

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.03.009

Sox9 治疗兔椎间盘退变的效果及机制研究*

赵哲 刘贾昆 王焕 王文波 徐宁

(哈尔滨医科大学附属第一医院骨科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探究 Sox9 用于治疗椎间盘退变的效果及调控机制。方法:将 Ad-sox9 和 Ad-GFP 各 20 μ L 分别转染至椎间盘退变的髓核组织中,转染后 3、7、30、60 天取材,采用免疫组化、免疫荧光和 MRI 等研究方法检测椎间盘髓核组织中 II 型胶原、蛋白多糖的表达情况,并分析对椎间盘退变的改善情况。结果:免疫组化染色显示 sox9 组中椎间盘髓核组织中 II 型胶原、蛋白多糖的表达明显升高,MRI 显示 sox9 组椎间盘 T2 像信号有明显改善($P<0.05$)。结论:体内转染腺病毒介导的 sox9 基因能够增加椎间盘内 II 型胶原和蛋白多糖的表达,并抑制椎间盘的退变进程。

关键词: 椎间盘;髓核;Sox9;II 型胶原;基因表达

中图分类号:R-33;R681.53 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)03-445-04

A Study on the Effects and Mechanisms of Sox9 in the Treatment of Rabbit with Intervertebral Disc Degeneration*

ZHAO Zhe, LIU Jia-kun, WANG Huan, WANG Wen-bo, XU Ning

(Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To explore the regulatory mechanism of Sox9 in the treatment of intervertebral disc degeneration. **Methods:** Ad - sox9 and Ad - GFP 20 μ L, respectively transfection nucleus pulposus of intervertebral disc degeneration of the rabbit, 3, 7, 30 and 60 days after transfection materials, using the methods of immunohistochemical, fluorescence and magnetic resonance imaging (MRI) detection of intervertebral disc nucleus pulposus in the expression of type II collagen and proteoglycan, and analysis on the improvement of the intervertebral disc degeneration. **Results:** Immunohistochemical staining showed that the expression of type II collagen and proteoglycan in intervertebral disc nucleus pulposus tissues in sox9 group was significantly increased, and MRI showed that T2 image signal of intervertebral disc in sox9 group was significantly improved ($P<0.05$). **Conclusion:** In vivo transfected adeno-mediated sox9 gene can increase the expression of type II collagen and proteoglycan in intervertebral disc, and inhibit the degeneration process of intervertebral disc.

Key words: Intervertebral disc; Nucleus pulposus; Sox9; Type II collagen; Gene expression

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R681.53 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)03-445-04

前言

腰椎间盘退变所致的腰腿痛是临床上的常见多发病,严重影响患者的生活质量^[1],临床治疗方法有保守治疗,包括牵引、理疗、卧床休息、药物治疗等。这些治疗方法只能暂时缓解疼痛症状,对于保守治疗无效的多采用手术治疗,包括微创手术、椎间盘切除、椎间盘置换、脊柱融合等,虽然能够在一定程度上缓解症状,但不能从根本上阻止椎间盘退变的进展,并可能引起相邻椎间盘的退变发生^[2,3]。近年来,随着分子生物学等相关基础学科的迅速发展,分子治疗、基因治疗等技术逐渐成为一种切实可行的重要治疗手段,椎间盘退变基因治疗的策略就是在椎间盘内转入治疗基因,增强椎间盘细胞合成细胞外基质的能力,最终延缓或逆转椎间盘退变进程^[4]。Sox9 基因位于人 17 号染色体长臂上,具有进化保守性,是胚胎性别决定过程中重要的基因,也是调控软骨发生的主要转录因子^[5]。在胚胎

的发育中,Sox9 和 II 型胶原在软骨祖细胞表达,直到软骨细胞变为肥大软骨细胞,Sox9 表达明显减弱至关闭。并且在间质细胞向软骨细胞分化过程中,如果 Sox9 失活,其软骨分化过程随即被遏制。研究表明 Sox9 结合 II 型胶原、蛋白多糖的增强子元件,可以激活表达,从而调控软骨分化^[6,7]。因此,Sox9 作为软骨发生重要的转录因子,可能在椎间盘软骨细胞中的表达水平会影响椎间盘退变的发生发展,并为腰椎间盘退变的基因治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4-6 周新西兰大白兔,体重 1.5 kg \pm 0.5(哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物中心提供)。

