基础研究

A20 介导 TNF-α 炎症微环境下髓核细胞衰老的机制研究

彭 鑫, 张 聪, 王 锋, 朱 磊, 樊 攀, 高佳伟, 俞皓闽, 吴小涛
(东南大学附属中大医院脊柱外科中心东南大学医学院 210009 南京市)

【摘要】目的:探讨锌指蛋白 A20[也称为肿瘤坏死因子诱导蛋白 3(tumor necrosis factor-induced protein 3, TNFAIP3)]在肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α, TNF-α)炎症微环境下髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)衰老发生机制。**方法**:体外分离培养 SD 大鼠髓核细胞。实验分为三组:正常对照组(只加入正常培养基)、TNF-α 干预组(加入不同浓度的 TNF-α, 10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml)和自然衰老组(在体外通过细胞不断增长传代至 P20 代)。应用 CCK-8 细胞增殖实验、β 半乳糖苷酶染色、Western blot(WB)、QT-PCR、immunofluorescence(IF)从基因、蛋白及细胞功能水平评估髓核细胞衰老变化。应用 WB、QT-PCR 和 IF 检测锌指蛋白 A20、NF-κB(p65)、NF-kB(p-p65/phospho S536)表达情况。**结果**:与正常对照组相比, TNF-α 干预 48h、72h 后髓核细胞的增殖能力明显降低;TNF-α 干预组和衰老组 β 半乳糖染色阳性率较对照组明显增高;QT-PCR 结果提示, 与对照组比, TNF-α 干预组 p53 表达增加(P<0.05), 而 A20 表达随着 TNF-α 浓度增高而降低;衰老组 A20 表达较对照组减少, 而 p53 扩增升高。WB 检测显示:TNF-α 可以诱导 p53、A20、p-p65 表达上调, 而 A20 表达随着 TNF-α 浓度增加而降低;同时衰老组 A20 表达较对照组减少, 而 p-p65 和 p53 表达增加(P<0.05);IF 显示:与对照组对比, TNF-α 处理下 A20、p-p65 表达增加, 但是 A20 的表达随着 TNF-α 增加而降低, 衰老组 A20 较对照组也明显降低, p-p65 表达增加。**结论**:髓核细胞衰老程度与 TNF-α 干预存在剂量关系, TNF-α 可以刺激髓核细胞 A20 表达升高, 并激活 NF-κB 信号通路。而 A20 表达情况受细胞衰老程度影响, 随着髓核细胞衰老 A20 所参与的作用效能逐渐减低。

【关键词】髓核细胞;锌指蛋白 A20;肿瘤坏死因子 α;炎症反应;细胞衰老
doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.09.09
中图分类号:R681.5, Q786 **文献标识码**:A **文章编号**:1004-406X(2019)-09-0834-07

Mechanism research of senescence of NP cells mediated by A20 in TNF-α inflammation microenvironment/PENG Xin, ZHANG Cong, WANG Feng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(9): 834-840

【Abstract】Objectives: To investigate the mechanism of zinc finger protein A20(also known as tumor necrosis factor-inducible protein 3, TNFAIP3) involved in the senescence of nucleus pulposus cells(NPCs) in the tumor necrosis factor α(TNF-α) inflammatory microenvironment. **Methods:** Isolated NPCs of sprague-dawley rat (SD) were cultured with or without TNF-α in vitro. The experiment was divided into three groups: normal control group(0ng/ml), TNF-α intervention group(10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml), and natural aging group(p20 generation). CCK-8 cell proliferation assay, β-galactosidase staining, Western blot(WB), QT-PCR and immunofluorescence (IF) were used to assess senescence changes in NP cells from genes, proteins and cell function levels. The expressions of p53, A20, NF-kB(p65) and NF-kB (p-p65/phospho S536) were observed by Western Blotting, QT-PCR and IF. **Results:** Compared with the normal control group, the proliferation ability of NP cells significantly decreased after TNF-α intervention for 48h and 72h. The positive rate of β-galactose staining in the TNF-α intervention group and the aging group was significantly higher than that of the control group. The results of QT-PCR demonstrated that compared with the control group, the expression of p53 in the

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:6590000248)
第一作者简介:男(1994-), 在读硕士研究生, 研究方向:脊柱退行性病变的基础与临床
电话:(025)83262334 E-mail:jinlingpengxin@163.com
通讯作者:吴小涛 E-mail:wuxiaotaospine@seu.edu.cn

