

异常力学负荷导致椎间盘退变的实验研究

毛强^{1,2} 何帮剑^{1,2} 张圣扬^{1,2,3} 肖鲁伟^{1,2} 童培建^{1,2} 华江^{1,2△}

[摘要] 目的:观察异常力学负荷是否通过激活 IL-1 β /Wnt- β -catenin 信号通路导致椎间盘退变。方法:选用 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 12 只,8 周龄,体质量 20~30 g,随机分为正常对照组和椎间盘退变模型组,每组 6 只。诱导椎间盘退变模型组小鼠保持长时间的后足站立姿势,增加小鼠腰椎的轴向力学负荷,每天共 5 h,维持 8 周;空白对照组小鼠不加任何干预。取各组小鼠腰椎间盘组织进行苏木精-伊红(HE)染色观察其病理学改变;免疫组织化学染色和 Western Blot 检测其 II 型胶原(Col2a1)、蛋白聚糖(Aggrecan),IL-1 β , β -catenin、基质金属蛋白酶-3 和基质金属蛋白酶-13(MMP-3 和 MMP-13)等蛋白的表达;qRT-PCR 检测 Col2a1,Aggrecan,IL-1 β , β -catenin,MMP-3 和 MMP-13 等基因的表达。结果:与正常对照组小鼠比较,椎间盘退变模型组小鼠的腰椎间盘组织 HE 染色结果显示椎间盘细胞数量和细胞外基质含量减少,纤维环结构紊乱,软骨终板厚度降低;免疫组织化学染色和 Western Blot 检测结果显示 Col2a1 和 Aggrecan 蛋白表达降低($P<0.01$),而 IL-1 β , β -catenin,MMP-3 和 MMP-13 的活性增强($P<0.01$);qRT-PCR 检测结果提示 Col2a1 和 Aggrecan 基因的表达显著下降($P<0.01$),而 IL-1 β , β -catenin,MMP-3 和 MMP-13 基因的表达明显上调($P<0.01$)。结论:异常力学负荷能引起小鼠椎间盘出现退变的组织病理学表现,导致椎间盘细胞外基质的组成成分减少,MMPs 的活性增加,符合椎间盘退变的主要特征。说明该方法能成功构建腰椎间盘退变小鼠模型,是一种有效模拟人类椎间盘退变的致病因素且简便易行的椎间盘退变小鼠模型制备方法;异常力学负荷可能通过激活 IL-1 β /Wnt- β -catenin 信号通路导致椎间盘退变的发生发展。

[关键词] 椎间盘退变;异常力学负荷;信号通路

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)12-0001-06

Experimental Study of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration Caused by Abnormal Mechanical Load

MAO Qiang¹ HE Bangjian¹ ZHANG Shengyang^{1,2}
XIAO Luwei¹ TONG Peijian¹ HUA Jiang^{1△}

¹ Department of Orthopedics and Traumatology, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

² Department of Orthopedics and Traumatology, Zhejiang Provincial Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;

³ The First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.

Abstract Objective: To explore whether abnormal mechanical load leads to lumbar intervertebral disc degeneration by activating the IL-1 β /Wnt- β -catenin signal pathway. **Methods:** 12

SPF female C57BL/6 mice(aged 8 weeks with 20~30 g) were randomly divided into the experimental group and the control group(6 mice in each group). Mice in the experimental group were maintained a standing postural position, which increased the axial mechanical load of the lumbar vertebrae for 5 h a day. Mice in the experimental group were performed nothing. After 8 weeks, the lumbar intervertebral disc tissues from two groups were fetched out. The patholog-

基金项目:浙江省自然科学基金(LQ16H270007)

国家自然科学基金(81603639)

浙江省中医药科学研究基金项目(2020ZA050)

¹ 浙江中医药大学附属第一医院骨伤科(杭州,310053)