1.2 实验试剂和材料

20 μ L Hamilton 微量注射器;Nikon eclipse80i 荧光显微镜

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11551165)

作者简介:赵哲(1971-),男,博士,副主任医师,主要从事关节微创外科,电话:13946090362,E-mail: zhaozhe363@163.com

(收稿日期:2019-06-27 接受日期:2019-07-23)

及成像系统;Leica CM3050S 冰冻切片机;1.5T 超导型磁共振扫描仪(Siemens 公司);sox9 的重组 5 型腺病毒(Ad-sox9)(本元正阳公司);绿色荧光蛋白的重组 5 型腺病毒(Ad-EGFP)(本元正阳公司)。

1.3 方法

1.3.1 椎间盘退变动物模型制备 取新西兰大白兔,麻醉后无菌条件下对兔子背部纵行切口,长度上起自 L1-2 节段,下至 L7-S1 节段,切开皮肤,将左侧背最长肌、多裂肌从关节突附着处拨开,分离暴露椎间盘;以 18G 腰穿针刺 L1-5 节段;回抽少量髓核组织,拔出穿刺针,剩余节段同样暴露但不做穿刺;以庆大霉素 8 万单位加入盐水中冲洗。

1.3.2 受态大肠杆菌的制备及转化 制备感受态大肠杆菌,转化大肠杆菌,提取质粒,分析质粒的限制性内切酶并且进行片段回收,连接与转化 DNA 片段,最后进行 PCR 扩增。

1.3.3 293 细胞复苏及培养 无菌条件下,复苏 293 细胞后,加入约 1 mL 完全培养基悬起细胞,移入 3×7 cm 的细胞瓶内,再补充 1 mL 完全培养基,37℃,5% CO₂ 孵箱培养过夜,按常规进行培养。

1.3.4 重组腺病毒的包装、扩增、重组病毒的滴度测定 用完全培养液将病毒作连续 10 倍稀释,从 10⁻¹-10⁻²⁰ 作为滴定稀释度,每一稀释度接种 3 孔 293 细胞,每孔加 0.25 mL 粗制重组腺病毒,37℃,5% CO₂ 孵箱培养 10 天,镜下观察半数出现病变现象的稀释度,即为 50%感染单位(TCID₅₀)。

1.3.5 模型制备 采用纤维环穿刺法制备兔腰椎间盘退变模型 36 只。实验组为注射 Ad-sox9 组 12 只、注射 Ad-GFP 组 12 只、对照组为注射 PBS 组 12 只。

1.3.6 外源性基因的转染 暴露椎间盘微量注射器直接注射髓核组织。所有动物均注射 3 个节段 L2-3、L3-4、L4-5 节段,每个节段注射腺病毒载体或 PBS 缓冲液均剂量为 20 μL。转染前后分别注射青霉素 8 万单位预防感染,术后分笼饲养,分别于转染后 3 天、7 天、30 天、60 天每组随机抽取 3 只观测指标。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS23.0 统计软件包进行分析处理,采用方差分析和 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 原始质粒及病毒种类鉴定

原始质粒为 pReceiver-M01-SOX9,经过 PCR 鉴定及酶切鉴定其结果符合。pReceiver-M01-SOX9 质粒经 PCR 扩增,再经 *EcoRI/SalI* 双酶切 PCR 产物;pDC316 质粒经 *EcoRI/SalI* 双酶切,切胶回收 3.9k 左右片段;连接以上 2 片段,转化,挑克隆;pDC316-Sox9 通过 *EcoRI/SalI* 双酶切鉴定,PCR 扩增鉴定插入序列,PCR 鉴定构建重组体质粒。

2.2 Ad-sox9 转染对髓核组织中 II 型胶原的影响

髓核组织中 II 型胶原的表达位于细胞间质中,蛋白多糖在胞浆和胞膜中表达。转染后 3 天,实验组 II 型胶原和蛋白多糖的表达量较低,与对照组无明显差异($P > 0.05$)。转染后 30 天,Ad-sox9 组中 II 型胶原与蛋白多糖的表达显示明显增高,与对照组相比,分别增加了 36.7%和 24.5%($P < 0.05$);转染后 60 天,Ad-sox9 组中 II 型胶原与蛋白多糖的表达与对照组相比分别增加了 65.3%和 50.5%($P < 0.05$);

