

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.02.0202

低氧诱导因子在髓核细胞生理功能调节中的作用机制研究进展

侯 洋, 史建刚*, 袁 文

第二军医大学长征医院脊柱外科, 上海 200003

[摘要] 椎间盘退变是临床常见难题下腰痛的主要病因之一。而髓核细胞表型的改变、细胞生存时间的减少、代谢活动的降低和细胞外基质含量下降均被认为与椎间盘退变相关。椎间盘是身体内最大的无血管组织, 在体内最显著的特点就是氧含量偏低。低氧诱导因子(HIF)是一种转录因子, 细胞在低氧条件下诱导产生 HIF 从而引发一系列的细胞反应来适应低氧的外环境。HIF 通过与低氧反应元件(HRE)结合以启动靶基因的转录表达。目前研究认为, HIF 在椎间盘退变的病理进程中具有重要作用, 可能是未来阻遏椎间盘退变进展甚至治愈这一临床难题的关键靶点。本文综述了 HIF 对于髓核细胞新陈代谢活动的调节作用, 包括 HIF 在髓核细胞的表达以及 HIF 对于髓核细胞表型、生存、新陈代谢以及细胞外基质生成的调控。

[关键词] 椎间盘退变; 低氧诱导因子; 髓核细胞

[中图分类号] R 681.53 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)02-0202-06

Role of hypoxia-inducible factor in regulating physiological function of nucleus pulposus cells: recent progress

HOU Yang, SHI Jian-gang*, YUAN Wen

Department of Spine Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] Intervertebral disc degeneration (IDD) is one of the main causes of low back pain—a common clinical problem. Alterations of the phenotype, reduction of survival time, decline of metabolic activity, and decrease of extracellular matrix of nucleus pulposus (NP) cells are thought associated with IDD. The intervertebral disc is the largest avascular tissue in the body, with the most distinctive characteristic being low oxygen tension. Hypoxia-inducible factor (HIF) is a transcriptional factor induced by the hypoxia condition to initiate a series of cellular responses, accommodating the hypoxia environment. HIF can start transcription of target genes by binding the hypoxia response element and may play an important role in the pathological process of IDD and serve as a crucial target for stopping progression or curing IDD. Here we summarized the roles of HIF in regulating metabolism activity of NP cells, including expression of HIF in NP cells, and regulatory roles of HIF in phenotype, survival, metabolism and extracellular matrix accumulation of NP cells.

[Key words] intervertebral disc degeneration; hypoxia-inducible factor; nucleus pulposus cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(2):202-207]

下腰痛严重影响患者的生活质量, 同时亦造成了巨大的经济损失和医疗支出, 成为当今社会一大公共卫生问题。西方发达国家下腰痛的发病率已达到 20%~40%^[1-2]。产生腰痛的原因有很多, 其中椎间盘退变为主要原因之一^[3-4]。

低氧是一种重要的细胞应激原, 其被发现在许多疾病包括脑缺血、肿瘤与慢性退变性疾病的发生与进展中发挥了重要的作用^[5-6]。而低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)作为一种转录激活因子, 能够诱导机体对低氧环境产生适应性反应, 从而引发一系列相互关联的细胞内级联反应, 其中包

括对细胞内数量众多酶类的调节^[7]。Richardson 等^[8]发现椎间盘组织中 HIF 的表达与氧分压有关, 而在退变的椎间盘组织中 HIF 的表达明显增高。

由于椎间盘内无血管组织, 因此椎间盘微环境最显著的特点是其氧分压偏低, 而椎间盘的低氧分压在椎间盘退变机制中的作用近年来逐渐成为研究者关注的热点; 正因为椎间盘低氧微环境的存在, 髓核细胞始终处于低氧状态中^[9-10]。此外, 椎间盘退变过程中软骨终板通透性的下降会加剧椎间盘组织原有的低氧状态^[11]。因此, HIF 可能在椎间盘细胞的生理功能调节以及椎间盘退变机制中发挥重要的