² 浙江省中医院骨伤科

³ 浙江中医药大学第一临床医学院

△通信作者 E-mail:zyydxmq@126.com

ical change of the lumbar intervertebral disc tissues were observed by HE staining. The expression of Col2a1, Aggrecan, IL-1 β , β -catenin, MMP-3 and MMP-13 proteins were detected by immunohistochemical staining and Western Blot, and the activity of Col2a1, Aggrecan, IL-1 β , β -catenin, MMP-3 and MMP-13 genes was evaluated by qRT-PCR. **Results:** Compared with the control group, the HE staining results in the experimental group showed that the number of cells and the amount of extracellular matrix were reduced, the fibrous ring structure was disordered, and the thickness of cartilage endplate were diminished. The immunohistochemistry results showed that the expressions of Col2a1 and aggrecan in the experimental group were decreased, whereas the expressions of IL-1 β , β -catenin, MMP-3 and MMP-13 were increased as compared with that of control group. The activity of Col2a1 and aggrecan genes in the experimental group was down-regulated compared with the control group, whereas the activity of IL-1 β , β -catenin, MMP-3 and MMP-13 genes were up-regulated. **Conclusion:** Maintaining a standing postural position for a long time can increase the axial mechanical load of the lumbar vertebrae to cause the typical degeneration of lumbar intervertebral disc in mice, which induces decline of the number of cells and upgradation of MMPs extracellular matrix activity. These suggest that this is an simple method to successfully build a lumbar intervertebral disc degeneration model. Abnormal mechanical load may lead to the development of lumbar intervertebral disc degeneration by activating IL-1 β /Wnt- β -catenin signal pathway.

Keywords: intervertebral disc degeneration; abnormal mechanical load; signal pathway

腰痛是全球性的公共健康问题^[1-5],椎间盘退变是腰痛的最主要原因^[6],尚无有效延缓或逆转椎间盘退变的方法^[7]。为了获得修复椎间盘退变的新方法,理解椎间盘退变的机制至关重要^[8]。异常力学负荷是椎间盘退变的主要致病因素^[9],椎间盘退变的机制尚未完全阐明^[10]。研究证实 IL-1 β 和 Wnt/ β -catenin 信号通路对椎间盘退变起关键作用^[11-12],提示 IL-1 β 与 Wnt/ β -catenin 信号通路间可能存在密切联系。本研究观察了异常力学负荷是否通过激活 IL-1 β /Wnt- β -catenin 信号通路,进而诱发椎间盘退变。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠,体质量 20~30 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物生产许可证号为 SCXK(沪)2013-0016。饲养条件:恒温恒湿,温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度 50%~60%,光照每 12 h 明暗交替,换风次数 15~20 次/h。由浙江中医药大学动物实验研究中心饲养。实验饲养室许可证号为 SYXK(浙)2018-0012。

1.2 主要试剂和仪器

二甲苯、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:MD911521,MD911621);苏木素染液、免疫组化试剂盒、DAB kit、中性树胶(北京百奥思科生物医学技术有限公司,批号:MD911467,MD912068,MDL9,MDL6);抗体 Col2a1, Aggrecan, MMP-3, MMP-13, IL-1 β 和 β -catenin(美国 Abcam 公司,批号:ab16051,ab7632,ab34712,ab19345);GAPDH 抗体(杭州华安生物有限公司,批号:60004-1-1 g);BCA 蛋白定量试剂盒、化学发光检测试剂、预染蛋白标志物(北京索莱宝科技有限公司,批号:pc0020,PE0010,PR1910);Trizol(生工生物工程股份有限公司,批号:B511311);

SYBR Green qPCR 试剂盒、逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号:CW2601,CW2569);J3353 型 X 光机(南京普爱医疗设备股份有限公司); μ CT-100 型 Micro-CT(瑞士 SCANCO Medical AG 公司);ASP200S 全自动脱水机、RM2235 石蜡切片机、HI1220 烤片台、G1150 H 加热石蜡包埋系统、DM3000 正置荧光显微镜(徕卡显微系统(上海)贸易有限公司);Micro17R 低温高速离心机、Nanodrop one 核酸定量仪(美国 Thermo 公司);EPS300 电泳仪、VE180C 电泳槽、VE186 转膜仪(上海天能科技有限公司);LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

1.3 实验动物分组

所有 C57BL/6 小鼠适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法将小鼠随机分为 2 组,每组 6 只,即正常对照组和椎间盘退变模型组。