TNF-α intervention group increased (P<0.05), while the expression of A20 decreased with the increase of TNF-α concentration. The expression of A20 in the aging group decreased compared with that in the control group, while p53 expansion increased. WB showed that TNF-α could induce up-regulated expressions of p53, A20 and p-p65, while the expression of A20 decreased with the increase of TNF-αconcentration. Meanwhile, the expression of A20 in the aging group decreased compared with that in the control group, while the expression of p-p65 and p53 increased (P<0.05). IF showed that compared with the control group, the expressions of A20 and p-p65 increased with TNF-α treatment, but the expression of A20 decreased with the increase of TNF-α. The A20 of aging group also decreased significantly and the expression of p-p65 increased. **Conclusions:** There is a dose relationship between senescence of NP cells and TNF-α intervention. TNF-α can stimulate the expression of A20 in NP cells and activate NF-κB signaling pathway. In addition, the expression of A20 is affected by the degree of cellular senescence, with aging of NP cells, the mechanism of action of A20 is decreasing.

【Key words】 Nucleus pulposus cells; Zinc finger protein A20; TNF-α: Inflammatory response; Cell senescence

【Author's address】 Spinal Surgery Center of Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University Southeast university Medical College, 210009, Nanjing, China

腰痛(low back pain,LBP)是骨科常见疾病,椎间盘退变是其主要原因之一[1],不但影响患者生活质量,而且增加了社会经济负担[2]。在椎间盘退变过程中,髓核(nucleus pulposus,NP)区域首先表现出退行性变化,这在一定程度上与髓核细胞外基质的分子变化有关[3,4]。已证实退行性的椎间盘内存在衰老的髓核细胞,而且髓核细胞衰老随着椎间盘退变的进展而加剧[5,6]。在椎间盘退变中,炎症反应在髓核区域内也是非常明显的[7],并发现炎症因子 TNF-α 在退变的椎间盘中表达升高[8,9]。TNF-α 可以激活核转录因子 κB(nuclear transcription factor-kB,NF-κB)信号通路,导致髓核细胞衰老退变[10~12]。可见炎症反应在椎间盘退变的病程中发挥一定作用,故推测通过抑制炎症反应的发生可有效减缓椎间盘退变的进程,为临床治疗椎间盘突出症提供了新方向。

锌指蛋白 A20 最初在人脐静脉内皮细胞中被发现,其是一种能抑制核转录因子-κB (NF-κB)活性的泛素化修饰酶,在体内炎症反应中发挥负性调节作用[13,14]。已有研究证实 A20 在肺损伤、神经系统炎症、狼疮肾炎等疾病中发挥一定的保护作用[15~17]。A20 蛋白表达水平升高受多种因素影响,其中有脂多糖(LPS)、IL-1 和 TNF-α 刺激作用下 NF-κB 激活[18,19]。目前已证实 A20 可以减弱 LPS 干预诱导的椎间盘老化[20],但是关于 A20 在椎间盘退变中的作用及其在 TNF-α 干预下髓核细胞老化发生发展机制尚未见报道。基于此,本文拟研究 TNF-α 干预和复制性髓核细胞老化后 A20 表达及 NF-κB 通路相关分子,并为进一步明确 A20 在椎间盘退变中的相关分子机制进行实验探索。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂与仪器

SD 大鼠(10 只,4 周,雄性,95~105g,本研究通过动物伦理委员会批准,动物合格证编号:NO.201824643)。

NPCs 细胞培养基(DMEM/F12,含 10%FBS、1%青霉素和链霉素双抗);Ⅱ型胶原酶(0.25%);胰酶(0.25%);CCK-8 增值检测试剂盒(南京凯基);细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色(碧云天,C0602);重组人 TNF-α(碧云天,P5318);相关抗体(表 1);全蛋白抽提试剂盒(凯基,KGP2100);BCA 试剂盒(凯基,KGP902);SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒(塞维尔,G2037);TaKaRa Mini-BEST Universal RNA Extraction Kit (TaKaRa,9767);SYBR Green(Vazyme,Q341-02)。

表 1 蛋白印迹和免疫荧光所用抗体

Table 1 The antibodies of Western Blotting and IF

	抗体公司,产品编号,用量 Antibody Company, product number, dosage
p53	Cell signaling,32532,(1:1000)
A20(TNFAIP3)	Cell signaling,5630,(1:1000)
TNFAIP3	Bioss,bs-2803R,(1:100-1:500)
p-p65	Abcam,ab86299,(1:2000-1:10000)
P65	Cell signaling,(1:1000)
β-actin	Servicebio,GB11001,(1:2000)