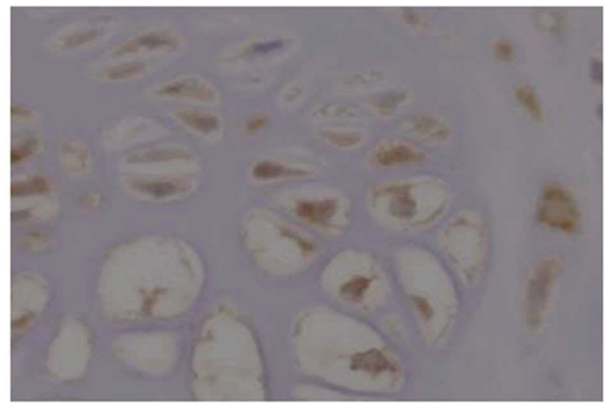


图 1 30 天蛋白多糖的表达×40

Fig.1 Expression of the proteoglycan after 30 days × 40

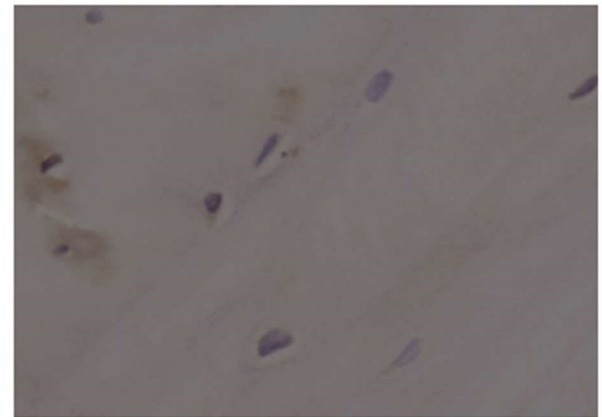


图 2 30 天 II 型胶原的表达×40

Fig.2 Expression of the type II collagen after 30 days × 40

2.3 Ad-GFP 转染后荧光显微镜结果

转染后 3 天,绿色荧光蛋白荧光表达量最高,转染后 7 天时,表达量降低了 40.6%;转染 30 天,绿色荧光蛋白的表达量下降了 60.7%;转染 30 天绿色荧光蛋白的表达量下降了 77.2%。而对照组无绿色荧光蛋白的表达。

