

基于基因芯片技术探索椎间盘退行性改变机制的研究进展

刁志君¹ 姜宏^{2△} 刘锦涛² 李晓春²

[关键词] 基因芯片;椎间盘退变;机制

[中图分类号] R681.5 [文献标志码] A [文章编号] 1005-0205(2018)07-0079-05

椎间盘退行性改变是脊柱退变性疾病发生的条件和基础,是造成腰背痛和坐骨神经痛的根本原因^[1,2],目前,椎间盘压力的增加、营养供给的不足、炎症反应的发生以及遗传等因素被认为是导致椎间盘发生退行性改变的主要原因^[3],但关于椎间盘退行性疾病的病因尚未明确,仍待研究。基因芯片(Gene Chip),属于计算机芯片的一种,在生物芯片(Biochip)中应用最广泛,同时技术也最成熟,其技术原理类似于 Southern 和 Northern 印迹杂交技术,属分子杂交,通过探针与固定在芯片上的大量 cDNA 和 EST 或寡核苷酸的杂交来实现,该技术在大规模基因发现、基因分析、基因组研究,尤其是在基因表达谱的研究中具有重要价值^[4]。目前,利用基因芯片技术研究椎间盘退变性疾病已然成为国内外科科研的新导向,笔者兹将近年来国内外对此的相关研究综述如下,以飨读者。

1 动物椎间盘基因表达谱的研究

通过对动物椎间盘基因表达谱进行研究,进而可推用到人类,为了解椎间盘退变与基因表达的关系具有重要的借鉴意义,同时也为探索基因在椎间盘退变中的作用提供了实验依据。

1.1 大鼠

Hideki 等^[5]通过建立大鼠髓核细胞饥饿模型,检测饥饿髓核细胞的差异基因表达,发现差异表达高于 1.5 倍的基因 2922 个,其中 Gadd45 和 Tp53 等可以影响细胞周期进程的 DNA 损伤检查点的相关基因差异表达显著,同时 p27Kip1, p21Cip1 和 p53 蛋白表达也同时上调。Tp53 是一种已知的肿瘤抑制基因,可调节与抑制细胞周期、DNA 修复及凋亡相关基因的转录水平。而 GADD45 是一种 DNA 修复相关分子,同时

也是 p53 的靶点之一,有研究报道^[6-8], GADD45 蛋白可控制 DNA 修复与细胞凋亡之间的平衡。p21Cip1 和 p27Kip1 都属于 CKIs(细胞周期素依赖性激酶抑制剂)中 Cip/Kip 系列的成员。此外,该实验显示剥夺髓核细胞的营养可以造成相关细胞周期的信号通路被激活,这也为椎间盘再生工程的发展提供了新的可能。

1.2 犬

Daisuke 等^[9]通过比较 16~18 周大的比格犬的髓核细胞与软骨细胞后得出 α-2-巨球蛋白(Alpha2-macroglobulin, A2M)、细胞角蛋白-18 以及神经细胞粘附因子(CD56),桥粒胶蛋白-2(Desmocollins, DSC)在髓核细胞中的表达较高。在这几个分子中, A2M 是一种强力的蛋白酶抑制剂,可有效抑制蛋白聚糖酶,同时也是 ADAMTS-4 及-5 的抑制剂^[10,11],而 ADAMTS-4 及-5 则在髓核中降解细胞外基质,加速髓核的退变。说明 A2M 在髓核细胞中的高表达对于髓核细胞有保护作用。该研究还发现人和比格犬的椎间盘的基因表达谱很相似,虽然也有些值得注意的些许不同,同时比格犬尾椎和腰椎的基因表达差异也很小,但从基因表达上观察,鼠和比格犬的种间差异就比较大了,所以比格犬是更加适合研究人类椎间盘的实验动物。

