测。

1.4.5 甲苯胺蓝染色 各组 ADSCs 处理结束后, 弃上清液, PBS 清洗 2 次, 每次 1 min; 加入适量的甲苯胺蓝染色液染色 5 min, 加入等量蒸馏水轻轻吹打, 静置 15 min; 蒸馏水清洗 2 次, 每次 30 s, 最后加入适量蒸馏水完全浸没细胞, 显微镜下观察。

1.4.6 RT-PCR 法检测 ADSCs 中 II 型胶原、蛋白聚糖、SOX9 mRNA 表达 各组 ADSCs 处理结束后, 收集细胞, 使用 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA, 按照反转录试剂盒将 1 μ g RNA 反转录成 cDNA, 根据荧光定量 PCR 试剂盒扩增。以 GAPDH 为内参, 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}} 算法计算各组 ADSCs 的 II 型胶原、蛋白聚糖和

SOX9 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 | qPCR 检测引物序列信息

Table 1 | Sequence information of primers detected by qPCR

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
GAPDH	F: ACA GCC TCA AGA TCA TCA GC R: GGT CAT GAG TCC TTC CAC GAT	104
II 型胶原	F: TGC TCC TGC CGT TTC GCT R: CCA GTG TCA CAG ACA CAG ATC C	240
蛋白聚糖	F: GGT CTC ACT GCC CAA CTA CCC R: CGA TGC CTT TCA CCA CGA CT	152
SOX9	F: GAC TTC TGA ACG AGA GCG AGA R: CCG TTC TTC ACC GAC TTC CTC	124

1.4.7 Western blot 法检测 ADSCs 中 SOX9 蛋白表达 各组 ADSCs 处理结束后, 收集细胞, RIPA 提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白样品浓度。每组取等质量蛋白上样, 将蛋白于 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 90 min, 一抗 4 °C 孵育过夜, HRP 山羊抗兔二抗室温孵育 90 min, 洗膜, ECL 显色曝光。利用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.4.8 比色法检测 ADSCs 的乳酸脱氢酶水平 各组 ADSCs 处理结束后, 取上清液, 按照乳酸脱氢酶比色法试剂盒说明书进行操作, 最后使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度值, 计算各组乳酸脱氢酶释放情况。

1.4.9 流式细胞术检测 ADSCs 内活性氧水平 按照 1 : 1 000 的比例用基础培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 μmol/L, 各组 ADSCs 处理结束后, 去除细胞培养液, 加入稀释好的 DCFH-DA 充分盖住细胞, 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min, 用基础培养液洗涤细胞 3 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 胰酶消化 2 min, 收集细胞, 流式细胞仪检测细胞内活性氧水平。

1.4.10 染色法检测 ADSCs 中 β- 半乳糖苷酶水平 各组 ADSCs 处理结束后, 去除细胞培养液, PBS 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, PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 3 min; 吸除 PBS, 每孔加入 1 mL 染色工作液, 37 °C 细胞培养箱内孵育过夜, 用保鲜膜封住 6 孔板防止蒸发, 普通光学显微镜下观察并拍照。

1.5 主要观察指标 ①不同浓度 T-BHP 对髓核细胞和 ADSCs 活力的影响, 不同体积分数补肾活血方含药血清对髓核细胞和 ADSCs 活力的影响; ②各干预组 ADSCs 形态变化、甲苯胺蓝染色结果; ③各干预组 ADSCs 中 SOX9、II 型胶原和蛋白聚糖的 mRNA 表达水平以及 SOX9 的蛋白表达水平; ④各干预组 ADSCs 中乳酸脱氢酶、活性氧、β- 半乳糖苷酶水平。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计学软件分析数据, 并使用 GraphPad Prism 8 制作统计图。实验数据满足正态性分布和方差齐性, 用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 检验; 不满足正态性分布和方差齐性, 采用 Wilcoxon 秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。统计学方法已经湖南中医药大学第一附属医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 退变髓核细胞及 ADSCs 鉴定结果 髓核细胞呈现多角形、短梭形等形态, 见图 1A; 甲苯胺蓝染色将髓核细胞中蛋白聚糖染成蓝色, 越靠近胞核处染色越深, 见图 1B。流式细胞术鉴定第 2 代 ADSCs 表面 CD34 阳性率为 1.81%, CD45 阳性率为 1.02%, CD90 阳性率为 99.93%, CD105 阳性率为 97.78%, 见图 1C-G, 符合间充质干细胞表面抗原的分布标准 (CD90 和 CD105 阳性率 $\geq 95\%$; CD34 和 CD45 阳性率 $\leq 2\%$)。

