

· 基础研究 ·

低氧通过HIF-1 α 调控髓核细胞中ADAMTS-4和ADAMTS-5的表达

华东方¹ Δ , 徐敏铭² Δ , 杨晨¹, 田野¹, 高阳¹, 魏磊鑫¹, 曹鹏^{1*}, 袁文^{1*}

1.第二军医大学附属长征医院脊柱外科, 上海 200003

2.江西省上饶平安医院脊柱外科, 江西 334000

【摘要】目的 观察低氧环境及低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)对髓核细胞中解聚蛋白样金属蛋白酶(ADAMTS)-4和ADAMTS-5启动子活性的影响, 探讨可能影响椎间盘退变的分子机制。**方法** 将体外培养的大鼠髓核细胞分别置于常氧和低氧(1% O₂)培养箱培养, 采用蛋白质印迹分析及PCR方法检测细胞中ADAMTS-4和ADAMTS-5的表达。对获取的ADAMTS-4和ADAMTS-5启动子片段测序, 并使用JASPAR数据库分析其中是否存在HIF-1 α 的结合位点。将HIF-1 α 过表达质粒、PGL3-ADAMTS-4质粒和PGL3-ADAMTS-5质粒转染至大鼠髓核细胞中, 用双荧光素酶报告基因检测系统检测髓核细胞中HIF-1 α 对ADAMTS-4和ADAMTS-5基因启动子的调控作用。**结果** 蛋白质印迹分析和PCR结果显示, 低氧分别在蛋白质水平和mRNA水平抑制髓核细胞中ADAMTS-4、ADAMTS-5的表达。使用JASPAR软件分析后, 发现ADAMTS-4启动子中可能包含1个HIF-1 α 的结合位点, 而ADAMTS-5启动子中可能包含2个HIF-1 α 的结合位点。双荧光素酶报告基因检测结果显示, HIF-1 α 的过表达能够显著抑制ADAMTS-4和ADAMTS-5启动子活性。**结论** 低氧可能通过HIF-1 α 抑制ADAMTS-4和ADAMTS-5的表达, 保持椎间盘内环境的稳态, 延缓椎间盘退变的发生。

【关键词】 芳香烃受体核转位子; 金属蛋白酶类; 细胞低氧; 脊髓

【中图分类号】 R 651.21 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-2957(2017)04-0233-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-2957.2017.04.008

Regulation of HIF-1 α dependent hypoxia on expression of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in nucleus pulposus cells

HUA Dong-fang¹ Δ , XU Min-ming² Δ , YANG Chen¹, TIAN Ye¹, GAO Yang¹, WEI Lei-xin¹, CAO Peng^{1*}, YUAN Wen^{1*}

1.Department of Spinal Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2.Department of Spinal Surgery, Shangrao Ping'an Hospital, Shangrao 334000, Jiangxi, China

【Abstract】Objective To observe the effects of hypoxia and hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) on the activity of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs(ADAMTS)-4 and -5 promoter in the nucleus pulposus cells explor the molecular mechanism of intervertebral disc degeneration. **Methods** Western blotting and PCR were used to detect the expression of ADAMTS-4 and -5 in the nucleus pulposus cells in normoxia and hypoxia environments *in vitro*. The ADAMTS-4 and -5 promoters were sequenced, and the binding sites for the presence of HIF-1 α were analyzed using JASPAR database. HIF-1 α , PGL3-ADAMTS-4 and -5 plasmids were transfected into rat nucleus pulposus cells, and the effect of regulation of HIF-1 α on ADAMTS-4 and -5 promoter were analyzed by Dual-Luciferase[™] Reporter Assay System. **Results** The results of Western blotting and PCR showed that the expression of ADAMTS-4 and -5 in nucleus pulposus cells was suppressed by hypoxia at protein level and mRNA level, respectively. Using JASPAR software analysis, we found that the ADAMTS-4 promoter may contain 1 HIF-1 α binding site, and the ADAMTS-5 promoter may contain 2 HIF-1 α binding sites. Dual-Luciferase[™] Reporter Assay System showed that overexpression of HIF-1 α could significantly inhibit the transcriptions of ADAMTS-4 and -5. **Conclusion** Hypoxia may suppress the expression of ADAMTS-4 and -5 by HIF-1 α , which may help to maintain the homeostasis of the intervertebral disc and delay the occurrence of disc degeneration.