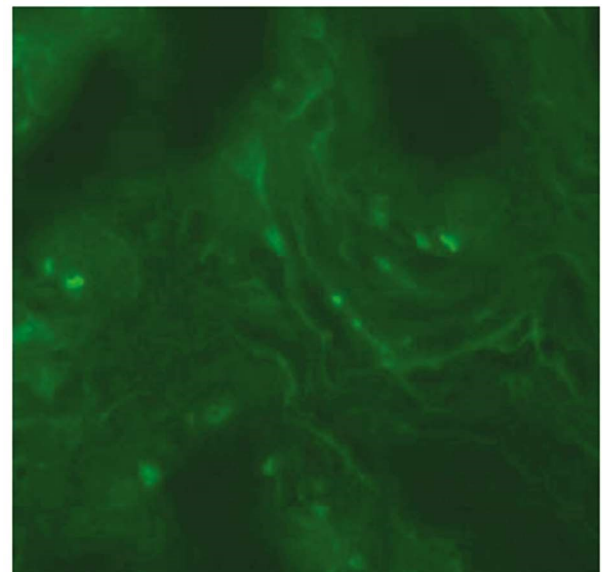


图 3 48 小时绿色荧光蛋白的表达×40

Fig.3 Expression of the GFP after 48 hours × 40

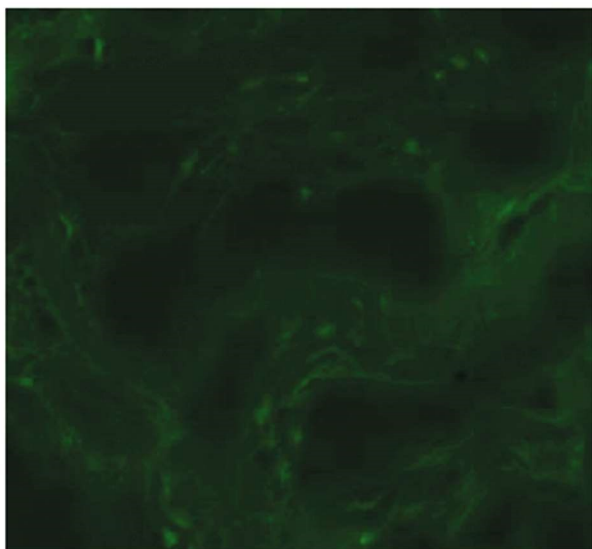


图 4 60 天绿色荧光蛋白的表达× 40

Fig.4 Expression of the GFP after 60 days× 40

2.4 Ad-sox9 转染对髓核组织中 II 型胶原的影响

转染 30 天后, T2 加权像显示注射节段间盘信号回升 (L2-3、L3-4、L4-5), 对照组 T2 加权像椎间盘仍为低信号影。Ad-sox9 组 T2 加权像信号回升更加显著, 而对照组为低信号影, 无明显改善。

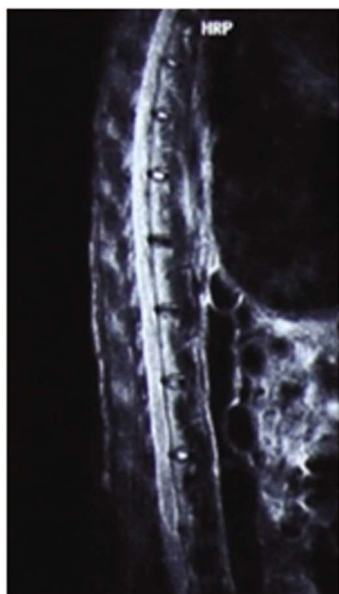


图 5 30 天 Ad-sox9 组核磁共振 T2 像

Fig.5 T2 image of MRI in Ad-sox9 group after 30 days

3 讨论

椎间盘退变是临床中常见的一种疾病, 其微观改变始于椎间盘髓核细胞及细胞外基质, 它是引起椎间盘中胶原和蛋白多糖降解的至关重要的生物效应物质^[9]。因此细胞外基质的成分稳定是提供椎间盘形态与功能的基础, 其分子生物学变化可引起 II 型胶原、蛋白多糖和水分的丧失, 继而发生胶原的交联和蛋白多糖的重构等, 使椎间盘髓核内的软骨细胞形态向纤维细胞转变^[9-11]。这些分子改变在一定程度引起了椎间盘形态变化,

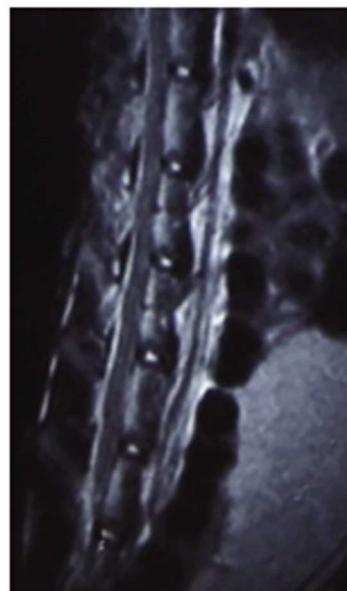


图 6 30 天 PBS 组核磁共振 T2 像

Fig.6 T2 image of MRI in PBS group after 30 days

最终导致了椎间盘退变。基因治疗就是在分子层面阻断椎间盘髓核中软骨细胞向纤维细胞转变和维持细胞外基质的稳定, 阻断或逆转椎间盘退变的演变过程^[12,13]。

椎间盘退变的发展是一个不可逆的过程, 本研究中检测了椎间盘髓核组织内 II 型胶原和蛋白多糖的表达水平, 随着观察时间的延长, 实验组髓核组织内的表达水平逐渐增高; 而对照组两种蛋白的表达无明显变化。术后的核磁共振扫描显示实验组 T2 序列高信号影明显高于对照组。以上结果表明, Ad-sox9 转染后的椎间盘退变有效地防止了 II 型胶原、蛋白多糖和水分的进一步丧失, 而且逆转了这一变化。从荧光显微镜观察发现, 转染后实验组腺病毒载体在椎间盘内的表达逐渐下降, 可持续 12 周, 对照组无绿色荧光蛋白的表达, 这可能与椎间盘髓核组织的解剖学结构有关, 上下软骨板、同心圆状的纤维环共同围成了相对封闭的环境, 不但可以使载体携带的基因长久表达, 并且具有内部血运少的特点, 减少了免疫排斥反应, 因此基因治疗在椎间盘髓核组织内的拥有其独特的优势^[14]。

