

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00117

人颈椎间盘髓核组织中 SOX9 与 COL2A1 基因的表达及其意义

程勇军, 綦珂, 何平, 宋庆鑫, 王琨, 沈洪兴*

第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察不同退变程度的人颈椎间盘髓核(nucleus pulposus, NP)组织中性别决定基因9(SOX9)、II型胶原 $\alpha 1$ (COL2A1)的表达差异,并探讨此差异在人颈椎间盘退变(cervical intervertebral disc degeneration, CIDD)发生发展中的意义。**方法** 收集在我院行手术治疗的36例颈椎病或颈椎外伤患者的NP组织及术前颈椎MRI(T₂加权像正中矢状位)资料,采用Miyazaki分级系统评估退变程度。用免疫组织化学法观察SOX9、COL2A1在NP组织中的表达定位,用荧光定量(FQ)RT-PCR、蛋白质印迹分析法检测SOX9、COL2A1在mRNA及蛋白水平上的表达量,分析其表达水平与CIDD程度间的关系,初步探究SOX9和COL2A1间的相互作用。**结果** SOX9在NP细胞核中表达,COL2A1在细胞外基质中表达;随着CIDD退变程度的加重,两者的mRNA和蛋白表达水平均逐渐降低;且以SOX9表达量为自变量(X)、COL2A1表达量为应变量(Y)的直线回归方程为 $Y=0.923X-0.059(P<0.001)$ 。**结论** 随着CIDD程度加重,SOX9与COL2A1基因表达水平逐渐降低,两者下降趋势相近,SOX9正向调控COL2A1的表达,提示SOX9与COL2A1基因功能改变可能是CIDD的分子机制之一。

[关键词] 颈椎;椎间盘退变;髓核;SOX9;COL2A1

[中图分类号] R 681.531 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)02-0117-07

Expression of SOX9 and COL2A1 gene in human cervical intervertebral disc nucleus pulposus and its significance

CHENG Yong-jun, QI Ke, HE Ping, SONG Qing-xin, WANG Kun, SHEN Hong-xing*

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

[Abstract] **Objective** To observe the expression of SRY(sex determining region Y)-box 9 (SOX9) and collagen type II alpha 1 (COL2A1) in human cervical intervertebral disc nucleus pulposus (NP) tissues of various degeneration degrees, so as to discuss the role of their expression during cervical intervertebral disc degeneration(CIDD). **Methods** Totally 36 human cervical intervertebral disc specimens and their pre-operation MRI findings were obtained from surgical patients or patients with cervical trauma, and they were classified into five grades according to the Miyazaki grading system. The expression of SOX9 and COL2A1 was examined by fluorescence quantitative RT-PCR, Western blotting analysis and immunohistochemistry staining. The relationship between SOX9, COL2A1 expression and the degrees of CIDD was analyzed, and the relationship between SOX9 and COL2A1 was also discussed. **Results** Both SOX9 and COL2A1 were expressed in NP tissues, with SOX9 seen in the nucleus and COL2A1 in the extracellular matrix. The expression of SOX9 and COL2A1 mRNA and protein gradually decreased as Miyazaki I progressed to Miyazaki V. We also found a linear relationship between COL2A1 (Y) and SOX9 (X) expression; $Y=0.923X-0.059 (P<0.001)$. **Conclusion** The expression of SOX9 and COL2A1 mRNA decrease with the increase of CIDD severity, with SOX9 and COL2A1 mRNA having a similar decreasing tendency. SOX9 positively regulate COL2A1 expression, indicating that changes of SOX9 and COL2A1 gene might be one of the molecular mechanisms of CIDD.

[Key words] cervical vertebrae; intervertebral disc degeneration; nucleus pulposus; SOX9; COL2A1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2): 117-123]

颈椎病是引起颈肩痛和四肢麻木无力并随之导致人们生活质量降低的常见原因,其发病年龄呈年轻

[收稿日期] 2012-06-07 **[接受日期]** 2012-12-10

[基金项目] 上海市科委基金(11JC1415600),军队“十一五”医药卫生科研基金(06MA163). Supported by Fund from Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (11JC1415600) and “11th Five-Year Plan” for Medical Science Research Foundation of the PLA (06MA163).

