

静水压下芹菜素对体外培养人髓核细胞凋亡率及基质代谢的影响[☆]

柳根哲, 陈江, 徐林, 李春根, 孙旗, 乔卫平, 朱志强

Effect of apigenin on apoptotic rate and matrix metabolism of human nucleus pulposus cells cultured *in vitro* under hydrostatic pressure

Liu Gen-zhe, Chen Jiang, Xu Lin, Li Chun-gen, Sun Qi, Qiao Wei-ping, Zhu Zhi-qiang

Abstract

BACKGROUND: Abnormal biomechanical environment and over-expression nitric oxide are the two important factors in the process of intervertebral disc degeneration.

OBJECTIVE: To discuss the effect of apigenin on the apoptotic rate and matrix metabolism of monolayer cultured human nucleus pulposus cells *in vitro* under different hydrostatic pressures.

METHODS: In the hydrostatic pressure loading system, 0.1-3 MPa pressure was imposed on the human nucleus pulposus cells (passage 4) in monolayer culture *in vitro* for 2 hours, while using apigenin and nitric oxide donor to intervene on nucleus pulposus cells, and analyzing the effect of apigenin on the apoptotic rate, matrix metalloproteinase and matrix metabolism of human nucleus pulposus cells under hydrostatic pressure.

RESULTS AND CONCLUSION: Under 0.3 MPa hydrostatic pressure, apigenin could reduce the degradation of extracellular matrix by regulating the balance between matrix metallo proteinases-3 (MMP-3) and human tissue inhibitor of metal protease-1 (TIMP-1), and improving nucleus pulposus cells inhibition status due to the high concentration of nitric oxide. Under 3 MPa hydrostatic pressure, apigenin had a role in reducing the apoptotic rate of nucleus pulposus cells and could alleviate the unbalance between the MMP-3 and TIMP-1. The results showed that apigenin has an influence on the function status and apoptotic rate of nucleus pulposus cells, the balance between MMP-3 and TIMP-1, and the effects are different under different hydrostatic pressure environments.

Department of Orthopaedics, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Liu Gen-zhe[☆], Doctor, Associate professor, Master's supervisor, Department of Orthopaedics, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China liu_genzhe2000@yahoo.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30873274*

Received: 2011-11-21
Accepted: 2011-12-29

Liu GZ, Chen J, Xu L, Li CG, Sun Q, Qiao WP, Zhu ZQ. Effect of apigenin on apoptotic rate and matrix metabolism of human nucleus pulposus cells cultured *in vitro* under hydrostatic pressure. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(9): 1521-1525. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 生物力学环境的异常及一氧化氮过度表达是椎间盘退变进程中重要的影响因素。

目的: 探讨静水压下芹菜素对体外单层培养的人髓核细胞凋亡率及基质代谢的影响。

方法: 在静水压加载系统对体外单层培养的人髓核细胞(传4代)施以0.1~3.0 MPa的静压, 加压2 h, 同时使用芹菜素和一氧化氮供体对髓核细胞进行干预, 分析不同静水压下芹菜素对髓核细胞凋亡率、基质金属蛋白酶及基质表达的影响。

结果与结论: 在0.3 MPa静水压下, 芹菜素能改善由于高浓度一氧化氮引起的髓核细胞功能抑制状态, 降低基质金属蛋白酶3过表达, 恢复基质金属蛋白酶3与其抑制因子1之间的平衡; 而在3 MPa静水压下, 芹菜素能降低一氧化氮引起的髓核细胞高凋亡, 并在一定程度上缓解基质金属蛋白酶3与其抑制因子1之间的不平衡。说明芹菜素能够对髓核细胞的功能状态、凋亡率, 对基质金属蛋白酶3及其抑制因子1平衡产生影响, 而且这种影响在不同的静水压环境下有所不同。

关键词: 静水压; 芹菜素; 髓核细胞; 凋亡率; 基质金属蛋白酶

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.09.001

柳根哲, 陈江, 徐林, 李春根, 孙旗, 乔卫平, 朱志强. 静水压下芹菜素对体外培养人髓核细胞凋亡率及基质代谢的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(9):1521-1525. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

