

富马酸二甲酯对大鼠椎间盘退变髓核中低氧诱导因子-1 α 表达和功能的影响

王伟^{1,2}, 方军², 李化壮², 赵光宗², 王善涛²

(1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261042; 2. 潍坊市益都中心医院, 山东 青州 262500)

摘要:目的 建立 SD 大鼠腰椎间盘退变模型采用测定低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 在大鼠模型腰椎间盘髓核中的表达情况及作用, 探讨富马酸二甲酯 (DMF) 对其表达及功能的影响。方法 对大鼠腰椎退变模型行磁共振成像 (MRI) 扫描后, 取 L4/L5 节段髓核组织行蛋白多糖检测, 石蜡包埋、切片后进行 HIF-1 α 的免疫组化染色。结果 MRI 结果显示模型对照组 (B 组) 的椎间盘髓核存在明显的退变, T2 加权相信号降低 ($P < 0.05$)。B 组髓核中的 HIF-1 α 呈强阳性, 与另两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对全部的髓核组织的进行蛋白多糖含量的检测, 可见对照组 B 组的蛋白多糖成分 (2.06 ± 0.04) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 流失最为严重, 富马酸二甲酯用药组 (C 组) (2.06 ± 0.05) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 相对较轻, 正常对照组 (A 组) 含量为 (3.28 ± 0.03) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 三组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 HIF-1 α 在退变的腰椎间盘组织中表达增高, 其表达与腰椎的退变密切相关。富马酸二甲酯作为 HIF-1 α 的抑制剂能降低 HIF-1 α 的表达, 抑制和延缓腰椎间盘退变的形成和发展。

关键词: 椎间盘退变; 富马酸二甲酯; 低氧诱导因子-1 α

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.008

Experimental research on the effect of dimethyl fumarate on the expression and function of hypoxia-inducible factor-1 α on rat intervertebral disc degeneration

WANG Wei^{1,2}, FANG Jun², LI Huazhuang², ZHAO Guangzong², WANG Shantao²

(1. Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261042, China;

2. Yidu Central Hospital of Weifang, Qingzhou, Shandong 262500, China)

Abstract: Objective To get experimental lumbar degenerative intervertebral disc model and evaluate the expression of HIF-1 α and the affect of dimethyl fumarate (DMF) on the expression and function of HIF-1 α . Methods The L4/L5 segment nucleus pulposus tissue was taken for detection of protein polysaccharides and the immunohistochemistry with HIF-1 α after MRI scan of the rat model of lumbar degeneration. Results The results of MRI showed that there was a significant degeneration of the intervertebral disc nucleus in the group B, and the T2 weighted phase signal was decreased ($P < 0.05$). The immunohistochemistry showed that HIF-1 α was strongly positive in the nucleus of group C, the differences were statistically significant ($P < 0.05$) compared with two control groups. The proteoglycan content in the nucleus pulposus was of all groups shown that proteoglycan contents in group A, B, C was (3.28 ± 0.03), (2.06 ± 0.04), (2.06 ± 0.05) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ respectively. The difference between them was statistically significant ($P < 0.01$). Conclusions The high expression of HIF-1 α in lumbar degenerative disc indicated that the expression of HIF-1 α is closely related to the lumbar disc degenerative. Treatment with Dimethyl Fumarate inhibits the expression of HIF-1 α and the development of experimental rat lumbar degenerative disc *in vivo*.

Key words: Lumbar degenerative intervertebral disc; Dimethyl fumarate; Hypoxia-inducible factor-1 α

低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 是在低氧的环境下具有调节自身机体功能作用的一类关键的氧依赖转录激活细胞因子。HIF-1 α 的蛋白质水平通过可控的蛋白质水解作用受到氧张力的严格调控。有研究证实, HIF-1 α 于存在突出退变的椎间盘中的表达强度要显著强于正常椎间盘, 且与细胞的凋亡具

有正相关, HIF-1 α 的表达强度会随着椎间盘髓核组织退变程度的进展而增强^[1-2]。富马酸二甲酯是临床常用的一种新型 HIF-1 α 抑制剂药物, 主要用于治疗多发性硬化, 是一种调节分子免疫的制剂, 其作用机制尚不明确^[3-4]。富马酸二甲酯是烟酸受体激动剂的一种, 可通过激活核因子- κ B (NF- κ B) 通路, 特异性结合多种基因的启动子、增强子位点, 调控机体的免疫应答反应, 降低某些炎性因子在中

