

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00739

## 退变颈椎椎间盘髓核中磷酸化 p38 MAPK 的表达

杨志高, 张帆, 陈智, 程勇军, 李凤宁, 吕开阳, 沈洪兴\*

第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 观察不同退变程度颈椎病患者椎间盘髓核(nucleus pulposus, NP)的病理改变及磷酸化 p38 MAPK(phosphorylated p38 mitogen activated protein kinase, p-p38 MAPK)的表达差异,探讨颈椎椎间盘退变可能的分子机制。**方法** 收集 2008 年 10 月至 2009 年 5 月在我院行手术治疗的 35 例颈椎患者的 NP 组织,获取术前相应颈椎 MRI(T<sub>2</sub>像正中矢状位)资料。其中男性 25 例,女性 10 例,年龄 27~82 岁,5 例来自单间隙,18 例来自两间隙,12 例来自三间隙;4 例为 C<sub>3/4</sub>、12 例为 C<sub>4/5</sub>、14 例为 C<sub>5/6</sub>、5 例为 C<sub>6/7</sub>。19 例 NP 组织用于普通病理和免疫组织化学染色,16 例用于蛋白质印迹分析。采用颈椎椎间盘 MRI 退变分级系统评定术前 NP 组织标本相应 MRI 退变程度。观察不同退变程度时 NP 组织的病理改变及 p-p38 MAPK 在 NP 组织中的定位;分析退变椎间盘中 p-p38 MAPK 含量与其 MRI 退变程度间的关系。**结果** 随着颈椎椎间盘退变程度加重, NP 内胶原纤维逐渐增多、增粗、变性,甚至聚集成团, NP 逐渐纤维化; p-p38 MAPK 定位于 NP 细胞核; NP 细胞 p-p38 MAPK 表达阳性率随颈椎椎间盘退变程度加重逐渐升高,不同退变等级阳性表达的程度(阴性、弱阳性、强阳性),组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );退变颈椎椎间盘中 p-p38 MAPK 的表达量(因变量 Y)与椎间盘退变程度(自变量 X)间存在线性关系:  $Y = 0.423X - 0.675$  ( $P < 0.05$ )。**结论** 随退变程度加重,退变 NP 组织中正常组织逐渐被纤维组织替代,趋于纤维化; p-p38 MAPK 定位于 NP 细胞核;其表达强度随退变加重而增强; p38 MAPK 信号通路的激活可能是人颈椎椎间盘退变的机制之一。

**[关键词]** 颈椎病;髓核; p38 丝裂原活化蛋白激酶类;椎间盘退变

**[中图分类号]** R 681.531 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0739-05

### Expression of phosphorylated p38 MAPK in nucleus pulposus of degenerated cervical intervertebral disc

YANG Zhi-gao, ZHANG Fan, CHEN Zhi, CHENG Yong-jun, LI Feng-ning, LÜ Kai-yang, SHEN Hong-xing\*

Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the pathological changes of nucleus pulposus(NP)in cervical spondylosis patients and the expression of phosphorylated p38 mitogen activated protein kinase(p-p38 MAPK) in NP with the progression of cervical disc degeneration, in an attempt to explore the mechanism behind cervical disc degeneration. **Methods** NP specimens were collected from 35 patients with cervical spondylosis, who received surgical treatment during October 2008 to May 2009 in our hospital. The preoperative MRI (T<sub>2</sub>-weighted midsagittal images) information of all patients was obtained. The 35 cases included 25 males and 10 females, with an age range of 27-82 years. Five specimens were from a single space, 18 from two spaces, and 12 from three spaces; 4 specimens were from C<sub>3/4</sub>, 12 from C<sub>4/5</sub>, 14 from C<sub>5/6</sub>, and 5 from C<sub>6/7</sub>. Nineteen specimens were used for pathology and immunohistochemistry study and 16 for Western blotting analysis. The degrees of disc degeneration were assessed by MRI grading system for cervical intervertebral disc degeneration. The pathological changes of NP of different degeneration grades and the location of p-p38 MAPK in NP were observed, and the relationship between the p-p38 MAPK and the degrees of MRI degeneration was analyzed. **Results** With the aggravation of discs degeneration, the collagen fibers within NP were increased, thickened, and degraded, forming clusters, and the NP gradually became fibrotic. Phosphorylated p38 MAPK located in the cell nucleus of NP tissues. The positive rate of p-p38 MAPK increased gradually with the aggravation of degeneration, and the expression degrees of p-p38 MAPK (negative, weakly positive, strongly positive) were significantly different between groups of different degeneration degrees( $P < 0.05$ ). A linear relationship was found between p-p38 MAPK expression and the degeneration degrees of cervical disc:  $Y = 0.423X - 0.675$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Normal tissues are gradually replaced by fibrotic tissues in degenerated NP. Phosphorylated p38 MAPK is located in the cell nucleus of NP cells; the p-p38 MAPK plays important roles in the cervical intervertebral discs degeneration. Expression of phosphorylated p38