【Key Words】 Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; Metalloproteases; Cell hypoxia; Spinal cord

J Spinal Surg, 2017, 15(4): 233-238

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81501918);

上海市卫计委面上项目(201440513)

Δ 共同第一作者

作者简介: 华东方(1984—), 硕士在读, 医师; battalionms@163.com

徐敏铭(1984—), 学士, 主治医师;

13755311241@sina.cn

*通信作者: 曹鹏 mdpinocao@126.com

袁文 smmuyuanwen@126.com

椎间盘是人体最大的无血管组织, 仅有少量的血管分布^[1]。因此, 低氧环境是椎间盘内髓核组织重要的生理环境^[2-3]。低氧能够诱导髓核细胞中低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 的表达, 后者对髓核细胞的存活及其细胞外基质的代谢具有重要作用, 进而参与椎间盘退变的病理生理进程^[4-7]。研究表明, 解聚蛋白样金属蛋白酶 (ADAMTS) 家族在椎间盘退行性变的过程中发挥重要作用, 其中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 是目前公认的最为重要的聚蛋白聚糖降解酶, 二者能够直接作用于髓核细胞外基质聚蛋白聚糖并将其彻底水解, 从而破坏细胞外基质, 在椎间盘退变过程中发挥核心作用^[8]。研究表明, 低氧环境及 ADAMTS-4、ADAMTS-5 对椎间盘细胞外基质代谢均具有重要作用^[9-10]。本研究拟观察低氧及 HIF-1 α 对髓核细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 表达的调控作用, 探讨影响椎间盘退行性变的分子机制, 以期对椎间盘退行性变的生物治疗提供新的靶点和思路。

1 材料和方法

1.1 材料

人 p β -gal 基载体 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子由礼来研究实验室 Thirunavukkarasu 博士馈赠, HIF-1 α 过表达质粒、显性负突变 HIF-1 α (DN-HIF-1 α) 质粒由斯克里普斯研究所 Jiahui Han 博士馈赠, pRL-TK 海肾荧光素酶质粒、双荧光素酶报告基因检测系统 (Dual LuciferaseTM Reporter Assay System)、质粒提纯试剂盒购自 Promega 公司, Anti-ADAMTS-4 和 Anti-ADAMTS-5 抗体购自 Abcam 公司, lipofectamine2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司, 胰酶-EDTA、DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司, DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒购自 Qiagen 公司, SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 PGL3-ADAMTS-4 和 PGL3-ADAMTS-5 基因质粒构建方法

用内切酶将 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子片段分别自 p β -gal 基载体中切出, 同时将 PGL3 空载体的上游和下游分别切开。琼脂糖凝胶电泳后, 将所得 DNA 片段进行提取、纯化。对获取的 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子片段测序, 并使用 JASPAR 数据库^[11]来研究其中是否存在 HIF-1 α 的结合位点。16℃下将 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 片段分别与 PGL3 连接, 转入大肠杆菌, 涂至含氨苄青霉素的琼脂糖培养板, 37℃孵箱过夜。挑取有效存活细菌, 纯化后

进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳确认质粒构建正确。

1.3 髓核细胞的分离和培养

用 Risbud 等^[12]的方法分离获取大鼠原代髓核细胞, 37℃、5%CO₂ 孵箱孵育 48 h 后换培养液, 之后每 2 d 换一次培养液, 按时观察细胞形态。当细胞长满约 80% 培养皿时按 1:3 进行传代。向待传代细胞培养瓶中加入适量 0.25% 胰酶-EDTA, 置入 37℃孵箱 30 s, 确认细胞浮起后加入培养液中中和胰酶, 离心 5 min 后 (1 000 r/min, 离心半径为 10 cm) 弃上清液, 加入新鲜培养液后将细胞分置新培养瓶。