枢系统中的表达,从而使其避免损害^[5]。本研究将检测在退变椎间盘组织内 HIF-1 α 的表达情况以及富马酸二甲酯对其表达的影响,以便更深入地了解椎间盘退化病变的机制,探索抑制退变的方法,这对椎间盘退变性疾病的研究有重大临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料 3 月龄的 SD 大鼠 48 只,平均体质量 250 g(购自山东大学动物中心);HIF-1 α 抗体试剂盒(购自南京建成生物公司);SP-9000 试剂盒(购自北京中杉金桥生物公司);富马酸二甲酯缓释胶囊购自 Biogen Idec 公司;10% 甲醛、二甲苯、氢氧化钠等均来自上海化学试剂厂。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组与造模干预 将大鼠随机分为 3 组,每组 16 只。正常对照组(A 组)未行任何手术及药物干预;模型对照组(B 组),建立腰椎间盘突出模型并口服生理盐水;富马酸二甲酯用药组(C 组),建立腰椎间盘突出模型并口服富马酸二甲脂(DMF)制剂。氯胺酮麻醉后将 B 组和 C 组大鼠的 L1 至 L6 节段的棘上、棘间韧带以及两旁的竖棘肌、棘突关节突等全部切除。标记后在标准饲养条件下单鼠单笼饲养,术后常规口服抗生素(注射用青霉素 20 万单位)预防感染治疗 1 周。术后 8 周分批分期处理动物进行观察。药物干预: C 组:给予 DMF 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹;A 组及 B 组用“生理盐水”3.0 mL · kg⁻¹ · d⁻¹。B 组和 C 组动物模型建立手术后 2 周开始给药,C 组按上述剂量灌胃给药,持续给药 6 周。第 8 周所有的实验动物行 MRI 扫描(扫描参数:矢状面 T1 加权 TR500/TE20,2 次收集信号;T2:T2 加权 TR2000/TE15/90,4 次收集信号,每层厚度 1 mm,间隔厚度 0 mm)。然后取 L4/5 节段的椎间盘的髓核作 5 μ m 切片备用。

1.2.2 免疫组化 髓核切片经常规脱蜡水化、磷酸缓冲盐溶液(PBS)水洗 3 遍每次 5 min,3% H₂O₂ (85% CH₄O)滴加置于 TMA 上,室内静置 15 min;PBS 水洗 3 次,每次 5 min;抗原修复;PBS 水洗 3 次,每次 5 min;山羊血清封闭,37 $^{\circ}$ C 15 min。甩去多余液体;滴加 I 抗(1:50 稀释),4 $^{\circ}$ C 过夜;过夜后需在 37 $^{\circ}$ C 复温 45 min;PBS 水洗 3 次,每次 5 min;滴加 II 抗(1:50 稀释),37 $^{\circ}$ C 30 min;将 0.05% 的辣根酶标记卵白素 II 抗工作液 37 $^{\circ}$ C 30 min;PBS 水洗 3 次,每次 5 min;在光学显微镜下滴加二氨基联苯(DAB) 5 ~ 10 min 并控制染色深度;PBS 或自来水冲洗 10 min;苏木素复染 5 min,1% 的盐酸分化,乙醇梯度脱水;PBS 水洗 3 次,每次 5 min;脱水、透明、封片、镜检。

1.2.3 蛋白多糖检测 分别取各组实验动物的 L4/L5 椎间盘组织,准确称重 0.3 g,研磨成浆后放入离心管内滴加 3% NaOH 溶液 2 mL,恒温振荡 2 h,将溶液 pH 值调至 8 ~ 9 之间,后滴加胰蛋白酶 2 mL,室温酶解 2 h。根据试剂盒的说明方法制备蛋白多糖标准品(1 ng · L⁻¹)精确取。0、6、12、18、24 μ L,稀释至 1 mL,加入间苯三酚溶液 2 mL,多糖标准品浓度最终为 0、2、4、6、8 ng · L⁻¹,水浴显色,100 $^{\circ}$ C,8 min。将去离子水(ddH₂O)空白调零,紫外分光光度计 554 nm 处测取各管 A 值,画出标准曲线。使用上述同样的方法测定各实验样品的 A 值。依据测出的 A 值结果换算出蛋白多糖(ng · L⁻¹)在三组椎间盘组织样品中的含量。用 Nikon 光学显微镜(Olympus,日本)进行切片结果分析,使用数码相机系统(佳能 A710,日本)记录图像数据备用。