**[收稿日期]** 2010-02-04 **[接受日期]** 2010-04-09

**[基金项目]** 军队“十一五”医药卫生科研基金(06MA163). Supported by “Eleventh Five-Year Plan” for Medical Science Research Foundation of the PLA(06MA163).

**[作者简介]** 杨志高, 硕士生. E-mail: yangmu322301@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873396, E-mail: shenhxgk@126.com

MAPK in NP increases with the aggravation of degeneration, suggesting that activation of p38 MAPK signaling pathway may be one of the mechanisms for cervical disc degeneration.

**[Key words]** cervical spondylosis; nucleus pulposus; p38 mitogen-activated protein kinases; intervertebral disc degeneration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7): 739-743]

椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 直接或间接导致了脊柱肌肉骨骼相关疾病的发生, 给个人及社会带来沉重负担<sup>[1]</sup>。以往研究证实局部慢性炎症参与了退变髓核 (nucleus pulposus, NP) 组织的病理改变。p38 MAPK 是由 360 个氨基酸组成的相对分子质量为 38 000 的蛋白, 其相关信号通路在炎症过程中发挥重要作用, 活化的 p38 MAPK 可显著提高炎症因子含量<sup>[2]</sup>, 引起细胞凋亡, 基质改变, 这可能是导致颈椎椎间盘退变 (cervical intervertebral disc degeneration, CIDD) 逐渐加重的生物学机制之一<sup>[3]</sup>。

本实验通过病理、免疫组化及蛋白质印迹法观察不同退变程度颈椎椎间盘 NP 组织的病理改变、磷酸化 p38 MAPK (p-p38 MAPK) 在 NP 组织表达的定位情况、分析 p-p38 MAPK 表达与椎间盘退变程度间的关系, 探讨人颈椎椎间盘退变的分子生物学机制, 以期为临床延缓或减少颈椎病的发生提供分子治疗的理论依据。

## 1 对象和方法

**1.1 研究对象** 2008 年 10 月至 2009 年 5 月收集 35 例颈椎病患者术中 NP 标本及术前颈椎 MRI (T<sub>2</sub> 像正中矢状位) 资料。随机分为两组, 一组 19 例 (14 例男性, 5 例女性, 年龄 42~78 岁, 其中 3 例来自单间隙, 10 例来自两间隙, 6 例来自三间隙, 2 例为 C<sub>3/4</sub>、7 例为 C<sub>4/5</sub>、7 例为 C<sub>5/6</sub>、3 例为 C<sub>6/7</sub>) 用于普通病理和免疫组织化学; 一组 16 例 (11 例男性, 5 例女性, 年龄 27~82 岁, 其中 2 例来自单间隙, 8 例来自两间隙, 6 例来自三间隙, 2 例为 C<sub>3/4</sub>、5 例为 C<sub>4/5</sub>、7 例为 C<sub>5/6</sub>、2 例为 C<sub>6/7</sub>) 用于蛋白质印迹分析。术中所有标本均在离体后于 -80℃ 的低温冰箱中保存。全部患者均在第二军医大学长海医院骨科行颈前路椎间盘摘除植骨融合内固定术。