1.4 低氧对细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 蛋白表达的影响

将体外培养的大鼠髓核细胞分别置于常氧和低氧 (1% O₂) 培养箱培养, 以常氧培养髓核细胞为对照组, 以低氧培养 4、8 和 24 h 的髓核细胞为实验组, 使用蛋白质印迹法检测髓核细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 蛋白表达。ADAMTS-4 相对分子质量约为 90 000, ADAMTS-5 相对分子质量约为 73 000。提取髓核细胞蛋白, 测定蛋白含量, 以 8% 分离胶进行 SDS-PAGE, 恒电压 80 V, 恒电流 220 mA, 90 min 后转至硝酸纤维素膜。将膜移至含有封闭液的平皿中, 室温下于脱色摇床上摇动封闭 1 h。加入 Anti-ADAMTS-4 (工作浓度 1:1 500) 和 Anti-ADAMTS-5 抗体 (工作浓度 1:250), 4℃孵育过夜, 回收一抗清洗后加入二抗孵育 1 h, 清洗后显影。

1.5 低氧对细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 mRNA 表达的影响

以常氧培养髓核细胞为对照组, 以低氧培养 1、4 和 8 h 的髓核细胞为实验组, 使用 PCR 方法检测髓核细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 mRNA 表达。依照 TRIzol Reagent 说明提取细胞 RNA, 使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度及纯度, 将浓度过高的 RNA 进行适当比例的稀释, 使其终浓度为 200 ng/ μ L, 按 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明合成 cDNA。引物由武汉擎科创新生物科技有限公司合成, 序列如下: R-ADAMTS-4-S 为 5'-TAC AACCACCGAACCGACCT-3', R-ADAMTS-4-A 为 5'-AA GAGTCTGGGGAACAGGGAG-3', 片段长度为 178 bp; R-ADAMTS-5-S 为 5'-CCGACAAGAGTCTGGAGCTGA-3'G, R-ADAMTS-5-A 为 5'-CTGCATCGTAGTGCTCCT CATG-3', 片段长度为 114 bp。应用 PCR 方法, 按照 Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) 试剂说明, 以 GAPDH 为内参, 检测样本中 ADAMTS-4、ADAMTS-5 mRNA 的表达。

1.6 低氧对细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子转录活性的影响

将 PGL3-ADAMTS-4 和 PGL3-ADAMTS-5 报告基因分别转染髓核细胞, 以常氧培养的转染细胞为对照组, 以低氧培养 2、8 h 的转染细胞为实验组, 使用双荧光素酶报告基因检测系统检测 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子转录活性。细胞培养于 24 孔板, 每孔细胞中加入裂解液 100 μ L, 置于室温摇床裂解 15 min, 取 15 μ L 细胞裂解悬液, 加入荧光素酶测试试剂 II (LAR II) 50 μ L, 读取荧光值, 再加入 Stop & Glo™ 50 μ L, 读取荧光值, 以后者为校正内参, 二者比值即为获得校正后读数。

1.7 HIF-1 α 过表达对细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子转录活性的影响

将 100、200、300 ng HIF-1 α 过表达质粒分别与 PGL3-ADAMTS-4 报告基因共转染髓核细胞。以转染 PGL3-ADAMTS-4 报告基因为对照组, 以共转染 HIF-1 α 过表达质粒和 PGL3-ADAMTS-4 为实验组, 使用双荧光素酶报告基因检测系统检测 HIF-1 α 过表达质粒对 ADAMTS-4 启动子活性影响。同法检测 HIF-1 α 过表达质粒对 ADAMTS-5 启动子活性的影响。

1.8 HIF-1 α 低表达对低氧环境下细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子转录活性的影响

将 DN-HIF-1 α 与 PGL3-ADAMTS-4 共转染髓核

细胞。以转染 PGL3-ADAMTS-4 报告基因、常氧培养的髓核细胞为对照组, 以共转染 0、100、200、300 ng DN-HIF-1 α 质粒和 PGL3-ADAMTS-4、低氧干预 8 h 的髓核细胞为实验组, 使用双荧光素酶报告基因检测系统检测 DN-HIF-1 α 对 ADAMTS-4 启动子活性的影响。同法检测 DN-HIF-1 α 对 ADAMTS-5 启动子活性的影响。