[作者简介] 程勇军,硕士,住院医师. E-mail: cyjchhp@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161696, E-mail: shenhxgk@126.com

化趋势^[1]。椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是该病发生的始发因素,但是 IDD 发生发展的病理生理机制尚不完全清楚,目前遗传因素在 IDD 过程中的作用受到越来越多的关注^[2]。性别决定基因组 9 [SRY (sex determining region Y)-box 9, SOX9]是一种重要的早期胚胎发育相关基因,在软骨的发育、成熟过程中对Ⅱ型胶原 $\alpha 1$ (collagen type II α 1, COL2A1)的合成起正向调控作用^[3],在 IDD 过程中的作用也日益受到重视^[4-5]。

本研究通过免疫组织化学染色、蛋白质印迹分析和荧光定量(FQ)RT-PCR方法,观察 SOX9、COL2A1在不同退变程度的人颈椎椎间盘髓核(nucleus pulposus, NP)组织中表达的定位情况及其在 mRNA 和蛋白水平上的表达量,分析基因表达水平与 IDD 程度间的关系,探讨人颈椎间盘退变(cervical intervertebral disc degeneration, CIDD)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 材料和方法

1.1 标本采集与处理 标本来源于 2010 年 2 月至 2011 年 5 月在我院行颈前路椎间盘摘除减压融合内固定手术的颈椎病患者及颈椎外伤患者,共 36 例椎间盘组织(C_{3/4} 8 例, C_{4/5} 12 例, C_{5/6} 9 例, C_{6/7} 6 例, C₇/T₁ 1 例),分离 NP,每例 NP 组织分成 3 份,分别用于 mRNA、蛋白表达检测及免疫组织化学检测。标本于术中取得并直接置于液氮中,在 30 min 内转入 -80℃ 冰箱备用,收集患者术前颈椎 MRI(MAGNETOM Aera 1.5 T, Siemens AG, Germany)资料(T₂像正中矢状位)。排除标准:甲状腺功能亢进、甲状旁腺功能亢进及糖尿病;肝肾疾病;服用过影响骨代谢的药物,如双膦酸盐药物、激素替代治疗、糖皮质激素、抗惊厥药和肝素钠;严重的髋关节及膝关节骨性关节炎;颈椎管狭窄、颈椎滑脱、强直性脊柱炎、椎管囊肿、脊柱肿瘤、脊柱创伤;职业或习惯高危因素,如司机、重体力劳动、吸烟。入选的研究对象均经过详细的病史采集和体格检查,取材均经患者及其亲属知情同意,并获得长海医院医学伦理委员会批准。

1.2 CIDD 程度的影像学分级 对患者术前 MRI 资料(T₂像正中矢状位)依据 Miyazaki 分级系统^[6],从髓核信号、结构、纤维环界限及间盘高度 4 个方面对所有标本的退变程度按 I ~ V 级进行评定,规定

I 级标本为正常组, II ~ V 级标本为退变组。

1.3 免疫组织化学染色 将石蜡切片常规脱蜡至水,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3×3 min;用 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液(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 盐酸处理 20 min,PBS 洗 3×3 min;0.3% H₂O₂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(免抗人 SOX9 多克隆抗体,Abcam 公司,货号:ab26414;免抗人 COL2A1 多克隆抗体,Abcam 公司,货号:ab53047)及二抗进行杂交,37℃ 下孵育 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;镜下随机选取 5 个视野观察并照相。细胞核中出现棕黄色颗粒为 SOX9 阳性表达,细胞外基质内出现棕黄色条状物为 COL2A1 阳性表达,按着色强度判断表达情况,并分为 0~+4 级^[7]。

1.4 蛋白质印迹法检测 NP 组织中 SOX9 和 COL2A1 蛋白的表达 应用组织裂解液分别提取不同退变程度的人颈椎间盘 NP 组织总蛋白,按照蛋白定量试剂盒(BCATM protein assay kit, PIERCE 公司)的操作说明测定组织提取液的蛋白浓度。每例标本取总蛋白 50 μ g,经 SDS-PAGE 分离后,通过浸渍转移法转至硝酸纤维素膜上,封闭后,加 1:100 一抗(抗体同上)和 1:500 的内参 β -actin 一抗,温育 1.5 h,加 1:2 000 HRP 二抗,温育 1.5 h,ECL 显色试剂盒显色,用 BioRad Flour-S MultiImager 凝胶成像仪扫描并保存。SOX9 的相对分子质量为 56 000, COL2A1 的相对分子质量为 142 000,根据相应条带判断两者蛋白表达的情况。