1.3 统计学方法 采取 SPSS 软件 18.0 分析,数据呈正态分布且方差齐性,则采取单因素方差分析方法,两两比较用 LSD;方差不齐或者非正态分布,用 Kruskal-Wallis H 方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 磁共振成像(MRI)结果 A 组 MRI 显示脊柱的正常生理弯曲存在,腰椎体及椎间盘排列有序,未见异常,椎间盘 T2 像呈高信号。B 组可出现椎间盘突出及后移,严重者甚至有椎管及椎体间隙狭窄的发生。T2 信号下明显降低。C 组在术后 8 周时椎间盘 T2 信号强度下降,可以出现程度不同的椎间盘突出及硬膜囊受压,信号强度介于 A 组和 B 组两者之间。

将上述各组椎间盘 T2 值进行统计学分析比较,A 组 T2 值为(224.30 $\pm$ 1.54);B 组为(164.30 $\pm$ 1.42);C 组为(201.36 $\pm$ 1.12)。三组数据之间差异有统计学意义,运用 SPSS18.0 对以上数据进行 Kruskal-Wallis H 检验($F = 18.32$),差异有统计学意义($P < 0.01$),具体见表 1,图 1。

表 1 8 周时各组椎间盘髓核矢状位 MRI 的 T2 加权像信号变化比较

组别	鼠数/只	T2 值/ $\bar{x} \pm s$
A 组	16	224.30 $\pm$ 1.54
B 组	16	164.30 $\pm$ 1.42
C 组	16	201.36 $\pm$ 1.12

注:进行 Kruskal-Wallis H 检验, $F = 18.32$,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

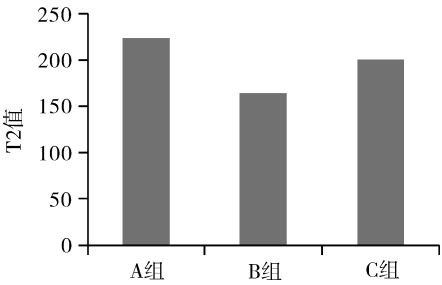


图1 各组椎间盘髓核矢状位 MRI 的 T2 加权像信号值比较

2.2 HIF-1 a 表达的结果 将各组动物椎间盘髓核组织利用免疫组化进行 SP 染色,随机选取互不重叠的 5 个视野,从低倍到高倍镜依次观察。椎间盘髓内组织中的脊索细胞和类软骨细胞的胞浆中均可见阳性染色。见图 2 ~ 4。无论椎间盘组织是否发生退变、突变的程度如何,HIF-1 α 均会在髓核组织内有所表达,但在 B 组中表达呈强阳性,远高

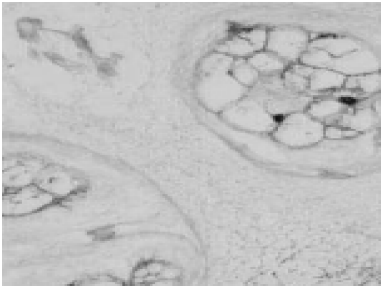


图2 A 组椎间盘组织中偶有少量的 HIF-1 α 的表达 (SP 染色 $\times 40$)

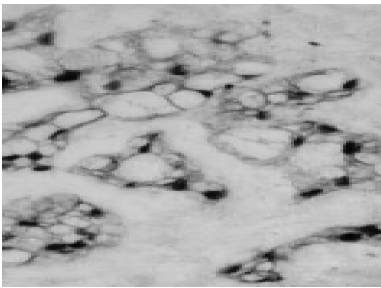


图3 B 组的 HIF-1 α 蛋白表达阳性染色明显增多,为强阳性 (SP 染色 $\times 40$)

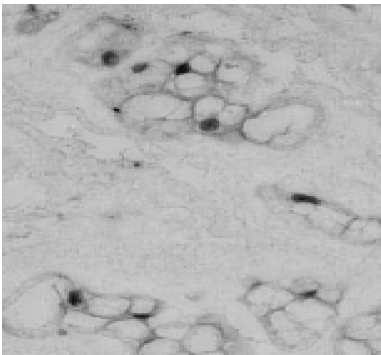


图4 C 组的 HIF-1 α 蛋白表达为弱阳性 (SP 染色 $\times 40$)

