

1-磷酸鞘氨醇受体在不同退变程度髓核组织中的表达变化

杨 匡, 李海音, 张 伟, 路 康, 周 跃, 李长青

(第三军医大学附属新桥医院骨科 400037 重庆市)

【摘要】目的:比较不同退变程度人椎间盘髓核组织中 3 种 1-磷酸鞘氨醇受体(S1PR1/2/3)表达水平的差异,探讨椎间盘中 S1PR 表达水平与椎间盘退变的关系。**方法:**收集腰椎间盘退行性病变患者手术切除的椎间盘组织,其中轻度退变(Pfirrmann 分级Ⅳ级)22 例,严重退变(Pfirrmann 分级Ⅴ级)14 例;同时取 6 例无椎间盘退变患者(单纯腰椎椎体骨折,Pfirrmann 分级Ⅱ级)手术切除的椎间盘组织作为对照组;通过 HE 染色以及 Saf-O 染色观察不同退变程度椎间盘的组织学变化,免疫组化检测不同退变程度组织中的 S1PR 表达水平;Ⅱ型胶原酶消化分离提取原代髓核细胞,通过 Real-time PCR、Western-blot 检测不同退变程度椎间盘髓核细胞中 S1PR 的表达水平,并通过细胞免疫化学方法对 S1PR 进行定位。**结果:**HE 染色及 Saf-O 染色结果显示退变椎间盘的纤维环出现破损,髓核细胞形成明显的集落,细胞外基质减少。免疫组化结果显示正常和轻度退变的髓核组织中 3 种受体(S1PR1/2/3)都有表达,严重退变的组织中表达极弱;Real-time PCR 结果显示对照组髓核细胞中 S1PR1/2/3 的 mRNA 表达水平分别是严重退变组的 5.34±0.52 倍、7.25±0.04 倍、1.92±0.06 倍,轻度退变组 S1PR1/2/3 的 mRNA 表达水平分别是严重退变组的 4.35±2.45 倍、4.96±3.44 倍、2.19±0.82 倍;Western-blot 发现对照组和轻度退变组髓核细胞中 S1PR1/2/3 均有表达,严重退变组表达水平较低;免疫细胞化学显示 S1PR 主要集中在髓核细胞的细胞质和细胞膜上。**结论:**髓核组织中主要表达 S1PR1/2/3,在严重退变的髓核组织和细胞中其表达水平明显下降,S1P 及其受体可能参与椎间盘髓核组织的退变过程。

【关键词】椎间盘退变;1-磷酸鞘氨醇受体;髓核细胞

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.12.06

中图分类号:R681.5,R363.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2015)-12-1083-07

Expression of sphingosine 1-phosphate receptors in degenerative nucleus pulposus with different degrees/YANG Kuang, LI Haiyin, ZHANG Wei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(12): 1083-1089

【Abstract】Objectives: To compare the expression of sphingosine 1-phosphate receptors(S1PRs) in degenerative nucleus pulposus with different degrees, and to analyze the relationship between the expression level and the degeneration. **Methods:** 22 mild degenerative intervertebral discs(Pfirrmann grade Ⅳ) and 14 advanced degenerative(Pfirrmann grade Ⅴ) discs were collected as samples, 6 normal samples(Pfirrmann grade Ⅱ, simple vertebral fracture) were used as controls. HE staining and Saf-O staining was used to show the histological changes of degeneration. The expression of S1PRs was detected by immunohistochemical method. Primary nucleus pulposus cells was obtained by collagenase Ⅱ digestion. Real-time PCR and Western-blot were used to assess the S1PRs in the nucleus pulposus cells. The cytochemistry was used to evaluate the location of S1PRs in nucleus pulposus cells. **Results:** HE and Saf-O staining showed intervertebral disk with advanced degeneration: fracture appeared in annulus fibrosus, cells bind together into clones in nucleus pulposus and extracellular matrix. The immunohistochemical result showed that normal and mild degenerated nucleus pulposus expressed S1PR1/2/3, almost not in the advanced degenerated cells. The real-time PCR showed that the expression of S1PR decreases in advanced degenerated nucleus pulposus(the normal to the advanced degener-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81572208)

第一作者简介:男(1989-),硕士研究生在读,研究方向:椎间盘退变与修复

电话:(023)68774328 E-mail:yangkuang.good@163.com

通讯作者:李长青 E-mail:changqli@163.com

ated was 5.34 ± 0.52 -fold, 7.25 ± 0.04 -fold, 1.92 ± 0.06 -fold, the mild degenerated to the advanced was 4.35 ± 2.45 -fold, 4.96 ± 3.44 -fold, 2.19 ± 0.82 -fold). Western-blot result showed that NP cells from control and mild degeneration expressed S1PR1/2/3, while much weak in the advanced degenerated NP cells. The cytochemistry showed that S1PRs focused in the membranes and cytoplasm of cells. **Conclusions:** The intervertebral disc mainly expresses S1PR1/2/3, and the expression decreases in the advanced degenerative nucleus pulposus. The S1P and its receptor may play a role in the degeneration of intervertebral disc.