2.2 T-BHP 浓度及补肾活血方含药血清体积分数筛选 随着 T-BHP 浓度的增加, 髓核细胞和 ADSCs 的细胞活力均显著下降 ($P < 0.05$), T-BHP 干预髓核细胞的 IC_{50} 为 44.49 μmol/L, 见图 2A, B, T-BHP 干预 ADSCs 的 IC_{50} 为 48.27 μmol/L, 见图 2D-E。当补肾活血方含药血清体积分数为 20% 时, 髓核细胞的细胞活力最佳 ($P < 0.05$), 见图 2C, 各体积分数补肾活血方含药血清对 ADSCs 的细胞活力无显著差异, 见图 2F。因此, 最终选择 50 μmol/L 的 T-BHP、体积分数 20% 补肾活血方含药血清进行后续实验。

2.3 各组 ADSCs 形态变化 如图 3 所示, 对照组 ADSCs 形态转变为多角形和短梭形, 提示与髓核细胞共培养后, ADSCs 的形态与类软骨样细胞逐渐接近。与对照组相比, 经 T-BHP 干预后, 模型组细胞明显皱缩, 部分细胞死亡后脱落; 与模型组相比, 含药血清组的细胞形态明显改善, 但无药血清组细胞形态改善不明显。

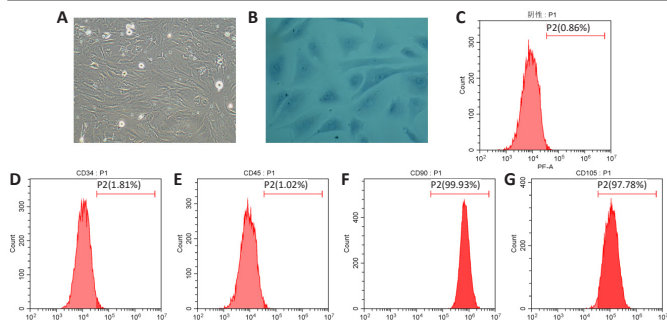
2.4 各组 ADSCs 甲苯胺蓝染色结果 如图 4 所示, 对照组细胞形态以多角形和短梭形为主, 蛋白聚糖被染为蓝色, 且越靠近细胞核染色越深, 提示与髓核细胞共培养后, ADSCs 可合成和分泌蛋白聚糖, 表达类软骨细胞功能。与对照组相比, 模型组细胞染色不明显; 与模型组相比, 经补肾活血方含药血清处理后, 这一情况得到改善, 但无药血清组改善不明显。

2.5 各组 ADSCs 中相关 mRNA 表达水平 如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组中 II 型胶原、蛋白聚糖、SOX9 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.000 1$); 与模型组相比, 补肾活血方含药血清组可显著促进 II 型胶原 ($P < 0.01$)、蛋白聚糖 ($P < 0.000 1$)、SOX9 ($P < 0.000 1$) mRNA 表达, 而无药血清干预后相关 mRNA 表达无明显改变 ($P > 0.05$)。

2.6 各组 ADSCs 中 SOX9 蛋白表达水平 如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组 SOX9 蛋白表达显著降低 ($P < 0.000 1$); 与模型组相比, 补肾活血方含药血清可显著促进 SOX9 蛋白表达 ($P < 0.05$), 而无药血清干预后蛋白表达下降情况无明显改变 ($P > 0.05$)。

2.7 各组 ADSCs 的细胞毒性、活性氧含量、细胞衰老检测结果 如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组乳酸脱氢酶释放量明显增加 ($P < 0.000 1$); 与模型组相比, 补肾活血方含药血清可显著抑制乳酸脱氢酶释放 ($P < 0.000 1$), 但无药血清组与模型组乳酸脱氢酶释放量无明显差异 ($P > 0.05$)。