于 C 组和 A 组;C 组的表达高于 A 组而低于 B 组。运用 SPSS18.0 对以上数据进行 Kruskal-Wallis H 检验($H=23.52$),各组大鼠 HIF-1 α 阳性表达情况差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

表2 各组大鼠髓核组织中 HIF-1 α 阳性表达情况/只

组别	鼠数	HIF-1 α 表达			
		阴性	弱阳性	中强阳性	强阳性
A 组	16	14	2	0	0
B 组	16	0	1	1	14
C 组	16	2	7	3	4
合计	48	16	10	4	18

注:Kruskal-Wallis H 检验($H=23.52$),各组大鼠 HIF-1 α 阳性表达情况差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 灌胃富马酸二甲酯后蛋白多糖的含量变化 对全部的髓核组织蛋白多糖含量进行检测, B 组灌胃后的蛋白多糖成分含量最少,流失最为严重,C 组相对较轻,A 组未见流失。三组蛋白多糖进行比较($F=3.422$),差异有统计学意义($P<0.05$),三组大鼠蛋白多糖水平数据见表 3,各组实验动物髓核组织中蛋白多糖水平检测的趋势见图 5。

表3 各组大鼠灌胃前后蛋白多糖水平比较/($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	灌胃前	灌胃后
A 组	16	3.27 ± 0.05	3.28 ± 0.03
B 组	16	3.29 ± 0.03	2.06 ± 0.04
C 组	16	3.22 ± 0.05	2.56 ± 0.05

注:三组蛋白多糖进行比较($F=3.422$),差异有统计学意义($P<0.05$)。

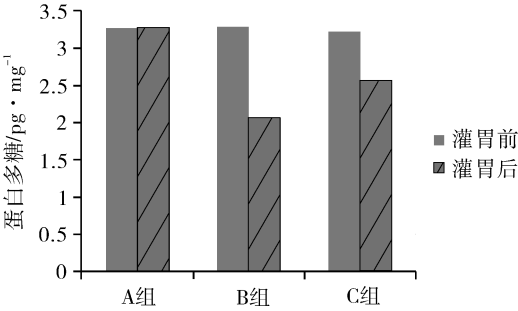


图5 各组髓核组织中蛋白多糖水平的比较

3 讨论

国外学者 Semenza 等^[6]发现一类能与促红细胞生成素(EPO)基因的低氧反应元件上特异结合的蛋白,将其命名为低氧诱导因子-1(HIF-1)。HIF-1 α 作为一类可使组织细胞在低氧环境中能够迅速适应的重要因子,是机体在低氧的环境状态下调节机体功能的一类重要的氧依赖转录激活因

子。其可以促进血管内皮生长因子(VEGF)和葡萄糖受体及外源性人重组促红细胞生成素形成,激活炎症因子表达并诱导泡沫细胞的形成,对细胞的凋亡及分化起到重要的调控作用^[7-10]。椎间盘组织相当于人类机体中的无血管组织,在形态上髓核细胞又近似于软骨细胞^[11],他们的新陈代谢通过毛细血管进行扩散,软骨在其附近。HIF-1如何在人髓核中表达,目前有以下几种观点:(1)髓核是无血管组织,生长在缺氧的环境;(2)具有自身类似关节软骨细胞的生理和组织学结构;(3)HIF在大鼠髓核中表达已被证实。已有的实验结果表明 HIF-1 α 与多种细胞因子与椎间盘退变过程相关,并发挥着关键作用^[9,12]。两者在退变髓核中呈正性相关且高度表达。众多的研究表明 HIF-1 α 、Sox-9、VEGF、转化生长因子(TGF)、基质金属蛋白酶(MMPs)、环氧化酶(COX-2)、骨形态蛋白(BMP)等众多细胞因子均与椎间盘的退变相关^[13-17]。然而在椎间盘的退变过程中 HIF-1 α 极有可能起着中心作用,调控葡萄糖转运、卵白多糖和胶原纤维的降解、促进血管再生、调控细胞的凋亡,而 Sox-9、VEGF、TGF、MMPs、COX-2、BMP 之间可能也存在协同作用,一同介入椎间盘退变过程。其中 HIF-1 α 与人类腰椎椎间盘退变的形成、加重具有某种正相关性,作为低氧状态下关键调节物的低氧诱导因子,能激活炎症因子的表达,诱导泡沫细胞的形成,调控多种细胞的凋亡及分化。当椎间盘发生退变时,会出现营养物质的供应不足和局部代谢障碍,为适应这种缺血缺氧状态, HIF-1 α 因子表达加强^[18]。正常情况下,椎间盘组织的营养来自椎体软骨的终板途径。当椎间盘出现退变时,营养物质局部代谢障碍、相对缺血缺氧,使 HIF-1 α 、一氧化氮、白细胞介素等得以表达来适应局部代谢障碍及缺氧环境,在这些细胞因子共同作用下,调节椎间盘蛋白多糖和胶原纤维的代谢, HIF-1 α 在椎间盘细胞的低氧环境及代谢过程过程中的作用至关重要^[19]。人体的 HIF-1 主要通过两个方面的作用机制参与机体的缺氧的调节,一方面是激活状态下的 HIF-1 与靶基因位点生成转录起始复合物,促进 VEGF 的表达,诱导新血管生成来适应机体的缺氧环境;另一方面是 HIF-1 能激活 P53 基因,抑制血管内皮细胞(ECs)凋亡,诱导新血管的生成^[20]。HIF-1 在退变的椎间盘组织的表达是否也是通过上述相同机制有待于我们继续研究。