1.5 FQ RT-PCR 检测 NP 组织中 SOX9 和 COL2A1 mRNA 的表达 用 TRIzol 法提取人颈椎间盘 NP 组织总 RNA,以 30 μ L DEPC 水溶解,并以 DNase I 去除污染的 DNA,RNA 定量为 1 g/L,在紫外分光光度计下测得波长为 260、280 nm 处的光密度(D)值,其 D 值均为 1.8~2.0。以 0.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。取 2 μ L 总 RNA 作为反转录模板,根据 cDNA TaKaRa 反转录试剂盒(货号:DRR037A,大连宝生物工程有限公司)进行反转录。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 30 s,共 40 个循环;72℃ 延伸 5 min。应用美国 ABI 公司的 StepOneTM 实时荧

光定量 PCR 仪,采用嵌入式染料法(SYBR Green 法)进行 PCR 扩增反应,相对表达量(RQ)以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,用仪器自带的 StepOne v1.1 软件进行分析。实验中所有引物使用 PrimerBlast 设计,引物序列如下:内参 $\beta actin$ 上游 5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC GC-3',下游 5'-CCA CCA TCA CGC CCT GGT GC-3';SOX9 上游 5'-CTC GGA CAC CGA GAA CAC GCG-3',下游 5'-CAG AAG TCT CCA GAG CTT GCC CAG C-3';COL2A1 上游 5'-ACT GGG ACT GTC CTC TGC GAC G-3',下游 5'-TCT GTC CCT TTG GTC CTG GTT GC-3'。PCR 溶解曲线示扩增产物成功。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析。不同退变等级组之间的性别因素比较采用 Fisher 确切概率法,年龄因素比较采用方差分析。目的基因 mRNA 相对表达量(计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,因此以目的基因的 $\Delta\Delta Ct$ 值表示)的比较:(1)由于全组 SOX9 和 COL2A1 的 $\Delta\Delta Ct$ 数值不满足正态性与方差齐性的要求,故正常组与退变组的比较采用 Mann-Whitney U 非参数检验方法;(2)Shapiro-Wilk 检验显示正常组与退变组 SOX9 和 COL2A1 的 $\Delta\Delta Ct$ 数值分布均满足正态分布,Levene 检验提示满足方差齐性,因此,各退变等级组之间 SOX9 mRNA 与 COL2A1 mRNA 表达量的两两比较采用 SNK- q 检验。SOX9 mRNA 与 COL2A1 mRNA 表达量采用双变量直线 Pearson 相关分析及线性回归方法检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 CIDD 程度分级以及不同退变程度组间性别、年龄因素比较 每个颈椎间盘 MRI 分级均由 2 名课题组成员及 2 名放射科医生共同评定,结果显示不同退变程度组之间性别、年龄因素的差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

2.2 免疫组织化学染色和蛋白质印迹分析结果 免疫组织化学染色结果显示不同退变程度颈椎间盘 NP 组织中 SOX9 与 COL2A1 均有不同程度的表达,前者定位于细胞核中(图 1),后者则在细胞外基质中表达(图 2),两者的表达均随退变程度的加重而逐渐减弱。蛋白质印迹分析结果(图 3)显示随着退变程度的加重,SOX9 与 COL2A1 的表达量逐渐减少,与免疫组化结果一致,进一步证实两者在蛋白水平的表达量与 CIDD 程度呈负相关,且 SOX9 总

体蛋白表达量在退变等级的 I ~ III 期明显高于 COL2A1,而两者在 IV ~ V 期表达量无明显差异。

表 1 颈椎间盘退变程度分级结果
以及性别、年龄因素比较

Tab 1 Grades of cervical intervertebral disc degeneration and distribution of gender and age

Grade	N	Female n(%)	Age (year, $\bar{x}\pm s$)
I	8	5(62.50)	52.25 \pm 5.20
II	7	0(0.00)	62.71 \pm 9.90
III	9	2(22.22)	60.00 \pm 13.57
IV	5	1(20.00)	57.60 \pm 16.85
V	7	1(14.29)	55.00 \pm 10.38