1.3 牛

由于牛尾椎的髓核与终板软骨大小与厚度均与人体相似,且牛尾椎也承受了一定压应力,所以牛可作为模拟人髓核研究的理想替代物。Ben 等^[12]利用基因芯片技术对牛椎间盘的关节软骨、纤维环及髓核细胞进行基因表达筛查,结果筛查出 34 个髓核特征性表达基因和 49 个椎间盘特征性表达基因,且差异表达倍数高于 100 倍。经 qRT-PCR 验证并对比人椎间盘组织实验结果发现, 11 个基因(SNAP25, KRT8, KRT18, KRT19, CDH2, IBSP, VCAN, TNMD, BASP1, FOXF1 及 FBLN1)在人正常髓核细胞中也存在差异

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81473691)

¹ 上海中医药大学(上海, 201203)

² 南京中医药大学附属苏州市中医医院

△通信作者 E-mail: honghong751@126.com

表达, 不过程度不高。4 个基因(SNAP25, KRT8, KRT18 和 CDH2)的表达在人退变髓核细胞显著下降。3 个基因(VCAN, TNMD 和 BASP1)的表达在人退变纤维环细胞中显著增加。椎间盘阴性标记基因 FBLN1 在人退变的纤维环、髓核细胞中的表达都明显升高。该实验通过差异基因的表达来区分牛和人的关节软骨、纤维环及髓核细胞。

椎间盘特异基因筛选的动物实验多在鼠、犬及牛等身上进行, 尤其是大鼠, 这些动物实验为椎间盘退变机制的探索以及椎间盘再生工程做出了巨大贡献。

2 人类椎间盘基因芯片工程的研究进展

人不同于动物, 而且人在出生几年后, 髓核内较大的空泡样细胞脊索细胞就全部凋亡, 这与动物的髓核中细胞组成也有很大不同^[5], 所以人椎间盘退性表达基因的研究对于椎间盘组织工程的进展有着十分重要的意义。

2.1 正常与退变髓核差异表达基因的筛选与分析

髓核组织是椎间盘的重要组成部分, 而髓核细胞的大量死亡可能是导致退变后椎间盘组织的细胞少于正常椎间盘组织的细胞的重要原因, 退变髓核特征性表达基因的研究对探索椎间盘退变的机制意义重大。Wan 等^[13]利用基因芯片技术分析人髓核中链非编码 RNA 的表达, 结果示: 共筛选出 116 个 lncRNAs (67 个上调, 49 个下调) 和 260 个 mRNAs 的差异表达基因, 且差异倍数达 10 倍以上, KEGG 通路分析显示差异表达的 mRNAs 与多种通路有关, 其中包括细胞外基质(ECM)-受体作用通路, 该团队发现参与细胞凋亡调控的 Fas 相关蛋白因子-1 (FAF1) 在退变的椎间盘组织中高表达, qRT-PCR 也验证了这个结果。该团队首次揭示了长链非编码 RNA 在椎间盘退变中的作用, 他们通过实验推断 RP11-296A18.3 的上调诱导了 FAF1 的过表达, 并最终导致椎间盘细胞的异常凋亡。有研究证明, 由 Fas 和 Fas 配体(FasL)相互作用诱导的椎间盘细胞的凋亡在椎间盘退变的进程中起重要作用^[14]。FAF1 是一种多领域蛋白, 是 Fas 死亡诱导信号复合体的一员, 且 FAF1 过表达可显著增强 Fas 介导的细胞凋亡作用, 导致细胞大量死亡^[15]。该研究表明 FAF1 可视为退变髓核组织的特异表达基因。

Shao 等^[16]通过基因芯片技术分析钙化髓核与非钙化髓核的差异表达基因, 该实验共筛选出 132 个差异表达基因, 其中有 129 个上调基因, 3 个下调基因。差异表达前 20 的差异表达基因中硬化蛋白(SOST), Wnt 抑制因子 1 (WIF1) 和人分泌型卷曲蛋白 4 (SFRP4) 皆与 Wnt 通路的抑制相关。在该实验中硬化蛋白(SOST)是差异表达最明显的基因, SOST 负责