1.4 椎间盘退变模型制备方法

根据小鼠水逃逸习性^[13],将其放置在有限的含水空间中以诱导其保持长时间的后足站立姿势,增加小鼠腰椎的轴向力学负荷,具体方法为:椎间盘退变模型组小鼠被置于独立的含有 24 $^{\circ}$ C 的水的 2 L 塑料烧杯中,烧杯内的水位设定为 5 mm,通过覆盖小鼠脚踝,以确保其保持后足站立姿势,每天共 5 h,维持 8 周。正常对照组小鼠被置于不含水的 2 L 塑料烧杯中。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 组织样本的获取及储存 所有操作应尽可能减少 RNA 酶对 RNA 的降解。8 周后所有小鼠断颈处死,取一泡沫垫,其上覆盖无菌单,小鼠取俯卧位于无菌单上。迅速用剪刀沿背部正中剪开皮肤,暴露脊柱,将脊柱腰段取下,剔除脊柱周围肌肉组织后,放入 DEPC 水处理后的 PBS 溶液中。在体视显微镜下将

椎间盘用剪刀和尖刀完成剥离,将取下的样本放入 1.5 mL离心管中并迅速储存于液氮中。待所有标本处理完毕后,可将所有离心管从液氮中取出,并迅速转移至-80 ℃冰箱中冻存待用。

1.5.2 苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠腰椎间盘组织的病理学改变 小鼠腰椎组织样本置入 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h 后进行脱钙处理。将脱钙后的小鼠腰椎组织和对应标签放于脱水盒内,再将脱水盒放入吊篮置于脱水机内依次梯度脱水。脱水后将样本置入包埋机,先往包埋框内倒入融化的蜡,再往上加浸好蜡的样本,放入冻台冷却,蜡凝固后取出。修整蜡块,于切片机上切片,厚 4 μm,在组织摊片机上展平,用载玻片捞起后,放入 60 ℃烘箱内烤片,直至水烤干蜡烤化,取出常温保存。随后进行常规 HE 染色,中性树胶封固后,通过显微镜拍照,采集分析样本相关部位。

1.5.3 免疫组织化学染色检测小鼠腰椎间盘组织相关蛋白的表达 组织切片经脱蜡和水合后,置于枸橼酸溶液(0.1 mol/L, pH = 6.0)中,60 ℃水浴孵育 16 h,进行抗原修复。取出组织切片,PBS 漂洗 3 次后,于 3% H₂O₂ 溶液中孵育 10 min,组织切片再经 PBS 漂洗 3 次后,滴加 10% 马血清,在 37 ℃环境下封闭 30 min。擦去封闭液后,滴加适宜浓度的一抗(Col2a1, Aggrecan, MMP-3, MMP-13, IL-1β 和 β-catenin抗体)置湿盒中 4 ℃孵育过夜,PBS 洗去一抗,滴加生物素化二抗工作液(ABclonal),室温下孵育 1 h,DAB 显色剂显色,自来水充分冲洗,HE 复染,脱水,透明,中性树胶封片。通过显微镜拍照,采集分析样本相关部位。

1.5.4 Western Blot 检测小鼠腰椎间盘组织相关蛋白的表达 取 100 mg 椎间盘组织样品置于培养皿中,加入适量液氮,用研钵充分研磨,加入 Lysis Buffer,组织匀浆机中进行匀浆(3×20 s),使组织尽量碾碎,冰上静置裂解 15~30 min。将匀浆液放入离心管中,12 000g,4 ℃离心 5 min,取上清转移至新的预冷的离心管中,用 BCA 试剂盒测浓度,处理蛋白随后上样。用 SDS-PAGE 分离总蛋白,随后用湿转法转移至 PVDF 膜上,一抗 4 ℃过夜,二抗室温孵育 2 h 后显影。

1.5.5 qRT-PCR 检测小鼠腰椎间盘组织相关基因的表达 将 100 mg 椎间盘组织加入 1 mL 的 Trizol 到匀浆管中,将裂解后样品室温放置 5 min,使得核 mRNA 与核酸完全分离。按照逆转录试剂盒说明书要求逆转录 mRNA 为 cDNA 作为模板,通过 SYBR Green qPCR 试剂盒要求进行 qRT-PCR 反应,引物信息如表 1 所示。PCR 反应条件为:95 ℃变性 10 min,95 ℃变性 15 s,60 ℃退火延伸 60 s,40 次循环。