激光共聚焦显微镜(OLYMPUS,日本)、qPCR仪(Thermo,美国)、全自动酶标仪(Thermo,美国)、电泳仪(BioRad,美国)、曝光仪(北京赛智)、高速离心机(Eppendorf,德国)。

1.2 细胞提取、培养及传代

10%水合氯醛麻醉大鼠,取大鼠尾巴,碘伏浸泡 5min;在无菌操作台中切开椎间盘,见白色凝胶样物质即为髓核组织,取髓核组织放入 0.25%的Ⅱ型胶原酶中,37℃、摇床 3h;移去胶原酶,加入培养基 4ml,37℃、饱和湿度、5% CO_2 细胞培养箱中,每 3d 换液,倒置相差显微镜观察细胞状况,待细胞生长 80%融合时,1:2 传代。

1.3 CCK-8 检测 TNF-α 处理后的髓核细胞增殖活力

NPCs 种植于 96 孔板中,2×10^3 个/每孔,每孔总体积 100μl;用 TNF-α(0、10、50、100 及 500ng/ml)干预,分别在 24h、48h、72h 特定时间点,每孔加入 10μl CCK-8 工作液,孵育 4h 后酶标仪检测每个孔在 450nm 处吸光度值。

1.4 β 半乳糖苷酶染色检测细胞衰老

NPCs 种植于 6 孔板,分为对照组(0ng/ml)、TNF-α 干预组和衰老组(P20 代);移去培养液,PBS 冲洗 1 次,室温固定 20min,PBS 洗 3min/3 次;每孔加入 1ml 染色液,用保鲜膜封闭,37℃孵育过夜;次日显微镜下观察阳性细胞。

1.5 Real-time PCR 检测基因表达

按照 RNA 提取试剂盒说明书提取对照组、TNF-α 干预组和衰老组 RNA,逆转录,在 PCR 仪中进行扩增,利用 StepOne Software v2.3 软件进行分析。各基因引物序列见表 2。

1.6 Western Blot 检测蛋白表达

按说明书抽提对照组、TNF-α 干预组和衰老组细胞全蛋白,BCA 法检测蛋白浓度;热变性后取相同质量的样品,10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭 1h,孵育一抗,4℃过夜;次日加入二抗(1:2000)室温孵育 1h,曝光,拍照。

表 2 各基因引物序列表

Table 2 Primer sequence of each gene

基因 Gene	引物序列 Primer sequences
P53	F: 5′-CCCCTGAAGACTGGATAACTGT-3′
	R: 5′-TCTCCTGACTCAGAGGGAGC-3′
A20	F: 5′-GTGGCGAAGCATACAACTGA-3′
	R: 5′-GGTCGTGGTTCGGGTCG-3′
β-actin	F: 5′-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3′
	R: 5′-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3′

1.7 免疫荧光染色

NPCs 种植于爬片上,TNF-α 干预 48h 后 PBS 冲洗,室温固定 15min,PBS 洗 3min/3 次;室温通透 20min,PBS 洗 3min/3 次,封闭 1h;吸干封闭液,不洗,一抗 4℃孵育过夜;次日 37℃复温 45min,PBS 洗 3min/3 次,吸干液体,滴加二抗,室温湿盒孵育 1h,PBS 洗 3min/3 次;复染核孵育 5min,PBS 洗 3min/3 次;吸干液体,封片液封片,最后荧光显微镜下观察。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料采用均数($\bar{x}\pm s$)标准差形式表示,每样本重复 3 次,多组间的均数比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组间的均数比较使用独立样本 t 检验,检验水准(α)以 $P<0.05$。

2 结果

2.1 髓核细胞形态特征

原代髓核细胞贴壁效率低呈簇生长且生长缓慢,大约需要 4d 贴壁,传代后的髓核细胞生长速度较快,形态相对均一,呈短梭形,细胞轮廓清晰(图 1a)。

2.2 CCK-8 检测髓核细胞增殖活力

与对照组相比,仅 TNF-α(10ng/ml、100ng/ml)干预 24h 后髓核细胞增殖活力无统计学意义;其余 TNF-α 干预后的髓核细胞增殖活性降低($P<0.05$),后续实验选择干预时间为 48h(图 1b)。