在引起椎间盘退变的诸多因素中, 一氧化氮的作用已引起广泛重视。高浓度的一氧化氮不仅刺激增加基质金属蛋白酶的活性, 增加蛋白聚糖和胶原的裂解^[1], 并且抑制髓核细胞分泌细胞外基质和合成II型胶原, 影响椎间盘的营养交换。研究认为, 基质金属蛋白酶(matrilysin/matrix metalloproteinases, MMP)及其抑制剂金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)失衡是导致椎间盘基质降解的根本原因之一^[2], 而且这种

失衡往往与一氧化氮量的增多存在着一定关系。此外, 一氧化氮还具有很强的细胞毒性^[3], 能够导致髓核细胞的过度凋亡, 使基质的产生量进一步减少, 加速了腰椎间盘的退变进程。因此如何通过调控髓核组织细胞一氧化氮产生量来延缓椎间盘退变成为研究的热点。

芹菜素是一种黄酮类化合物, 具有很强的抗氧化和抗脂质过氧化作用^[4]。它可以显著抑制脂多糖引起的巨噬细胞诱导型一氧化氮合酶高表达, 降低细胞内一氧化氮水平^[5]。本实验在体外构建的静水压加载系统中使用芹菜素对人髓核细胞进行干预研究, 以进一步明确芹菜素在髓核细胞抗凋亡及延缓基质分解等方面的作用。

北京中医药大学
东直门医院骨科,
北京市 100700

柳根哲☆, 男,
1964年生, 黑龙江
省牡丹江市人,
朝鲜族, 2000年
日本国立富山医
药科大学毕业,
博士, 副教授, 硕
士研究生导师, 主
要从事脊柱外科
及脊柱微创技术、
椎间盘的生物力学、
退变与再生的
基础研究。
liu_genzhe2000
@yahoo.com.cn

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:1673-8225
(2012)09-01521-05

收稿日期: 2011-11-21
修回日期: 2011-12-29
(20111121016/D·G)

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2010-06/2011-04在中国中医科学院骨伤科研究所实验室完成。

材料: 人椎间盘髓核细胞(Human Nucleus Pulposus Cells, Cat. No.4800, www.Sciencellonline.com)和专用髓核细胞培养基(Nucleus Pulposus Cell Medium)均由美国ScienCell Research Laboratories提供,使用荧光免疫检验法(纤维连接蛋白及波形蛋白抗体)对细胞表型鉴定。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
细胞凋亡 TUNEL 检测试剂盒、 兔抗 Collagen II 抗体、一抗 Anti- MMP-3、一抗 Anti- TIMP-1	武汉博士德生物工程 有限公司
兔 SP 检测试剂盒	天津市灏洋生物制品 有限公司
芹菜素	南京替斯艾么中药 研究公司
SNAP	NO 供体, 江苏碧云天 生物技术研究所
Ham/F12 培养液培养液、 PBS 细胞爬片	北京百事创新科技 有限公司
智能恒温静水压加载系统	北京世纪森朗实验 仪器有限公司

实验方法:

静水压加载系统的设计原理及主要构成:

主要由压力容器、智能温控装置、气压源、压力显示仪器以及活塞装置、蒸馏水和细胞爬片等构成。将细胞培养基及髓核细胞爬片一同放入压力腔内的注射器中,容器内的压力通过培养基传递至髓核细胞,产生相应大小的静水压作用。实验系统具备稳定的气压源,设计压力范围0~5 MPa,见图1。