表 1 基因引物序列信息

基因	正向引物	反向引物
Col2a1	5'-ACTGGTAAGT	5'-CCACACCAAAT
	GGGGCAAGAC-3'	TCCTGTTCA-3'
Aggrecan	5'-CCTGCTACTT	5'-AGATGCTGTT-
	CATCGACCCC-3'	GACTCGAACCT-3'
MMP-3	5'-GGAGCGAGGC-	5'-CGTAGACAAGG-
	CATTTACAAC-3'	TAGCCCACTTT-3'
MMP-13	5'-CTTCTTCTTGT	5'-CTGTGGAGGTC
	TGAGCTGGACTC-3'	ACTGTAGACT-3'
IL-1β	5'-GCAACTGTTCC	5'-ATCTTTTGGGG
	TGAACTCAACT-3'	TCCGTCAACT-3'
β-catenin	5'-TGCCAAGTG	5'-GGGATGGT-
	GGTGGTATA-3'	GGGTGTAAGA-3'
β-actin	5'-CACGATGGAGGG	5'-TAAAGACCTCTA
	GCCGGACTCATC-3'	TGCCAACACAGT-3'

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较,方差齐性者采用两独立样本 *t* 检验,方差不齐者采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠腰椎间盘组织病理学观察结果

HE 染色组织学分析结果显示,与正常对照组小鼠的椎间盘组织相比,椎间盘退变模型组小鼠的椎间盘组织髓核细胞数量和细胞外基质含量下降,细胞体积减小,纤维环变薄、结构紊乱、出现裂隙,软骨终板高度降低(见图 1)。

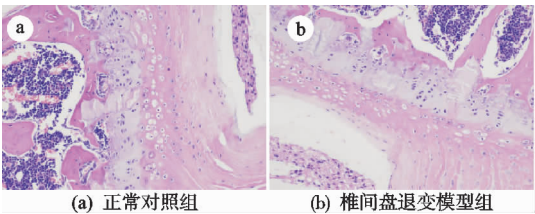


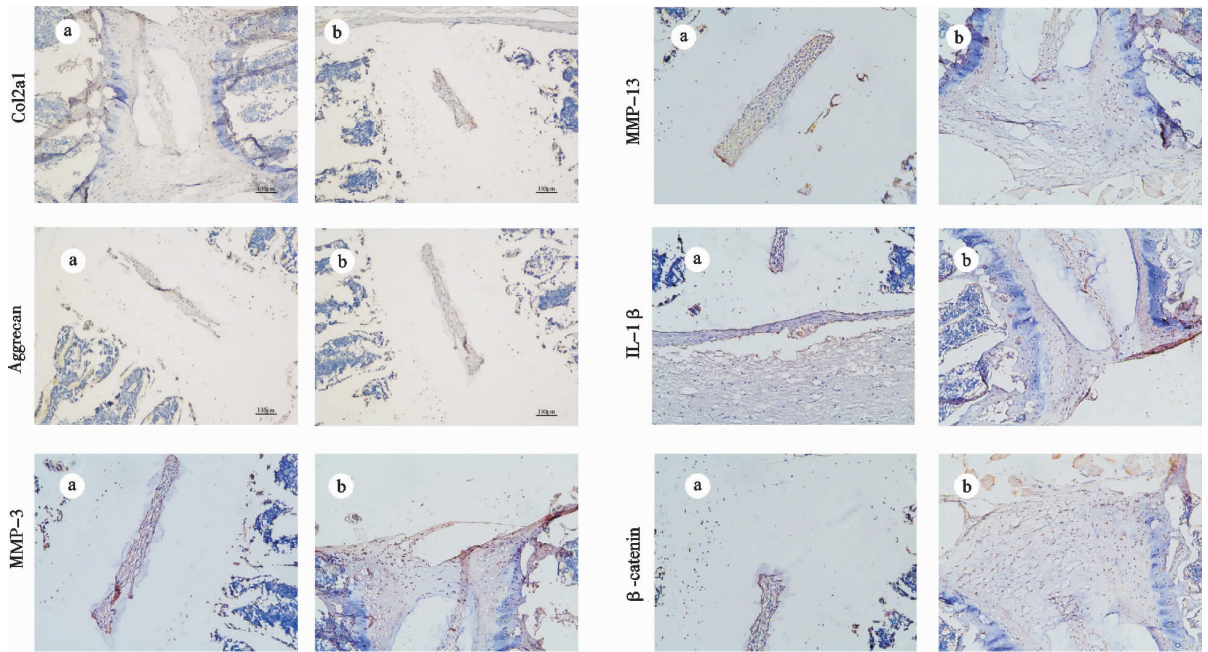
图 1 HE 染色观察各组小鼠腰椎间盘组织的病理学改变(200×)