[收稿日期] 2015-10-17 **[接受日期]** 2015-12-05

[作者简介] 侯 洋, 博士, 讲师、主治医师。E-mail: yanghouspine@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885799, E-mail: alexzandersuper@163.com

作用。本文通过对既往 HIF 的相关研究文献进行回顾,综述了 HIF 在髓核细胞以及椎间盘退变中的作用及其可能机制。

1 HIF 的结构与功能

当细胞处于低氧状态时,细胞会对外界的低氧张力产生反应而上调 HIF 蛋白的表达。HIF 家族成员主要包括 HIF-1、HIF-2 及 HIF-3,每一种 HIF 蛋白都包含一个 α 亚基及一个 β 亚基^[6]。其中 α 亚基主要决定了 HIF 的活性,其通过调节下游一系列靶基因的表达发挥相关生物学作用。研究已证实 HIF-1 和 HIF-2 的功能存在差别^[12-13],两者的表达均与氧分压有关,在低氧条件下二者的表达较常氧条件下明显增高^[8]。

2 HIF 在髓核细胞中的表达

在 3 种 HIF 蛋白中,HIF-1 和 HIF-2 对于髓核细胞功能的调节最为重要。Risbud 等^[14]将人类、鼠以及山羊的髓核细胞分别置于低氧和常氧(2%和 21%)条件下进行培养,检测 HIF-1 α 的表达情况,结果表明髓核细胞在低氧条件下持续表达有功能活性的 HIF-1 α 蛋白。Agrawal 等^[15]观察鼠髓核细胞中 HIF-2 α 的表达情况,结果发现在低氧条件下 HIF-2 α 的转位激活有明显上升,但 HIF-2 α mRNA 以及蛋白表达水平与常氧条件下相比并未有明显改变。脯氨酰 4-羟化酶结构域(prolyl hydroxylase, PHD)蛋白是 2-氧戊二酸盐/铁依赖的加双氧酶超家族成员,其包括 PHD1、PHD2 以及 PHD3^[16]。研究表明在许多细胞类型中,HIF-1 α 和 HIF-2 α 的降解主要受氧依赖的蛋白酶体和 PHD 的调节与催化;然而在髓核细胞中,HIF-1 α 及 HIF-2 α 的降解主要受 26S 蛋白酶体的调节,这与氧浓度正常与否无关^[17]。此外,在所有的 PHDs 成员中,只有 PHD2 通过氧依赖模式调控 HIF-1 α 的有限降解,而 HIF-2 α 的降解则主要通过非 PHD 依赖模式进行调节^[17]。

目前,髓核细胞的表型特征仍然未研究清楚。Rajpurohit 等^[18]通过蛋白质印迹法以及免疫组织化学分析发现 HIF-1 α 仅仅表达于髓核细胞表面,在纤维环以及软骨终板细胞中并未检测到 HIF-1 α 的表达;而 HIF-1 β 在髓核细胞中的表达水平显著高于纤维环及软骨终板细胞,表明这两种 HIF-1 同分异构

体的表达差异可以用于髓核细胞与纤维环细胞以及软骨终板细胞的鉴别。Richardson 等^[8]检测了人正常以及退变椎间盘组织中 HIF-1 α 的表达情况,结果发现 HIF-1 α 仅表达于髓核细胞,表明 HIF-1 α 用于髓核细胞表型的鉴定具有可行性。王凯^[19]发现在正常及退变的髓核组织中均存在 HIF-1 α 的表达,且随着椎间盘退变程度的加重,HIF-1 α 的表达相应增加。