**1.2 纳入标准** 自愿捐献自身 NP 组织的颈椎病患者; 需行颈前路手术治疗的颈椎病患者; 排除颈椎外伤、肿瘤、炎症、结核、畸形的单纯颈椎病患者。

**1.3 颈椎椎间盘退变影像学分级** 采用 Miyazaki 等<sup>[4]</sup>介绍的人颈椎椎间盘退变 MRI 分级系统对留取的患者术前 MRI 资料 (T<sub>2</sub> 像正中矢状位) 进行退变程度的评定。

**1.4 H-E 染色** 术中取退变 NP 组织, 经 4% 甲醛

溶液固定后, 常规石蜡包埋, 4 μm 切片。切片常规用二甲苯脱蜡, 经各级乙醇至水洗。苏木精染色 5 min, 自来水冲洗。盐酸乙醇分化 30 s 后自来水浸泡 15 min。置伊红液 2 min。常规脱水, 透明, 封片。普通光镜观察。

**1.5 免疫组织化学染色** 石蜡切片常规脱蜡至水, PBS 洗 3×3 min; 用 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液 (CB) pH 6.0 热诱导修复 (微波 3 档 20 min), 室温自然冷却, PBS 洗 3×3 min; 1 mol/L HCl 20 min, PBS 洗 3×3 min; 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制内源性过氧化物酶 20 min, 室温, PBS 洗 3×3 min; 20% 正常羊血清室温孵育 30 min; 1:100 稀释一抗 37℃ 孵育 2 h, PBS 洗 3×3 min; EnVision 试剂 (HRP-M) 37℃ 30 min, PBS 洗 3×3 min; DAB 显色 8~12 min; 苏木精衬染, 热水蓝化, 吹干后, 树脂封片; 镜下观察, 核紫蓝色, 阳性呈棕黄色。

**1.6 蛋白质印迹法测定退变椎间盘组织中 p38 MAPK 蛋白的表达** 制备组织裂解产物: 取 50~100 mg 组织在冰上剪成碎片, 用预冷的 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 离心弃去 PBS; 加入 0.5~1 ml 预冷的蛋白裂解液, 4℃ 用玻璃匀浆器匀浆 20~40 次, 然后在冰浴中放置 10 min, 且每隔 5 min 在旋涡混合仪震荡 30 s; 12 000×g 4℃ 离心 10 min, 将上清转移到新离心管中, 即得组织总蛋白产物。SDS-PAGE 电泳: 往上样样品加入适量 5×SDS, 混匀后沸水中煮 5 min 后上样, 加入足量电泳缓冲液, 调整电压到 100 V, 电泳溴酚蓝刚跑出即可终止。分离后, 100 V, 足量转移缓冲液中转移至硝酸纤维膜上, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 用 1:1 000 稀释的 p-p38 抗体, 1:800 的内参 GAPDH 一抗, 进行蛋白质印迹分析, 温浴 1.5 h, 用封闭液将 HRP 二抗 1:5 000 稀释, 温育 1.5 h, TBST 清洗 4 次, 每次 10 min。采用 DAB 显色试剂盒显影, 对胶片进行扫描, UVP 凝胶图像处理系统 Labworks 4.6 软件分析目的条带灰度值。

**1.7 免疫组化结果评定** p-p38 MAPK 蛋白阳性表达细胞核, 呈黄色或棕黄色颗粒。按照椎间盘退变等级分组, 随机选取视野, 计数 100 个细胞, 同时保证所取的每个椎间盘 NP 标本都参与细胞计数。依据细胞着色强度分为: 无色为阴性, 浅黄色和黄色为弱阳性, 棕黄色为强阳性。

**1.8 统计学处理** 采用  $\chi^2$  检验对免疫组织化学结

果进行分析;双变量直线回归方法验证 p-p38 MAPK 含量与椎间盘退变程度间的相关性, p-p38 MAPK 相对含量以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 病理结果 MRI 退变分级为 I 级时, NP 组织基质由不规则排列的稀疏的胶原纤维网状结构组成;在纤维交汇处形成陷窝,陷窝内有大小不等的孤立或成群的 NP 细胞,核仁明显、呈深蓝色(图 1A); II 级时, NP 组织基质内胶原纤维增多,结构模糊,细胞数量较 I 级时减少,细胞胞核消失、呈空泡征(图 1B); III 级时, NP 组织基质胶原纤维增多、轻度变性,网状结构尚存; NP 细胞稀疏,染色变浅,大多细胞核