2.2 免疫组织化学检测各组小鼠腰椎间盘组织相关蛋白的表达结果

借助免疫组织化学检测技术,检测各组小鼠腰椎间盘组织中细胞外基质组成成分 Col2a1 和 Aggrecan,以及细胞外基质降解酶 MMP-3 和 MMP-13 等蛋白的表达情况。检测结果显示,椎间盘退变模型组小鼠腰椎间盘组织中 Col2a1 和 Aggrecan 蛋白的表达明显低于正常对照组小鼠的椎间盘组织。与此相反,椎间盘退变模型组小鼠腰椎间盘组织中 MMP-3 和 MMP-13 等细胞外基质降解酶的表达阳性率显著高于正常对照组小鼠的椎间盘组织。进一步检测各组小鼠腰椎间盘组织中 IL-1β 和 β-catenin 蛋白的表达水平发现,与正常对照组小鼠的腰椎

间盘组织相比较,椎间盘退变模型组小鼠腰椎间盘组织

中 IL-1 β 和 β -catenin 蛋白的表达显著增加(见图 2)。



(a) 正常对照组; (b) 腰椎间盘退变模型组。与正常对照组小鼠的腰椎间盘组织相比,椎间盘退变模型组小鼠腰椎间盘组织中的 Col2a1 和 Aggrecan 蛋白表达下调,而 MMP-3, MMP-13, IL-1 β 和 β -catenin 蛋白表达上调。

图 2 免疫组织化学技术检测各组小鼠腰椎间盘组织中 Col2a1, Aggrecan, MMP-3, MMP-13, IL-1 β 和 β -catenin 等蛋白的表达情况(200 \times)

2.3 Western Blot 技术检测各组小鼠腰椎间盘组织相关蛋白的表达结果

通过 Western Blot 检测技术检测各组小鼠腰椎间盘组织中细胞外基质组成成分 Col2a1 和 Aggrecan,以及细胞外基质降解酶 MMP-3 和 MMP-13 等蛋白的表达情况(见图 3)。检测结果显示,椎间盘退变模型组小鼠腰椎间盘组织中 Col2a1 和 Aggrecan 蛋白的表达显著下降,与正常对照组小鼠比较,差异有统计学意义($P <$

0.01)。与此相反,椎间盘退变模型组小鼠腰椎间盘组织中 MMP-3 和 MMP-13 等细胞外基质降解酶的表达明显上升,与正常对照组小鼠相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。同时,进一步检测了各组小鼠腰椎间盘组织中 IL-1 β 和 β -catenin 蛋白的合成情况,结果显示椎间盘退变模型组小鼠椎间盘组织中 IL-1 β 和 β -catenin 蛋白的合成显著增加,与正常对照组小鼠相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