3 HIF 与髓核细胞的凋亡及生命活动

髓核细胞的存活与否对于椎间盘稳态以及功能的维持非常重要,椎间盘的局部微环境特征是氧分压低,但体外研究表明髓核细胞能够在低氧条件下存活且细胞活性功能完整^[10]。因此推测髓核细胞可能拥有在椎间盘低氧条件下维持其生存的某种机制。目前研究已经表明 Fas 及其配体可以传递死亡信号导致细胞凋亡,而从突出椎间盘组织中培养的细胞中已经发现了 Fas 及其配体的表达^[20]。半乳糖凝集素 3(galectin-3, gal-3)是 β 半乳糖苷结合动物凝集素家族的一员,研究表明其参与细胞黏附及凋亡的调节^[21]。Zeng 等^[22]研究鼠髓核细胞中 HIF-1 α 与 gal-3 启动子的相互作用,结果发现抑制 HIF-1 α 能够下调 gal-3 启动子的活性,进而引起 Fas 介导的髓核细胞凋亡的增加;而进一步的研究证实 HIF-1 α 与 gal-3 低氧反应元件(HRE)的结合以及 HRE 点突变能够完全阻断低氧诱导的 gal-3 启动子活性,表明 HIF-1 α 能够上调 gal-3 的表达进而抑制 Fas 介导的髓核细胞凋亡。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)在血管生长的生理及病理条件下均具有至关重要的作用^[23]。已有研究表明 VEGF 对于正常椎间盘组织活性及功能的维持非常重要^[23]。Fujita 等^[24]发现髓核细胞同时表达 VEGF-A 和 mbVEGFR-1(VEGF-A 受体的膜结合形式),而将 VEGF-A 的拮抗物 VEGFR-1-Fc 作用于髓核细胞则可引起髓核细胞的凋亡,这表明 VEGF-A/VEGFR-1 级联反应参与了髓核细胞抗凋亡功能的调节。Agrawal 等^[15]发现 HIF-1 α 和 HIF-2 α 在低氧条件下能够调节 cited2(p300 结合蛋白)启动子的活性而上调

cited2 的表达,而 cited2 表达的上调或抑制均会引起髓核细胞 VEGF 表达的变化。这些研究结果表明 HIF-1 和 HIF-2 可以通过调节 VEGF 的表达进而增强髓核细胞在椎间盘低氧条件下的生存能力。

在低氧条件下,髓核细胞的能量代谢几乎完全依赖于无氧糖酵解^[25]。HIF 在髓核细胞新陈代谢功能的维持中起到了重要的作用,HIF-1 作为重要的转录因子参与调节糖酵解中一系列基因的表达,同时还能够调节线粒体的能量代谢^[26]。研究表明低氧反应葡萄糖载体(glucose transporter, GLUT)对于促进髓核细胞的无氧糖酵解具有重要作用^[8]。在哺乳动物细胞中,GLUT 作为膜内在蛋白存在于细胞膜表面,其功能是通过弥散作用将葡萄糖沿浓度梯度进行转运^[8]。Richardson 等^[8]分析了人正常和退变椎间盘组织中 GLUT-1、GLUT-3、GLUT-9 和 HIF-1 α 的表达情况,结果表明 HIF-1 α 、GLUT-1、GLUT-3 和 GLUT-9 共同表达于人正常椎间盘组织中,在髓核细胞中 HIF-1 α 的表达上调与 GLUT-1、GLUT-3 和 GLUT-9 表达的增加有关,而在纤维环细胞中 HIF-1 α 的表达与 GLUT-1、GLUT-3 和 GLUT-9 的表达无关联性;此外,他们还发现随着椎间盘组织退变程度的增加 GLUT 的表达亦相应升高。综上所述,HIF-1 参与了髓核细胞在椎间盘低氧条件下新陈代谢功能的维持,这是通过调节 GLUT-1、GLUT-3 和 GLUT-9 表达来实现的。Ha 等^[27]研究证实退变椎间盘组织中 HIF-1 α 的表达增加,且其与髓核细胞的凋亡水平相关联,表明 HIF-1 α 的表达有利于椎间盘组织保持微环境的稳定。

4 HIF 与髓核细胞外基质的合成

椎间盘细胞仅占了成人椎间盘组织很小的体积分数,然而其对于椎间盘细胞外基质含量的稳定至关重要;而椎间盘细胞外基质的稳态有助于椎间盘功能的保持,其受椎间盘细胞合成以及分解代谢动态平衡机制的调节。椎间盘退变的重要特征即椎间盘细胞外基质修复与退变进程的失衡^[28]。椎间盘细胞外基质主要由蛋白聚糖和胶原组成,而纤维环与髓核组织的细胞外基质成分并不相同,髓核组织中富含蛋白聚糖成分,其能够使椎间盘抵抗轴向应力;而胶原成分使脊柱具备了伸屈活动的弹