仁消失、胞核结构模糊或消失(图 1C); IV 级时, NP 组织基质胶原大量增多、增粗,胶原严重变性; NP 细胞染色变浅,大量细胞核仁消失,细胞呈现空泡征(图 1D); V 级时, NP 组织基质不规则排列的稀疏的胶原纤维网状结构被粗大的变性纤维替代,有些纤维组织在局部扭结成团;陷窝结构不明显, NP 细胞罕见、染色浅(图 1E)。

可见,随着椎间盘退变程度的加重, NP 区内网状结构逐渐消失,嗜酸性基质和胶原纤维逐渐增多,有些纤维聚合在一起,形成粗大的纤维,可见单个、成双或成群的软骨细胞散在其中,多数细胞位于软骨陷窝内,外有软骨囊包绕,胞核圆,胞质嗜碱性,核周可见透亮区,而且随着退变程度加重 NP 细胞胞核变较小,染色深,有的固缩,胞质结构模糊,甚至消失。

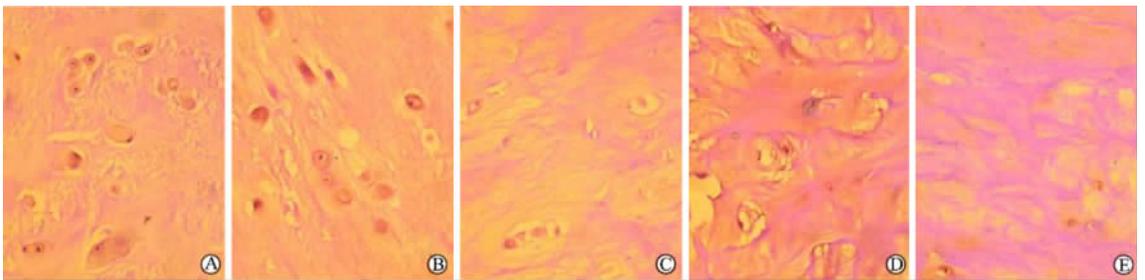


图 1 MRI 退变分级为 I ~ V 级(A~E)时 NP 组织的微观结构改变

Fig 1 Micro-structural changes of NP tissue of different MRI degradation degrees(H-E staining)

Np: Nucleus pulposus. A, B, C, D, and E represent MRI degradation degrees I, II, III, IV, and V, respectively. Original magnification:  $\times 400$

2.2 免疫组织化学染色结果 MRI 退变分级为 I 级时, NP 组织 NP 细胞含量较多,细胞核为蓝色,核仁清楚,细胞孤立或聚集成群,未见 p-p38 MAPK 表达阳性细胞(图 2A); II 级时, p-p38 MAPK 定位于胞核,细胞外基质未见表达; NP 组织中 NP 细胞大多孤立分布,多数细胞 p-p38 MAPK 阳性表达,颜色以浅黄到黄色为主(图 2B); III 级时, p-p38 MAPK 定位于胞核,细胞外基质未见表达;细胞外基质可见裂隙; p-p38 MAPK 阳性细胞比例明显增多, p-p38 MAPK 表达程

度较 II 级时明显加重,阳性表达细胞以黄色为主(图 2C); IV 级时, p-p38 MAPK 定位于胞核,细胞外基质未见表达;细胞外裂隙更加明显; p-p38 MAPK 阳性细胞比例较 III 级时上升, p-p38 MAPK 表达程度较 III 级时明显提高,阳性表达细胞以棕黄色为主(图 2D); V 级时,同样 p-p38 MAPK 定位于胞核,细胞外基质未见表达;细胞外基质结构模糊,呈稀疏条纹结构; NP 内细胞固缩, p-p38 MAPK 在细胞核表达,阳性表达细胞以棕黄色为主(图 2E)。