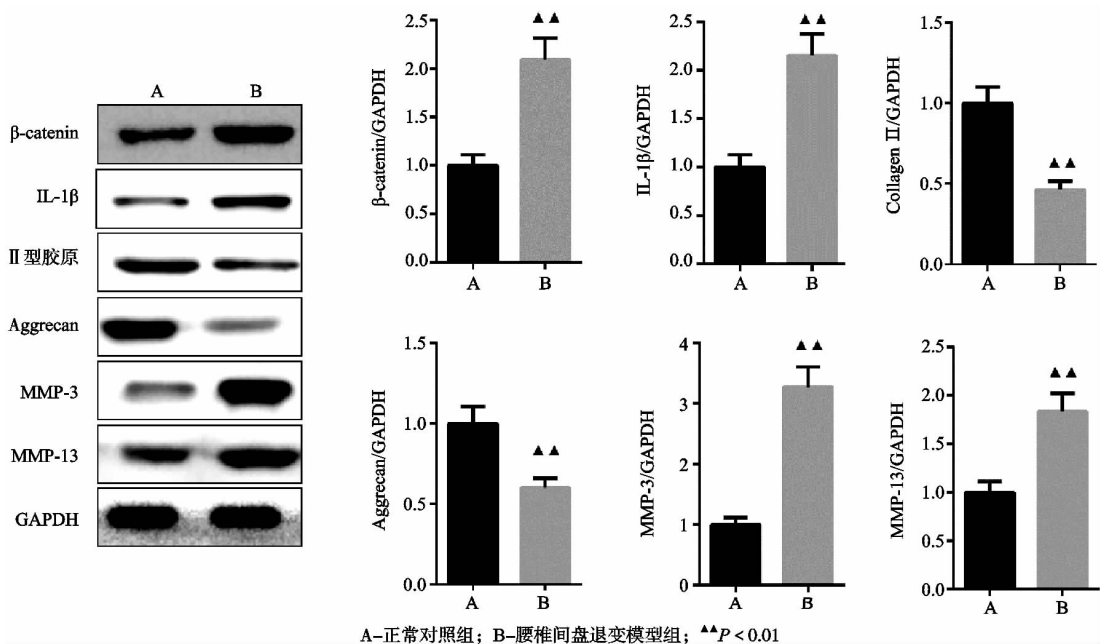


图 3 Western Blot 技术检测各组小鼠腰椎间盘组织 Col2a1, Aggrecan, MMP-3, MMP-13, IL-1 β 和 β -catenin 等蛋白的表达情况

2.4 qRT-PCR 技术检测各组小鼠腰椎间盘组织中相关基因的表达结果

采用 qRT-PCR 技术检测各组小鼠腰椎间盘组织中 Col2a1, Aggrecan, MMP-3, MMP-13, IL-1 β 和 β -catenin 等基因的表达情况 (见图 4)。检测结果显示

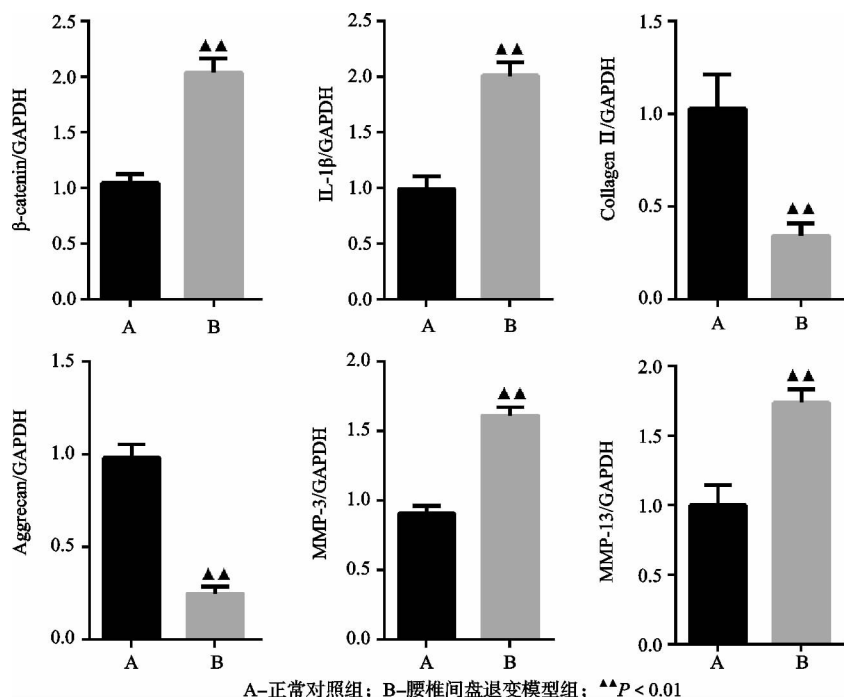


图 4 qRT-PCR 技术检测各组小鼠腰椎间盘组织 Col2a1, Aggrecan, MMP-3, MMP-13, IL-1 β 和 β -catenin 等基因的表达情况

3 讨论

椎间盘通过为脊柱提供柔韧性和抗压力,在人体脊柱的生理性负荷运动中起重要作用^[8],这种运动保证了细胞外基质正常代谢的维持和椎间盘营养的供应^[14]。但是,无节制的力学加载将导致椎间盘退变的发生,是椎间盘退变最主要的致病因素之一。基于此,本研究依据小鼠水逃逸的习性,诱导小鼠后足站立,使腰椎承受异常力学载荷,模拟人类腰椎间盘退变的致病因素。