2.3 FQ RT-PCR 检测结果 SOX9 总体 mRNA 表达量高于 COL2A1,正常组与退变组之间的 SOX9 $\Delta\Delta Ct$ 值(-5.65 vs -3.49)与 COL2A1 $\Delta\Delta Ct$ 值(-5.15 vs -3.28)表达差异均有统计学意义($P<0.05$),正常组的 COL2A1 与 SOX9 的表达水平均高于退变组($P<0.05$)。各组两两之间比较显示 COL2A1 $\Delta\Delta Ct$ 、SOX9 $\Delta\Delta Ct$ 差异均有统计学意义($P<0.05$,表 2),且随着退变程度的增加,COL2A1 与 SOX9 的相对表达量均降低,两者下降趋势相近。

SOX9 与 COL2A1 之间符合以 SOX9 表达量为自变量(X)、COL2A1 表达量为应变量(Y)的直线回归关系,线性回归方程 $Y=0.923X-0.059$, $P<0.001$,决定系数 $R^2=0.929$,校正 $R^2=0.926$ (图 4),即随着 SOX9 转录水平的增加,COL2A1 转录也增加,COL2A1 转录水平的 92.6%受 SOX9 转录调控,其余 7.4%受其他因子影响。

3 讨论

IDD 是引起颈椎病的始发因素,但其发生发展的病理生理机制尚不完全清楚。目前普遍认为其发生与高龄、吸烟、肥胖、慢性积累劳损、外伤等密切相关,与生活习惯、职业也有一定的关系^[8]。因此,我们在选择研究对象时排除了可能影响 IDD 的疾病、药物、职业、生活习惯,此外,本研究中不同退变等级组之间,年龄、性别因素的差异无统计学意义,研究结果更能体现遗传因素在 IDD 过程中的作用。根据国内外文献报道,IDD 遗传机制的研究对象主要集中在腰椎间盘退变或突出^[9-10],颈椎间盘退变的研究较少,本研究以人颈椎间盘 NP 组织为研究对象,以初步阐明 SOX9 与 COL2A1 基因功能改变在 CIDD 过程中的作用。

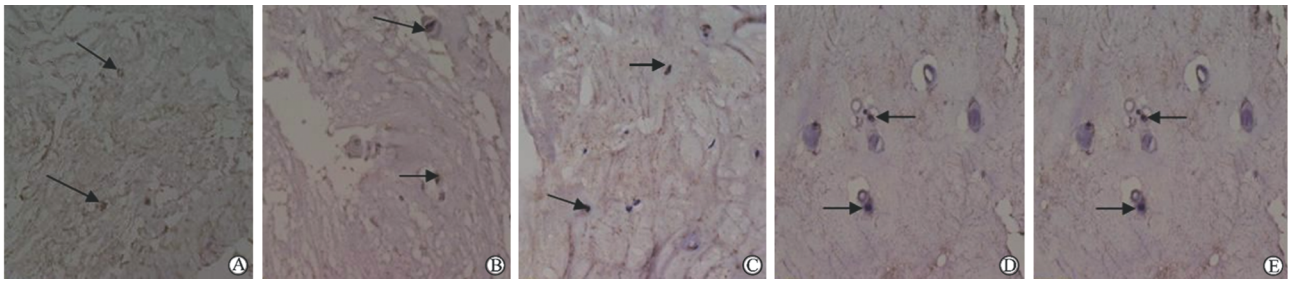


图 1 各组髓核组织中 SOX9 免疫组化染色结果

Fig 1 Immunohistochemical staining results of SOX9 in nucleus pulposus tissues of each group

A, B, C, D and E represent MRI degradation degrees I, II, III, IV and V, respectively. Arrows show the positive staining. Original magnification: $\times 400$

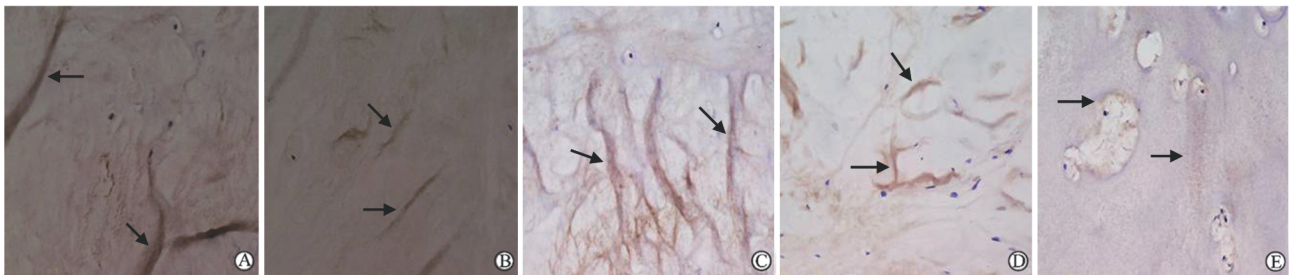


图 2 各组髓核组织中 COL2A1 免疫组化染色结果

Fig 2 Immunohistochemical staining results of COL2A1 in nucleus pulposus tissues of each group

