

研究论文

17 β -雌二醇通过PI3K/Akt/mTOR通路抑制白介素1 β 诱导的大鼠椎间盘髓核细胞的凋亡

郭洪涛, 郭尔斐, 徐建杰, 张斌, 高雁冰, 武建忠*

石家庄市第一医院脊柱外科, 石家庄 050011

摘要: 髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)的异常凋亡是导致椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IVDD)的主要原因。本研究组前期研究显示, 17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E₂)能够通过PI3K/Akt信号通路抑制白介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)诱导的大鼠椎间盘NPCs凋亡。本研究旨在探讨PI3K/Akt途径的下游蛋白是否参与E₂对NPCs凋亡的抑制作用。用胰蛋白酶消化法分离原代大鼠NPCs, 采用E₂和PI3K/Akt信号通路下游蛋白的不同抑制剂预处理后用IL-1 β 处理, 用Annexin V/PI染色法检测凋亡率, 用CCK-8法检测细胞活力, 用细胞黏附试验检测NPCs与II型胶原的黏附能力, 用Western blot检测哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of Rapamycin, mTOR)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)和核因子 κ B (nuclear factor kappaB, NF- κ B)磷酸化水平。结果显示, E₂显著抑制IL-1 β 诱导的NPCs凋亡, 逆转由IL-1 β 引起的细胞活力和黏附能力的降低, 抑制IL-1 β 对mTOR磷酸化水平的下调作用, 而雷帕霉素可以阻断E₂的这些保护作用。以上结果提示, E₂可能通过PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制IL-1 β 诱导的NPCs凋亡。

关键词: 17 β -雌二醇; 髓核细胞; mTOR; 白介素1 β ; 凋亡**中图分类号:** R34

17 β -estradiol inhibits interleukin-1 β -induced rat nucleus pulposus cell apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR signal pathway

GUO Hong-Tao, GUO Er-Fei, XU Jian-Jie, ZHANG Bin, GAO Yan-Bing, WU Jian-Zhong*

Department of Spinal Surgery, Shijiazhuang first hospital, Shijiazhuang 050011, China

Abstract: The apoptosis of nucleus pulposus cells (NPCs) is the main cellular process of intervertebral disc degeneration (IVDD). Our previous studies showed that 17 β -estradiol (E₂) protects rat NPCs from interleukin-1 β (IL-1 β)-induced apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway. This study was aimed to investigate whether downstream proteins of PI3K/Akt pathway were involved in inhibition of E₂ on NPCs' apoptosis. Primary culture of rat NPCs was isolated by trypsin digestion. Being pretreated with E₂ and different inhibitors of downstream proteins of PI3K/Akt pathway, the NPCs were treated with IL-1 β . Cellular apoptosis was detected by Annexin V/PI staining. Cell viability was detected by CCK-8. Cell adhesion was evaluated by cell-collagen binding assay. Phosphorylation levels of mammalian target of Rapamycin (mTOR), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and nuclear factor κ B (NF- κ B) were detected by Western blot. The results showed that E₂ significantly inhibited the IL-1 β -induced apoptosis of NPCs, reversed the decrease of cell viability and adhesion induced by IL-1 β , and inhibited the down-regulation of mTOR phosphorylation level induced by IL-1 β . Rapamycin could block these protective effects of E₂. These results suggest that E₂ may inhibit IL-1 β -induced NPCs' apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

Key words: 17 β -estradiol; nucleus pulposus cells; mTOR; interleukin-1 β ; apoptosis

Received 2020-03-03 Accepted 2020-08-17

This work was supported by the Fund Project of Health Commission of Hebei Province, China (No. 20180999).

*Corresponding author. E-mail: 2085561950@qq.com

临床上, 椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IVDD) 可引起下腰痛及椎间盘突出, 导致患者生活质量下降, 尤其是处于绝经期的老年女性^[1]。已有研究报道^[2, 3], 椎间盘细胞的异常凋亡在 IVDD 过程中扮演了关键角色, 因此, 有效地抑制细胞异常凋亡的进展可能会有效延缓 IVDD 进程。已有大量文献报道了 17 β -雌二醇 (17 β -estradiol, E₂) 具有抗细胞凋亡的能力^[4-6], 其作用机制是上调整合蛋白表达水平并增强细胞与胞外基质大分子层黏连蛋白-1 的黏附作用^[7], 也与 E₂ 上调抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-XL 表达水平^[8] 及凋亡受体的基因转录^[9] 有关。