编码硬骨蛋白(硬骨素), 该蛋白是一种由骨细胞分泌的糖蛋白, 也是晚期成骨细胞的重要标志物。一项早期的研究显示硬骨素可以通过与 BMP 受体竞争性结合而起到 BMP 抑制剂的作用, 从而抑制由 BMP 诱导成骨细胞分化和骨生长^[17]。但也有研究显示, 硬化蛋白的抑制作用是通过 Wnt 信号通路介导的, 而不是通过 BMP 介导的^[18], 且该实验发现 3 个基因(SOST, WIF1 和 SFRP4)都曾被报道与 Wnt 信号通路的抑制有关^[19]。该实验差异表达基因 BMP-2 是一种骨形成诱导剂, 且近几年的一项研究中, 发现 Wnt/ β -catenin 信号通路激活成骨细胞中 BMP-2 的表达^[20], 并由此推测 BMP-2 途径可能在 Wnt 抑制剂的过表达中起作用。该实验结果显示异常的 Wnt 通路和一些炎症相关因子的过度表达似乎可能是引起椎间盘骨化的两个关键因素, 该实验证明了椎间盘的钙化现象可能与 Wnt 通路的异常和局部炎症相关。

此外, 国内也有一些学者对退变椎间盘髓核组织的特征性差异表达基因进行过报道。李海音^[21]发现 POTEb 可能参与髓核退变的进程, 并起重要作用; 康新桂^[22]曾报道 bFGF 可影响细胞周期, 从而促进髓核细胞的增殖; 王海强^[23]的研究表明, 下调的 miR-155 通过对靶蛋白 FADD 和 caspase-3 的调控促进 Fas 介导的凋亡, 提示 miR-155 在椎间盘退变的病因学中的作用。这些相关研究的成果对明确退变髓核的特征性表达基因意义重大, 对探索椎间盘退变的机制同样具有重要的借鉴作用。

2.2 正常与退变纤维环差异表达基因的筛选与分析

纤维环组织对于脊柱的稳定、活动、负载等功能发挥重要的作用, 纤维环的退变往往标志着椎间盘退变的开始, 近些年, 国内外对退变纤维环差异基因表达的研究成果颇丰, 从而可以更好地理解椎间盘退变的机制。Zepur 等^[24]利用基因芯片技术比较了退变纤维环组织和正常纤维环的基因表达, 结果显示在退变纤维环组织中共有 238 个差异基因表达, 17 个基因表达显著, 其中上调基因 10 个, 下调基因 7 个, 胰岛素样生长因子结合蛋白 3(IGFBP3)是最强烈上调的基因, 失调的细胞功能包括细胞增殖和炎症应答等。在退变纤维环组织中发现最显著的典型信息通路为干扰素通路, 这项研究表明 IFIT3 和 IGFBP3 基因表达的上调激活了干扰素- α (Interferon- α , IFNA) 信号通路, 并由此影响、参与椎间盘的退行性变。此前亦有报道称, IGFBP3 和 IFIT3 可参与调控细胞的生长和增殖, 对许多细胞的增殖都具有抑制作用, 非常不利于细胞的生长^[25]。干扰素是最早发现的细胞因子之一, 并在信号通路的研究中得到广泛应用, 在椎间盘突出的组织中发现存在炎症细胞因子干扰素- γ (IFNG), 但关于

IFNA 的相关报道依然很少^[26]。有报道称,椎间盘纤维环细胞生长的停滞是由于 IFNA 诱导 IFIT3 等基因,通过 IFIT3 的抗细胞增殖及 IGFBP3 促进细胞凋亡功能实现的^[27]。IGFBP3 等基因在椎间盘纤维环组织的退变进程中发挥重要作用,同时也表明,通过识别生物标记和信号通路认识椎间盘退行性改变的级联反应,同时为寻找建立人椎间盘再生工程的可能性。