[Key words] Intervertebral disk degeneration; Sphingosine 1-phosphate receptors; Nucleus pulposus cells

[Author's address] Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China

椎间盘退变是引起慢性腰疼的主要原因^[1],目前其确切的机制还不完全清楚,老化、损伤、异常的力学刺激等多种因素都参与退变的发生和进展,最终引起复杂的病理生理变化^[2]。1-磷酸鞘氨醇(S1P)是鞘磷脂代谢过程中产生的脂质介质,可以影响细胞的多种功能,包括细胞的凋亡、迁移、分化、炎症反应、血管生成等^[3]。S1P通过与其G蛋白偶联受体(S1PR)结合发挥作用,该受体有5种亚型,在不同的组织中受体类型和表达水平的差异可以引起不同的细胞效应。文献报道^[4]随着软骨组织退变的加重(OARSI组织评分标准),软骨细胞中S1PR2/S1PR1的比例降低,S1P可以通过S1PR2抑制IL-1 β 引起的软骨细胞炎症反应,降低一氧化氮合酶(iNOS)和金属基质降解酶-13(MMP-13)的表达。髓核细胞与软骨细胞具有相似的细胞外基质成分和生物学特性^[5],S1P在软骨细胞中的作用使其在椎间盘退变的治疗和控制中表现出一定的应用前景。纤维环的破损是椎间盘退变的重要病理表现,这会导致髓核组织失去保护,破坏了其特殊的免疫豁免内环境^[6];另一方面随着退变的进展,髓核组织中出现血管神经组织生长渗透^[7],可能直接接触到血浆或脑脊液成分,而S1P广泛存在于这些体液中,但S1P在椎间盘退变中的作用目前还没有相关的研究。本研究旨在观察S1P受体(S1PR)在退变髓核组织中的表达,并分析其与椎间盘退变的相关性;探讨S1P相关信号在椎间盘退变中的功能,为椎间盘退变的控制和药物治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究获得新桥医院伦理审查委员会批准和患者知情同意。排除并发感染、肿瘤、免疫性疾病或者内分泌疾病的病例。由2位医生各自根据标

准腰椎矢状位MRI T2像对椎间盘进行Priffmann分级(I~V级),并达成一致结论。轻度退变组(Priffmann分级IV级)标本22例,来源于22例椎间盘突出症患者,男10例,女12例,年龄 55.0 ± 5.5 岁;严重退变组(Priffmann分级V级)标本14例,来源于14例腰椎间盘突出症患者,男7例,女9例,年龄 56.5 ± 5.4 岁。轻度退变组和严重退变组患者的年龄和性别比例无显著性差异。对照组来源于6例腰椎椎体骨折患者,男4例,女2例,年龄18~30岁,既往无慢性腰痛病史。手术中获取的椎间盘组织标本分为2份,一份用于组织学检查,一份用于细胞的分离培养及后续实验。

1.2 组织学检查

将手术中获取的椎间盘组织标本用PBS溶液清洗,4%多聚甲醛固定24h,石蜡包埋固定,制备厚度5 μ m的组织切片。脱蜡至水,进行常规HE染色和Saf-O染色。显微镜下观察不同退变程度(对照组Priffmann分级II级、轻度退变组Priffmann分级IV级、严重退变组Priffmann分级V级)的椎间盘组织学特点。

1.3 免疫组织化学检查

椎间盘组织石蜡切片脱蜡至水,采用常规SABC法进行染色,具体如下:3% H_2O_2 室温下5~10min,蒸馏水洗3次,用高压热修复法进行抗原修复;用山羊血清封闭,室温封闭20min;I抗(S1PR1,sc-48356;S1PR2,sc-25491;S1PR3,sc-30024;SANTA CRUZ,滴度均为1:50)4 $^{\circ}$ C孵育过夜;生物素II抗和SABC试剂先后于37 $^{\circ}$ C处理20min;DAB显色;苏木素复染2min,树胶封片,显微镜下观察拍照。

1.4 髓核细胞的分离和培养

椎间盘组织标本在解剖显微镜下用眼科镊挑拣胶冻状的髓核组织,尽量剔除纤维环和软骨终板;经过0.5%II型胶原酶(Sigma-Aldrich)消化

12h;加入等量培养基(10%胎牛血清、DMEM/F12 培养基、100u/ml 青-链霉素)终止消化,收集细胞悬液通过 40 μ m 细胞滤器过滤,1200r/min 离心 6.5min,弃上清重悬,将细胞悬液收集至细胞培养瓶,于 37℃、5%CO₂、95%湿度条件的孵箱中培养,倒置相差显微镜下观察生长情况,1 周换 2 次培养基。细胞一般贴壁需 3d 时间,达 70%融合度时 1:2 传代(一般 10~14d)。选取 P0~P2 细胞进行后续细胞学实验。