性^[29]。已有研究表明 HIF-1 α 能够在基因和蛋白水平促进蛋白聚糖的合成^[29]。

椎间盘组织中另外一个重要的组分是糖胺聚糖,其对于髓核组织凝胶性状的保持非常重要^[30]。已知葡萄糖分子与大分子的合成有关^[8],而 HIF 也已被证实可以通过调节 GLUT 的表达促使髓核细胞对葡萄糖的摄取增加,这是通过增强细胞膜的弥散作用来实现的^[31]。从这个角度来讲,HIF-1 能够促进糖胺聚糖的合成。然而,对于 HIF 在糖胺聚糖合成中的作用仍然有不同的意见。Gogate 等^[32]通过检测 HIF-1 α 和 HIF-2 α 对 β -1,3 葡萄糖醛酸转移酶 1 (glucuronosyl transferase 1, GlcAT-1) 启动子活性的影响发现 HIF-1 α 和 HIF-2 α 能够通过与多种 HREs 结合来抑制 GlcAT-1 启动子的活性,而 GlcAT-1 正是硫酸软骨素(糖胺聚糖的主要成分)合成过程中的关键酶,表明 HIF 能够通过抑制 GlcAT-1 在基因水平的表达来发挥对髓核细胞外基质合成的调节作用。

5 HIF 与椎间盘细胞自噬

自噬与凋亡有着复杂的关系,在特定条件下,细胞通过自噬作用抑制凋亡以适应外界刺激,然而在某些因素作用下,自噬亦会引起细胞的凋亡。研究已经证实自噬在多种疾病的发生与进展中发挥了重要作用^[33-35]。有学者报道 HIF-1 α 可以通过诱导 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 的表达而减少细胞的凋亡^[36]。Bohensky 等^[37-38]研究发现 HIF-1 α 在软骨细胞的自噬调控中发挥重要作用,而在此过程中,软骨细胞自噬随着 HIF-2 α 表达下调以及 HIF-1 α 表达上调而相应增加。

髓核细胞在形态上与软骨细胞相类似,而且能表达 II 型胶原和蛋白聚糖,因此亦称为类软骨细胞^[39]。Ye 等^[40]报道 SD 大鼠腰椎间盘组织中细胞自噬随年龄增长而不断增加;而进一步研究发现,内质网应激对椎间盘细胞自噬的诱发具有重要作用。前述研究表明自噬在椎间盘退变病理进程中可能发挥了重要作用,然而自噬与 HIF 的关系尚需进一步的研究予以明确。

6 HIF 对髓核细胞外失营养性矿化的影响

在正常的健康个体中,矿化仅局限于坚硬组织

中以形成骨骼和牙齿,而在这些组织中,矿化物的生长和进展都有着精确的调控机制;然而,老龄化、外伤以及疾病可以引起软组织的营养不良性矿化^[41]。研究表明营养不良性矿化可能引起一系列疾病,如关节软骨的钙化导致骨关节炎、心血管系统的矿化导致动脉粥样硬化的加剧以及血管的阻塞等^[41]。