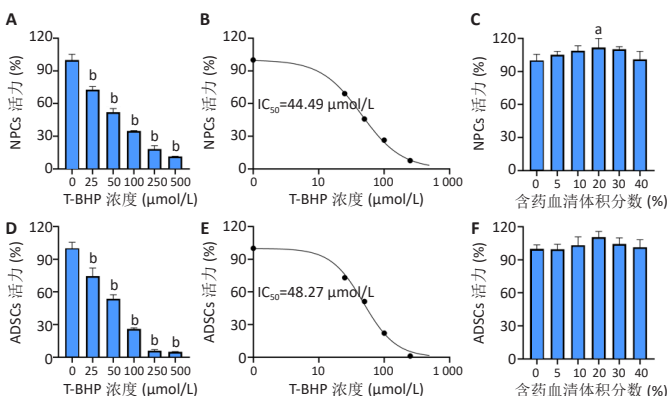
流式细胞术结果显示, 与对照组相比, 模型组细胞内活



图注：图 A 为髓核细胞在 100 倍显微镜下形态；B 为甲苯胺蓝染色 (×400)，髓核细胞中蛋白聚糖染成蓝色，越靠近胞核处染色越深；C-G 为流式细胞术鉴定干细胞表面标志物。

图 1 | 人退变髓核细胞及脂肪间充质干细胞鉴定结果

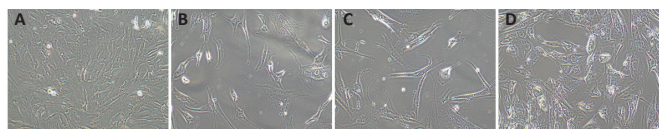
Figure 1 | Identification results of human degenerative nucleus pulposus cells and adipose-derived stem cells



图注：图 A 为 T-BHP 对髓核细胞 (NPCs) 活力的影响；B 为 T-BHP 降低 NPCs 活性的 IC₅₀ 曲线分析；C 为补肾活血方含药血清对 NPCs 活力的影响；D 为 T-BHP 对脂肪间充质干细胞 (ADSCs) 活力的影响；E 为 T-BHP 降低 ADSCs 活性的 IC₅₀ 曲线分析；F 为补肾活血方含药血清对 ADSCs 活力的影响。与对照组相比，^a*P* < 0.05，^b*P* < 0.000 1。

图 2 | 叔丁基过氧化氢 (T-BHP)、补肾活血方含药血清对细胞活力的影响

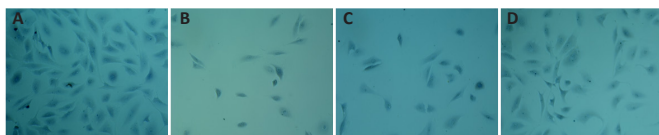
Figure 2 | Influence of drug-containing serum of tert-butyl hydrogen peroxide and Bushenhuoxue decoction on cell viability



图注：图 A-D 分别为对照组、模型组、无药血清组和含药血清组。

图 3 | 各组脂肪间充质干细胞的形态学观察 (×100)

Figure 3 | Morphological observation of adipose-derived stem cells in each group (×100)

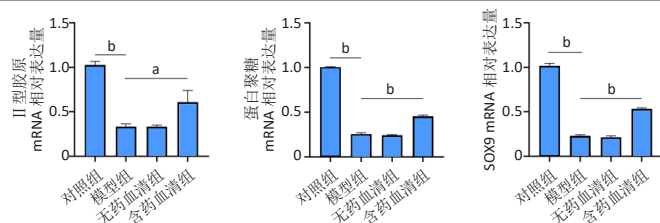


图注：图 A-D 分别为对照组、模型组、无药血清组和含药血清组。

图 4 | 各组脂肪间充质干细胞甲苯胺蓝染色 (×200)

Figure 4 | Toluidine blue staining of adipose-derived stem cells in each group (×200)