A, B, C, D and E represent MRI degradation degrees I, II, III, IV and V, respectively. Arrows show the positive staining. Original magnification: $\times 400$

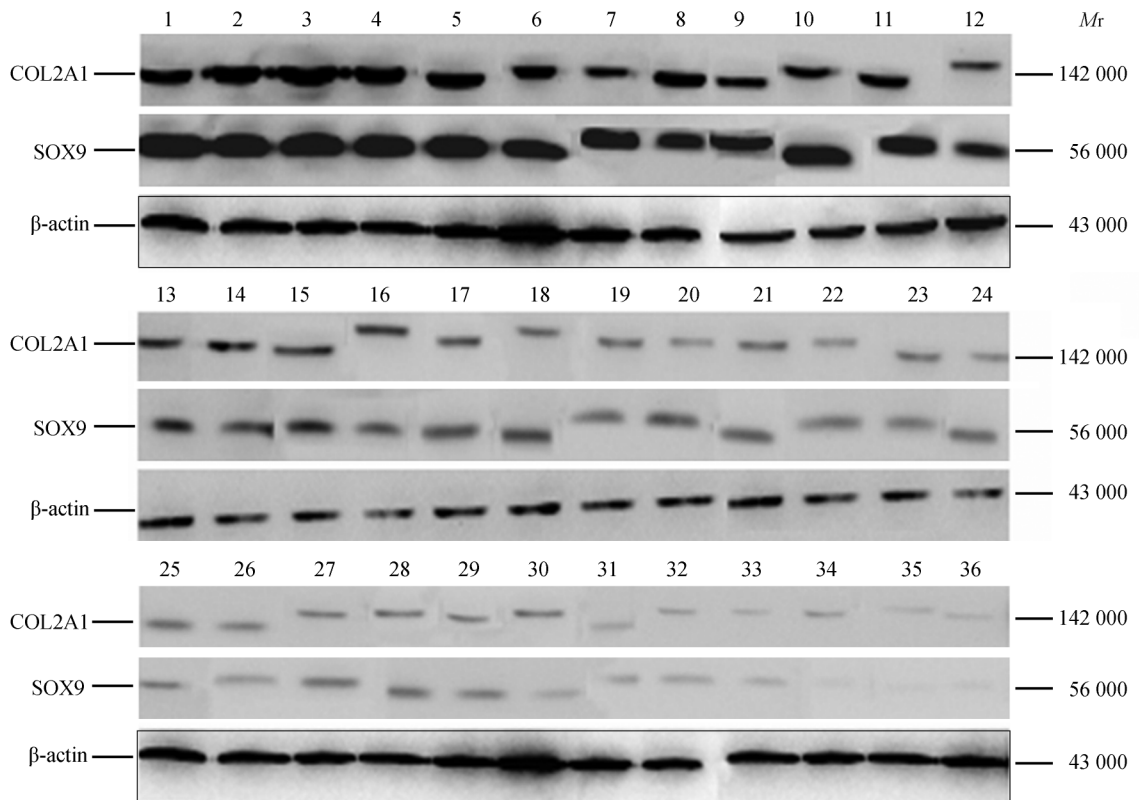


图 3 SOX9 和 COL2A1 表达的蛋白质印迹分析结果

Fig 3 Expression of SOX9 and COL2A1 proteins as detected by Western blotting analysis

1-36 represent 36 CIDD samples, with the degeneration degrees of samples 1-8 being grade I, 9-15 being grade II, 16-24 being grade III, 25-29 being grade IV, and 30-36 being grade V

表 2 各组 SOX9 与 COL2A1 mRNA 的表达量

Tab 2 Expression of SOX9 and COL2A1 mRNA in different groups

Grade	SOX9		COL2A1	
	$\Delta\Delta Ct$	RQ	$\Delta\Delta Ct$	RQ
I	-5.62(-5.79, -5.45)	49.19(39.11, 61.88)	-5.21(-5.35, -5.07)	37.00(30.61, 44.73)
II	-4.89(-5.11, -4.67)	29.71(22.01, 40.12)	-4.99(-5.12, -4.86)	31.87(26.77, 37.95)
III	-3.98(-4.15, -3.81)	15.79(12.49, 19.96)	-3.57(-3.68, -3.46)	11.91(10.25, 13.85)
IV	-2.43(-2.69, -2.17)	5.38(3.77, 7.67)	-2.24(-2.37, -2.11)	4.72(3.95, 5.64)
V	-0.44(-0.76, -0.12)	1.36(0.88, 2.10)	-0.34(-0.64, -0.04)	1.27(0.84, 1.91)