除此之外,椎间盘组织的钙化被认为可以引起或促进椎间盘退变的进展^[42]。软组织中细胞在调节矿化物沉积方面具有重要作用。细胞可能通过晶体成核作用促进细胞基质外的矿物质沉积,而在此过程中形成的基质囊泡释放退变产物导致细胞死亡^[41]。相反,研究亦表明细胞通过合成抑制因子可以阻止矿化的进展^[43]。令人惊奇的是,尽管椎间盘包含纤维蛋白和含水的细胞外基质成分,然而在正常的髓核组织中未发现钙化沉积,这说明髓核组织能调控营养不良性矿化、阻止钙化沉积^[44]。有学者提出矿物盐的沉积是通过 ANK 基因 (progressive ankylosis gene, Ank/ANKH) 进行调控的,ANK 是一种多通道跨膜蛋白,能够调控无机焦磷酸盐(营养不良性矿化的强力抑制因子)的运输^[45]。除此之外,还有研究表明 ANKH 的变异可以导致关节和骨骼的营养不良性矿化^[46]。Skubutyte 等^[47]研究成年鼠和新生鼠椎间盘组织中 ANK 的表达和分布情况,结果发现成年鼠椎间盘髓核组织中 ANK 的表达要显著高于新生鼠。此外,当 HIF-1 α 或 HIF-2 α 在髓核细胞中处于表达沉默状态时,ANK 可因低氧的诱导而出现 mRNA 和蛋白水平的表达增加;而且髓核细胞中 HIF-1 α 或 HIF-2 α 表达的增加可以抑制 ANK 的表达,表明 HIF 可以通过抑制 ANK 的表达从而调控髓核细胞中营养不良性矿化的发生。

7 结 论

研究 HIF 对髓核细胞功能的调控有助于阻止椎间盘退变的发生以及促进退变组织的再生修复。既往相关研究结果表明 HIF 在椎间盘细胞生理功能调节中发挥了重要的作用:首先,HIF 可以通过调控 gal-3、VEGF 以及 GLUT 的表达增强髓核细胞在椎间盘低氧条件下的生存能力;其次,HIF 能够调控糖胺聚糖合成过程中的关键酶来影响髓核细胞外基质的平衡;此外,HIF 还可以通过减少椎间盘细胞的自噬以及营养不良性矿化进而延缓椎间盘退变的

进展,维持椎间盘组织内环境的稳定。综上所述,HIF 可能成为治疗椎间盘退变性疾病的潜在靶点,通过调节髓核细胞的生物学功能来修复退变的椎间盘组织;而以 HIF 为靶点的药物可以最终通过增强髓核细胞的存活时间、维持髓核细胞的新陈代谢功能、促进髓核细胞外基质的合成、影响髓核细胞的营养不良性矿化以及调控细胞的自噬最终解决椎间盘退变这一临床难题。

[参考文献]

- [1] Manusov E G. Lowback pain diagnosis and treatment. Preface[J]. Prim Care, 2012, 39: xi-xii.
- [2] Kuru T, Yeldan I, Zengin A, Kostanoglu A, Tekeoglu A, Akbaba Y A, et al. [The prevalence of pain and different pain treatments in adults][J]. Agri, 2011, 23: 22-27.
- [3] Ciapetti G, Granchi D, Devescovi V, Leonardi E, Greggi T, Di Silvestre M, et al. *Ex vivo* observation of human intervertebral disc tissue and cells isolated from degenerated intervertebral discs[J]. Eur Spine J, 2012, 21(Suppl 1): S10-S19.
- [4] Erwin W M, DeSouza L, Funabashi M, Kawchuk G, Karim M Z, Kim S, et al. The biological basis of degenerative disc disease: proteomic and biomechanical analysis of the canine intervertebral disc[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17: 240.
- [5] Semenza G L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology[J]. Annu Rev Pathol, 2014, 9: 47-71.
- [6] Semenza G L. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease[J]. Annu Rev Physiol, 2014, 76: 39-56.
- [7] Zhao J, Zhang P, Qin L, Pan X H. Hypoxia is essential for bone-tendon junction healing: the molecular biological evidence[J]. Int Orthop, 2011, 35: 925-928.
- [8] Richardson S M, Knowles R, Tyler J, Mobasheri A, Hoyland J A. Expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-3, GLUT-9 and HIF-1 α in normal and degenerate human intervertebral disc [J]. Histochem Cell Biol, 2008, 129: 503-511.
- [9] Merceron C, Mangiavini L, Robling A. Loss of HIF-1 α in the notochord results in cell death and complete disappearance of the nucleus pulposus[J]. PLoS One,