1.5 Real-time PCR 检测

选取 31 例(对照组 3 例,轻度退变组 18 例,严重退变组 10 例)标本分离培养的 P1 髓核细胞,常规 TRIZOL 法提取髓核细胞 RNA,参照反转录试剂盒(Prime Script™ reagent Kit TAKARA code NO R0037A)说明书进行 cDNA 的合成,Linegene9600 仪器进行 Real-time PCR 实验,引物序列见表 1。髓核细胞中 S1PR 的定量以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 算法得到各样品中 S1PR 的相对值。

1.6 细胞免疫化学检查

将 1 例轻度退变标本中获取的 P0 髓核细胞接种于 6 孔板,在 6 孔板中放入盖玻片,制备细胞爬片。待细胞生长贴附于盖玻片上,状态稳定后,用 4%多聚甲醛固定,用高压热修复法进行抗原修复;用脱脂牛奶室温封闭 20min;I 抗(S1PR1, sc -48356;S1PR2, sc -25491;S1PR3, sc -30024, SANTA CRUZ,滴度均为 1:50)4℃孵育过夜;孵育 II 抗, DAB 显色;苏木素复染 2min,树胶封片。显微镜下观察拍照。

1.7 Western-blot 检测

选取 11 例(对照组 3 例,轻度退变组 4 例,严重退变组 4 例)标本分离培养的 P2 髓核细胞,应用组织裂解液提取髓核细胞总蛋白,BCA 法测定提取液蛋白浓度。取总蛋白 20 μ g,经 10%十二烷

基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离后转移至硝酸纤维膜上,用 5%脱脂牛奶封闭 2h, I 抗(S1PR1, sc -48356;S1PR2, sc -25491; S1PR3, sc -30024, SANTA CRUZ, 滴度均为 1:500)4℃孵育过夜, II 抗室温孵育 2h,显色拍照。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。Real-time PCR 的结果采用完全随机设计资料单因素方差分析(One-way ANOVA)比较不同退变程度的髓核细胞中 S1PR mRNA 水平,并用 SNK 法进行两两比较,各组数据均表示为平均数 $\pm$ 标准差, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组椎间盘的组织学特点

对照组椎间盘组织纤维环平行规律排列,无明显的裂痕,可见细胞核细长的梭形成纤维细胞,髓核组织均质淡染,含丰富的细胞基质,小空泡或梭形的细胞均匀散在分布,无明显的软骨结节;轻度退变的椎间盘组织纤维环区域胶原排列略微不规则,有细小的破裂,开始出现炎症细胞浸润,髓核组织中出现小的软骨结节;严重退变的椎间盘组织纤维环区域胶原排列不规则,有明显的缺损和炎症细胞浸润,髓核区域出现较大的软骨结节,伴有一定程度的纤维化(图 1)。针对髓核区域细胞外基质的 Saf-O 染色结果显示:对照组大部分为深染的红色,表明该组织中富含蛋白聚糖成分,而退变的组织中细胞外基质染红的程度与对照组相比较弱,说明胞外基质中蛋白聚糖含量下降,严重退变的髓核组织只有形成软骨结节的部分染红,而结节以外的区域染色不明显(图 2)。

2.2 三组髓核组织中 S1PR 的表达

对照组髓核细胞呈细小的空泡或梭形, S1PR1/2/3 免疫组化染色呈阳性,主要定位在细胞内,在细胞外基质中几乎没有表达;在轻度退变的髓核组织中,髓核细胞呈散在的小集落, S1PR 的分布与对照组基本相同,集中在细胞内, S1PR2/3 阳性表达, S1PR1 表达呈弱阳性。在严重退变的髓核组织中,细胞聚集形成明显的结节,3 种 S1PR 几乎都呈阴性(图 3)。

2.3 三组髓核细胞中 S1PR 的表达水平及其在细胞中的定位

三组髓核细胞 S1PR 的 mRNA 表达见表 2。

表 1 1-磷酸鞘氨醇受体(S1PRs)的引物序列

Table 1 Primer sequences for S1PRs

目的基因 Gene	引物序列 Primer Sequences
S1PR1	正向 Forward TATCAGCGCGGACAAGGAGAACAG 反向 Reverse ATAGGCAGGCCACCCAGGATGAG
S1PR2	正向 Forward CATCGTGCTAGCCGCTCTTA 反向 Reverse GGCATAGTCCAGAAGGAGGA
S1PR3	正向 Forward CTGCCGTGCACAATCTCCCTGACTG 反向 Reverse GGCCCGCCGCATCTCCT
GADPH	正向 Forward TGGTATCCTGGAAGGACTCA 反向 Reverse CCAGTAGAGGCAGGGATGAT