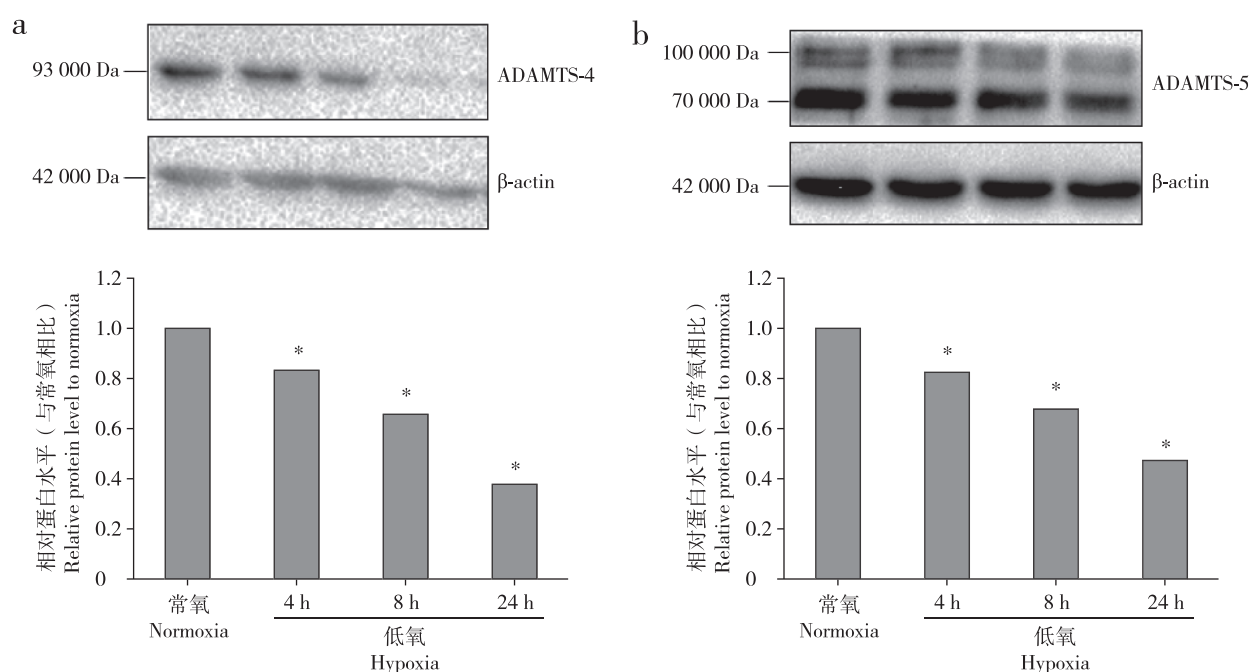
1.9 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析。所有实验独立重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析 (ANOVA) 进行组间比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 低氧对髓核细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 表达的调控作用

蛋白质印迹分析结果显示低氧显著抑制髓核细胞中 ADAMTS-4、ADAMTS-5 的表达, 并且该抑制作用具有时间依赖性 ($P < 0.05$, 图 1)。为了进一步验证以上结果, 使用 PCR 在 mRNA 水平对 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的表达进行检测, 结果显示, 低氧能够在 mRNA 水平显著抑制 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的表达 ($P < 0.05$, 图 2)。