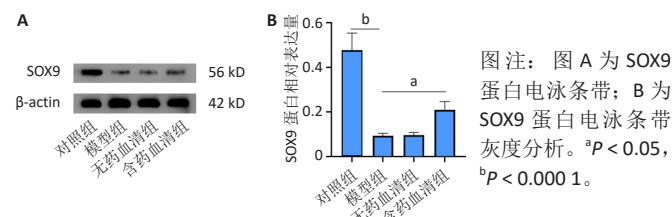
性氧水平明显升高 (*P* < 0.000 1)；与模型组相比，补肾活血方含药血清组活性氧水平显著下降 (*P* < 0.000 1)，但无药血清组与模型组无明显差异 (*P* > 0.05)，见图 8。



图注：^a*P* < 0.001，^b*P* < 0.000 1。

图 5 | 各组脂肪间充质干细胞中 II 型胶原、蛋白聚糖、SOX9 mRNA 表达

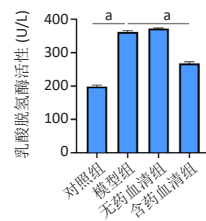
Figure 5 | Expression of type II collagen, proteoglycan, and SOX9 mRNA in adipose-derived stem cells of each group



图注：图 A 为 SOX9 蛋白电泳条带；B 为 SOX9 蛋白电泳条带灰度分析。^a*P* < 0.05，^b*P* < 0.000 1。

图 6 | 各组脂肪间充质干细胞中 SOX9 蛋白表达

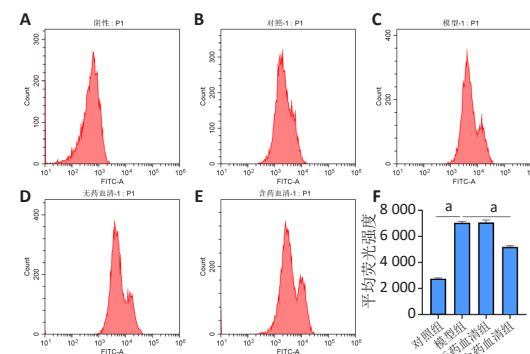
Figure 6 | Expression of SOX9 protein in adipose-derived stem cells of each group



图注：^a*P* < 0.000 1。

图 7 | 各组脂肪间充质干细胞培养液中乳酸脱氢酶水平

Figure 7 | Levels of lactate dehydrogenase in adipose-derived stem cell culture medium in each group

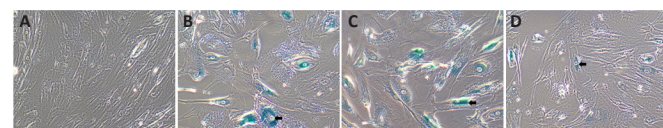


图注：图 A-E 为流式细胞图；F 为统计学分析结果。^a*P* < 0.000 1。

图 8 | 各组脂肪间充质干细胞内活性氧水平

Figure 8 | Reactive oxygen species levels in adipose-derived stem cells of each group

衰老相关 β-半乳糖苷酶染色结果表明，与对照组相比，模型组 β-半乳糖苷酶阳性细胞百分比显著增加；与模型组相比，补肾活血方含药血清组阳性细胞百分比显著降低，但无药血清处理后无明显改变，见图 9。



图注：图 A-D 分别为对照组、模型组、无药血清组和含药血清组，箭头处为 β-半乳糖苷酶染色阳性。

图 9 | 各组脂肪间充质干细胞 β-半乳糖苷酶染色 (×100)

Figure 9 | Beta-galactosidase staining in adipose-derived stem cells of each group (×100)