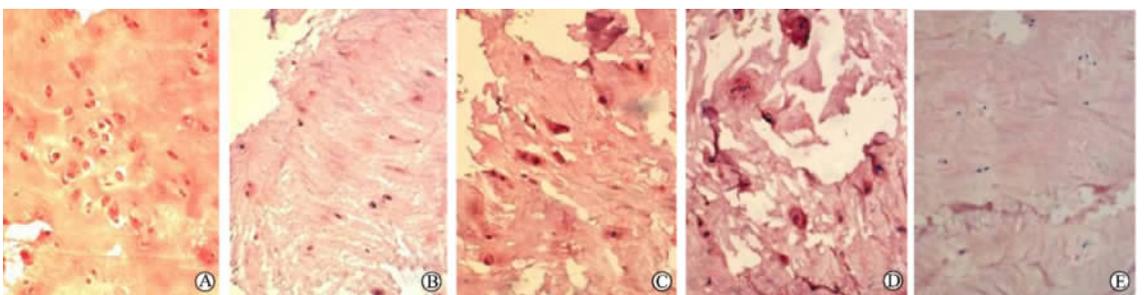


图 2 MRI 退变分级为 I ~ V 级(A~E)时 NP 组织 p-p38 MAPK 的表达情况

Fig 2 Expression of p-p38 MAPK in NP tissue of different MRI degradation degrees(IHC staining)

Np: Nucleus pulposus. A, B, C, D, and E represent MRI degradation degrees I, II, III, IV, and V, respectively. Original magnification:  $\times 200$

各组 NP 组织中 p-p38 MAPK 定位于 NP 细胞核中,且随退变程度加重,细胞中 p-p38 MAPK 强度明显增强(表 1)。p-p38 MAPK 在椎间盘退变等级为 I ~ V 级时阳性率分别为 0、45%、70%、90%、93%;各个退变等级阳性表达程度(阴性、弱阳性、强阳性)组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 各组 p-p38 MAPK 阳性细胞分布

Tab 1 Results of p-p38 MAPK-positive cells in different groups

MRI grade	N	p-p38 MAPK(n/100 cells)			Positive rate(%)
		Negative <sup>a</sup>	Weakly positive <sup>b</sup>	Strongly positive	
I	1	100	0	0	0
II	2	55	25	20	45
III	4	30	33	37	70
IV	8	10	22	68	90
V	4	7	13	80	93

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$  vs weakly positively or strongly positive group; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$  vs strongly positive group

2.3 蛋白质印迹分析结果 椎间盘 NP 组织中 p-p38 MAPK 的相对含量随椎间盘退变程度的加重逐渐增高。16 例标本中, CIDD 程度 III、IV 级者占本实验例数的 62.5%(表 2)。p-p38 MAPK 含量与 CIDD 程度间存在以椎间盘 MRI 退变等级为自变量(X), p-p38 MAPK 相对含量为因变量(Y)的线性关系:  $Y = 0.423X - 0.675$  ( $P < 0.05$ ),  $\beta$  值的 95% 可信区间为 [0.298, 0.547], 相关性系数  $R = 0.890$ 。

表 2 患者椎间盘 MRI 退变分级及相应 p-p38 MAPK 灰度值

Tab 2 Disc degeneration grades and corresponding p-p38 MAPK gray values

(N=16)

MRI grade	n(%)	Relative value of p-p38 MAPK gray
II	3(18.75)	0.236 7±0.051 8
III	6(37.50)	0.543 1±0.144 9
IV	4(25.00)	1.016 4±0.066 3
V	3(18.75)	1.470 9±0.545 6

### 3 讨论

CIDD 直接或间接导致了颈椎病的发生。目前治疗颈椎病最有效的治疗方法是手术,但手术存在费用高、风险大等缺点,给个人和社会带来了沉重负担,因而探索 IDD 的分子生物学机制,从分子水平上治疗或延缓椎间盘退变就尤显重要。