本研究将新型 HIF-1 α 抑制剂富马酸二甲酯应用于实验动物,探讨富马酸二甲酯对 HIF-1 α 表达

的影响,同时对 HIF-1 α 在退变中的髓核进行检测,在正常或存在退变的情况下,髓核组织内 HIF-1 a 都有所表达,但在 B 组中表达强度显著高于 C 组和 A 组。对全部的髓核组织的进行蛋白多糖含量检测,B 组的蛋白多糖成分含量最少,流失最为严重,C 组相对较轻。所以,我们认为 HIF-1 α 的表达及强度与腰椎间盘的退变及其程度具有正相关性,退变程度越深表达越强。富马酸二甲酯能有效减少 HIF-1 α 的表达,对防止和延缓退变的发生、发展都具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] FUJITA N, CHIBA K, SHAPIRO IM, et al. 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(2): 401-412.
- [2] TRAN CM, FUJITA N, HUANG BL, et al. Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 and CCN2 Form a Regulatory Circuit in Hypoxic Nucleus Pulposus Cells; CCN2 SUPPRESSES HIF-1 LEVEL AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(18): 12654-12666.
- [3] STOOFF TJ, FLIER J, SAMPAT S, et al. The antipsoriatic drug dimethylfumarate strongly suppresses chemokine production in human keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells[J]. Br J Dermatol, 2001, 144(6): 1114-1120.
- [4] SEIDEL P, ROTH M. Anti-inflammatory dimethylfumarate: a potential new therapy for asthma[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 875403.
- [5] GILL AJ, KOLSON DL. Dimethyl Fumarate Modulation of Immune and Antioxidant Responses: Application to HIV Therapy[J]. Critical Reviews in Immunology, 2013, 33(4): 307-309.
- [6] SEMENZA GL. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1[J]. J Appl Physiol, 2004, 96(3): 1173-1177.
- [7] GESSI S, FOGGI E, SACCHETTO V, et al. Adenosine modulates HIF-1 α , VEGF, IL-8, and foam cell formation in a human model of hypoxic foam cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(1): 90-97.
- [8] WANG P, QI H, SUN C, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α exacerbates endothelial barrier dysfunction induced by hypoxia[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32(4): 859-870.
- [9] 王俊丰, 贾长青, 刘洪亮, 等. 缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子在突出腰椎间盘中的表达及意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(1): 65-69.
- [10] XIANG L, GILKES DM, CHATURVEDI P, et al. Ganetespib blocks HIF-1 activity and inhibits tumor growth, vascularization, stem cell maintenance, invasion, and metastasis in orthotopic mouse models of triple-negative breast cancer[J]. Journal of Molecular Medicine, 2013, 92(2): 151-164.