2.3 SA-β-Gal 染色检测髓核细胞老化率

与正常对照组比,TNF-α 干预组和衰老组 β 半乳糖苷酶染色阳性比例增加,差异具有显著统计学意义($P<0.05$);随着 TNF-α 干预浓度增加,细胞 β 半乳糖苷酶染色阳性率上升($P<0.05$)(图 1c)。

2.4 Real-time PCR 检测 A20、p53 扩增情况

与对照组比,TNF-α(10ng/ml、50ng/ml)干预 48h 后 A20 基因扩增明显增加,统计学意义显著($P<0.05$),TNF-α(100ng/ml)干预后 A20 变化无统计学意义;而 p53 基因扩增随着 TNF-α 浓度的增加而上升,统计学意义明显($P<0.05$);衰老组 A20 扩增降低,p53 增加且均具有统计学意义($P<0.05$)(图 2a)。

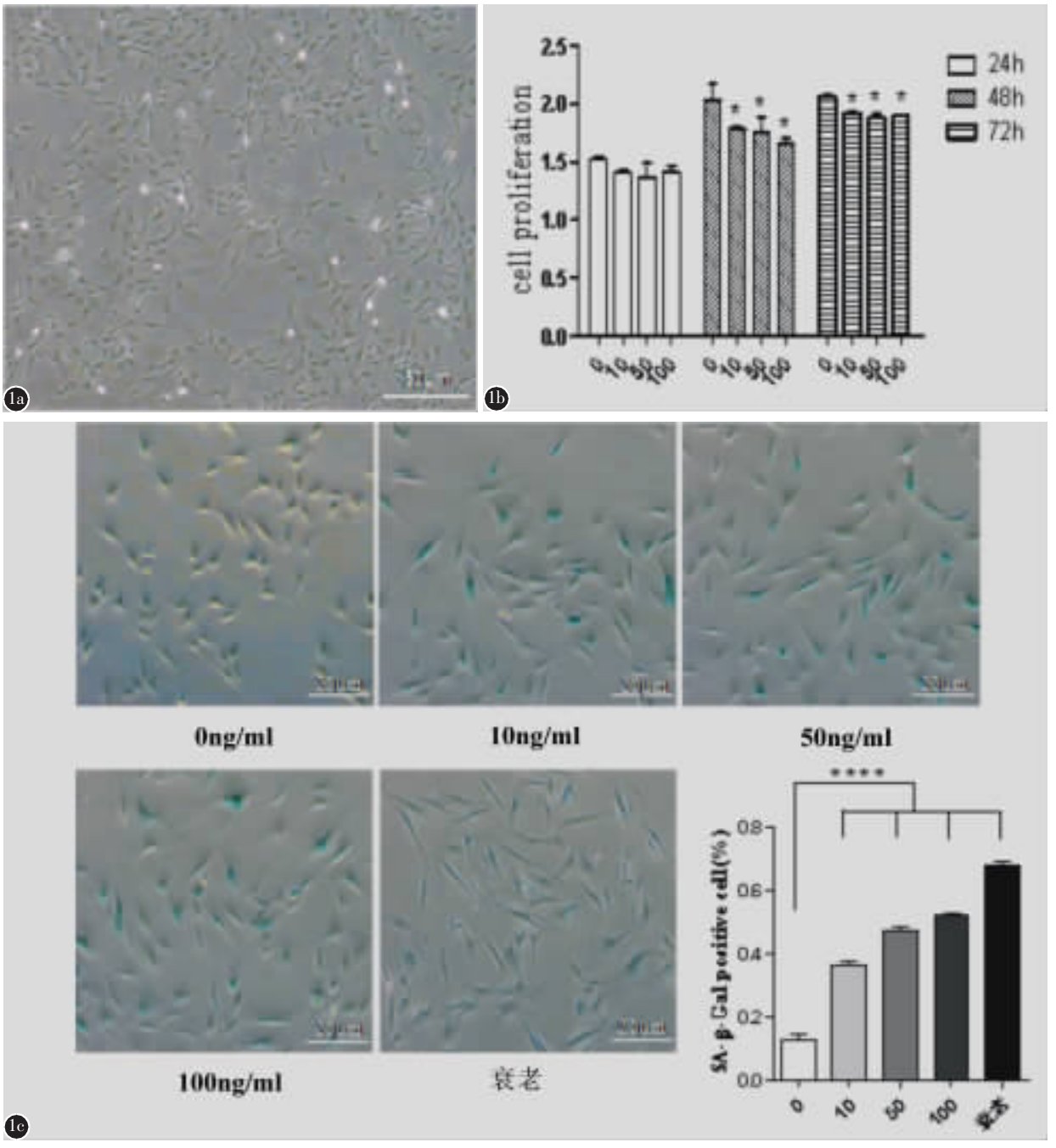


图 1 **a** P3 代正常髓核细胞 **b** CCK8 检测在 TNF-α 干预 48h、72h 后髓核细胞的增殖活力较对照组减弱明显 **c** β 半乳糖苷酶染色：TNF-α 干预组和衰老组 β 半乳糖染色阳性率较对照组明显增高

Figure 1 **a** Normal nucleus pulposus cells P3 **b** CCK-8 assay show that Cell viability of NPCs was significantly weaker than that of the control groupafter 48h and 72h of TNF-α intervention **c** Senescence-associated β-galactosidase