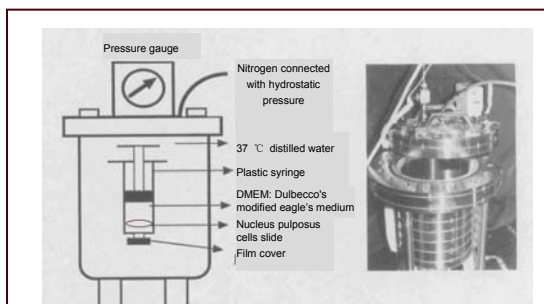


Figure 1 Sketch map of the hydrostatic pressure loading system
图1 静水压装置示意图

髓核细胞的增殖传代、铺片: 将直径为1 cm的细胞玻片包被及灭菌消毒过后,放置于24孔培养板中,将3代髓核细胞消化后铺片于玻片上,细胞铺片密度为5 000 cells/cm²,隔天换液,3~5 d后(细胞融合达80%)进行静水压下芹菜素药物干预研究。

干预药物溶液的制备及浓度: ①芹菜素溶液制备:用1/10 000电子天平称取芹菜素粉末(生产批号:TCM033-090507)0.006 7 g,芹菜素的相对分子质量为270.24,将其溶于4 mL二甲基亚砜中配成浓度为6.25 mmol/L的溶液备用,实验选用芹菜素干预的终浓度为12.5 μmol/L。②S-亚硝基-N-乙酰青霉胺(S-Nitroso-N-acetylpenicillamine, SNAP)一氧化氮供体溶液制备:SNAP为暗红色结晶,相对分子质量298.0,分子式为Na₂[Fe(CN)₅NO]·2H₂O,溶解于水,称取少量SNAP,使用Milli-Q级纯水溶解SNAP,配制成水溶液,分装后-20 °C保存,室温避光保存。实验中选用SNAP干预的终浓度为500 μmol/L。

实验分组: 在本实验中,共设空白组、SNAP组、SNAP+芹菜素组3组,每组均在3种不同的静水压,0.1, 0.3, 3 MPa下进行实验,持续作用时间为2 h,检测不同静水压下各药物组对于髓核细胞凋亡率、MMP-3及TIMP-1以及II型胶原表达的影响。

髓核细胞凋亡率检测方法: 采用细胞凋亡TUNEL检测试剂盒,操作步骤:①细胞玻片先用多聚赖氨酸进行处理,用40 g/L的多聚甲醛/0.01 mmol/L PBS(pH值7.0~7.6)室温下固定30~60 min。0.01 mmol/L PBS洗2 min×2次。蒸馏水洗涤2 min×2次。②新鲜配制体积分数3% H₂O₂,室温处理10 min。蒸馏水洗涤2 min×3次。③标本片加0.01 mmol/L TBS 1:200新鲜稀释 Proteinase K 37 °C消化30 s, 0.01 mmol/L TBS洗2 min×3次。④标本片加标记缓冲液(Labeling Buffer)20 μL/片,以保持玻片湿润。按每张玻片取TdT和DIG-d-UTP各1 μL,加入18 μL标记缓冲液中,混匀。甩去玻片上多余液体后加标记液,20 μL/片。置样品于湿盒中,37 °C标记2 h。⑤0.01 mmol/L TBS洗2 min×3次。⑥加封闭液50 μL/片,室温30 min,甩掉封闭液,不洗。⑦用抗体稀释液1:100稀释生物素化抗地高辛抗体:(取1 mL抗体稀释液加生物素化抗地高辛抗体10 μL),混匀后50 μL/片加至标本片上。置样品于湿盒中,37 °C反应30 min。0.01 mmol/L TBS洗2 min×3次。⑧用

抗体稀释液1:100稀释SABC:取1 mL抗体稀释液加SABC 10 μ L,混匀后50 μ L/片加至切片,37 $^{\circ}$ C反应30 min,0.01 mmol/L TBS洗5 min \times 4次。⑨DAB显色:取1 mL蒸馏水,分别加入DAB试剂盒中A,B,C试剂各一滴,混匀后加至标本片上,显色10~30 min。水洗。⑩苏木精轻度复染。0.01 mmol/L TBS洗,蒸馏水洗。脱水,透明,封固。用显微镜观察。TUNEL染色显示凋亡髓核细胞细胞核呈棕黄染色,非凋亡细胞细胞核呈蓝染。TUNEL染色阳性细胞率计算方法:每组取8张玻片,每张玻片计数不少于200个细胞,阳性细胞率=阳性细胞数/总细胞数 \times 100%。