髓核细胞的减少是椎间盘退变的主要特征之一^[9],髓核细胞通过产生细胞外基质成分,在维持椎间盘代谢平衡中发挥重要作用^[7,15]。本研究借助组织病理学技术观察发现椎间盘退变模型组小鼠的椎间盘高度降低,纤维环结构紊乱,出现裂隙,软骨终板变薄,髓核细胞数量减少,与人类椎间盘退变的组织学特征类似,呈现出椎间盘退变的病理学表现。细胞外基质组成成分含量减少是椎间盘退变的另一重要特征^[9],椎间盘细胞外基质主要由 II 型胶原和蛋白聚糖组成。在椎间盘退变过程中,II 型胶原和蛋白聚糖的合成减少^[16]。本实验发现与正常对照组小鼠比较,后足站立小鼠腰椎间盘组织中 II 型胶原和蛋白聚糖两种蛋白的含量显著减少,编码 II 型胶原和蛋白聚糖的基因也呈下调表达,符合椎间盘退变的特征。上述结果证实了借助小鼠水逃逸的习性,诱导小鼠后足站立,使腰椎承受异常力学载荷,能成功构建腰椎间盘退变小鼠模型。

椎间盘退变模型组小鼠腰椎间盘组织中 Col2a1 及 Aggrecan 基因的表达较正常对照组小鼠显著下调,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);而 MMP-3, MMP-13, IL-1 β 和 β -catenin 基因的表达却明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

IL-1 β 被认为对椎间盘退变进程有巨大影响^[17],在椎间盘退变过程中,IL-1 β 通过上调细胞凋亡相关基因的表达,导致组织细胞功能丧失和数量减少^[18]。本研究观察发现,椎间盘退变模型组小鼠腰椎间盘组织中 IL-1 β 蛋白和基因的表达均显著高于正常对照组小鼠的腰椎间盘组织,说明异常力学负荷通过上调腰椎间盘组织中 IL-1 β 的活性,进而诱发椎间盘退变的发生。与此同时,本实验从基因和蛋白水平证实与正常对照组小鼠比较,腰椎间盘退变模型组小鼠腰椎间盘组织中 β -catenin 的活性显著增加,提示异常力学负荷激活了腰椎间盘组织中 Wnt/ β -catenin 信号通路。更重要的是,多项研究已证实 Wnt/ β -catenin 信号通路在椎间盘退变时被激活,并推动整个病理进程的发生和发展^[19]。IL-1 β 可通过激活结肠癌细胞中的 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肿瘤的生长,因此上述研究结果提示,异常力学负荷可能通过上调 IL-1 β 的表达,继而激活椎间盘细胞中的 Wnt/ β -catenin 信号通路导致椎间盘退变的发生,并促进其发展。

细胞外基质降解过程受基质金属蛋白酶 (MMPs) 及其抑制剂组织抑制金属蛋白酶 (TIMPs) 的调控^[20],退变椎间盘组织中 MMPs 的生成显著增加^[8],一系列证据表明 MMPs 对椎间盘退变起重要作用^[7]。退变椎间盘中 MMP-3 和 MMP-13 的表达显著增加^[16],通过抑制 MMP-3 和 MMP-13 的活性能延缓或逆转椎间

盘退变^[21]。椎间盘细胞中的 Wnt/ β -catenin 信号通路通过诱导 MMPs 的表达降解细胞外基质,引起椎间盘退变^[22]。本研究发现椎间盘退变组小鼠腰椎间盘组织中 MMP-3 和 MMP-13 的表达和活性显著增加,这一结果表明异常力学负荷激活了椎间盘细胞中的 Wnt/ β -catenin 信号通路,并进一步作用于下游的信号分子,促进 MMPs 的合成,引发椎间盘退变。

综上所述,本研究证实迫使小鼠利用后足站立,改变小鼠腰椎的受力状况,使小鼠腰椎间盘受到异常力学负荷,可引发小鼠腰椎间盘退变,建立椎间盘退变小鼠模型,符合人类腰椎间盘退变的发病原因。进一步探索发现异常力学负荷可能通过上调椎间盘内 IL-1 β 的表达和活性,进而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进椎间盘细胞合成 MMPs,降解椎间盘细胞外基质,即异常力学负荷可能激活 IL-1 β /Wnt- β -catenin 信号通路导致腰椎间盘退变。这些结果为异常力学负荷引发椎间盘退变的可能机制提供了新视角,为椎间盘退变的防治提供了新思路。