sox9 基因是 sox(SRY HMGbox) 基因家族成员之一, 不但是性别决定的因子, 而且是决定软骨分化和维持软骨表型的重要基因。sox9 是 II 型胶原合成过程中一个重要的转录因子, 其在软骨的发育、成熟过程中对 II 型胶原基因 (Col2a1) 表达增强和促使 II 型胶原合成增加的作用已十分明确^[15]。研究表明 sox9 被当做 II 型胶原 mRNA 转录中的正向操纵子^[16-18]; Sive 等^[19]用原位杂交方法分析了正常与退变椎间盘内 sox9、II 型胶原和蛋白多糖三种软骨因子的表达状况, 发现在退变的椎间盘的髓核与纤维环中 sox9 与 II 型胶原 mRNA 的表达明显降低。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^[20]。当椎间盘内软骨细胞变成肥大的纤维细胞时, sox9 对 II 型胶原和蛋白多糖的正向调控通路随即关闭, 所以实验中注射的 Ad-sox9 可以使椎间盘内髓核细胞持续维持软骨细胞的表型, 在分子水平起到阻断椎间盘退变的进展。

目前已有多种因子被运用到治疗椎间盘退变的研究中^[21-25], Thompson^[26]等首先描述通过外源性转化生长因子-β (TGF-β1)

转入犬椎间盘髓核细胞,发现其增加了蛋白多糖的合成,开创了椎间盘退变基因治疗的先河。有学者将重组的人骨形态发生蛋白 2(BMP-2)导入成年兔退变的椎间盘细胞中,结果显示其按剂量依赖方式正相调控 *sox9* 基因 mRNA 的表达,从而引起 Col2a1 表达的增加,相应地增加 II 型胶原及蛋白聚糖的合成^[27]。髓核细胞是相对不分裂细胞,普通载体难以高效转染,而腺病毒可以高效转染分裂期和非分裂期细胞,文献报道 150 MOI 即可转染 100%体外培养的髓核细胞。另外,由于存在免疫应答反应,一般情况下腺病毒载体介导的基因表达很难维持 12 周。而椎间盘相对封闭的环境使得血循环中的抗体很难攻击靶细胞,因而获得转入基因的长久表达。研究表明生物因子对于椎间盘退变的作用主要是通过增强 *sox9* 的表达水平发挥作用,其潜在的调控通路被认为是 MEK-ERK 通路^[28,29]。Paul^[30]等人构建了表达 *sox9* 及绿色荧光蛋白的腺病毒载体 Ad-*sox9*,发现可有效地转染软骨母细胞系 HTB-94 和人退变椎间盘细胞,并显著提高这两种细胞的 II 型胶原合成水平。直接注射至动物模型的椎间盘中的 Ad-*sox9*,其转染的细胞长期保持软骨细胞的表型,提示病毒载体的安全性。本实验中直接注射 *sox9* 腺病毒载体治疗椎间盘退变结果与对照组相比差异显著,实验组的髓核细胞内的表达持续了 12 周,表明了 *sox9* 基因的生物学作用可以被某些细胞因子有效地进行调控,揭示了 *sox9* 基因治疗椎间盘退变的潜在价值。本实验中研究证实转染后 II 型胶原 mRNA 获得了高效表达,且随着时间的延长,表达量愈高。本实验 *sox9* 转染后 2 周、4 周、8 周退变椎间盘 II 型胶原的表达量明显比空白对照组高,两两配对 t 检验示有显著性差异。通过 MRI 检测显示退变的椎间盘的低信号明显改善,从而证实了 *sox9* 对椎间盘退变的治疗作用。