免疫组织化学染色法检测MMP-3、TIMP-1、II型胶原表达情况:SP-9001 Rabbit HistostainTM-Plus Kits,具体步骤:①体积分数3% H_2O_2 去离子水孵育5~10 min,以消除内源性过氧化物酶活性。②蒸馏水冲洗,PBS浸泡5 min。③滴加封闭用正常山羊血清工作液,室温孵育10~15 min,倾去,勿洗。④滴加适当比例的一抗(一抗Anti-MMP-3浓度为1:40;一抗Anti-TIMP-1浓度为1:50,一抗Anti-Col II浓度为1:10),4 $^{\circ}$ C过夜。⑤PBS冲洗,3 min \times 3次。⑥滴加生物素化二抗工作液(IgG/Bio)-生物素标记山羊抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C孵育10~15 min。⑦PBS冲洗,3 min \times 3次。⑧滴加辣根酶标记链霉素卵白素工作液(S-A/HRP),37 $^{\circ}$ C孵育10~15 min;⑨PBS冲洗,3 min \times 3次。⑩显色剂显色,自来水充分冲洗。将染色玻片通过奥林巴斯BX51显微镜行图像拍照及软件处理后,运用ImagePro Plus 6.0图像分析软件对染色图像进行平均吸光度值分析,每张玻片随机选取不重叠的4个视野进行拍照。根据图像中提取的阳性信号计算吸光度值,阳性染色越强,对应的吸光度值越大,表明目标蛋白合成越旺盛。所有图像拍照均在同一曝光时间及白平衡值下进行。计算同一实验组玻片各照片的平均值及标准差,最后用统计学软件对各实验组的平均吸光度值进行分析。

统计学分析:由第一作者将全部有效数据采excel 2007工作表建立数据库,采用统计软件SPSS 13.0进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组内比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示两组之间比较差异有显著性意义。

2 结果

2.1 静水压下各实验组髓核细胞凋亡率检测结果
0.3 MPa静水压下空白组髓核细胞凋亡率明显低于3 MPa静水压下髓核细胞的凋亡率,差异有显著性意义($P < 0.05$);0.3 MPa静水压下3个实验组间髓核细胞凋亡率差异无显著性意义($P > 0.05$);3 MPa静水压下SNAP+芹菜素组髓核细胞凋亡率明显低于SNAP组,差异有显著性意义($P < 0.01$),见表1。

表1 髓核细胞凋亡率检测结果

Table 1 Apoptotic rate in human nucleus pulposus cells ($\bar{x}\pm s$, $n=8$, %)

Pressure	Blank group	SNAP group	SNAP+apigenin group
Under 0.1 MPa	9.10 \pm 0.48	10.15 \pm 1.14	9.62 \pm 1.23
Under 0.3 MPa	10.34 \pm 1.04	12.10 \pm 1.13	11.24 \pm 1.08
Under 3 MPa	23.47 \pm 1.22 ^a	48.10 \pm 1.12	30.28 \pm 2.20 ^b

SNAP: S-Nitroso-N-acetylpenicillamine; ^a $P < 0.05$, vs. blank group under 0.3 MPa; ^b $P < 0.01$, vs. SNAP group

2.2 静水压下各实验组髓核细胞II型胶原表达情况
0.3 MPa静水压下空白组II型胶原产生量明显多于3 MPa静水压下空白组,差异有显著性意义($P < 0.01$);0.3 MPa静水压下,SNAP+芹菜素组II型胶原产生量明显多于SNAP组,差异有显著性意义($P < 0.05$);3 MPa静水压下,SNAP+芹菜素组II型胶原产生量与SNAP组比较,差异无显著性意义($P > 0.05$)。II型胶原在0.3 MPa下SNAP+芹菜素组表达最旺盛,在3 MPa下SNAP组表达最少,见表2,图2。