参考文献

- TERASHIMA Y, KAKUTANI K, YURUBE T, et al. Expression of adiponectin receptors in human and rat Intervertebral disc cells and changes in receptor expression during disc degeneration using a rat tail temporary static compression model[J]. J Orthop Surg Res, 2016, 11(1): 147.
- ZHENG L, XIN Y, SHEN J X, et al. MicroRNA in intervertebral disc degeneration[J]. Cell Prolif, 2015, 48(3):278-283.
- ZHOU X Y, CHEN L L L, GRAD S, et al. The roles and perspectives of microRNAs as biomarkers for intervertebral disc degeneration[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(12):3481-3487.
- HARTVIGSEN J, HANCOCK M J, KONGSTED A, et al. What low back pain is and why we need to pay attention[J]. Lancet, 2018, 391(10137):2356-2367.
- MAHER C, UNDERWOOD M, BUCHBINDER R. Non-specific low back pain[J]. Lancet, 2017, 389(10070): 736-747.
- CHEN F, LIU H, LI Z M, et al. Paraoxonase 1 was negatively associated with intervertebral disc degeneration[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2019, 44(18):E1053-E1062.
- MAKINO H, SEKI S, YAHARA Y, et al. A selective inhibition of c-Fos/activator protein-1 as a potential therapeutic target for intervertebral disc degeneration and associated pain[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):16983.
- HWANG M H, SON H G, LEE J W, et al. Photobiomodulation of extracellular matrix enzymes in human nucleus pulposus cells as a potential treatment for intervertebral disk degeneration[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):11654.
- VERGROESEN P A, KINGMA I, EMANUEL K S, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration; a vicious circle[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(7):1057-1070.
- LIU Q, WANG X M, HUA Y, et al. Estrogen deficiency exacerbates intervertebral disc degeneration induced by spinal instability in rats[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2019, 44(9):E510-E519.
- RISBUD M V, SHAPIRO I M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content[J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(1):44-56.
- HU B, SHI C, XU C, et al. Heme oxygenase-1 attenuates IL-1 β induced alteration of anabolic and catabolic activities in intervertebral disc degeneration[J]. Sci Rep, 2016, 6: 21190.
- AO X, WANG L, SHAO Y, et al. Development and characterization of a novel bipedal standing mouse model of intervertebral disc and facet joint degeneration[J]. Clin Orthop Relat Res, 2019, 477(6):1492-1504.
- HUANG Y C, JILL P G, KEITH D K. Intervertebral disc regeneration: do nutrients lead the way[J]. Nat Rev Rheumatol, 2010(9):561-566.
- WIET M G, PISCIONERI A, KHAN S N, et al. Mast cell-intervertebral disc cell interactions regulate inflammation, catabolism and angiogenesis in discogenic back pain[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):12492.
- SANO T, AKEDA K, YAMADA J, et al. Expression of the RANK/RANKL/OPG system in the human intervertebral disc: implication for the pathogenesis of intervertebral disc degeneration[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2019, 20(1):225.
- 李文超, 林一峰, 梁祖建, 等. 鹿茸多肽对软骨终板细胞基质蛋白及其降解酶基因表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019, 27(1):6-10.
- JOHNSON Z I, SCHOEPLIN Z R, CHOI H, et al. Disc in flames: roles of TNF- α and IL-1 β in intervertebral disc degeneration[J]. Eur Cell Mater 2015, 30:104-116.
- 展嘉文, 王尚全, 朱立国, 等. 持续压力对离体培养兔脊柱运动节段终板内血管内皮生长因子及 β -catenin 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(6):1-5.
- VANDENBROUCKE R E, LIBERT C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(12):904-927.
- YANG S F, LI L H, ZHU L H, et al. Aucubin inhibits IL-1 β or TNF- α -induced extracellular matrix degradation in nucleus pulposus cell through blocking the miR-140-5p/CREB1 axis[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 13639-13648.
- HIYAMA A, SAKAI D, RISBUD M V, et al. Enhancement of intervertebral disc cell senescence by WNT/ β -catenin signaling-induced matrix metalloproteinase expression[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(10):3036-3047.

(收稿日期:2020-06-02)