本研究组前期报道了 E₂ 可以有效抑制左氧氟沙星诱导的大鼠纤维环细胞的凋亡^[10], 而且本研究组研究显示, E₂ 通过下调基质金属蛋白酶-3 和 13 的表达水平抑制白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 诱导的髓核细胞 (nucleus pulposus cells, NPCs) 的异常凋亡^[11], 活化的 PI3K/Akt 信号转导通路在 E₂ 抑制大鼠椎间盘 NPCs 凋亡的过程中通过抑制 cleaved-Caspase-3 的表达水平发挥作用^[6, 12]。然而, PI3K/Akt 通路激活后抑制椎间盘 NPCs 凋亡的下游信号通路尚不清楚。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of Rapamycin, mTOR)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 和核因子 κ B (nuclear factor kappaB, NF- κ B) 是 PI3K/Akt 下游信号通路中的关键蛋白^[13-15], 可以被其特异性抑制剂 (分别为雷帕霉素、SB216763、SC75741) 所抑制。我们猜想这三种信号通路蛋白可能参与 E₂ 延缓 IVDD 的发展, 为了验证这一猜想, 本研究采用了这三种蛋白的抑制剂探讨 E₂ 抑制 NPCs 细胞凋亡的下游信号通路, 以期为进一步制定预防和治疗椎间盘退行性疾病的药物治疗策略提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM/F12 购自 GE Healthcare 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco Invitrogen 公司, II 型胶原酶购自 Sigma-Aldrich 公司, E₂ 受体拮抗剂 ICI182780 购自 Sigma 公司, CCK-8 试剂盒购自 Dojindo Molecular Technologies 公司, FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒购自 BD Pharmingen 公司, E₂ 购自 Sigma 公司, IL-1 β 购自 PeproTech 公司, 兔源多克隆抗 mTOR 抗体、兔源多克隆抗

p-mTOR 抗体、兔源单克隆抗 GSK-3 β 抗体、兔源单克隆抗 p-GSK-3 β 抗体、兔源单克隆抗 NF- κ B P65 抗体、兔源多克隆抗 p-NF- κ B P65 抗体和兔源单克隆抗 β -actin 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司, 雷帕霉素、SC75741、SB216763 均购自 Selleck Chemicals 公司, 化学发光试剂购自 Solarbio 公司。

1.2 细胞的分离及培养 本研究选用河北医科大学动物实验中心提供的清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 2 周龄, 体重大于 200 g。静脉注射戊巴比妥钠 (150 mg/kg) 处死大鼠, 解剖显微镜下将大鼠腰椎、骶椎周围软组织剥离干净, 无菌条件下分离出椎间盘中凝胶状的髓核组织, 37 °C 水浴, 分别采用 0.25% II 型胶原酶消化 1 h 和 0.2% 胰蛋白酶消化 5 min。离心后, 将沉淀物置于含酚红的 DMEM 和 10% FBS 配制的培养基中, 置于 CO₂ 培养箱中培养 (5% CO₂、37 °C)。4 天后, 显微镜下观察到有少量椎间盘 NPCs 生长于培养瓶底部。常规换液, 原代 NPCs 生长覆盖瓶底 80% 后用 0.2% 胰蛋白酶消化并进行细胞分瓶传代, 备用。所有实验动物的处理方案均符合国家颁布的《实验动物管理条例》, 并得到河北医科大学实验动物伦理委员会的批准。

1.3 细胞处理和分组 大鼠椎间盘 NPCs 分为 7 个组: 对照组、IL-1 β 组、IL-1 β +E₂ 组、IL-1 β +E₂+ICI182780 组、IL-1 β +E₂+雷帕霉素组、IL-1 β +E₂+SB216763 组和 IL-1 β +E₂+SC75741 组。将培养好的大鼠椎间盘 NPCs 经胰蛋白酶消化, 制作成细胞悬液。计数后按 $2 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ 的细胞密度接种于 96 孔细胞板, 放入 CO₂ 培养箱静置培养, 每组 6 个复孔。培养 48 h 后, 镜下观察细胞贴壁后弃除培养基, 每孔更换为无酚红、无血清的 DMEM 培养基饥饿培养 90 min。除对照组和 IL-1 β 组外, 每组加入 E₂ (终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$)^[10], 5 min 后分别加入特异性抑制剂雷帕霉素 (100 nmol/L)^[16]、SC75741 (1 $\mu\text{mol/L}$)^[17] 和 SB216763 (1 $\mu\text{mol/L}$)。特异性抑制剂处理 30 min 后各组分别加入 IL-1 β (75 ng/mL)^[18], 置于 CO₂ 培养箱中分别培养 1、12、24、48 h。对于 IL-1 β +E₂+ICI182780 组, E₂ 受体抑制剂 ICI182780 (1 $\mu\text{mol/L}$)^[10] 先于 E₂ 加入培养基中。对照组不给予任何药物。