3 讨论 Discussion

椎间盘退变作为人类直立行走的代价之一,其发生发展严重影响着患者的生活质量。中医药治疗椎间盘退变类疾病具有经济实惠、不良反应小、患者接受程度高、临床疗效较好等优势。在一项对气滞血瘀型腰椎间盘突出症患者的临床疗效观察中,相比单纯口服西药,中药能更有效地减轻患者腰腿酸痛、腰部板硬、局部压痛等症状,且能更好地改善患者腰部功能^[19]。赵旭涛等^[20]研究表明,寒湿痹阻型腰椎间盘突出症患者口服中药结合中药熏洗后,与单纯服用非类固醇类抗炎药相比,C-反应蛋白以及肿瘤坏死因子 α 、目测类比分均显著下降,JOA评分上升,提示中药治疗可抑制机体炎症反应,具有较好的临床疗效。中医将椎间盘退变归属于“腰痛病”“痹证”范畴,中医有关该病记载较多,疼痛是其重要临床症状。《素问·脉要精微论》有云:“腰者肾之府,转摇不能,肾将惫矣。”《诸病源候论》有云:“肾气不足,受风邪之所为也,劳伤则肾虚,虚则受于风冷,风冷与正气交争,故腰脚痛。”可见该病发生与肝肾不足、机体虚弱密切相关,不荣则痛。此外,《素问·痹论》记载:“衡络之脉,令人腰痛不可俯仰,仰则恐仆,得之举重伤腰。”《诸病源候论·腰痛不得挽仰候》记载:“劳损于肾,动伤经络,又为风冷所侵,血气搏击,故腰痛也。”《景岳全书·腰痛》记载:“跌仆伤而腰痛者,此伤在筋骨而血脉凝滞。”外伤劳损形成瘀血实邪,血瘀而不通,不通则痛。总之,椎间盘退变疾病多属本虚标实,其中肾脏虚损、无以濡养是内因,外伤、劳损致血瘀则为外因,故肾虚血瘀为本病病机,补肾活血为其基本治法^[21]。补肾活血方根据《太平惠民和剂局方》中的青娥丸化裁而来,该方由杜仲 15 g、补骨脂 10 g、怀牛膝 10 g、丹参 12 g、威灵仙 10 g、木瓜 9 g 组成,全方补肾强骨以治本,活血通络以治标。前期研究表明,补肾活血方通过 Wnt 信号通路调节髓核细胞增殖和细胞外基质重塑以缓解椎间盘退变的发展^[18]。此次研究通过在体外构建退变髓核细胞和 ADSCs 共培养氧化损伤模型,模拟体内退变椎间盘内微环境,旨在进一步探索和发掘补肾活血方联合 ADSCs 治疗椎间盘退变的作用机制,为中医药联合干细胞移植在临床中治疗椎间盘退变提供实验依据。

椎间盘组织中的胶原主要为 I 型和 II 型胶原,其中绝大部分为 II 型胶原,当椎间盘发生退变时,细胞外基质合成代谢减弱,分解代谢增强,表现为 I 型胶原比例增加、II 型胶原比例下降,同时蛋白聚糖含量显著减少,细胞外基质慢性过度分解,导致髓核吸收承受外力的功能下降而易于损伤^[22]。髓核细胞作为椎间盘的主要细胞之一,在维持椎间盘完整性和稳定性方面发挥了重要的作用,其坏死和凋亡均可导致椎间盘退变^[23]。因此,恢复髓核细胞功能是修复受损椎间盘、抑制退变的有效治疗方法。通过甲苯胺蓝染色实验也证实了补肾活血方能促进共培养体系中 ADSCs 的蛋白聚糖表达。SOX9 作为软骨细胞的重要调节因子^[24],影响着细胞内蛋白聚糖和 II 型胶原的表达^[25]。当 PI3K/Akt 信号通路被激活时,