RQ: Relative quantity. $\Delta\Delta Ct$ values of SOX9 and COL2A1 mRNA were significantly different between groups of different degeneration grades ($P < 0.05$). Data in the brackets are the 95% confidence interval

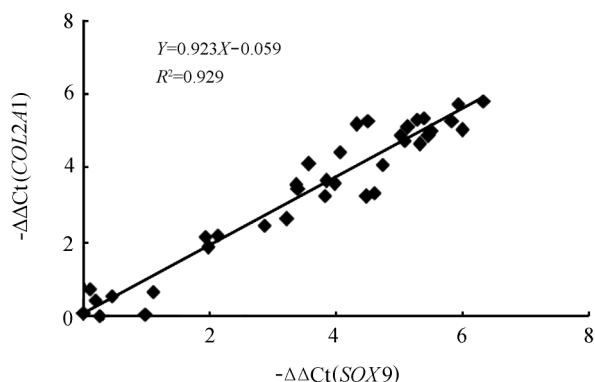


图 4 SOX9 表达量与 COL2A1 表达量的线性回归散点图

Fig 4 Linear regression scatter diagram between SOX9 and COL2A1

SOX9 基因作为一种重要的早期胚胎发育相关基因,参与诸如性别决定、软骨形成等多种早期胚胎发育过程,在除肥大软骨细胞外的所有软骨前体细胞和软骨细胞中均有表达^[11-12]。COL2A1 基因是软骨基质蛋白 II 型胶原特异性增殖基因,1997 年, Lefebvre 等^[13]研究发现 COL2A1 在软骨细胞中的表达与 SOX9 浓度呈正比关系,证实 COL2A1 是 SOX9 依赖性软骨细胞特异性增殖基因。Bell 等^[14]研究显示 SOX9 能结合于 COL2A1 的软骨细胞特异增强子,直接调控其表达,SOX9 突变相关的软骨发育不良综合征之骨骼异常可能是在软骨形成过程中 SOX9 对 COL2A1 异常调控造成的,说明 COL2A1 很可能是 SOX9 的靶基因。由此可知,SOX9 是 II 型胶原合成过程中的一个重要的转录因子,在软骨细胞的发育、成熟过程中对 II 型胶原起正向调控作用,在椎间盘退变过程中的作用也渐被关注。

Sive 等^[7]用原位杂交方法分析了正常与退变椎间盘内 SOX9 的表达,发现在退变的椎间盘 NP 与纤维环组织中,SOX9 mRNA 的表达降低。通过免疫定位分析方法发现椎间盘纤维环组织中 SOX9 的

表达水平与年龄呈反比。Paul 等^[15]在体外实验中发现 SOX9 腺病毒载体能够增加 NP 细胞内 SOX9 与 II 型胶原的表达,同时在兔 IDD 的病理模型中注射重组腺病毒载体,发现和对照组相比,注射 SOX9 腺病毒的椎间盘能维持更好的软骨细胞表型。有学者进一步对不同时期椎间盘(包括新生儿椎间盘、正常椎间盘、退变各个时期椎间盘)应用 RT-PCR、蛋白质印迹分析和免疫组化方法检测 NP 组织中 SOX9、II 型胶原基因的表达,并分析两者的相关性,发现 SOX9 mRNA 在椎间盘 NP 细胞中的表达从新生儿到严重的 IDD 患者逐渐降低,II 型胶原下降的幅度与 SOX9 降低的幅度基本一致,这表明 IDD 的发生与 SOX9 的表达降低有关系,SOX9 在正向调控 II 型胶原的合成方面发挥了重要的作用^[16-17]。张琦等^[18]成功地将重组 pcDNA3.1IE-SOX9Flag 质粒转染到兔的骨髓间充质干细胞,转染后的干细胞能分化成髓核样细胞,这为基因治疗 IDD 疾病建立了基础。同时, Park 等^[19]利用 PCR 和蛋白质印迹分析技术,发现 SOX9 基因表达产物和蛋白聚糖、胶原蛋白 I、碱性磷酸酶等在退变的人体椎间盘中成分减少。