目前许多基因治疗椎间盘退变的研究结果被证明效果明显,但基因治疗要真正过度到临床应用还有诸多需要解决的问题,包括如何构建更加高效、安全的表达载体,以及如何使目的基因得到更加稳定、长期的表达。并且许多假说缺乏理疗的支持,但我们相信,随着分子技术及基因工程的发展,应用安全基因治疗椎间盘退变等脊柱疾患将为期不远。

参考文献(References)

- Zheng CJ, Chen J. Disc degeneration implies low back pain [J]. *Theor Biol Med Model*, 2015, 12 (24): 324-333
- Radcliff KE, Kepler CK, Jakoi A, et al. Adjacent segment disease in the lumbar spine following different treatment interventions[J]. *Spine J*, 2013, 1(10): 1339-1349
- Iatridis JC, Kang J, Kandel R, et al. New horizons in spine research: intervertebral disc repair and regeneration [J]. *J Orthop Res*, 2017, 35 (1): 5-7
- Priyadarshani P, Li Y, Yao L. Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(2): 206-212
- Martinez-Sanchez A, Murphy CL. miR-1247 functions by targeting cartilage transcription factor SOX9 [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(43): 30802-30814
- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, et al. The Sry-related gene *Sox9* is expressed during chondrogenesis in mouse embryos[J]. *Nat Genet*, 1995, 9: 15-20
- Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. L-*Sox5*, *Sox6* and *Sox9* control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001, 9: S69-S75
- Li Y, Li K, Han X, et al. The imbalance between TIMP3 and matrix-degrading enzymes plays an important role in intervertebral disc degeneration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469 (3): 507-514
- Wang W, Hao J, Zheng S, et al. Association Between Cartilage Intermediate Layer Protein and Degeneration of Intervertebral Disk: A Meta-analysis[J]. *Spine*, 2016, 41(20): E1244-E1248
- Phillips K L, Cullen K, Chiverton N, et al. Potential roles of cytokines and chemokines in human intervertebral disc degeneration: interleukin-1 is a master regulator of catabolic processes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(7): 1165-1177
- Ouyang A, Cerchiari AE, Tang X, et al. Effects of cell type and configuration on anabolic and catabolic activity in 3D co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells [J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(1): 61-73
- Yue B, Lin Y, Ma X, et al. Effect of survivin gene therapy via lentivirus vector on the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4593-4598
- Liu Y, Yu T, Ma X, et al. Lentivirus-mediated TGF- β 3, CTGF and TIMP1 gene transduction as a gene therapy for intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(4): 1399-1404
- Vergroesen PP, Kingma I, Emanuel KS, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(7): 1057-1070
- 黄秀芳,原向伟. *Sox9* 和 II 型胶原蛋白在人腰椎间盘退变中的表达及意义[J]. *中国医药科学*, 2014, 4(3): 18-21
- Urban JP, McMullin JF. Swelling pressure of the lumbar intervertebral discs: influence of age, spinal level, composition, and degeneration[J]. *Spine*, 1988, 13(2): 179-187
- Garfin SR, Herkowitz HN. Disc disease: Does it exist?[J]. *The Lumbar Spine*, 1990: 369-380
- Adler JH, Schoenbaum M, Silberberg R. Early onset of disk degeneration and spondylosis in sand rats[J]. *Vet Pathol*, 1983, 20: 13-22
- Sive JJ, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs[J]. *J Clin Pathol Mol Pathol*, 2002, 55(2): 91-97
- Pearce RH, Gimmer BJ, Adams ME. Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc[J]. *J Orthop Res*, 1987, 5(2): 198-205
- Kraus P, Lufkin T. Implications for a stem cell regenerative medicine based approach to human intervertebral disk degeneration [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 17-22
- Henry N, Clouet J, Le Bideau J, et al. Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: from cell therapies to multiscale delivery systems[J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 281-294
- Li Z, Yu X, Shen J, et al. MicroRNA in intervertebral disc degeneration[J]. *Cell Prolif*, 2015, 48(3): 278-283
- Meng X, Zhu Y, Tao L, et al. MicroRNA-125b-1-3p mediates intervertebral disc degeneration in rats by targeting teashirt zinc finger homeobox 3[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(3): 2627-2633