Helen 等^[28]对 15 位腰椎间盘突出患者的纤维环组织进行了基因表达分析,并利用激光捕捉显微切割技术从石蜡包埋的人纤维环组织中直接提取细胞用于芯片,并进行生物信息学分析。结果筛选出 47 个差异表达基因,其中上调基因 13 个,下调基因 19 个,该实验发现椎间盘的复制性衰老与 LOXL2 和 GAS-1 的表达上调相关。GAS1 是一种膜蛋白,且实验证明,在细胞融合和生长抑制的进程中,GAS1 的表达显著上调^[29],且 GAS1 有抑制细胞周期进程的作用。Erb 等^[30]发现在衰老的成纤维细胞中 GAS 基因显著表达。赖氨酰氧化酶样蛋白 2(LOXL2)是一种细胞外的铜依赖蛋白,可促进胶原和弹性蛋白的交联^[31]。Pascal 等^[32]发现 LOXL2 参与人类二倍体成纤维细胞的衰老,在其中发挥重要作用,当 LOXL2 过表达,可诱导复制性衰老的发生。该实验表明 LOXL2 和 GAS-1 可能是椎间盘退变的特异表达基因,使进一步认识了椎间盘的退变与老化,同时也证实了激光捕捉显微切割技术的实用性,为类似于细胞稀少的人纤维环组织中提取 mRNA 提供了好方法。

Yang 等^[33]研究人退行性变椎间盘和正常椎间盘组织中纤维环和髓核的基因表达,发现 COL3A1 是退变髓核、纤维环组织共同的差异表达基因,且 RPL8, RPS16 及 RPS28 等基因的异常表达可能影响细胞内信息的翻译和转录,造成蛋白质合成障碍,并最终导致椎间盘的退行性改变。腰椎的退行性病变与腰椎的灵活性、腰椎的活动范围关系密切,而 Yang 等通过研究发现 COL3A1 在骨骼生长系统中扮演重要作用,从而合理的推断出该基因的表达可能潜在影响腰椎灵活度的发育,并进一步导致椎间盘的退变。曾由相关研究证明,包括 COL3A1 在内的若干基因共同通过一系列复杂机制参与椎间盘退行性变的发生^[34,35]。对于黑色素瘤患者而言,RPL8 抗原参与介入免疫系统,可以将其作为代表相关性的一种疫苗靶向^[36]。RPS16 曾被报道,其与线粒体翻译缺陷、阿尔兹海默病等疾病有关^[37]。RPS23 与肝细胞癌的线粒体功能失调有关^[38]。胶原蛋白、非胶原蛋白、弹性胶原是人类椎间盘组织中重要的组成部分,而组织中蛋白多糖、胶原蛋白的减少正是导致椎间盘退行性病变的主要原因之一^[39],在生物体中,蛋白质是由核酸和蛋白质组成的

核糖体在基因遗传信息的调控下合成的。Yang 的研究表明,COL3A1, RPL8, RPS16 及 RPS28 与椎间盘组织的退变关系密切,尤其是 COL3A1 可视为椎间盘组织退变的特异性表达基因。