- 2014, 9: e110768.
- [10] Chen J W, Li B, Yang Y H, Jiang S D, Jiang L S. Significance of hypoxia in the physiological function of intervertebral disc cells[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2014, 24:193-204.
- [11] Sakai D, Grad S. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 84: 159-171.
- [12] Eubank T D, Roda J M, Liu H, O'Neil T, Marsh C B. Opposing roles for HIF-1 α and HIF-2 α in the regulation of angiogenesis by mononuclear phagocytes [J]. *Blood*, 2011, 117: 323-332.
- [13] Zhu G Q, Tang Y L, Li L, Zheng M, Jiang J, Li X Y, et al. Hypoxia inducible factor 1 α and hypoxia inducible factor 2 α play distinct and functionally overlapping roles in oral squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16: 4732-4741.
- [14] Risbud M V, Guttapalli A, Stokes D G, Hawkins D, Danielson K G, Schaefer T P, et al. Nucleus pulposus cells express HIF-1 α under normoxic culture conditions: a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98: 152-159.
- [15] Agrawal A, Gajghate S, Smith H, Anderson D G, Albert T J, Shapiro I M, et al. Cited2 modulates hypoxia-inducible factor-dependent expression of vascular endothelial growth factor in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disc [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58: 3798-3808.
- [16] Madsen C D, Pedersen J T, Venning F A, Singh L B, Moendarbary E, Charras G, et al. Hypoxia and loss of PHD2 inactivate stromal fibroblasts to decrease tumour stiffness and metastasis [J]. *EMBO Rep*, 2015, 16: 1394-1408.
- [17] Fujita N, Chiba K, Shapiro I M, Risbud M V. 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: 401-412.
- [18] Rajpurohit R, Risbud M V, Ducheyne P, Vresilovic E J, Shapiro I M. Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: expression of hypoxia inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2[J]. *Cell Tissue Res*, 2002, 308: 401-407.
- [19] 王 凯. 人退变椎间盘髓核中 HIF-1 和 GLUT-1 表达相关性及其意义[D]. 荆州:长江大学,2013.
- [20] Stich S, Stolk M, Girod P P, Thomé C, Sittlinger M, Ringe J, et al. Regenerative and immunogenic characteristics of cultured nucleus pulposus cells from human cervical intervertebral discs [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0126954.
- [21] de Oliveira J T, Ribeiro C, Barros R, Gomes C, de Matos A J, Reis C A, et al. Hypoxia up-regulates galectin-3 in mammary tumor progression and metastasis[J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0134458.
- [22] Zeng Y, Danielson K G, Albert T J, Shapiro I M, Risbud M V. HIF-1 α is a regulator of galectin-3 expression in the intervertebral disc[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22: 1851-1861.
- [23] Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34: 1785-1788.
- [24] Fujita N, Imai J, Suzuki T, Yamada M, Ninomiya K, Miyamoto K, et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for nucleus pulposus cells in the intervertebral disc [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372: 367-372.
- [25] Malandrino A, Noailly J, Lacroix D. The effect of sustained compression on oxygen metabolic transport in the intervertebral disc decreases with degenerative changes[J]. *PLoS Comput Biol*, 2011, 7: e1002112.
- [26] Hwang H J, Lynn S G, Vengellur A, Saini Y, Grier E A, Ferguson-Miller S M, et al. Hypoxia inducible factors modulate mitochondrial oxygen consumption and transcriptional regulation of nuclear-encoded electron transport chain genes [J]. *Biochemistry*, 2015, 54: 3739-3748.
- [27] Ha K Y, Koh I J, Kirpalani P A, Kim Y Y, Cho Y K, Khang G S, et al. The expression of hypoxia inducible factor-1 α and apoptosis in herniated discs[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006, 31: 1309-1313.
- [28] Wang W J, Yu X H, Wang C, Yang W, He W S, Zhang S J, et al. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 448: 238-246.
- [29] Agrawal A, Guttapalli A, Narayan S, Albert T J, Shapiro I M, Risbud M V. Normoxic stabilization of HIF-1 α drives glycolytic metabolism and regulates aggrecan gene expression in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disk [J]. *Am J Physiol Cell*