1.4 CCK-8 法 在对照组和各实验组中, 每孔均加入 CCK-8 试剂 10 μL , 共同培养 1 h。置于波长 450 nm 的酶标仪上测定各孔吸光度值, 计算各组的细胞活力。

1.5 细胞与胶原的黏附实验 对大鼠 NPCs 结合 II 型胶原 $\alpha 1$ (collagen type II $\alpha 1$, COL2 $\alpha 1$) 的能力进行了评估。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胶原蛋白包被 24 孔培养板, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。用 10 mg/mL 的牛血清白蛋白封闭非特异性结合位点 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 缓冲液洗板 2 次。NPCs 在 5% CO_2 培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h, 然后将 7 组细胞经胰蛋白酶消化后加入胶原包被的 24 孔培养板中, 每组 6 孔, 每孔 1×10^4 个细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBS 清洗后用 0.5% 的甲苯胺蓝染色, 4% 的多聚甲醛固定 15 min, 1% 十二烷基磺酸钠溶解 1 h。酶标仪波长调至 590 nm, 读取吸光度值并记录分析。

1.6 流式细胞术 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 检测细胞凋亡 应用凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。预冷的 PBS 清洗各处理组 NPCs, $1 \times 10^6/\text{mL}$ 缓冲液重悬细胞至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞密度, 取 1×10^5 个细胞置于 5 mL 离心管中, 每管中继续加入 5 μL FITC-Annexin V 和 5 μL 碘化丙锭 (PI) 溶液, 混匀后室温下避光静置 15 min。各离心管分别加入 400 μL 的 $1 \times$ 缓冲液, 于流式细胞仪 (FC500, BD 公司) 中检测, 计算机分析结果并记录。

1.7 Western blot 各组细胞清洗后分别加入 100 μL 的 RIPA 裂解液 (包括蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂)。低温 12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清