staining of NPCs: the positive rate of β-galactose staining in TNF-α intervention group and aging group was significantly higher than that of the control group

2.5 Western blot 检测 A20、p-p65 等相关蛋白

与对照组比，随着 TNF-α 干预浓度增加，p53、p-p65 逐渐增高（$P<0.05$），而 A20 在 TNF-α（10ng/ml）时表达增加（$P<0.05$），但是随着 TNF-α 浓度增加，A20 表达有降低趋势，在 TNF-α（100ng/ml）时，细胞 A20 表达与对照组无显著差异；此外，衰老组 A20 表达减少，p53 表达增加（$P<0.05$）（图 2b）。

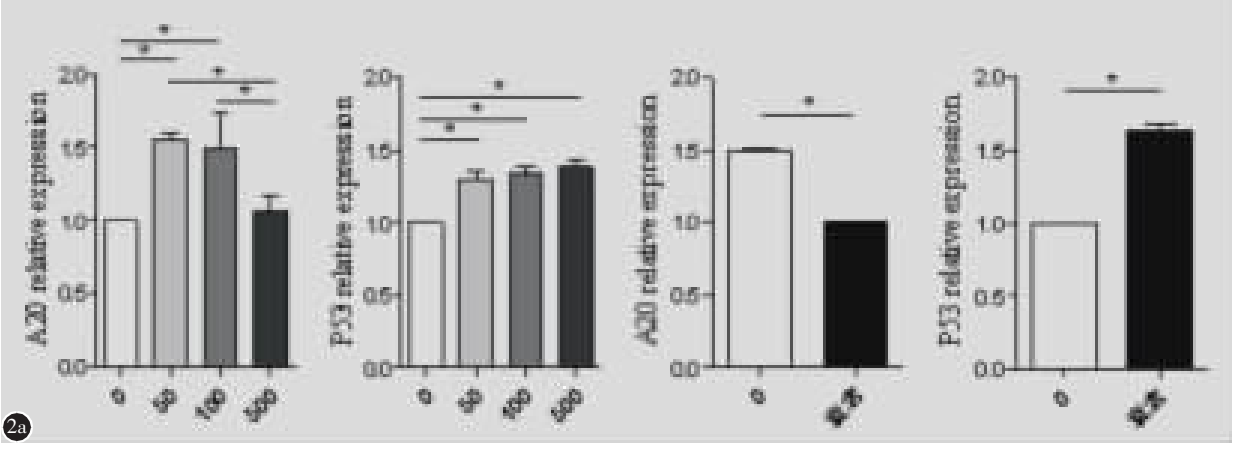
2.6 免疫荧光检测髓核细胞内 A20、p-p65 表达

与对照组相比，免疫荧光检测提示 TNF-α 干预组髓核细胞内锌指蛋白 A20 表达上调，然随着 TNF-α 浓度增加，A20 表达有下降趋势；p-p65 的表达也随着 TNF-α 干预浓度升高而增加；此外，衰老组 A20 表达较对照组降低而 p-p65 的表达升高明显（图 3、4）。

3 讨论

椎间盘退变是引起临床上慢性腰腿痛及神经根疼痛的重要原因之一，它受衰老，损伤，氧化应激等多种因素的影响，而炎症因子表达增加是椎间盘退变的一个重要标志[21]。椎间盘的退变、修复与多种炎症因子有关，研究表明 TNF-α 可增强组织金属蛋白酶（MMP）活性来减少Ⅱ型胶原和蛋白多糖的合成，并介导髓核细胞凋亡，引起椎间盘退变[22]。