2.3 正常与退变椎间盘差异表达基因的筛选与分析

Chen 等^[40]比较了不同程度腰椎间盘突出患者椎间盘的基因表达,结果显示 MAP2K6, RHOBTB2 差异表达最为显著,信息通路分析显示 MAPK 信号通路表达最为显著。MAP2K6 亦称 MKK6,属编码双特异性蛋白激酶家族的成员,可参与合成 MAP2K,该蛋白可磷酸化并激活 p38MAPK,诱导炎症、环境应激等反应的发生,由此引起细胞周期停滞、转录激活、凋亡等细胞生物进程^[41]。退变椎间盘基质环境的显著特征是合成与分解代谢的不平衡,同时伴随炎症反应的发生。已有研究证明,MAPK 通过介导 Wnt/ β -蛋白信号通路的激活^[42,43],并由此参与了退变椎间盘中的分解代谢和合成代谢过程。MAPK 信号通路通过改变合成代谢和分解代谢基因的表达、影响蛋白多糖降解而调节细胞外基质的合成,在椎间盘退变的进程中发挥重要的作用^[44]。RHOBTB2 属 Ras 同源(Rho)亚家族,由低分子量的鸟嘌呤-5'-三磷酸结合蛋白组成。Rho 蛋白是调节分子,可将表面受体连接到肌动蛋白细胞骨架的组织上,因此,可介导细胞形状,收缩性,运动性和基因表达变化的调节^[45]。Wang 等^[46]发现 RHOBTB2 的表达在细胞有丝分裂期间高度上调,且 RHOBTB2 的过度表达在短期可促进细胞的增殖,但长期会产生相反的效果,且 RHOBTB2 表达水平的改变会影响细胞的周期、凋亡等生物进程。Chen 等也由此得出结论,MAP2K6 和 RHOBTB2 可能是治疗椎间盘退变的特异性分子靶点。

3 小结与展望

临床上对于椎间盘退变相关疾病的治疗主要以保守和手术为主,但手术失败综合征的发生率高,且无论是那种手术方式都存在着明显的缺陷,所以为求更好的治疗手段,应当明确椎间盘退变的机制,发现治疗此类疾病的特征性靶点,从而对患者进行精准医疗。人椎间盘组织差异表达基因的筛选对于椎间盘退变机制的研究意义重大,FAF1, SOST, IGFBP3, LOXL2, GAS-1, COL3A1, MAP2K6 及 RHOBTB2 等基因在椎间盘组织中的差异性表达对更清楚的解释椎间盘退变的机制、理解椎间盘退变的进程具有重要的意义,同时也对临床上椎间盘突出的预防、诊断与治疗具有重要的意义,此外,发现退变椎间盘的特征性表达基因也有利于髓核再生工程的发展。