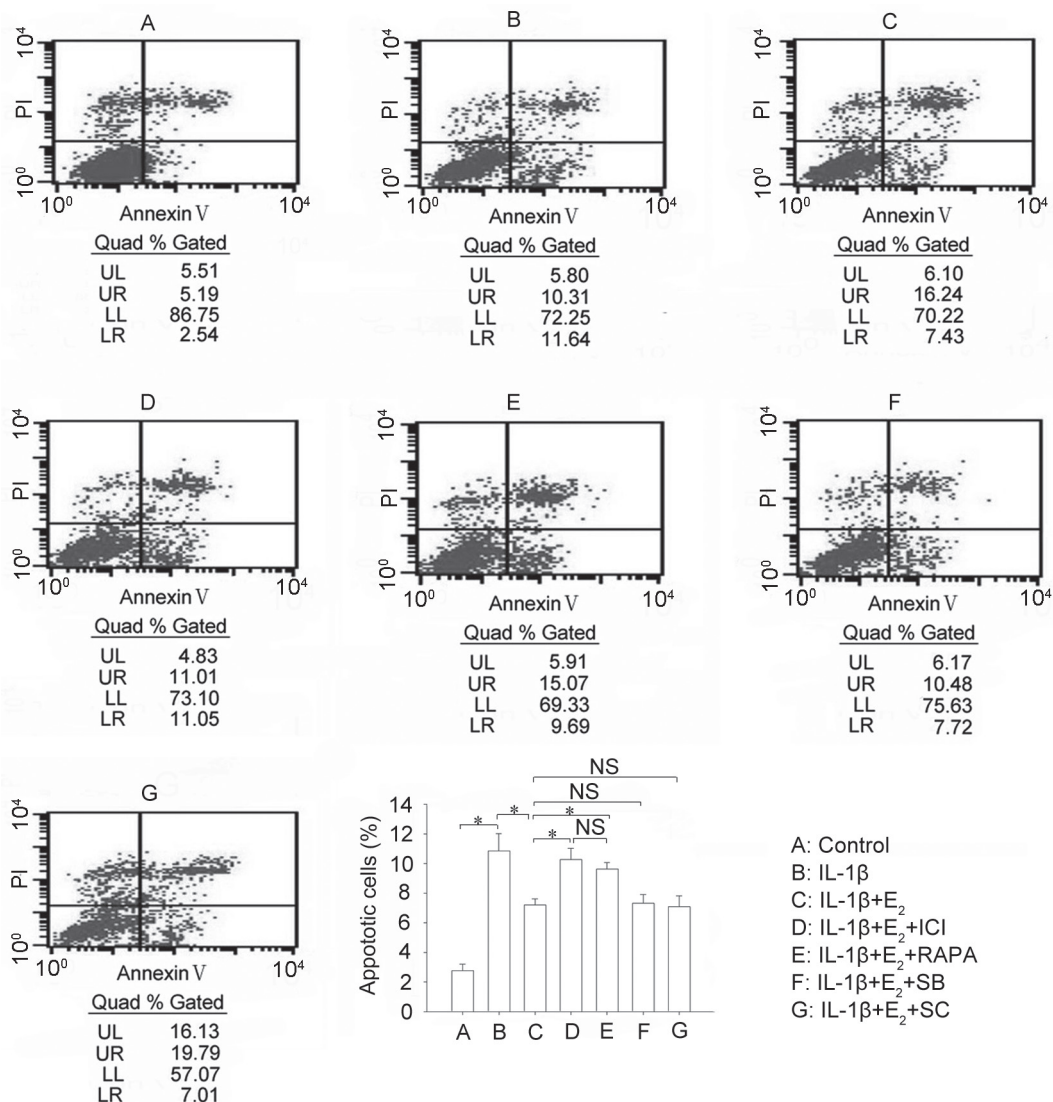


图 1. 各组髓核细胞(NPCs)凋亡率

Fig. 1. Apoptotic rates of nucleus pulposus cells (NPCs) in different groups detected by flow cytometry. Mean \pm SD, $n = 6$. * $P < 0.05$. IL-1 β , interleukin-1 β ; E $_2$, 17 β -estradiol; ICI, ICI182780; RAPA, rapamycin; SB, SB216763; SC, SC75741; NS, no statistical significance.

液, BCA 法测量蛋白浓度。加入 $4 \times$ 蛋白上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 蛋白变性后 $20 \mu\text{g}/\text{泳道}$ 蛋白上样、电泳、转膜、封闭液封闭处理, 分别用抗 mTOR (1:600)、p-mTOR (1:600)、GSK-3 β (1:1 000)、p-GSK-3 β (1:1 000)、NF- κB P65 (1:1 000)、p-NF- κB P65 (1:1 000)、 β -actin 抗体 (1:1 000) 4°C 孵育过夜。TBST 清洗后羊抗兔二抗 (1:5 000, A0208, 碧云天) 室温孵育 2 h, 化学发光试剂盒 (PE0010, Solarbio) 常温显色, 用凝胶成像仪 (1600R, Tanon) 显影并计算灰度值, 以 β -actin 为内参计算各蛋白的相对表达水平。

1.8 统计分析 所有数据均采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 形式表示。采用 SPSS 18.0 统计软件包进行统计分析。如果数据满足正态性和方差齐性, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较使用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组NPCs凋亡率

用 FACS 检测 NPCs 的早期凋亡率, 结果显示, 对照组及 IL-1 β 组中 NPCs 的凋亡率分别为 2.54% 和 10.10%; IL-1 β +E₂ 组的凋亡率为 7.43%, 显著低于 IL-1 β 组 ($P < 0.05$)。IL-1 β +E₂+雷帕霉素组的细

胞凋亡率为 9.85%, 显著高于 IL-1 β +E₂ 组 ($P < 0.05$), 与 IL-1 β +E₂+ICI182780 组的凋亡率相比无显著差异 ($P > 0.05$)。IL-1 β +E₂+SB216763 组和 IL-1 β +E₂+SC75741 组 NPCs 早期凋亡率分别为 7.32% 和 7.76%, 与 IL-1 β +E₂ 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 1)。该研究结果提示雷帕霉素具有抑制 E₂ 抗大鼠椎间盘 NPCs 凋亡的作用。

2.2 各组NPCs细胞活性

CCK-8 法检测结果显示, 在给药处理 1、12、24 和 48 h 时间点, IL-1 β 组细胞活性均显著低于对照组 (均 $P < 0.001$), IL-1 β +E₂ 组细胞活性显著高于 IL-1 β 组 (均 $P < 0.001$), IL-1 β +E₂+雷帕霉素组的细胞活性显著低于 IL-1 β +E₂ 组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$) (图 2)。该结果提示 E₂ 抑制了 IL-1 β 诱导的细胞活性降低, 雷帕霉素和 ICI182780 抑制了 E₂ 的这一作用。

2.3 各组NPCs的黏附能力

胶原黏附实验结果显示, 与对照组相比, IL-1 β 组细胞黏附 II 型胶原能力显著下降 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β 组相比, IL-1 β +E₂ 组黏附 II 型胶原能力显著提高 ($P < 0.05$), 提示 E₂ 显著抑制了 IL-1 β 的细胞毒性作用; 与 IL-1 β +E₂ 组相比, IL-1 β +E₂+ICI182780