葛根素通过调控炎症因子抑制兔膝关节骨性关节炎的研究

陈兴华,黄珍谷,王棚,刘涛

(重庆市大足区人民医院骨科,重庆 402360)

摘要:目的 研究葛根素对兔膝关节骨性关节炎的抑制作用及机制。**方法** 将40只成年新西兰兔随机分为正常组、模型组、生理盐水组、葛根素组,每组10只,后三组构建兔膝关节骨性关节炎模型。模型构建成功后,生理盐水组和葛根素组分别膝关节内注射生理盐水、葛根素0.5 mL,5周共10次。药物注射完成后,切开膝关节肉眼观察关节面,抽取关节液采用ELISA法检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、环氧化酶2(COX2)、前列腺素E2(PGE2)表达水平,Western blot法检测关节软骨组织中基质金属蛋白酶2(MMP-2)、II型胶原蛋白(Collagen II)表达水平。**结果** 葛根素作用后膝关节软骨面病损程度明显减轻。葛根素作用后膝关节液中IL-1 β 、TNF- α 、COX2、PGE2表达水平降低,IL-10表达水平增加,而关节软骨组织中MMP-2表达降低,Collagen II表达增加。**结论** 葛根素可能参与了骨性关节炎中促炎因子与抑炎因子间的平衡,具有一定的抑制细胞外基质中胶原的降解作用,从而有可能减缓骨性关节炎的病程进展。

关键词:葛根素;骨性关节炎;炎症因子;基质金属蛋白酶;II型胶原蛋白

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.009

Puerarin inhibits the progress of osteoarthritis of rabbit knee by balancing inflammation system

CHEN Xinhua, HUANG Zhengu, WANG Peng, LIU Tao

(Department of Orthopedics, Dazu District People's Hospital, Chongqing 402360, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of puerarin on osteoarthritis of rabbit knee and its mechanism. **Methods** Forty adult new zealand rabbits were randomly divided into normal, model, saline and puerarin group, ten in each group. The rabbits in last three groups were chose to construct knee osteoarthritis model. After success of model construction, the saline and puerarin group were injected with 0.5 mL saline or puerarin into knee joint cavity respectively, twice one week for five weeks. After treatment, changes on knee joint articular surface was observed by naked eye after incision. The expression level of IL-1 β , IL-10, TNF- α , COX2, PGE2 in synovia were detected by ELISA, and the expression level of MMP-2 and Collagen II in articular cartilage tissue were detected by Western blot.

Results Cartilage lesion were alleviated after treatment with puerarin. The expression of IL-1 β , TNF- α , COX2, PGE2 decreased and

基金项目:重庆市卫生局科研项目(2012-2-356)

通信作者:黄珍谷,男,副主任医师,研究方向:创伤骨科和关节外科,E-mail:1293015523@qq.com

- [11] KIM KW, LIM TH, KIM JG, et al. The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs[J]. Spine, 2003, 28(10):982-990.
- [12] 裴洪, 廖全明. GLUT-1 在人类腰椎间盘中表达及研究意义[J]. 中国骨与关节杂志, 2012, 1(6):639-643.
- [13] 汤艳, 陈惠德. 退变椎间盘 NF- κ B 与 IL-1、IL-6、TNF- α 表达的相关性研究进展[J]. 安徽医药, 2011, 15(10):1304-1306.
- [14] LEE YA, JI HI, LEE SH, et al. The role of adiponectin in the production of IL-6, IL-8, VEGF and MMPs in human endothelial cells and osteoblasts: implications for arthritic joints[J]. Exp Mol Med, 2014, 46:e72.
- [15] KIM K, PARK WY, KIM JY, et al. Prognostic Relevance of the Expression of CA IX, GLUT-1, and VEGF in Ovarian Epithelial Cancers[J]. Korean Journal of Pathology, 2012, 46(6):532.
- [16] MORAES TM, ROZZA AL, KUSHIMA H, et al. Healing actions of essential oils from Citrus aurantium and d-limonene in the gastric mucosa: the roles of VEGF, PCNA, and COX-2 in cell proliferation[J]. J Med Food, 2013, 16(12):1162-1167.
- [17] AHLUWALIA A, TARNAWSKI AS. Critical role of hypoxia sensor-HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(1):90-97.
- [18] SEMENZA GL. O2-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1[J]. J Appl Physiol, 2004, 96(3):1173-1177.
- [19] WALSH AJ, LOTZ JC. Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading[J]. J Biomech, 2004, 37(3):329-337.
- [20] PARK JB, PARK IC, PARK SJ, et al. Anti-apoptotic effects of caspase inhibitors on rat intervertebral disc cells[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(4):771-779.

(收稿日期:2016-06-21,修回日期:2016-10-21)