参考文献

[1] Kepler CK, Ponnappan RK, Tannoury CA, et al. The mo-

- lecular basis of intervertebral disc degeneration[J]. *Spine J*, 2013, 13(3):318-330.
- [2] Kadow T, Sowa G, Vo N, et al. Molecular basis of intervertebral disc degeneration and herniations; what are the important translational questions[J]? *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473(6):1903-1912.
 - [3] Khan AN, Jacobsen HE, Khan J, et al. Inflammatory biomarkers of low back pain and disc degeneration; a review [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1410(1):68-84.
 - [4] De Benedetti VM, Biglia N, Sismondi P, et al. DNA chips: the future of biomarkers[J]. *Int J Biol Markers*, 2000, 15(1):1-9.
 - [5] Hideki S, Katsuhisa Y, Koji I, et al. Global Identification of Genes Related to Nutrient Deficiency in Intervertebral Disc Cells in an Experimental Nutrient Deprivation Model [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(3):e58806.
 - [6] Moskalev AA, Smit-McBride Z, Shaposhnikov MV, et al. Gadd45 proteins: relevance to aging, longevity and age-related pathologies[J]. *Ageing Res Rev*, 2012, 11(1):51 - 66.
 - [7] Yan HX, Zhang YJ, Zhang Y, et al. CRIF1 enhances p53 activity via the chromatin remodeler SNF5 in the HCT116 colon cancer cell lines[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1860(4):516-522.
 - [8] Guo W, Zhang B, Li Y et al. Gene expression profile identifies potential biomarkers for human intervertebral disc degeneration[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6):8665-8672.
 - [9] Sakai D, Nakai T, Mochida J, et al. Differential Phenotype of Intervertebral Disc Cells; Microarray and Immunohistochemical Analysis of Canine Nucleus Pulposus and Annulus Fibrosus [M]. North-Holland, 2009, 34(14):1448-1456.
 - [10] Fontanil T, Álvarez-Teijeiro S, Villaronga Má, et al. Cleavage of Fibulin-2 by the aggrecanases ADAMTS-4 and ADAMTS-5 contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8):13716-13729.
 - [11] Bintang S. The role of alpha-2-macroglobulin (a2m) in cartilage healing[J]. *AP-SMART*, 2017, 9:101.
 - [12] Minogue BM, Richardson SM, Zeef LA, et al. Transcriptional profiling of bovine intervertebral disc cells: implications for identification of normal and degenerate human intervertebral disc cell phenotypes[J]. *Arthritis Research and Therapy*, 2010, 12(1):1-20.
 - [13] Wan Z, Song F, Sun Z, et al. Aberrantly expressed long noncoding RNAs in human intervertebral disc degeneration a microarray related study[J]. *Arthritis Research and Therapy*, 2014, 16(5):465
 - [14] Shao Q, Chen JP, Lin QK, et al. Protective effects of paeoniflorin against FasL induced apoptosis of intervertebral disc annulus fibrosus cells via Fas/FasL signalling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(6):2351-2355.
 - [15] Wu X, Wang K, Hua W et al. Down-regulation of islet amyloid polypeptide expression induces death of human annulus fibrosus cells via mitochondrial and death receptor pathways[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1863(6):1479-1491.
 - [16] Shao J, Yu M, Jiang L, et al. Sequencing and bioinformatics analysis of the differentially expressed genes in herniated discs with or without calcification[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(1):81-90
 - [17] Kamiya N, Shuxian L, Yamaguchi R, et al. Targeted disruption of BMP signaling through type IA receptor (BMPRI-A) in osteocyte suppresses SOST and RANKL, leading to dramatic increase in bone mass, bone mineral density and mechanical strength[J]. *Bone*, 2016, 91:53-56.
 - [18] van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist[J]. *J Exp Med*, 2014, 199(6):805-814.
 - [19] Yamada A, Iwata T, Yamato M, et al. Diverse functions of secreted frizzled-related proteins in the osteoblastogenesis of human multipotent mesenchymal stromal cells[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(13):3270-3278.
 - [20] Zhang R, Oyajobi BO, Harris SE, et al. Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts[J]. *Bone*, 2013, 52(1):145-156.
 - [21] 李海音. 成人髓核细胞特征性表达基因的筛选与验证[D]. 重庆:第三军医大学, 2014.
 - [22] 康新桂. 人老化椎间盘髓核细胞体外老化模型的建立与细胞老化表型的初探[D]. 南京:东南大学, 2016.
 - [23] 王海强. MicroRNA-155 调控在人椎间盘退变中的作用研究[D]. 西安:第四军医大学, 2011.
 - [24] Kazezian Z, Gawri R, Haglund L, et al. Gene Expression Profiling Identifies Interferon Signalling Molecules and IGFBP3 in Human Degenerative Annulus Fibrosus[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:15662.
 - [25] Zepur K, Zhen L, Mauro A, et al. Injectable hyaluronic acid down-regulates interferon signaling molecules, IGFBP3 and IFIT3 in the bovine intervertebral disc[J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 52:118-129.
 - [26] Shamji MF, Setton LA, Jarvis W, et al. Proinflammatory cytokine expression profile in degenerated and herniated human intervertebral disc tissues[J]. *Arthritis and rheumatism*, 2010, 62(7):1974-1982.
 - [27] Wu DJ, Chen K, Wei XZ, et al. Analysis of intervertebral disc-related genes[J]. *Genetics And Molecular Research*, 2014, 13(1):2032-2038.
 - [28] Gruber HE, Mougeot JL, Hoelscher G, et al. Microarray Analysis of Laser Capture Microdissected-Anulus Cells From the Human Intervertebral Disc[J]. *The Spine Journal*, 2007, 32(11):1181-1187.