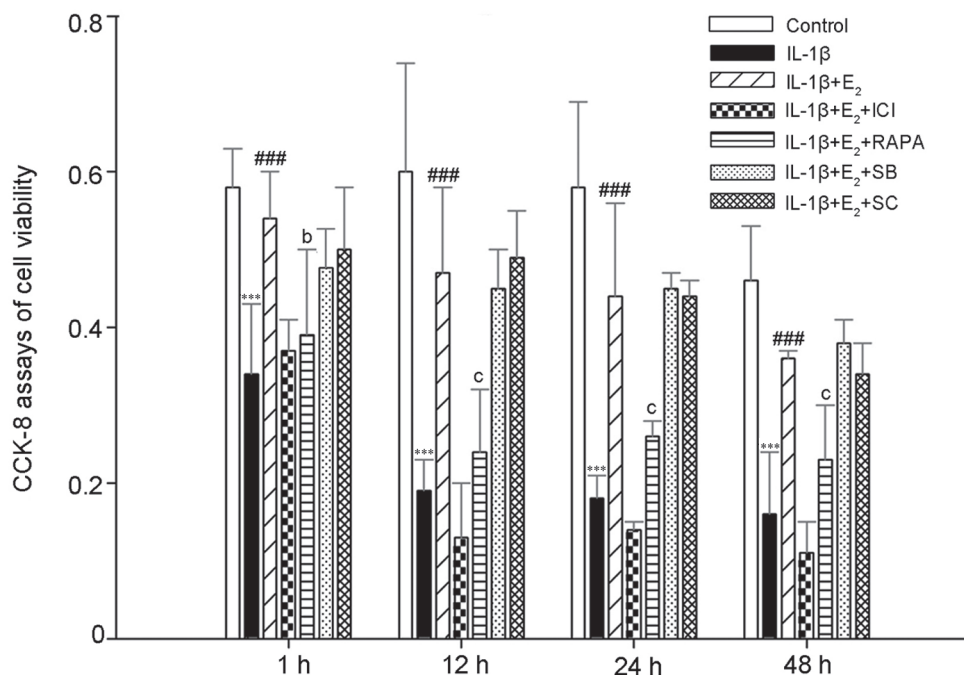


图 2 各组髓核细胞(NPCs)的细胞活力

Fig. 2. Cell viability of nucleus pulposus cells (NPCs) in different groups detected by CCK-8 assays. Mean \pm SD, $n = 6$. *** $P < 0.001$ vs control; ### $P < 0.001$ vs IL-1 β ; ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ vs IL-1 β +E₂. IL-1 β , interleukin-1 β ; E₂, 17 β -estradiol; ICI, ICI182780; RAPA, Rapamycin; SB, SB216763; SC, SC75741.

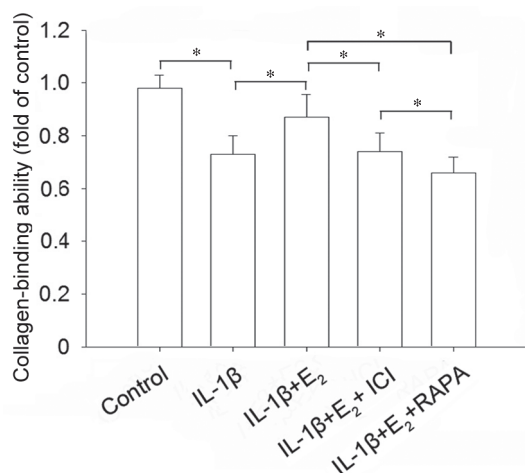


图 3. 各组髓核细胞(NPCs)黏附II型胶原能力

Fig. 3. The collagen-binding activity of nucleus pulposus cells (NPCs) in different groups. 24-well plates were coated with collagen type II $\alpha 1$ (COL2 $\alpha 1$), and pre-treated NPCs were placed and allowed to adhere at 37 °C for 60 min. Mean \pm SD, $n = 6$. * $P < 0.05$. IL-1 β , interleukin-1 β ; E₂, 17 β -estradiol; ICI, ICI182780; RAPA, Rapamycin.

组和 IL-1 β +E₂+ 雷帕霉素组黏附 II 型胶原能力显著下降 ($P < 0.05$) (图 3), 提示雷帕霉素和 ICI182780 能够抑制 E₂ 的细胞保护作用。

2.4 信号通路关键蛋白磷酸化水平

Western blot 结果显示, 与对照组相比, IL-1 β 显著下调 mTOR 磷酸化水平 ($P < 0.05$), E₂ 显著逆转了 IL-1 β 这一下调作用 ($P < 0.05$)。在 ICI182780 或雷帕霉素预处理的 NPCs 中, p-mTOR 磷酸化水平显著低于 IL-1 β +E₂ 组 ($P < 0.05$) (图 4A)。如图 4B 所示, IL-1 β +E₂ 组 GSK-3 β 磷酸化水平显著低于 IL-1 β 组 ($P < 0.05$), IL-1 β +E₂+ICI182780 组 GSK-3 β 磷酸化水平显著低于 IL-1 β +E₂ 组 ($P < 0.05$)。然而, IL-1 β +E₂ 组与 IL-1 β +E₂+SB216763 组 GSK-3 β 磷酸化水平之间无显著差异 ($P > 0.05$)。对照组和 IL-1 β 组 NF- κ B P65 磷酸化水平之间无显著差异 ($P > 0.05$) (图 4C)。以上结果表明, 雷帕霉素和 ICI182780 均抑制了 E₂ 引起的 mTOR 磷酸化, 提示 mTOR 在 E₂ 抑制 NPCs 凋亡中发挥了作用。