- Physiol, 2007, 293: C621-C631.
- [30] Choy A T, Chan B P. A structurally and functionally biomimetic biphasic scaffold for intervertebral disc tissue engineering [J]. PLoS One, 2015, 10: e0131827.
- [31] Feng G, Li L, Liu H, Song Y, Huang F, Tu C, et al. Hypoxia differentially regulates human nucleus pulposus and annulus fibrosus cell extracellular matrix production in 3D scaffolds [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21: 582-588.
- [32] Gogate S S, Nasser R, Shapiro I M, Risbud M V. Hypoxic regulation of β -1, 3-glucuronyltransferase 1 expression in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disc: role of hypoxia-inducible factor proteins[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63: 1950-1960.
- [33] Choi K S. Autophagy and cancer [J]. Exp Mol Med, 2012, 44: 109-120.
- [34] Son J H, Shim J H, Kim K H, Ha J Y, Han J Y. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases [J]. Exp Mol Med, 2012, 44: 89-98.
- [35] Pierdominici M, Vomero M, Barbati C, Colasanti T, Maselli A, Vacirca D, et al. Role of autophagy in immunity and autoimmunity, with a special focus on systemic lupus erythematosus [J]. FASEB J, 2012, 26: 1400-1412.
- [36] Bohensky J, Shapiro I M, Leshinsky S, Terkhorn S P, Adams C S, Srinivas V. HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway[J]. Autophagy, 2007, 3: 207-214.
- [37] Bohensky J, Leshinsky S, Srinivas V, Shapiro I M. Chondrocyte autophagy is stimulated by HIF-1 dependent AMPK activation and mTOR suppression [J]. Pediatr Nephrol, 2010, 25: 633-642.
- [38] Bohensky J, Terkhorn S P, Freeman T A, Adams C S, Garcia J A, Shapiro I M, et al. Regulation of autophagy in human and murine cartilage: hypoxia-inducible factor 2 suppresses chondrocyte autophagy [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60: 1406-1415.
- [39] Gou S, Oxentenko S C, Eldrige J S, Xiao L, Pingree M J, Wang Z, et al. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2014, 93(11 Suppl 3): S122-S131.
- [40] Ye W, Xu K, Huang D, Liang A, Peng Y, Zhu W, et al. Age-related increases of macroautophagy and chaperone-mediated autophagy in rat nucleus pulposus [J]. Connect Tissue Res, 2011, 52: 472-478.
- [41] Golub E E. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology [J]. Semin Immunopathol, 2011, 33:409-417.
- [42] Melrose J, Burkhardt D, Taylor T K, Dillon C T, Read R, Cake M, et al. Calcification in the ovine intervertebral disc: a model of hydroxyapatite deposition disease[J]. Eur Spine J, 2009, 18: 479-489.
- [43] De Vilder E Y, Vanakker O M. From variome to phenome: pathogenesis, diagnosis and management of ectopic mineralization disorders [J]. World J Clin Cases, 2015, 3: 556-574.
- [44] Gurley K A, Chen H, Guenther C, Nguyen E T, Rountree R B, Schoor M, et al. Mineral formation in joints caused by complete or joint-specific loss of ANK function[J]. J Bone Miner Res, 2006, 21: 1238-1247.
- [45] Xu H G, Cheng J F, Peng H X, Lv K, Wang H, Liu P, et al. JNK phosphorylation promotes natural degeneration of cervical endplate chondrocytes by down-regulating expression of ANK[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17: 2335-2344.
- [46] Xu H G, Zhang X H, Wang H, Liu P, Wang L T, Zuo C J, et al. Intermittent cyclic mechanical tension-induced calcification and downregulation of ankh gene expression of end plate chondrocytes[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2012, 37: 1192-1197.
- [47] Skubutyte R, Markova D, Freeman T A, Anderson D G, Dion A S, Williams C J, et al. Hypoxia-inducible factor regulation of ANK expression in nucleus pulposus cells: possible implications in controlling dystrophic mineralization in the intervertebral disc[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62: 2707-2715.