虽然目前的研究表明 SOX9 与 IDD 存在相关性,但是,以往研究的内容主要集中在腰椎间盘退变,单纯以 CIDD 为研究对象的较少,而且 SOX9 在 IDD 发生发展过程中的作用机制尚不清楚。本研究通过免疫组化、蛋白质印迹分析和 FQ RT-PCR,发现 SOX9 在人颈椎间盘 NP 细胞胞核中表达, COL2A1 主要在细胞外基质中表达,两者均随着 CIDD 程度的加重,表达强度及表达量逐渐降低,且 SOX9 与 COL2A1 减弱的趋势相近,与赵哲等^[21]在腰椎间盘的研究结果一致。本研究进一步对 SOX9 与 COL2A1 mRNA 表达量进行回归分析,发现两者存在直线正相关关系,表明 SOX9 可能正向调控

COL2A1 的表达。我们还发现 SOX9 总体蛋白表达量在退变程度 I ~ III 期高于 COL2A1,而在 IV ~ V 期两者表达量无明显差异,由此推测,在 IDD 早中期存在自我修复,晚期修复能力降低甚至消失。

本实验每个颈椎间盘 MRI 分级由两名课题组成员及两名放射科医生共同评定,并结合了病理学观察验证^[20],最大限度降低了实验人员的主观误差,提高了实验的精确性;但是由于标本多数来自退变程度已经达到 III 级或以上水平的椎间盘,且样本量较小,对实验结果的分析存在一定的影响。本实验为初步探索性研究,我们将进一步扩大样本量,从信号通路、基因多态性方面研究 SOX9 基因与 CID 相关的分子机制。

尽管目前关于 SOX9 在 IDD 过程中的作用的研究越来越多,然而作为 II 型胶原形成过程中重要的转录调控因子,在软骨形成分化过程中它还与其他调控因子相互作用,如 SOX5、SOX6^[22-23]、人软骨糖蛋白 39^[24]、核因子(NF)- κ B 家族成员 RelA^[25];此外,它还受到多个信号通路的调控,如印第安刺猬蛋白-甲状旁腺素相关肽(Ihh-PTHrP)信号通路^[26-27],与肿瘤发生发展密切相关的 Wnt/ β -catenin 信号途径(Wnt 信号途径)^[28-30],转化生长因子 β (TGF- β)/Smad 信号转导通路^[31]。

因此,SOX9 参与 IDD 的调控机制远没有研究清楚,还需要进一步深入研究其作用的分子靶点、相互作用关系以及在 II 型胶原形成中的具体调控机制,为人工调控、构建组织工程化胶原及生物治疗颈椎病等奠定基础。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Singh H. Disc disease and back pain in young adults [J]. J Pain Palliat Care Pharmacother, 2012, 26: 174-175.

[2] Kalb S, Martirosyan N L, Kalani M Y, Broc G G, Theodore N. Genetics of the degenerated intervertebral disc [J]. World Neurosurg, 2012, 77(3-4): 491-501.

[3] Gordon C T, Tan T Y, Benko S, Fitzpatrick D, Lyonnet S, Farlie P G. Long-range regulation at the SOX9 locus in development and disease[J]. J Med Genet, 2009, 46: 649-656.

[4] Tim Yoon S, Su Kim K, Li J, Soo Park J, Akamaru T,

Elmer W A, et al. The effect of bone morphogenetic protein-2 on rat intervertebral disc cells *in vitro* [J]. Spine(Phila Pa 1976), 2003, 28: 1773-1780.

[5] Konishi E, Nakashima Y, Iwasa Y, Nakao R, Yanagisawa A. Immunohistochemical analysis for Sox9 reveals the cartilaginous character of chondroblastoma and chondromyxoid fibroma of the bone [J]. Hum Pathol, 2010, 41: 208-213.

[6] 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.

[7] Sive J I, Baird P, Jeziorski M, Watkins A, Hoyland J A, Freemont A J. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs [J]. Mol Pathol, 2002, 55: 91-97.

[8] Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Kizawa H, Oya T, et al. A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease [J]. Nat Genet, 2005, 37: 607-612.