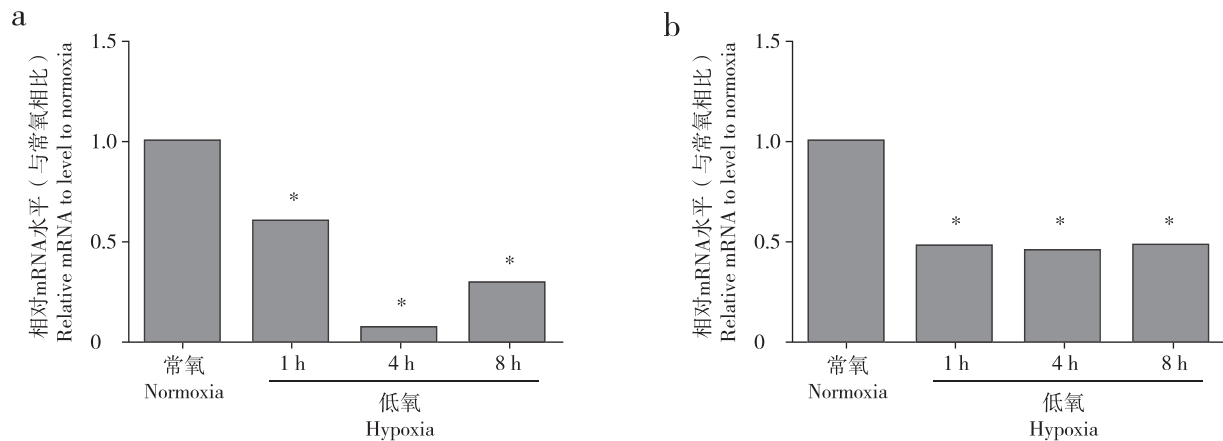


a: ADAMTS-4 b: ADAMTS-5 * 与常氧对照组比较, $P < 0.05$

a: ADAMTS-4 b: ADAMTS-5 * $P < 0.05$, compared with normoxia

图1 蛋白质印迹法检测低氧对髓核细胞中 ADAMTS-4、ADAMTS-5 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of hypoxia on ADAMTS-4 and ADAMTS-5 protein expression in nucleus pulposus cells by Western blotting



a: ADAMTS-4 b: ADAMTS-5 * 与常氧对照组比较, $P < 0.05$

a: ADAMTS-4 b: ADAMTS-5 * $P < 0.05$, compared with normoxia

图2 PCR检测低氧对髓核细胞中ADAMTS-4、ADAMTS-5 mRNA表达的影响

Fig. 2 Effect of hypoxia on ADAMTS-4 and ADAMTS-5 mRNA expression in nucleus pulposus cells by PCR

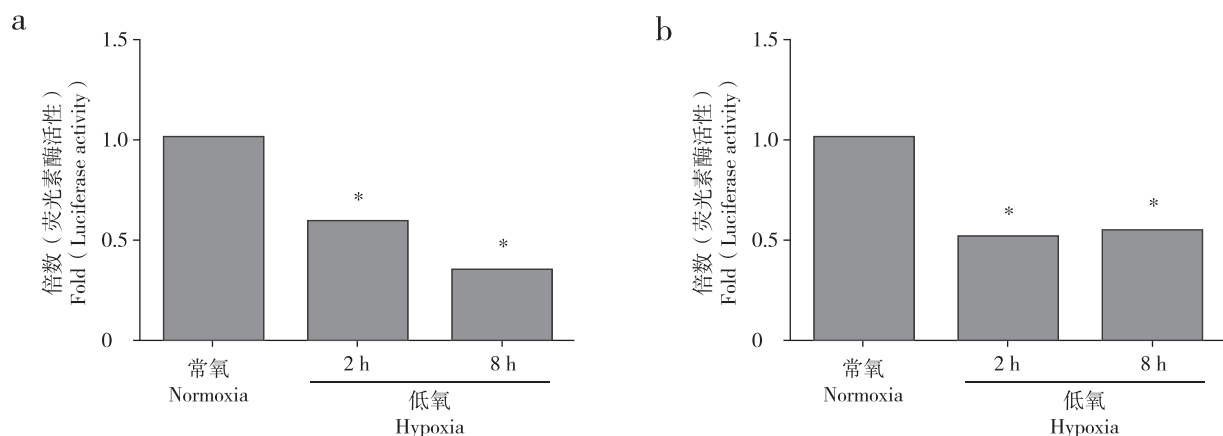
2.2 ADAMTS-4和ADAMTS-5启动子片段HIF-1 α 结合位点的分析

对获取的ADAMTS-4和ADAMTS-5启动子片段测序,并使用JASPAR数据库来研究其中是否存在HIF-1 α 的结合位点。结果显示在ADAMTS-4启动子转录起始点上游-3 082~-3 075碱基处有1个HIF-1 α 的结合位点,为“CTGCGTGG”序列。ADAMTS-5启动子转录起始点上游-4 020~-4 013碱基处有1个HIF-1 α 的结合位点,为“GTACGTGT”序列;-802~-795碱基处有1个HIF-1 α 的结合位点,为“AGGCGTGC”序列。