表2 各组髓核细胞II型胶原表达情况

Table 2 Expression of collagen-II in nucleus pulposus cells in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=8$, A)

Pressure	Blank group	SNAP group	SNAP+apigenin group
Under 0.1 MPa	0.82 \pm 0.25	0.78 \pm 0.12	0.80 \pm 0.73
Under 0.3 MPa	0.93 \pm 0.19	0.75 \pm 0.26	0.89 \pm 0.32 ^b
Under 3 MPa	0.55 \pm 0.12 ^a	0.43 \pm 0.22	0.46 \pm 0.17

SNAP: S-Nitroso-N-acetylpenicillamin; ^a $P < 0.01$, vs. blank group under 0.3 MPa; ^b $P < 0.05$, vs. SNAP group

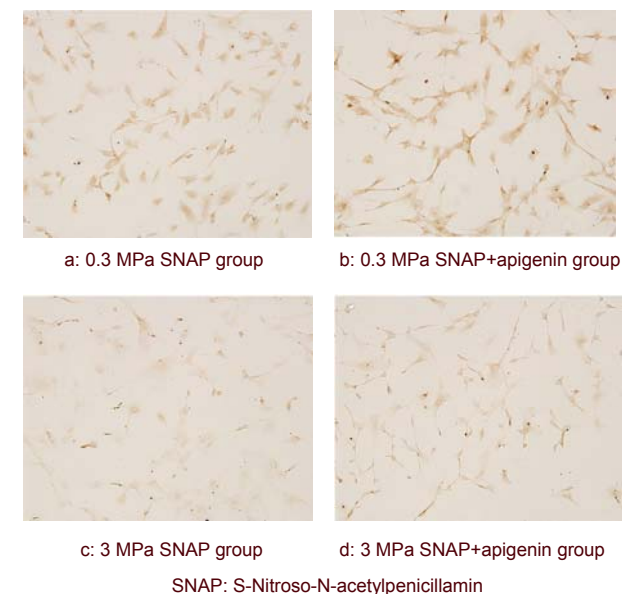


Figure 2 Immunohistochemical staining of collagen-II in nucleus pulposus cells ($\times 100$)

图2 髓核细胞II型胶原免疫组织化学染色情况($\times 100$)

2.3 静水压下各实验组髓核细胞MMP-3及TIMP-1表

达情况 MMP-3在3MPa下SNAP组表达最为明显, 在0.3 MPa下SNAP+芹菜素组表达最少, 见图3; TIMP-1在0.3 MPa下SNAP+芹菜素组表达相对较多, 在3 MPa下SNAP组表达最少, 见图4。

下SNAP+芹菜素组MMP-3产生量明显少于SNAP组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。同时, 0.3 MPa静水压下SNAP组及3 MPa静水压下3个实验组MMP-3产生量均大于同条件下TIMP-1产生量, 见表3。