[9] Williams F M, Popham M, Hart D J, de Schepper E, Bierma-Zeinstra S, Hofman A, et al. GDF5 single-nucleotide polymorphism rs143383 is associated with lumbar disc degeneration in Northern European women [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63: 708-712.

[10] 肖斌, 田伟, 赵丹慧, 吴成爱, 王娜, 张砚卓. TIMP-1 666C>T 单核苷酸多态性与腰椎间盘退变相关性分析 [J]. 中华医学杂志, 2010, 90: 2939-2942.

[11] Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Esteban C R, Zemmyo M, et al. Transcriptional coactivator PGC-1alpha regulates chondrogenesis via association with Sox9 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 2414-2419.

[12] Mori-Akiyama Y, Akiyama H, Rowitch D H, de Crombrughe B. Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 9360-9365.

[13] Lefebvre V, Huang W, Harley V R, Goodfellow P N, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1 (II) collagen gene [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17: 2336-2346.

[14] Bell D M, Leung K K, Wheatley S C, Ng L J, Zhou S, Ling K W, et al. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene [J]. Nat Genet, 1997, 16: 174-178.

[15] Paul R, Haydon R C, Cheng H, Ishikawa A, Nenadovich N, Jiang W, et al. Potential use of Sox9 gene therapy

- for intervertebral degenerative disc disease[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2003, 28:755-763.
- [16] Lee Y J, Kong M H, Song K Y, Lee K H, Heo S H. The relation between sox9, TGF-beta1, and proteoglycan in human intervertebral disc cells[J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2008, 43:149-154.
- [17] Gruber H E, Norton H J, Ingram J A, Hanley E N Jr. The SOX9 transcription factor in the human disc: decreased immunolocalization with age and disc degeneration[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2005, 30:625-630.
- [18] 张琦, 钱济先, 文艳华, 裘秀春, 马保安, 范清宇. SOX9 基因真核表达载体转染诱导 BMSCs 分化为类髓核细胞[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24:811-816.
- [19] Park J Y, Kuh S U, Park H S, Kim K S. Comparative expression of matrix-associated genes and inflammatory cytokines-associated genes according to disc degeneration: analysis of living human nucleus pulposus[J]. *J Spinal Disord Tech*, 2011, 24:352-357.
- [20] 杨志高, 张帆, 陈智, 程勇军, 李凤宁, 吕开阳, 等. 退变颈椎间盘髓核中磷酸化 p38 MAPK 的表达[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31:739-743.
- Yang Z G, Zhang F, Chen Z, Cheng Y J, Li F N, Lü K Y, et al. Expression of phosphorylated p38 MAPK in nucleus pulposus of degenerated cervical intervertebral disc[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31:739-743.
- [21] 赵哲, 王文波, 李吉友, 刘洋, 李雪松, 马淑茜. 椎间盘髓核细胞中 Sox9 与 II 型胶原基因表达的关系[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2007, 17:384-387.
- [22] Akiyama H, Chaboissier M C, Martin J F, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6[J]. *Genes Dev*, 2002, 16:2813-2828.
- [23] Kupcsik L, Stoddart M J, Li Z, Benneker L M, Alini M. Improving chondrogenesis: potential and limitations of SOX9 gene transfer and mechanical stimulation for cartilage tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16:1845-1855.
- [24] Jacques C, Reeklies A D, Levy A, Berenbaum F. Hc-gp39 contributes to chondrocyte differentiation by inducing SOX9 and type II collagen expressions[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, 15:138-146.
- [25] Ushita M, Saito T, Ikeda T, Yano F, Higashikawa A, Ogata N, et al. Transcriptional induction of SOX9 by NF-kappaB family member RelA in chondrogenic cells[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17:1065-1075.
- [26] Kim Y J, Kim H J, Im G I. PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373:104-108.
- [27] Mak K K, Bi Y, Wan C, Chuang P T, Clemens T, Young M, et al. Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression[J]. *Dev Cell*, 2008, 14:674-688.
- [28] Topol L, Chen W, Song H, Day T F, Yang Y. Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284:3323-3333.
- [29] Zhong N, Gersch R P, Hadjiargyrou M. Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation[J]. *Bone*, 2006, 39:5-16.
- [30] Cho H H, Kim Y J, Kim S J, Kim J H, Bae Y C, Ba B, et al. Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12:111-121.
- [31] Lorda-Diez C I, Montero J A, Martinez-Cue C, Garcia-Porrero J A, Hurler J M. Transforming growth factors beta coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284:29988-29996.