2.3 低氧及HIF-1 α 对ADAMTS-4和ADAMTS-5启动子的调控作用

构建PGL3-ADAMTS-4和PGL3-ADAMTS-5报告

基因并将其转染髓核细胞,采用双荧光素酶报告基因检测系统进行检测,结果显示低氧能够抑制ADAMTS-4和ADAMTS-5启动子启动转录($P < 0.05$,图3)。随后,将HIF-1 α 过表达质粒分别与PGL3-ADAMTS-4或PGL3-ADAMTS-5报告基因共转染髓核细胞,双荧光素酶报告基因检测系统结果显示HIF-1 α 能够抑制ADAMTS-4和ADAMTS-5启动子活性,且该抑制作用与HIF-1 α 过表达质粒的剂量呈正相关性($P < 0.05$,图4)。为了进一步明确HIF-1 α 的作用,将DN-HIF-1 α 与PGL3-ADAMTS-4或PGL3-ADAMTS-5分别共转染髓核细胞,结果显示DN-HIF-1 α 能够拮抗低氧对ADAMTS-4和ADAMTS-5启动子活性的抑制作用(图5)。

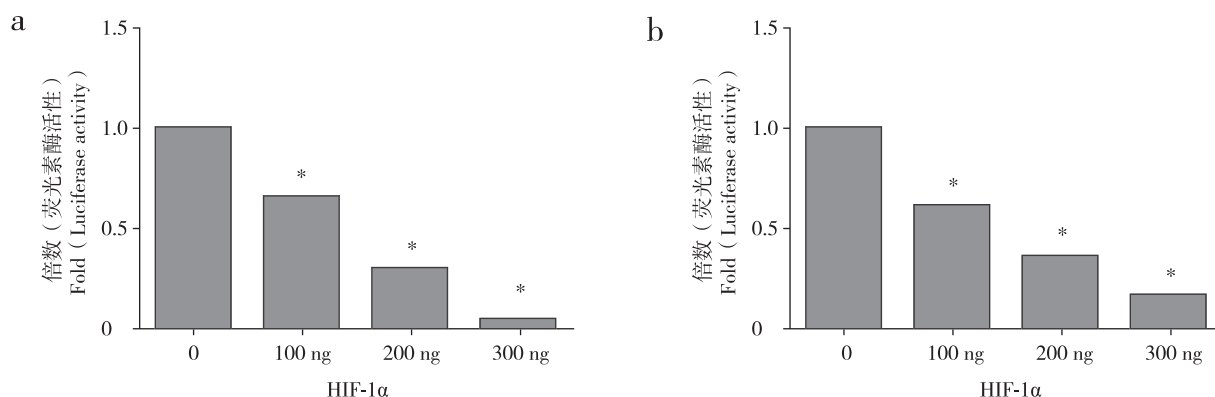


a: ADAMTS-4 b: ADAMTS-5 * 与常氧对照组比较, $P < 0.05$

a: ADAMTS-4 b: ADAMTS-5 * $P < 0.05$, compared with normoxia

图3 双荧光素酶报告基因检测系统检测低氧对髓核细胞中ADAMTS-4、ADAMTS-5启动子活性的影响

Fig. 3 Effect of hypoxia on promoter activity of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in nucleus pulposus cells by dual luciferase reporter assay system