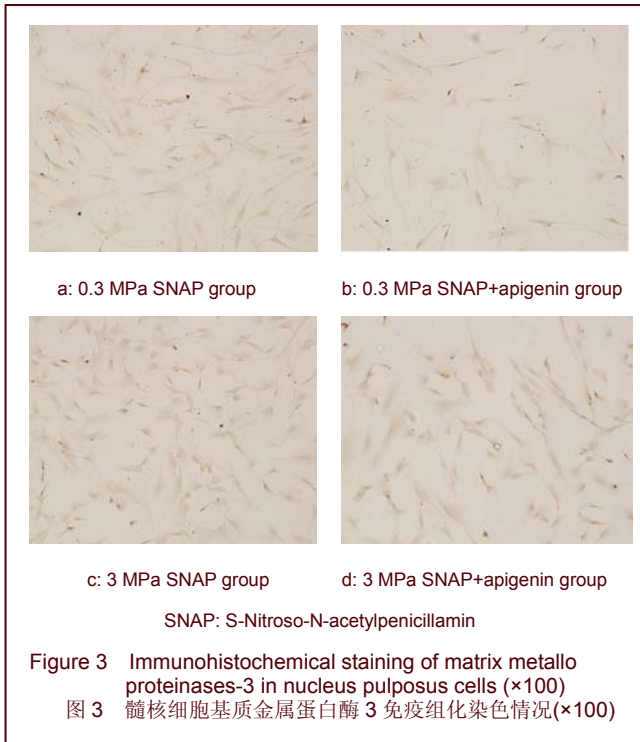


表3 各组髓核细胞基质金属蛋白酶3及基质金属蛋白酶组织抑制因子1表达情况
Table 3 Expression of matrix metallo proteinases-3 (MMP-3) and tissue inhibitor of metal protease-1 (TIMP-1) in nucleus pulposus cells of each group ($\bar{x} \pm s, A$)

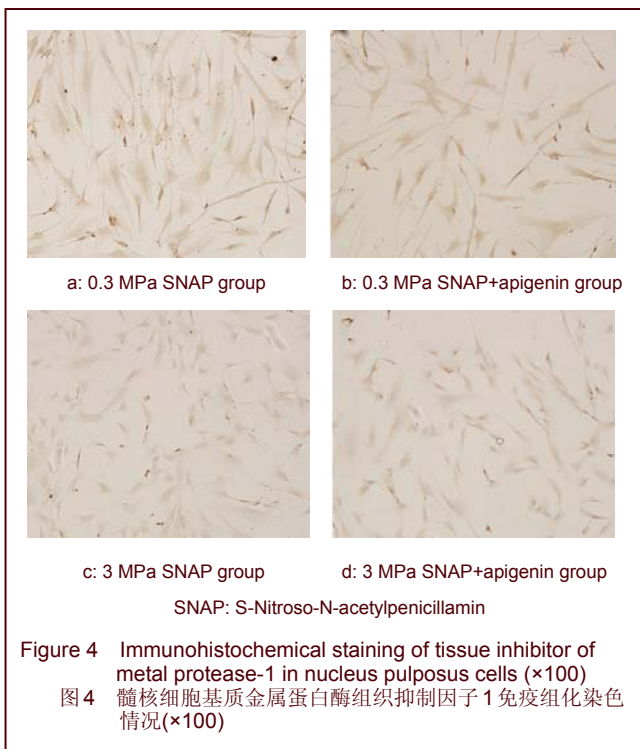
Group	MMP-3	TIMP-1
Under 0.1 MPa		
Blank	0.62±0.09	0.75±0.05
SNAP	0.69±0.07	0.70±0.02
SNAP+apigenin	0.66±0.05	0.73±0.03
Under 0.3 MPa		
Blank	0.55±0.04	0.78±0.03
SNAP	0.78±0.02	0.72±0.04
SNAP+apigenin	0.63±0.05 ^b	0.75±0.03
Under 3 MPa		
Blank	0.81±0.09 ^a	0.77±0.06
SNAP	0.94±0.06	0.71±0.03
SNAP+apigenin	0.83±0.03 ^b	0.74±0.02

SNAP: S-Nitroso-N-acetylpenicillamin; ^a $P < 0.05$, vs. blank group under 0.3 MPa; ^b $P < 0.05$, vs. SNAP group