本实验通过病理、免疫组化及蛋白质印迹方法观察不同退变程度颈椎椎间盘 NP 组织的病理改变

及 p-p38 MAPK 在 NP 组织表达的定位情况,分析 p-p38 MAPK 表达与椎间盘退变程度间的关系,结果发现:随着椎间盘退变程度的加重, NP 区内网状结构逐渐消失,嗜酸性基质和胶原纤维逐渐增多,有些纤维聚合在一起,形成粗大的纤维,可见单个、成双或成群的软骨细胞散在其中,多数细胞位于软骨陷窝内,外有软骨囊包绕,胞核圆,胞质嗜碱性,核周可见透亮区。而且,随着退变程度加重, NP 细胞胞核变小、染色加深,有的甚至固缩,胞质结构模糊,甚至消失。退变 NP 组织内胶原纤维排列紊乱,纤维增粗,甚至聚集成团; p-p38 MAPK 定位于 NP 细胞胞核中,且随退变程度加重,细胞 p-p38 MAPK 阳性程度明显增强; NP 中 p-p38 MAPK 阳性细胞比例随退变程度加重逐渐升高,各个退变等级阳性表达程度(阴性、弱阳性、强阳性)各组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),退变程度越重, p-p38 MAPK 强阳性细胞比例越高; p-p38 MAPK 含量与 CIDD 程度之间存在以椎间盘 MRI 退变等级为自变量、 p-p38 MAPK 表达量为因变量的线性关系:  $Y = 0.423X - 0.675$  ( $P < 0.05$ ),即随着椎间盘退变程度的加重其细胞中 p-p38 MAPK 含量逐渐增加。本研究结果表明, p38 MAPK 信号通路在椎间盘退变中发挥了重要作用。

正常椎间盘由软骨终板、纤维环和 NP 三部分构成<sup>[5-7]</sup>, NP 胶原纤维呈不规则的网状结构,其上附有蛋白多糖颗粒,此胶原纤维网眼和多水的蛋白多糖一起共同维持 NP 的具有形变、轴承、吸收应力和均匀传递应力的作用<sup>[8]</sup>。NP 退变多在纤维环变性的基础上继发产生,早期主要改变为水分脱失和吸收功能减退,逐渐其正常组织结构被纤维组织代替,导致 NP 进行性缩小。Moore 等<sup>[9]</sup>认为 NP 退变使 NP 水化程度明显下降, NP 皱缩,内层纤维环出现裂隙,并伸入 NP,随后 NP 出现裂隙甚至碎片,变性、扭结或伴钙化的胶原纤维及其继发性改变最终导致 NP 凝胶系统破坏、吸收震荡的能力下降。

p38 MAPK 是 1993 年由 Brewster 等<sup>[10]</sup>在研究高渗环境对真菌的影响时发现的,由 360 个氨基酸组成的相对分子质量为 38 000 的蛋白,属应激激活的蛋白激酶,在炎症过程中发挥重要作用。炎症因子具有促进椎间盘蛋白多糖降解并抑制其合成,参与椎间盘炎症反应等作用,被认为在 IDD 的发生发展中起重要作用。椎间盘细胞体外培养,证实存在 IL-1 正反馈回路<sup>[11]</sup>。用吡啶异咪唑啉衍生物抑制 p38 MAPK 活性可减少或阻断多重炎症介质,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 的产生<sup>[12]</sup>。动物实验表明,抑制 p38 MAPK 信号通路可降低 NP 细胞对

IL-1 的反应,这表明抑制 p38 MAPK 信号通路在炎症介导的椎间盘退变中发挥作用<sup>[3]</sup>。人椎间盘 NP 细胞体外培养相关研究表明:抑制 p38 MAPK 信号通路可减少 NP 细胞炎症因子的产生,延缓 NP 细胞退变速度,可减少与炎症、疼痛以及椎间盘分解代谢相关因子的产生<sup>[13]</sup>。持续的刺激可使退变椎间盘不断产生炎症因子,p38 MAPK 的激活可显著提高炎症因子含量<sup>[14]</sup>。抑制 p38 MAPK 活性,可以使 IL-1 和 TNF- $\alpha$  促进细胞分泌 PGE<sub>2</sub>、IL-6、MMP-3 的作用明显减弱;p38 MAPK 抑制剂可弱化 TNF- $\alpha$  对 TIMP-1 的抑制作用,抑制 p38 MAPK 活性可减少与炎症、疼痛及椎间盘分解代谢相关因子的产生<sup>[13]</sup>。由此不难看出,p38 MAPK 信号通路在椎间盘退变中发挥了重要作用。