锌指蛋白 A20 是一个可有效抑制 NF-κB 通路活化的胞质蛋白，并且激活 NF-κB 通路的因素几乎均能使 A20 表达增高[23]。TNF-α 是导致 A20 表达升高的一个重要因素，为了观察 A20 与髓核细胞衰老是否存在联系。在实验中，首先利用不同浓度 TNF-α 干预髓核细胞诱导细胞衰老，TNF-α 干预后细胞衰老相关指标（p53、β 半乳糖苷酶染色）较对照组增加显著（$P<0.05$）。研究发现 A20 的表达在 TNF-α（10ng/ml）干预后明显增加，但是随着 TNF-α 浓度增加，细胞衰老程度增加，p-p65 也表达明显升高（$P<0.05$），而 A20 的表达反而降低，同时，对照组和衰老组（p20 代）相比，衰老组的 p-p65 表达增加，A20 表达较对照组明显减少（$P<0.05$）。提示与对照组比，高浓度 TNF-α 组（100ng/ml）和衰老组 A20 表达减少，低浓度 TNF-α 组（10ng/ml）A20 表达明显增加。可知 A20 的表达与细胞状态有关，随着细胞老化程度增加，A20



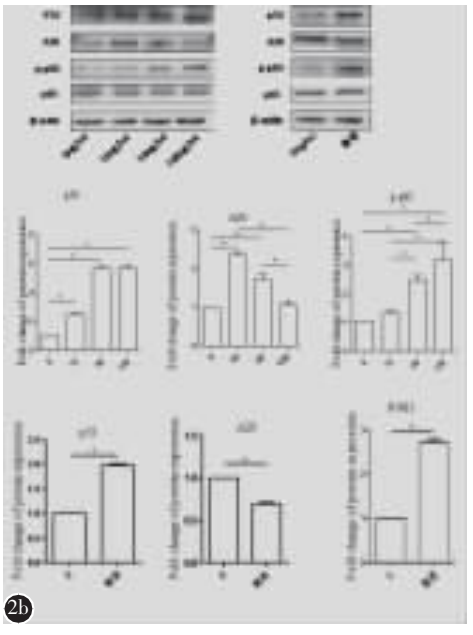


图 2 **a** QT- PCR 检测与对照组比，TNF-α 干预组 p53 表达增加（$P<0.05$），而 A20 表达随着 TNF-α 浓度增高而降低；衰老组 A20 表达较对照组减少，而 p53 扩增升高 **b** TNF-α 可以诱导 p53、A20、p-p65 表达上调，而 A20 表达随着 TNF-α 浓度增加而降低；同时衰老组 A20 表达较对照组减少，而 p-p65 和 p53 表达增加（$P<0.05$）

Figure 2 **a** QT-PCR demonstrated that compared with the control group, the expression of p53 in the TNF-α intervention group increased ($P<0.05$), while the expression of A20 decreased with the increase of TNF-α concentration. The expression of A20 in the aging group decreased compared with the control group, while p53 expansion Increased **b** Western blot analysis showed that TNF-α could induce up-regulated expressions of p53, A20 and p-p65, while the expression of A20 decreased with the increase of TNF-αconcentration. Meanwhile, the expression of A20 in the aging group was decreased compared with that in the control group, while the expression of p-p65 and p53 increased($P<0.05$)