3 讨论

椎间盘退变进程中组织细胞有规律地减少, 髓核结构大小也发生很大变化, 其中功能性细胞数量的减少更为明显, 即便是存活细胞, 其生理活性亦明显降低^[6-7]。椎间盘活性细胞减少及随之而来的细胞外基质合成减少和成分改变是导致退变的病理基础, 而椎间盘细胞过度凋亡是导致椎间盘细胞减少的直接原因^[8-9]。Ha等^[10]研究发现, 椎间盘脱出患者椎间盘细胞凋亡率达74.3%, 椎间盘突出者为42.8%, 而正常对照组仅为28%。引起髓核细胞凋亡的因素有很多, 其中一氧化氮是关键因素之一。一氧化氮具有很强的细胞毒性, 高浓度的一氧化氮能够直接造成髓核细胞的损伤甚至是凋亡。其引起细胞损伤的途径主要有两方面: 其一, 高浓度的一氧化氮能抑制多种与线粒体电荷传递系统及柠檬酸循环有关的酶, 通过与酶的硫铁中心结合, 导致细胞铁减少而抑制线粒体呼吸, 引起细胞损伤。其二, 一氧化氮与超氧化阴离子 O_2^- 反应生成过氧化亚硝基阴离子 $ONOO^-$ 。ONOO⁻在退变髓核组织的酸性环境下能迅速分解为具有很强毒性作用的OH⁻和NO₂自由基, 这两种自由基的氧化性都非常强, 具有很强的细胞毒性, 从而造成组织细胞损伤^[11-12]。退变椎间盘的酸性环境有利于一氧化氮发挥很强的细胞毒性, 从而促进了腰椎间盘的退变过程。

基质合成与降解的失衡会导致基质成分的紊乱, 进而引起椎间盘功能减退, 造成椎间盘组织退变。MMPs是细胞外基质的降解酶, 近年来对金属蛋白酶的研究越



3 MPa下空白组MMP-3的产生量明显高于0.3 MPa静水压下空白组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 0.3MPa静水压下SNAP+芹菜素组MMP-3产生量明显少于SNAP组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 3 MPa静水压

来越受到重视,在椎间盘退变过程中金属蛋白酶及其抑制剂所起的作用也得到学者们的广泛关注。**MMP-3**是最重要的基质金属蛋白酶之一,具有强大的分解基质的功能,主要通过改变椎间盘基质内蛋白多糖、胶原、和弹性蛋白等生物大分子的结构、功能及含量,从而在椎间盘退变中起重要作用。除了其直接作用外,更重要的是**MMP-3**还可以激活其它潜在的各类**MMPs**,形成瀑布效应,从而加速退变过程^[13]。**TIMP-1**是**MMP-3**的特异性抑制因子,它可以特异性地与**MMP-3**催化中心的锌离子结合,从而封闭其催化活性,使有活性的**MMP-3**失活,或避免无活性的**MMP-3**激活。

本实验结果表明,体外单层培养的人髓核细胞在**0.3 MPa**的静水压环境下时,髓核细胞增殖旺盛,细胞功能状态较好,II型胶原的合成旺盛。当加入一氧化氮供体**SNAP**后,细胞迅速代谢产生大量一氧化氮,使得一氧化氮浓度迅速上升,髓核细胞受到相应的刺激后表现出功能性抑制,II型胶原合成量明显下降。同时,金属蛋白酶**MMP-3**的表达被进一步激活,**MMP-3**的产生量明显上升,使得**MMP-3**与**TIMP-1**之间的平衡被打破,过多的**MMP-3**作用于基质底物,使基质分解作用大于合成。添加芹菜素干预以后,髓核细胞II型胶原的表达较**SNAP**组明显增多,同时**MMP-3**的产生量相对减少,而髓核细胞凋亡率在各组之间的未表现出明显的差异。这说明在该压力环境下髓核细胞的功能状态较好,受一氧化氮刺激后主要表现为功能状态的抑制,对于一氧化氮产生的细胞毒性表现出一定的耐受性,当给予芹菜素以后,髓核细胞功能的抑制状态得到了一定程度的恢复,而**MMP-3**的产生量也随之下降,使**MMP-3**与**TIMP-1**之间的平衡逐渐趋于正常,从而避免基质的过度分解。