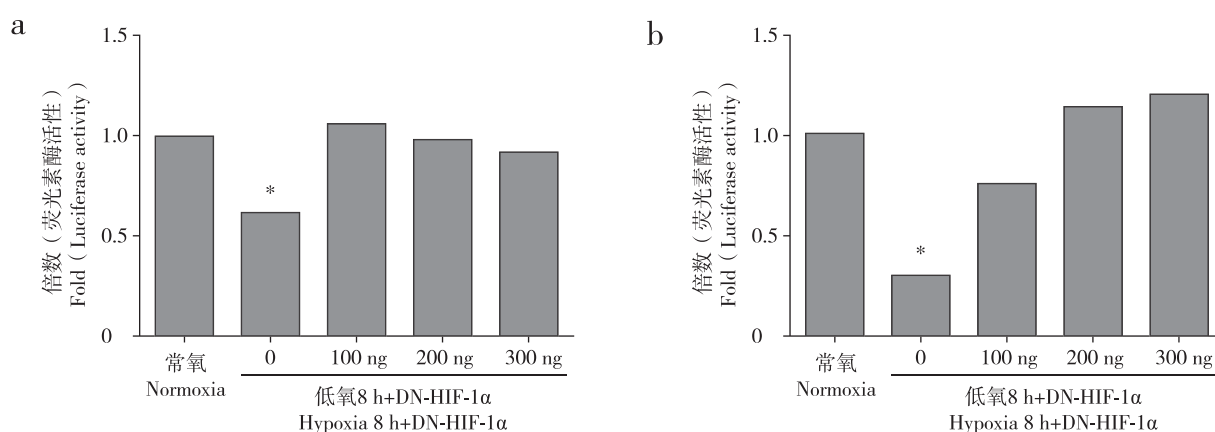


a: ADAMTS-4 b: ADAMTS-5 * 与常氧对照组比较, $P < 0.05$

a: ADAMTS-4 b: ADAMTS-5 * $P < 0.05$, compared with normoxia

图4 双荧光素酶报告基因检测系统检测 HIF-1α 对髓核细胞中 ADAMTS-4、ADAMTS-5 启动子活性的影响

Fig. 4 Effect of HIF-1α on promoter activity of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in nucleus pulposus cells by dual luciferase reporter assay system



a: ADAMTS-4 b: ADAMTS-5 * 与常氧对照组比较, $P < 0.05$

a: ADAMTS-4 b: ADAMTS-5 * $P < 0.05$, compared with normoxia

图5 双荧光素酶报告基因检测系统检测 DN-HIF-1α 对低氧 8 h 环境下髓核细胞中 ADAMTS-4、ADAMTS-5 启动子活性的影响

Fig. 5 Effect of DN-HIF-1α on promoter activity of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in nucleus pulposus cells under hypoxia 8 h environment by dual luciferase reporter assay system

3 讨论

ADAMTS 为新发现的一类 Zn^{2+} 依赖的分泌型金属蛋白酶, 正常髓核细胞分泌的 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 参与调节保持椎间盘内环境的平衡。同基质金属蛋白酶 (MMP) 通过诱导巨噬细胞浸润间接水解蛋白聚糖^[13] 不同, ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 可以直接水解蛋白聚糖^[14]。相比于正常髓核细胞, 退变髓核细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 水平的上调可引发椎间盘内环境稳态失衡而促进椎间盘退变^[15]。

HIF-1 普遍存在于人和哺乳动物细胞内, 是在基因转录水平调节细胞低氧反应的重要调节因子。HIF-1 由 α 亚基和 β 亚基组成, 其中 β 亚基持续性表达, 为芳香烃受体转运子; α 亚基包括 1 个氧依赖降

解结构域 (正常氧分压下 HIF-1 降解所必需的结构) 和 2 个反式激活结构域 (主要参与转录激活作用)。椎间盘氧分压从外层纤维环到中间髓核呈锐减趋势, 正常椎间盘外层纤维环的氧分压约为 7.5 kPa, 髓核中心的氧分压仅为 0.5 kPa; 而在退变椎间盘组织中, 髓核中心的氧分压为 1.04~12.67 kPa^[16-17]。相比于正常髓核细胞, 退变髓核细胞中 HIF-1 α 表达明显降低^[18]。

本实验证实在低氧状态下, ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 表达显著降低, 并且该调控过程处于启动子转录水平。为探明 HIF-1 α 在其中的作用, 本实验利用克隆的 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 片段构建了 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 双荧光素酶报告基因质粒, 对获取的 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子片段测序分析, 结果示 ADAMTS-4 与 ADAMTS-5 启动子