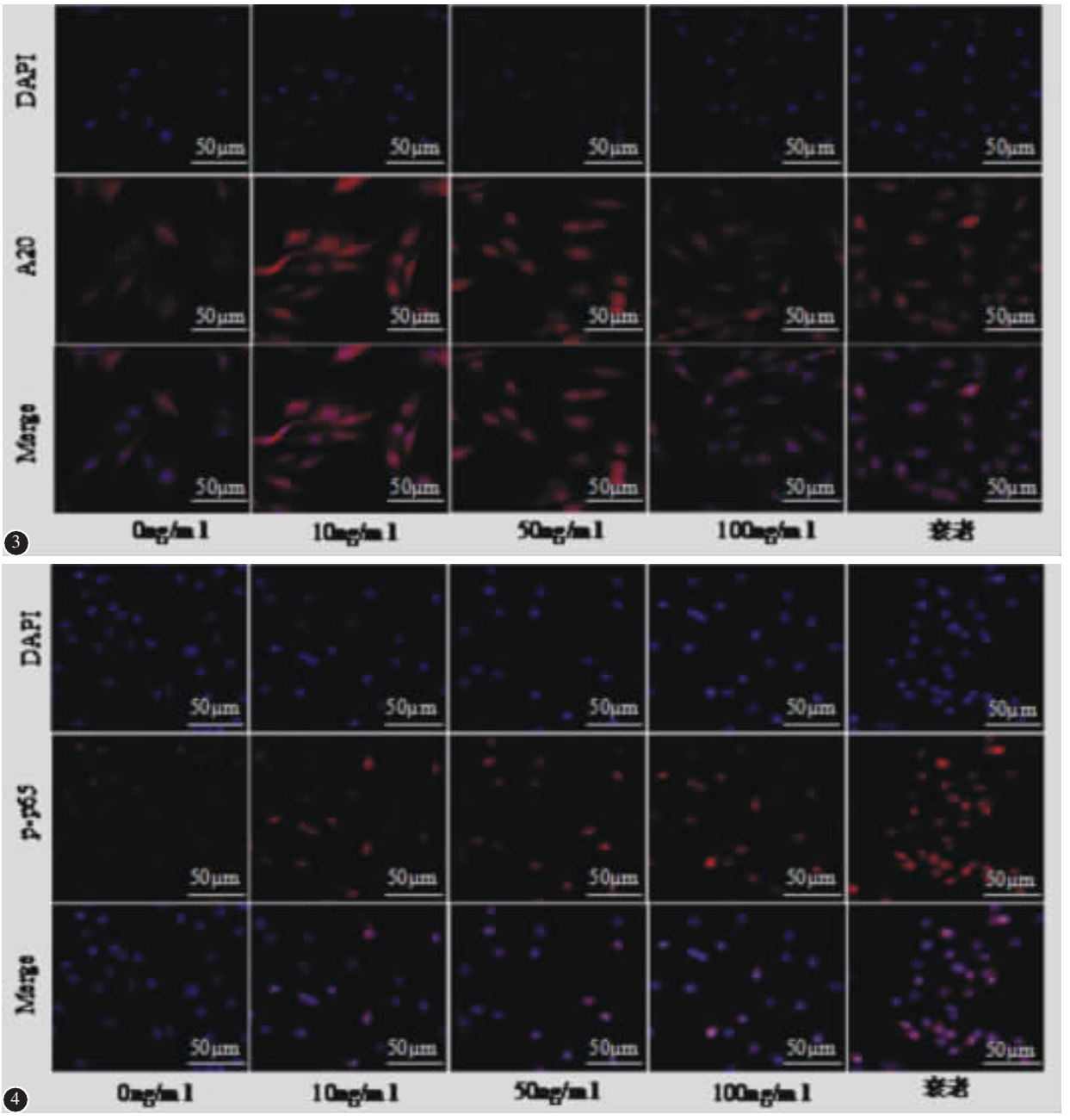


图 3、4 细胞免疫荧光检测结果(×400,蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核,红色荧光代表 A20,p-p65);与对照组对比,TNF-α 处理下 A20、p-p65 表达增加,但是 A20 的表达随着 TNF-α 增加而降低,衰老组 A20 较对照组也明显降低,p-p65 表达增加

Figure 3, 4 Immunofluorescence staining (A20, P-P65 showed red while nucleus counter stained with DAPI turned blue): compared with the control group, the expression of A20 and p-p65 increased with TNF-α treatment, but the expression of A20 decreased with the increase of TNF-α. The A20 of aging group also decreased significantly and the expression of p-p65 increased

表达逐渐减少,A20 可能在细胞衰老中发挥一种代偿作用。此外,TNF-α 诱导髓核细胞衰老同时活化 NF-κB 通路,并且随着髓核细胞衰老 NF-κB 信号通路活化增强,但 A20 表达反而降低。已研究证实 A20 与 NF-κB 信号通路之间存在负反馈环[24],NF-κB 通路也参与髓核细胞衰老过程。

综上所述,可知复制性衰老髓核细胞较对照组髓核细胞中 A20 表达降低,p-p65 表达增加,故 A20 在正常复制衰老髓核细胞过程中与 NF-κB 通路存在一定负性调控关系。低浓度 TNF-α 诱导