相比而言,当单层培养的人髓核细胞置于**3MPa**的静水压环境下时,髓核细胞增殖能力及功能状态较弱,II型胶原的合成明显受到抑制。**MMP-3**与**TIMP-1**呈现出不平衡表达,**MMP-3**产生量较多,基质代谢以分解为主。加入一氧化氮供体**SNAP**后,该组髓核细胞凋亡率显著高于空白组,说明在高静水压下,髓核细胞本身状态较弱,其抵抗一氧化氮细胞毒性的能力大大降低,致使细胞凋亡率的显著增加。空白组金属蛋白酶**MMP-3**的产生量明显多于**TIMP-1**的产生量,说明**MMP-3**在**3MPa**的静水压环境下处于高表达状态,继而受到一氧化氮刺激以后,**MMP-3**的表达被过度激活放大,引起了**MMP-3**与**TIMP-1**之间的严重失衡。当添加芹菜素干预以后,实验结果显示髓核细胞凋亡率及**MMP-3**产生量相比**SNAP**组有一定程度下降,这说明**3MPa**的静水压环境下,芹菜素能够阻止因为一氧化氮过量表达引起的髓核细胞过度凋亡,并能在一定程度上抑制**MMP-3**的过度激活表达。两组之间II型胶原产生量无明显差异,这可能

与该环境下髓核细胞处于功能抑制状态,II型胶原其基础表达量就较少有关。总之,在高静水压环境下芹菜素能抑制一氧化氮的毒性,减少椎间盘髓核细胞的凋亡,同时能够降低**MMP-3**的高表达水平,减速对基质的分解,延缓胞外基质成分寿命。

总之,本实验通过静水压环境下芹菜素对髓核细胞干预作用研究,同时对髓核细胞的凋亡率及基质代谢情况进行了检测观察对比,以进一步明确类一氧化氮**S**抑制剂芹菜素作为延缓椎间盘退变药物的可行性。

4 参考文献

- [1] Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *curr opin Rheumatol*. 1998; 10:263-268.
- [2] Razaq S, Wilkins RJ, Urban JP. The effect of extracellular pH on matrix turnover by cells of the bovine nucleus pulposus. *Eur Spine J*. 2003;12(4):341-349.
- [3] Kaur H, Halliwell B. Evidence for Nitric oxide-mediated Oxidative damage in chronic inflammation. *FEBS Lett*. 1994;50:9-12.
- [4] Sui HX. Guowai Yixue Weisheng Fence. 2008;35(2):105. 隋海霞. 芹菜素的生物学作用[J]. 国外医学卫生学分册, 2008, 35(2): 105.
- [5] Matsuda H. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide Production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorg Med Chem*. 2003;11(9):7.
- [6] Häuselmann HJ, Opliger L, Michel BA, et al. Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. *FEBS Lett*. 1994;352: 361-364.
- [7] Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine*. 1996;21:271-277.
- [8] Liu GZ, Ishihara H, Osada R, et al. Nitric oxide mediates the change of proteoglycan synthesis in the human lumbar intervertebral disc in response to hydrostatic pressure. *Spine*. 2001;26(2):134-141.
- [9] Li XC, FQ. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2005;9(6):82. 李小川,付勤. 一氧化氮酶抑制剂对退行性变腰椎间盘基质代谢的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(6):82.
- [10] Ha KY, Koh IJ, Kirpalani PA, et al. The expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and apoptosis in herniated discs. *Spine*. 2006;31(12):1309-1313.
- [11] Kaur H, Halliwell B. Evidence for Nitric oxide-mediated Oxidative damage in chronic inflammation. *FEBS Lett*. 1994;350: 9-12.
- [12] Schmidf HH, Walter U. No at work. *Cell*. 1995;78:919-921.
- [13] Long HQ, Chen XL, Hu YG. Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi. 2000; 7(4):384-386. 龙厚清,陈晓亮,胡有谷. 基质金属蛋白酶与腰椎间盘退变的关系[J]. 中国矫形外科杂志, 2000, 7(4):384-386.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 课题接受了国家自然科学基金资助(30873274)。

作者贡献: 设计、实施和资料收集为第一、二作者,评估为全部作者,均受过专业培训,未使用盲法评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。伦理要求:未涉及伦理道德相关内容。

本文创新性: 使用芹菜素及静水压系统对人髓核细胞在体外培养条件下进行综合干预,观察芹菜素在不同的静水压环境下对人髓核细胞及细胞外基质代谢的影响,探讨芹菜素用于延缓椎间盘退变的可行性,并揭示部分作用机制。