3 讨论

本研究结果显示, PI3K/Akt 信号通路的下游蛋白 mTOR 参与了 E₂ 调控 IL-1 β 诱导的大鼠椎间盘 NPCs 凋亡过程。研究显示, NPCs 的异常凋亡是导

致 IVDD 的主要诱因^[19]。众所周知, PI3K/Akt 信号通路在细胞存活过程中发挥重要作用, 并且 Akt 通路在调控 NPCs 的生长、存活和抑制其凋亡方面的作用也已得到证实^[20]。mTOR 是 PI3K/Akt 通路的下游信号蛋白, 是细胞生长的主要传感器, 参与蛋白质的翻译、增殖和抗凋亡过程^[21]。本研究结果显示, mTOR 的抑制剂雷帕霉素能显著抑制 E₂ 对 NPCs 的胶原黏附作用和 mTOR 磷酸化的保护作用, 促进了 IL-1 β 诱导的 NPCs 凋亡, 提示 mTOR 可能作为 PI3K/Akt 信号通路的下游蛋白参与了 E₂ 调控 NPCs 凋亡和黏附过程。

本研究结果显示, IL-1 β 显著下调 NPCs mTOR 磷酸化水平, 而 E₂ 处理可以逆转。E₂ 受体拮抗剂 ICI182780 和 mTOR 的特异性抑制剂雷帕霉素均明显抑制了 E₂ 对 mTOR 磷酸化的作用, 提示 E₂ 是通过与细胞表面的 E₂ 受体结合发挥抗凋亡的作用, 且激活的 PI3K/Akt/mTOR 信号途径可能参与了抗大鼠椎间盘 NPCs 凋亡的过程, 这一研究结果与在其他细胞中的研究结果一致^[22, 23]。

已有文献报道, mTOR 信号通路在成骨细胞和小胶质细胞抗凋亡过程中发挥重要作用^[24]。然而, 关于 mTOR 是否参与了椎间盘 NPCs 的凋亡尚无相关报道。mTOR 通过激活真核翻译起始因子 4EBP1 和 p70s6k 调控细胞凋亡, 被 mTOR 激活的 p70s6k 增加抗凋亡蛋白 Bcl-2/Bcl-xl 的表达并抑制前凋亡蛋白 BAD 的表达^[25], Bcl-2 通过线粒体外膜阻断细胞色素 C 的释放, 抑制细胞色素 C 介导的 Caspase 激活^[26]。本研究结果显示, 雷帕霉素抑制了 E₂ 对 IL-1 β 诱导细胞凋亡的逆转作用, 表明 mTOR 可能参与 E₂ 抑制 NPCs 凋亡的过程。

GSK-3 β 和 NF- κ B 均为 PI3K/Akt 信号通路的下游关键蛋白。本研究结果显示, IL-1 β +E₂ 组中加入 GSK-3 β 和 NF- κ B 通路抑制剂对细胞凋亡率无显著影响。GSK-3 β 信号通路激活 Caspase-8 和 Caspase-2, 诱导 Bid 裂化并释放细胞色素 C, 从而导致细胞凋亡和线粒体功能障碍^[27]。本研究结果显示, IL-1 β 组中 GSK-3 β 磷酸化水平显著上调, 提示 GSK-3 β 信号通路可能与 IL-1 β 诱导的大鼠椎间盘 NPCs 凋亡有关, 我们会针对这一通路进行后续的研究。除此之外, IL-1 β 对 E₂ 预处理的 NPCs NF- κ B P65 磷酸化水平没有明显作用, 提示 NF- κ B 可能未参与 IL-1 β 调控的 NPCs 凋亡过程。