本研究直接以人颈椎椎间盘 NP 活体组织作为研究对象,与以往相关研究报道相比,为 p38 MAPK 信号通路参与椎间盘退变这一观点,提供直接实验证据,更具说服力和临床价值。本研究结果表明:p38 MAPK 信号通路参与椎间盘退变,p38 MAPK 以活性形式 p-p38 MAPK,在 NP 细胞胞核中发挥作用。本研究初步揭示 p38 MAPK 信号通路参与椎间盘退变的相关性,有助于阐明椎间盘退变的分子生物学机制,但 p38 MAPK 在椎间盘退变中的确切作用机制尚不明确,且本实验标本数量较少,只分析了 p38 MAPK 信号通路枢纽蛋白同椎间盘退变程度间的关系。因此 p38 MAPK 信号通路参与椎间盘退变的确切分子机制有待进一步的研究阐明,为在分子水平上延缓或逆转椎间盘退变的发生,从分子水平上防治颈椎病提供确切分子生物学理论基础。

## [参考文献]

[1] Borenstein D G. Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2001,13:128-134.

[2] Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta[J]. *J Bi-*

*ol Chem*, 1997,272:30122-30128.

- [3] Studer R K, Gilbertson L G, Georgescu H, Sowa G, Vo N, Kang J D. p38 MAPK inhibition modulates rabbit nucleus pulposus cell response to IL-1[J]. *J Orthop Res*, 2008,26:991-998.
- [4] Miyazaki M, Hong S W, Yoon S H, Morishita Y, Wang J C. Reliability of a magnetic resonance imaging-based grading system for cervical intervertebral disc degeneration [J]. *J Spinal Disord Tech*, 2008,21:288-292.
- [5] Rousseau M A, Ulrich J A, Bass E C, Rodriguez A G, Liu J J, Lotz J C. Stab incision for inducing intervertebral disc degeneration in the rat[J]. *Spine*, 2007,32:17-24.
- [6] Kandel R, Roberts S, Urban J P. Tissue engineering and the intervertebral disc: the challenges[J]. *Eur Spine J*, 2008,17(Suppl 4):480-491.
- [7] Lurie J D, Berven S H, Gibson-Chambers J, Tosteson T, Tosteson A, Hu S S, et al. Patient preferences and expectations for care: determinants in patients with lumbar intervertebral disc herniation[J]. *Spine*, 2008,33:2663-2668.
- [8] 顾宁,潘维,张海黔,袁春伟,韦钰,朱同银,等. 腰椎间盘中胶原的超微结构研究[J]. *中国医学影像技术*, 1995,11:401-405.
- [9] Moore R J, Vernon-Roberts B, Fraser R D, Osti O L, Schembri M. The origin and fate of herniated lumbar intervertebral disc tissue[J]. *Spine*, 1996,21:2149-2155.
- [10] Brewster J L, de Valoir T, Dwyer N D, Winter E, Gustin M C. An osmosensing signal transduction pathway in yeast[J]. *Science*, 1993,259:1760-1763.
- [11] Jimbo K, Park J S, Yokosuka K, Sato K, Nagata K. Positive feedback loop of interleukin-1beta upregulating production of inflammatory mediators in human intervertebral disc cells *in vitro*[J]. *J Neurosurg Spine*, 2005,2:589-595.
- [12] Lee J C, Laydon J T, McDonnell P C, Gallagher T F, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis[J]. *Nature*, 1994,372:739-746.
- [13] Studer R K, Aboka A M, Gilbertson L G, Georgescu H, Sowa G, Vo N, et al. p38 MAPK inhibition in nucleus pulposus cells: a potential target for treating intervertebral disc degeneration [J]. *Spine*, 2007,32:2827-2833.
- [14] Ulrich J A, Liebenberg E C, Thuillier D U, Lotz J C. ISSLS prize winner: repeated disc injury causes persistent inflammation[J]. *Spine*, 2007,32:2812-2819.

[本文编辑] 尹茶