上游均存在高度可能性的 HIF-1 α 结合位点。将 HIF-1 α 分别与 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 报告基因共转染至髓核细胞后, HIF-1 α 能够显著抑制 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子活性, 此外 DN-HIF-1 α 却能够拮抗低氧对 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子活性的抑制作用。既往的研究结果显示, 低氧状态能够诱导髓核细胞发生细胞自噬, 并且促进热休克蛋白的表达, 从而确保缺乏营养物质的髓核细胞存活。并且, 低氧通过 HIF-1 α 诱导细胞外基质合成的关键酶——葡萄糖醛酸基转移酶的表达, 从而使椎间盘细胞外基质合成^[19]。而本研究结果从另一个方面显示了低氧对椎间盘的保护作用: 低氧可能通过抑制椎间盘中某些重要的降解代谢因素, 从而保护椎间盘细胞外基质的丢失。由此推测, 在正常髓核中低氧通过调节 HIF-1 α 的产生抑制 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 启动子活性从而降低其表达, 使生理状态下细胞外基质不被破坏, 保持椎间盘内环境的稳态, 延缓椎间盘退变的发生。

参考文献

- [1] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(8): 345-350.
- [2] Bekerredjian R, Walton CB, MacCannell KA, et al. Conditional HIF-1 α expression produces a reversible cardiomyopathy[J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11693.
- [3] Li H, Liang CZ, Chen QX. Regulatory role of hypoxia inducible factor in the biological behavior of nucleus pulposus cells[J]. Yonsei Med J, 2013, 54(4): 807-812.
- [4] Merceron C, Mangiavini L, Robling A, et al. Loss of HIF-1 α in the notochord results in cell death and complete disappearance of the nucleus pulposus[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110768.
- [5] Bibby SR, Urban JP. Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells[J]. Eur Spine J, 2004, 13(8): 695-701.
- [6] Horner HA, Urban JP. 2001 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2001, 26(23): 2543-2549.
- [7] Zeng Y, Danielson KG, Albert TJ, et al. HIF-1 α is a regulator of galectin-3 expression in the intervertebral disc[J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(12): 1851-1861.
- [8] Abbaszade I, Liu RQ, Yang F, et al. Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family[J]. J Biol Chem, 1999, 274(33): 23443-23450.
- [9] Arai M, Anderson D, Kurdi Y, et al. Effect of adenovirus-mediated overexpression of bovine ADAMTS-4 and human ADAMTS-5 in primary bovine articular chondrocyte pellet culture system[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12(8): 599-613.
- [10] Hui W, Barksby HE, Young DA, et al. Oncostatin M in combination with tumour necrosis factor α induces a chondrocyte membrane associated aggrecanase that is distinct from ADAMTS aggrecanase-1 or -2[J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(11): 1624-1632.
- [11] Wasserman WW, Sandelin A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(4): 276-287.
- [12] Risbud MV, Guttapalli A, Stokes DG, et al. Nucleus pulposus cells express HIF-1 α under normoxic culture conditions: a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(1): 152-159.
- [13] Haro H, Shinomiya K, Murakami S, et al. Up-regulated expression of matrilysin and neutrophil collagenase in human herniated discs[J]. J Spinal Disord, 1999, 12(3): 245-249.
- [14] Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins[J]. Science, 1999, 284(5420): 1664-1666.
- [15] Patel KP, Sandy JD, Akeda K, et al. Aggrecanases and aggrecanase-generated fragments in the human intervertebral disc at early and advanced stages of disc degeneration[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(23): 2596-2603.
- [16] Urban JP. The role of the physicochemical environment in determining disc cell behaviour[J]. Biochem Soc Trans, 2002, 30(Pt 6): 858-864.
- [17] Bartels EM, Fairbank JC, Winlove CP, et al. Oxygen and lactate concentrations measured *in vivo* in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain[J]. Spine (Phila Pa 1976), 1998, 23(1): 1-8.
- [18] Chen S, Fang XQ, Wang Q, et al. PHD/HIF-1 upregulates CA12 to protect against degenerative disc disease: a human sample, *in vitro* and *ex vivo* study[J]. Lab Invest, 2016, 96(5): 561-569.
- [19] Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5[J]. J Clin Invest, 2010, 120(1): 127-141.

(收稿日期: 2017-03-08)

(本文编辑: 于 倩)