综上所述, 本研究结果提示, PI3K/Akt/mTOR

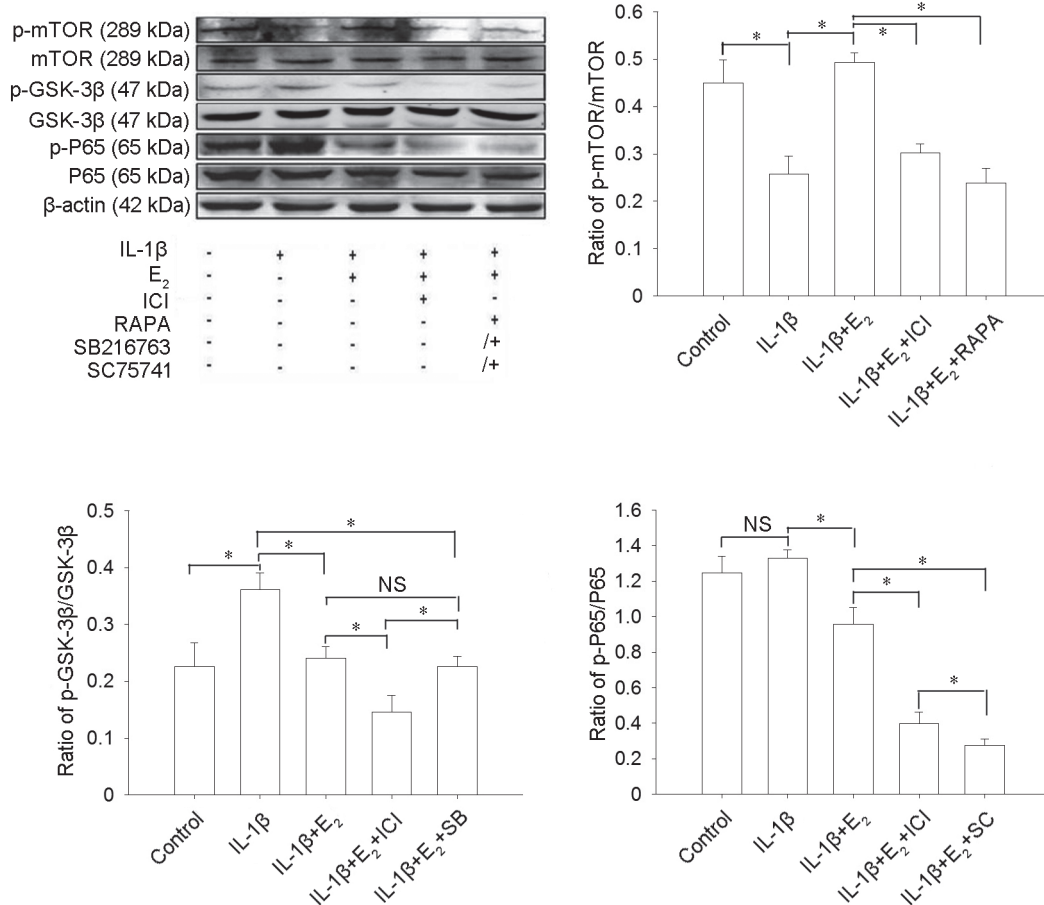


图 4. 各组mTOR、GSK-3 β 和NF- κ B P65磷酸化水平

Fig. 4. Phosphorylation levels of mTOR, GSK-3 β and NF- κ B P65 in different groups detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 6$. * $P < 0.05$. NS represents no statistical significance between two groups. IL-1 β , interleukin-1 β ; E₂, 17 β -estradiol; ICI, ICI182780; RAPA, Rapamycin; SB, SB216763; SC, SC75741; GSK-3 β , glycogen synthase kinase-3 β .

信号通路可能参与了E₂对IL-1 β 诱导的NPCs凋亡的调控过程, 该研究成果为椎间盘退行性疾病的预防和治疗提供了一个新的治疗目标。

参考文献

- Ha KY, Chang CH, Kim KW, Kim YS, Na KH, Lee JS. Expression of estrogen receptor of the facet joints in degenerative spondylolisthesis. *Spine (Phila Pa 1976)* 2005; 30(5): 562–566.
- Wang SZ, Rui YF, Lu J, Wang C. Cell and molecular biology of intervertebral disc degeneration: current understanding and implications for potential therapeutic strategies. *Cell Prolif* 2014; 47(5): 381–390.
- Zhao R, Liu W, Wang M, Zhang Y, Pan L, Feng F, Xia T, Yang L. Lysyl oxidase inhibits TNF- α induced rat nucleus pulposus cell apoptosis via regulating Fas/FasL pathway and the p53 pathways. *Life Sci* 2020; 260: 118483.
- Huber C, Collishaw S, Mosley JR, Reeve J, Noble BS. Selective estrogen receptor modulator inhibits osteocyte apoptosis during abrupt estrogen withdrawal: implications for bone quality maintenance. *Calcif Tissue Int* 2007; 81(2): 139–144.
- Bozzo C, Graziola F, Chiochetti A, Canonico PL. Estrogen and beta-amyloid toxicity: role of integrin and PI3-K. *Mol Cell Neurosci* 2010; 45(2): 85–91.
- Yang SD, Ma L, Yang DL, Ding WY. Combined effect of 17 β -estradiol and resveratrol against apoptosis induced by interleukin-1 β in rat nucleus pulposus cells via PI3K/Akt/caspase-3 pathway. *PeerJ* 2016; 4: e1640.
- Nelson K, Helmstaedter V, Moreau C, Lage H. Estradiol, tamoxifen and ICI 182,780 alter α 3 and β 1 integrin expression and laminin-1 adhesion in oral squamous cell carcinoma cell cultures. *Oral Oncol* 2008; 44(1): 94–99.