髓核细胞衰老同时使细胞 A20 表达增加，高浓度的 TNf-α 诱导细胞衰老后 A20 表达反而减少，故认为 A20 的表达在衰老细胞中存在一个平衡点，当细胞衰老达到一定程度时 A20 表达减少。然而，髓核细胞衰老是一个复杂的整体的过程，A20 表达的诱导因素也较多，不能单单因为一个因素的改变做出肯定的判断。在 TNF-α 微环境下髓核细胞 A20 与 p-p65 的关系也需进一步研究确定。本研究为从 A20 介导 TNF-α 微环境下髓核细胞老化提供新的机制认识，也为将来退变生物学修复打下实验理论基础。

4 参考文献

1. Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain [J]. Rheumatology (Oxford), 2009, 48(1): 5-10.
2. Luo X, Pietrobon R, Sun SX, et al. Estimates and patterns of direct health care expenditures among individuals with back pain in the United States[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2004, 29 (1): 79-86.
3. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, et al. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science [J]. Spine, 2002, 27(23): 2631-2644.
4. 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.
5. Roberts S, Evans EH, Kletsas D, et al. Senescence in human intervertebral discs[J]. Eur Spine J, 2006, 15(Suppl 3): S312-S316.
6. 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.
7. Johnson Z, Schoepflin Z, Choi H, et al. Disc in flames: roles of TNF-alpha and IL-1beta in intervertebral disc degeneration[J]. Eur Cell Mater, 2015, 30: 104-116.
8. Weiler C, Nerlich AG, Bachmeier BE, et al. Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2005, 30(1): 44-53, 54.
9. Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, et al. Increased IL-17 expression in degenerated human discs and increased production in cultured annulus cells exposed to IL-1ss and TNF-alpha[J]. Biotech Histochem, 2013, 88(6): 302-310.
10. Ham B, Fernandez MC, D'Costa Z, et al. The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis [J]. Trends Cancer Res, 2016, 11(1): 1-27.
11. Li P, Gan Y, Xu Y, et al. 17beta-estradiol attenuates TNF-alpha-induced premature senescence of nucleus pulposus cells through regulating the ROS/NF-kappaB pathway[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(2): 145-156.
12. Li P, Gan Y, Xu Y, et al. The inflammatory cytokine TNF-alpha promotes the premature senescence of rat nucleus pulposus cells via the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 42938.
13. Shembade N, Harhaj E. A20 inhibition of NFkappaB and inflammation: targeting E2:E3 ubiquitin enzyme complexes [J]. Cell Cycle, 2010, 9(13): 2481-2482.
14. Lee EG, Boone DL, Chai S, et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice[J]. Science, 2000, 289(5488): 2350-2354.
15. Sun L, Zou LX, Han YC, et al. A20 overexpression exerts protective effects on podocyte injury in lupus nephritis by downregulating UCH-L1[J]. J Cell Physiol, 2019.
16. Li Z, Chu S, He W, et al. A20 as a novel target for the anti-neuroinflammatory effect of chrysin via inhibition of NF-kappaB signaling pathway[J]. Brain Behav Immun, 2019, 79: 228-235.
17. Gao D, Liu F, Li Z, et al. Isobavachalcone attenuates Sephadex-induced lung injury via activation of A20 and NRF2/HO-1 in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 848: 49-54.
18. Beyaert R, Heyninck K, Van Huffel S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(8): 1143-1151.
19. Laherty C, Perkins N, Dixit VM. Human T cell leukemia virus type I tax and phorbol12-myristate 13-acetate induce expression of the A20 zinc finger protein by distinct mechanisms involving nuclear factor KB[J]. 1993, 268(7): 5032-5039.
20. 蓝海洋, 杨智杰, 夏辉强, 等. 锌指蛋白 A20 对内毒素刺激时人椎间盘髓核细胞炎症及退变的影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(6): 543-548.
21. Vo NV, Hartman RA, Patil PR, et al. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs [J]. J Orthop Res, 2016, 34(8): 1289-1306.
22. Molinos M, Almeida C, Caldeira J, et al. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration[J]. J R Soc Interface, 2015, 12(104): 20141191.
23. Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes[J]. Science, 2010, 327(5969): 1135-1139.
24. Verstrepen L, Verhelst K, van Loo G, et al. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3)[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(12): 2009-2020.

（收稿日期：2019-03-20 修回日期：2019-06-06）
（英文编审 郑国权/贾丹彤）
（本文编辑 彭向峰）