大鼠髓核细胞内 SOX9 的表达增加,从而诱导大鼠髓核细胞中蛋白聚糖基因的表达水平增加,而当 PI3K/Akt 信号通路被抑制时,SOX9 表达和转录活性降低,导致蛋白聚糖表达水平下降^[26]。SOX9 还在间充质干细胞分化过程中发挥重要作用,SOX9 能加速骨髓间充质干细胞的软骨分化和软骨细胞生长^[27],SOX9 和转化生长因子 $\beta 1$ 联合作用可加速脐带间充质干细胞的软骨形成^[28]。越来越多的研究发现,活性氧及氧化应激引起的椎间盘细胞损伤在椎间盘退变过程中扮演着重要角色^[29-32]。当活性氧的产生及清除失衡时,活性氧在退变椎间盘中过量产生并累积导致氧化应激,此外,活性氧可作为信号分子激活炎症信号通路,从而导致髓核细胞衰老、死亡,最终加速椎间盘退变的发展^[32-33]。近年来,干细胞移植治疗椎间盘退变越来越受到学者们的青睐^[34]。ZHANG 等^[35]运用间充质干细胞和水凝胶联合注射治疗山羊中重度椎间盘退变,可改善椎间盘组织形态,恢复了近 10% 椎间盘高度。NORIEGA 等^[36]对 24 例保守治疗无效的慢性腰痛患者进行的一项随机对照试验,结果显示间充质干细胞治疗患者功能指标明显改善,42 个月后随访发现间充质干细胞在改善椎间盘含水量、延缓椎间盘退变等方面远期疗效可靠。由于髓核组织内没有血管,显著降低了细胞移植后发生免疫反应的风险^[37],来源于髓核、骨髓、脂肪、脐带、尿液的干细胞均被应用于干细胞防治椎间盘退变领域,其中 ADSCs 因来源丰富、易于获取、增殖能力强等特点,已然成为细胞移植的理想种子细胞^[38]。研究发现,将 ADSCs 联合抗氧化剂注入到小鼠椎间盘后,细胞增殖活性显著增加,细胞外基质 II 型胶原、蛋白聚糖、SOX9 表达上调,小鼠椎间盘退变得到明显改善^[39]。但移植后的 ADSCs 必须面对氧化应激损伤、炎症反应、pH 值降低、过度机械负荷和代谢紊乱等恶劣微环境^[40],其移植后如何长期存活、增殖分化、恢复髓核细胞功能等问题,制约了干细胞的应用。

研究结果显示,ADSCs 和髓核细胞体外共培养之后,ADSCs 形态逐渐转变为短梭形或多角形,细胞开始表达 II 型胶原、蛋白聚糖、SOX9 mRNA 和 SOX9 蛋白,提示 ADSCs 表现出类髓核分化的趋势。使用 T-BHP 干预后,II 型胶原、蛋白聚糖、SOX9 的 mRNA 表达和 SOX9 的蛋白表达被抑制,乳酸脱氢酶、活性氧的释放和 β -半乳糖苷酶阳性细胞百分比增多,提示共培养体系中细胞通过释放乳酸脱氢酶和活性氧发生细胞氧化损伤。在使用补肾活血方含药血清干预后,ADSCs 中 II 型胶原、蛋白聚糖、SOX9 的 mRNA 表达水平和 SOX9 的蛋白表达水平显著上升,ADSCs 表现出类髓核分化趋势,ADSCs 的乳酸脱氢酶和活性氧释放量显著降低,减缓细胞衰老和死亡。

综上所述,经与髓核细胞共培养之后,ADSCs 开始表现出类髓核分化趋势,补肾活血方可以促进 ADSCs 存活、增殖、类髓核分化,为中医药协同干细胞治疗椎间盘退变提供一定的实验基础。然而,此次研究仍存在一定的局限性,包括未能对补肾活血方减轻共培养体系氧化损伤是否具有时间依赖

性进行探索，也未对补肾活血方发挥作用的机制进行探讨，且缺乏动物实验模型验证，值得进一步深入研究。

致谢：感谢湖南中医药大学医学院血管生物学实验室全体老师，感谢李夏博士、文江博士提供的技术支持与实验指导。

作者贡献：通讯作者杨少锋负责实验设计、手稿校审、统筹安排；第一作者郭泽华负责实验实施、论文撰写；李兆勇、陈龙负责实验评估、文章校对；段家豪、蒋浩波、陈光学负责数据分析、图片绘制；刘恩旭、苏友贤负责细胞培养、部分指标检测。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789-1858.

[2] SONG Y, LU S, GENG W, et al. Mitochondrial quality control in intervertebral disc degeneration. *Exp Mol Med*. 2021;53(7):1124-1133.