- [29] Luna-Antonio BI, Rodriguez-Muñoz R, Namorado-Tonix C, et al. Gas1 expression in parietal cells of Bowman's capsule in experimental diabetic nephropathy[J]. *Histochem Cell Biol*, 2017, 148(1):33-47.
- [30] Erb MJ, Camacho D, Xie W, et al. Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 and CHOP Restrict the Expression of the Growth Arrest-Specific p20K Lipocalin Gene to G0[J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36(23):2890-2902.
- [31] Peng DH, Ungewiss C, Tong P, et al. ZEB1 induces LOXL2-mediated collagen stabilization and deposition in the extracellular matrix to drive lung cancer invasion and metastasis[J]. 2017, 36(14):1925-1938.
- [32] Pascal T, Debaq-Chainiaux F, Chre'tien A, et al. Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(17):3651-3659.
- [33] Yang Z, Chen X, Zhang Q, et al. Dysregulated COL3A1 and RPL8, RPS16, and RPS23 in Disc Degeneration Revealed by Bioinformatics Methods[J]. *The Spine Journal*. 2015, 40(13):E745-E751.
- [34] Liu C, Fei HD, Sun ZY, et al. Bioinformatic analysis of the microarray gene expression profile in degenerative intervertebral disc cells exposed to TNF- α [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(18):3332-3339.
- [35] Xu F, Gao F, Liu, YD, et al. Bioinformatics analysis of molecular mechanisms involved in intervertebral disc degeneration induced by TNF- α and IL-1 β [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3):2925-2931.
- [36] Beril T, Jelena J, Shan W, et al. The N-terminal extension of yeast ribosomal protein L8 is involved in two major remodeling events during late nuclear stages of 60S ribosomal subunit assembly[J]. *RNA*, 2016, 22(9):1386-1399.
- [37] Sharman MJ, Nik SHM, Chen MM, et al. The guinea pig as a model for sporadic Alzheimer's disease (AD): the impact of cholesterol intake on expression of AD-related genes[J]. *PloS One*, 2013, 8(6):1-12.
- [38] Nam BH, Jeong SH, Kwak HW, et al. Korean Version of a Model to Estimate Survival in Ambulatory Patients with Hepatocellular Carcinoma (K-MESIAH) [J]. *PloS One*, 2015, 10(10):e0138374.
- [39] Peck SH, McKee KK, Tobias JW, et al. Whole Transcriptome Analysis of Notochord-Derived Cells during Embryonic Formation of the Nucleus Pulposus[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10504.
- [40] Chen Y, Chen K, Li M, et al. Genes associated with disc degeneration identified using microarray gene expression profiling and bioinformatics analysis [J]. *Genetics And Molecular Research*, 2013, 12(2):1431-1439.
- [41] Liu Z, Lv Y, Zhang Y, et al. Matrine-Type Alkaloids Inhibit Advanced Glycation End Products Induced Reactive Oxygen Species-Mediated Apoptosis of Aortic Endothelial Cells In Vivo and In Vitro by Targeting MKK3 and p38MAPK Signaling[J]. 2017, 6(12):e007441.
- [42] Hiyama A, Sakai D, Tanaka M, et al. The relationship between the Wnt/ β -catenin and TGF- β /BMP signals in the intervertebral disc cell[J]. *J. Cell Physiol*, 2011, 226(5):1139-1148.
- [43] Scholtes S, Kromer E, Weisser M, et al. Global Chondrocyte Gene Expression after a Single Anabolic Loading Period: Time Evolution and Re-inducibility of Mechano-responses[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 233(1):699-711.
- [44] Liu CJ, Yang H, Gao F, et al. Resistin Promotes Intervertebral Disc Degeneration by Upregulation of ADAMTS-5 Through p38 MAPK Signaling Pathway[J]. *Spine*, 2016, 41(18):1414-1420.
- [45] Kamaruddin MI, Nakamura-Shibasaki M, Mizuno Y, et al. Ocular hypotensive effects of a Rho-associated protein kinase inhibitor in rabbits[J]. *Clin Ophthalmol*, 2017, 11:591-597.
- [46] Wang CJ, Yang D, Luo YW, et al. RhoBTB2 (DBC2) functions as a multifunctional tumor suppressor in thyroid cancer cells via mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4):5954-5958.

(收稿日期:2018-01-13)