- 8 Nilsen J, Diaz Brinton R. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(5): 2842–2847.
- 9 Zaldivar V, Magri ML, Zarate S, Jaita G, Eijo G, Radl D, Ferraris J, Pisera D, Seilicovich A. Estradiol increases the expression of TNF- α and TNF receptor 1 in lactotropes. *Neuroendocrinology* 2011; 93(2): 106–113.
- 10 Yang SD, Ma L, Gu TX, Ding WY, Zhang F, Shen Y, Zhang YZ, Yang DL, Zhang D, Sun YP, Song YL. 17 β -Estradiol protects against apoptosis induced by levofloxacin in rat nucleus pulposus cells by upregulating integrin α 2 β 1. *Apoptosis* 2014; 19(5): 789–800.
- 11 Yang SD, Yang DL, Sun YP, Wang BL, Ma L, Feng SQ, Ding WY. 17 β -estradiol protects against apoptosis induced by interleukin-1 β in rat nucleus pulposus cells by down-regulating MMP-3 and MMP-13. *Apoptosis* 2015; 20(3): 348–357.
- 12 Deng X, Chen S, Zheng D, Shao Z, Liang H, Hu H. Icaritin prevents H₂O₂-induced apoptosis via the PI3K/Akt pathway in rat nucleus pulposus intervertebral disc cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017; 2017: 2694261.
- 13 Lin CY, Chen JH, Fu RH, Tsai CW. Induction of Pi form of glutathione S-transferase by carnosic acid is mediated through PI3K/Akt/NF- κ B pathway and protects against neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2014; 27(11): 1958–1966.
- 14 Huang H, Zhong R, Xia Z, Song J, Feng L. Neuroprotective effects of rhynchophylline against ischemic brain injury via regulation of the Akt/mTOR and TLRs signaling pathways. *Molecules* 2014; 19(8): 11196–11210.
- 15 Kim DE, Kim B, Shin HS, Kwon HJ, Park ES. The protective effect of hispidin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through Akt/GSK-3 β and ERK1/2 signaling pathway. *Exp Cell Res* 2014; 327(2): 264–275.
- 16 Yan H, Frost P, Shi Y, Hoang B, Sharma S, Fisher M, Gera J, Lichtenstein A. Mechanism by which mammalian target of rapamycin inhibitors sensitize multiple myeloma cells to dexamethasone-induced apoptosis. *Cancer Res* 2006; 66(4): 2305–2313.
- 17 Lai Y, Fan L, Zhao Y, Ge H, Feng X, Wang Q, Zhang X, Peng Y, Wang X, Tao L. Cx32 suppresses extrinsic apoptosis in human cervical cancer cells via the NF κ B signalling pathway. *Int J Oncol* 2017; 51(4): 1159–1168.
- 18 Wang H, Ding W, Yang D, Gu T, Yang S, Bai Z. Different concentrations of 17 β -estradiol modulates apoptosis induced by interleukin-1 β in rat annulus fibrosus cells. *Mol Med Rep* 2014; 10(5): 2745–2751.
- 19 Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(3): R45.
- 20 Elghazi L, Balcazar N, Bernal-Mizrachi E. Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(2): 157–163.
- 21 Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, Ortiz-Vega S, Yonezawa K. Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 2006; 25(48): 6361–6372.
- 22 Zhou J, Wu J, Zheng F, Jin M, Li H. Glucagon-like peptide-1 analog-mediated protection against cholesterol-induced apoptosis via mammalian target of rapamycin activation in pancreatic betaTC-6 cells. *J Diabetes* 2015; 7(2): 231–239.
- 23 Zhang J, Wang C, Yu S, Luo Z, Chen Y, Liu Q, Hua F, Xu G, Yu P. Sevoflurane postconditioning protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling. *Sci Rep* 2014; 4: 7317.
- 24 Shang YC, Chong ZZ, Wang S, Maiese K. Prevention of beta-amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI 3-K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL. *Aging (Albany NY)* 2012; 4(3): 187–201.
- 25 Pastor MD, Garcia-Yebenes I, Fradejas N, Perez-Ortiz JM, Mora-Lee S, Tranque P, Moro MA, Pende M, Calvo S. mTOR/S6 kinase pathway contributes to astrocyte survival during ischemia. *J Biol Chem* 2009; 284(33): 22067–22078.
- 26 Konstantinidis K, Whelan RS, Kitsis RN. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(7): 1552–1562.
- 27 Lin CF, Tsai CC, Huang WC, Wang YC, Tseng PC, Tsai TT, Chen CL. Glycogen synthase kinase-3 β and caspase-2 mediate ceramide- and etoposide-induced apoptosis by regulating the lysosomal-mitochondrial axis. *PLoS One* 2016; 11(1): e0145460.