[3] MA H, XIE C, CHEN Z, et al. MFG-E8 alleviates intervertebral disc degeneration by suppressing pyroptosis and extracellular matrix degradation in nucleus pulposus cells via Nrf2/TXNIP/NLRP3 axis. *Cell Death Discov*. 2022;8(1):209.

[4] KAMALI A, ZIADLOU R, LANG G, et al. Small molecule-based treatment approaches for intervertebral disc degeneration: Current options and future directions. *Theranostics*. 2021;11(1):27-47.

[5] COSTĂCHESCU B, NICULESCU AG, TELEANU RI, et al. Recent Advances in Managing Spinal Intervertebral Discs Degeneration. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(12):6460.

[6] WANG J, XIA D, LIN Y, et al. Oxidative stress-induced circKIF18A downregulation impairs MCM7-mediated anti-senescence in intervertebral disc degeneration. *Exp Mol Med*. 2022;54(3):285-297.

[7] SONG D, GE J, WANG Y, et al. Tea Polyphenol Attenuates Oxidative Stress-Induced Degeneration of Intervertebral Discs by Regulating the Keap1/Nrf2/ARE Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6684147.

[8] ZHAO Y, QIU C, WANG W, et al. Cortistatin protects against intervertebral disc degeneration through targeting mitochondrial ROS-dependent NLRP3 inflammasome activation. *Theranostics*. 2020;10(15):7015-7033.

[9] 李才, 许盼盼, 胡捷, 等. 褪黑素调控 Nrf2/ARE 信号通路延缓髓核间质干细胞退变的实验研究 [J]. *中华全科医学*, 2022,20(11):1831-1835.

[10] ALPÍZAR-AGUIRRE A, GONZÁLEZ-CARBONELL RA, ORTIZ-PRADO A, et al. Biomechanics of the bone-screw interface in transpedicular spinal instrumentation. *Acta Ortop Mex*. 2022;36(3):172-178.

[11] CHU G, ZHANG W, HAN F, et al. The role of microenvironment in stem cell-based regeneration of intervertebral disc. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:968862.

[12] BURROW KL, HOYLAND JA, RICHARDSON SM. Human Adipose-Derived Stem Cells Exhibit Enhanced Proliferative Capacity and Retain Multipotency Longer than Donor-Matched Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells during Expansion In Vitro. *Stem Cells Int*. 2017;2017:2541275.

[13] 张永辉, 李玲慧. 人退变髓核细胞诱导脂肪间充质干细胞向类髓核细胞分化的实验研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2018,26(7):644-649.

[14] SUN J, YANG F, WANG L, et al. Delivery of coenzyme Q10 loaded micelle targets mitochondrial ROS and enhances efficiency of mesenchymal stem cell therapy in intervertebral disc degeneration. *Bioact Mater*. 2022;23:247-260.

[15] 陈炜成, 董达胜, 黄竞威, 等. 补肾健脾法联合顺势牵引对脾胃两虚型腰椎间盘突出症患者的临床疗效 [J]. *中成药*, 2023,45(4):1146-1149.

[16] 程明, 吴杨玲, 刘羽, 等. 腰痛逐瘀止痛汤结合调脊通督针法治疗气滞血瘀型腰椎间盘突出突出症临床疗效及安全性观察 [J]. *中华中医药学刊*, 2021,39(11):236-239.

[17] 朱立国, 展嘉文, 冯敏山, 等. 补肾活血方治疗椎间盘源性腰痛的临床观察 [J]. *世界中医药*, 2017,12(3):554-557.

[18] YANG S, LI L, ZHU L, et al. Bu-Shen-Huo-Xue-Fang modulates nucleus pulposus cell proliferation and extracellular matrix remodeling in intervertebral disk degeneration through miR-483 regulation of Wnt pathway. *J Cell Biochem*. 2019;120(12):19318-19329.