- [3] Obulareddy VT, Chava VK, Nagarakanti S. Association of stress, salivary cortisol, and chronic periodontitis: a clinico-biochemical study [J]. *Contemp Clin Dent*, 2018, 9(Suppl 2): S299-S304
- [4] Saita M, Kaneko J, Sato T, et al. Novel antioxidative nanotherapeutics in a rat periodontitis model: Reactive oxygen species scavenging by redox injectable gel suppresses alveolar bone resorption[J]. *Biomaterials*, 2016, 76: 292-301
- [5] Ghezzi P, Floridi L, Boraschi D, et al. Oxidative stress and inflammation induced by environmental and psychological stressors: A biomarker perspective [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28 (9): 852-872
- [6] Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis[J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 910
- [7] Zhao YJ, Li Q, Cheng BX, et al. Psychological stress delays periodontitis healing in rats: the involvement of basic fibroblast growth factor [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 732902
- [8] Cui M, Li Q, Zhang M, et al. Long-term curcumin treatment antagonizes masseter muscle alterations induced by chronic unpredictable mild stress in rats[J]. *Arch Oral Biol*, 2014, 59(3): 258-267
- [9] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93(3): 358-364
- [10] Semenoff-Segundo A, Proto AN, Smenoff TA, et al. Effects of two chronic stress models on ligature-induced periodontitis in Wistar rats [J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(1): 66-72
- [11] Roshni Jaiswal, Nina Shenoy, Biju Thomas. Evaluation of association between psychological stress and serum cortisol levels in patients with chronic periodontitis-Estimation of relationship between psychological stress and periodontal status[J]. *J India Soc Periodontol*, 2016, 20(4): 381-385
- [12] Gomes EP, Aguiar JC, Fonseca-Silva T, et al. Diazepam reverses the alveolar bone loss and hippocampal interleukin-1beta and interleukin-6 enhanced by conditioned fear stress in ligature-induced periodontal disease in rats[J]. *J Periodontol Res*, 2013, 48(2): 151-158
- [13] Trivedi S, Lal N. Antioxidant enzymes in periodontitis[J]. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2017, 7(1): 54-57
- [14] Zhang T, Andrukhov O, Haririan H, et al. Total antioxidant capacity and total oxidant status in saliva of periodontitis patients in relation to bacterial load[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 5: 97
- [15] Liu C, Mo L, Niu Y, et al. The role of reactive oxygen species and autophagy in periodontitis and their potential linkage [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 439
- [16] Savita AM, Sarun E, Arora S, et al. Evaluation of glutathione level in gingival crevicular fluid in periodontal health, in chronic periodontitis and after nonsurgical periodontal therapy: A clinicobiochemical study [J]. *Contemp Clin Dent*, 2015, 6(2): 206-210
- [17] Bains VK, Bains R. The antioxidant master glutathione and periodontal health[J]. *Dent Res J (Isfahan)*, 2015, 12(5): 389-405
- [18] Chin YT, Cheng GY, Shih YJ, et al. Therapeutic applications of resveratrol and its derivatives on periodontitis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1403(1): 101-108
- [19] Bhattarai G, Poudel SB, Kook SH, et al. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis [J]. *Acta Biomater*, 2016, 29: 398-408
- [20] 王雯文, 张兰, 王韵秋, 等. 布洛芬联合甲硝唑对慢性牙周炎龈沟液中细胞因子的影[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(9): 1763-1766
- [21] Almerich-Silla JM, Montiel-Company JM, Pastor S, et al. Oxidative stress parameters in saliva and its association with periodontal disease and types of bacteria[J]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 653537

(上接第 448 页)

- [25] Gu SX, Li X, Hamilton JL, et al. MicroRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc [J]. *Gene*, 2015, 555(2): 80-87
- [26] Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors[J]. *Spine*, 1991, 16: 253-256
- [27] Wallach CJ, Sobima S, Watanabe Y, et al. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in human intervertebral disc[J]. *Spine*, 2003, 28(20): 2331-2337
- [28] Cheng CC, Uchiyama Y, Hiyama A, et al. PI3K/AKT regulates aggrexin gene expression by modulating Sox9 expression and activity in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 221(3): 668-676
- [29] Colombier P, Clouet J, Hamel O, et al. The lumbar intervertebral disc: from embryonic development to degeneration [J]. *Joint Bone Spine*, 2014, 81(2): 125-129
- [30] Paul R, Haydon RC, Cheng H, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease[J]. *Spine*, 2003, 28(8): 755-763