[19] 胡俊翔, 包文娟, 胡佳, 等. 撤针联合中药对气滞血瘀型腰椎间盘突出症患者的临床疗效观察 [J/OL]. *中华中医药学刊* :1-11[2023-08-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20230605.1709.014.html>

[20] 赵旭涛, 俞仲翔. 石氏温经强腰方结合中药熏蒸治疗腰椎间盘突出症(寒湿痹阻型)临床效果研究 [J/OL]. *辽宁中医杂志* :1-9[2023-08-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1128.R.20230607.1534.058.html>

[21] 李凯明, 朱立国, 李玲慧, 等. 补肾活血方对兔退变椎间盘模型经典 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020,35(12):6001-6005.

[22] LIU L, HE J, LIU C, et al. Cartilage intermediate layer protein affects the progression of intervertebral disc degeneration by regulating the extracellular microenvironment (Review). *Int J Mol Med*. 2021;47(2):475-484.

[23] ZHANG Y, YANG B, WANG J, et al. Cell Senescence: A Nonnegligible Cell State under Survival Stress in Pathology of Intervertebral Disc Degeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:9503562.

[24] SONG H, PARK KH. Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration. *Semin Cancer Biol*. 2020;67(Pt 1):12-23.

[25] FUGLERUD BM, DRISSLER S, LOTTO J, et al. SOX9 reprograms endothelial cells by altering the chromatin landscape. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(15):8547-8565.

[26] CHENG CC, UCHIYAMA Y, HIYAMA A, et al. PI3K/AKT regulates aggrecan gene expression by modulating Sox9 expression and activity in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *J Cell Physiol*. 2009;221(3):668-676.

[27] ZHANG P, GAO G, ZHOU Z, et al. microRNA-130b downregulation potentiates chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by targeting SOX9. *Braz J Med Biol Res*. 2021;54(4):e10345.

[28] KHALID S, EKRAM S, RAMZAN F, et al. Co-regulation of Sox9 and TGF β 1 transcription factors in mesenchymal stem cells regenerated the intervertebral disc degeneration. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1127303.

[29] HUA W, LI S, LUO R, et al. Icariin protects human nucleus pulposus cells from hydrogen peroxide-induced mitochondria-mediated apoptosis by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(1):165575.

[30] WANG Y, CHENG H, WANG T, et al. Oxidative stress in intervertebral disc degeneration: Molecular mechanisms, pathogenesis and treatment. *Cell Prolif*. 2023:e13448.

[31] XU J, SHAO T, LOU J, et al. Aging, cell senescence, the pathogenesis and targeted therapies of intervertebral disc degeneration. *Front Pharmacol*. 2023;14:1172920.

[32] CHEN HW, ZHOU JW, ZHANG GZ, et al. Emerging role and therapeutic implication of mTOR signalling in intervertebral disc degeneration. *Cell Prolif*. 2023;56(1):e13338.

[33] SEOL D, COLEMAN MC, MARTIN JA, et al. Targeting oxidative stress with amobarbital to prevent intervertebral disc degeneration: Part I. in vitro and ex vivo studies. *Spine J*. 2021;21(6):1021-1030.

[34] FORRESTER SJ, KIKUCHI DS, HERNANDES MS, et al. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res*. 2018;122(6):877-902.

[35] ZHANG C, GULLBRAND SE, SCHAER TP, et al. Combined Hydrogel and Mesenchymal Stem Cell Therapy for Moderate-Severity Disc Degeneration in Goats. *Tissue Eng Part A*. 2021;27(1-2):117-128.

[36] NORIEGA DC, ARDURA F, HERNÁNDEZ-RAMAJÓ R, et al. Treatment of Degenerative Disc Disease With Allogeneic Mesenchymal Stem Cells: Long-term Follow-up Results. *Transplantation*. 2021;105(2):e25-e27.

[37] 王宇翔, 徐海栋, 赵建宁. 细胞移植治疗椎间盘退变的研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2021,29(11):1009-1012.

[38] MOHAMED-AHMED S, FRISTAD I, LIE SA, et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):168.

[39] XIAO L, XU SJ, LIU C, et al. Sod2 and catalase improve pathological conditions of intervertebral disc degeneration by modifying human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Life Sci*. 2021;267:118929.

[40] ZHANG W, SUN T, LI Y, et al. Application of stem cells in the repair of intervertebral disc degeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):70.

(责任编辑: ZM, MZH, ZN, QY)