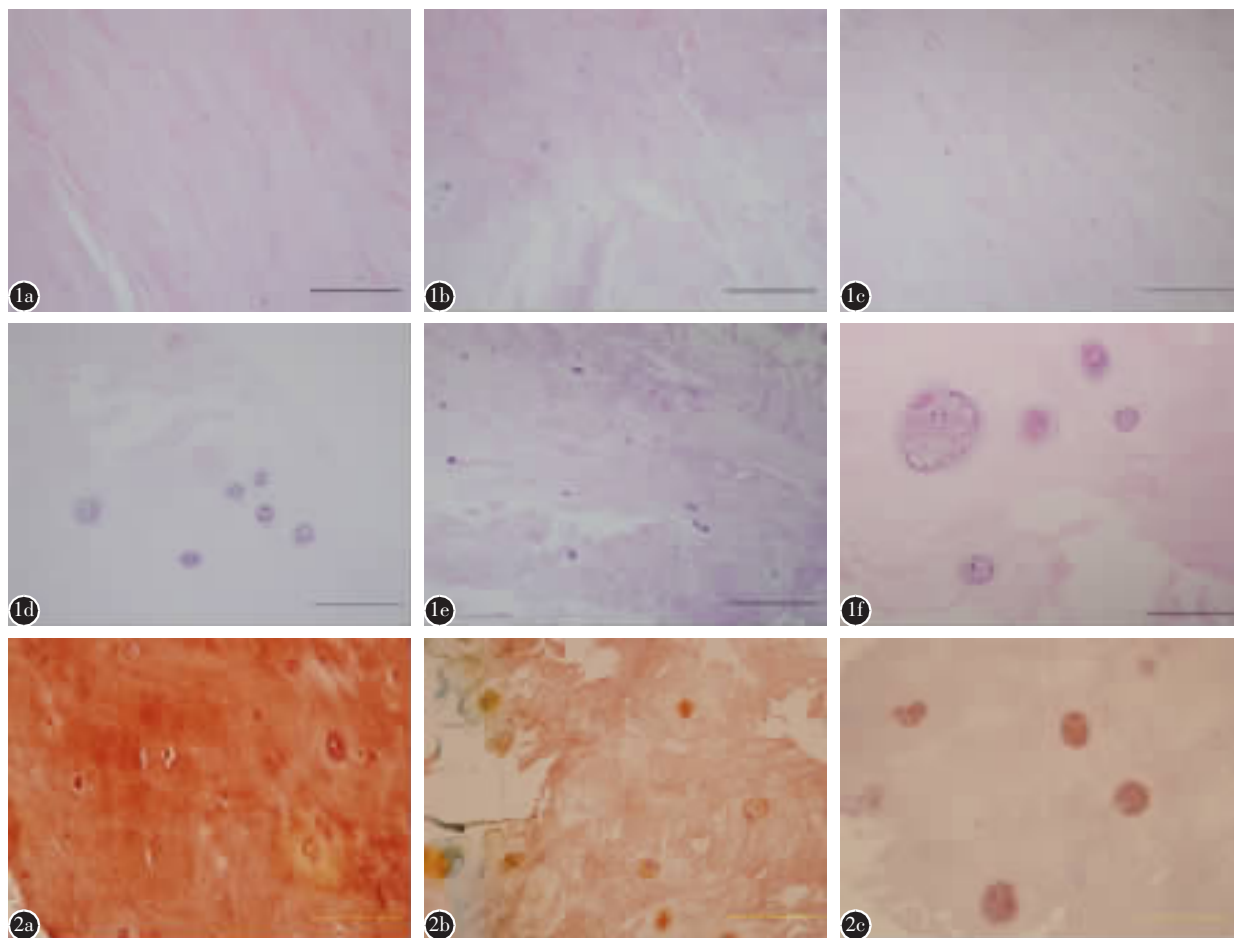


图 1 椎间盘组织 HE 染色结果 **a** 对照组椎间盘纤维环胶原纤维致密排列 **b** 对照组椎间盘髓核细胞外基质丰富 **c** 轻度退变椎间盘纤维环出现细小裂缝 **d** 轻度退变椎间盘髓核散在的小的细胞结节 **e** 重度退变椎间盘纤维环出现明显的裂缝和炎症浸润 **f** 重度退变椎间盘髓核出现大的细胞结节,细胞外基质少(标尺 100 μ m) **图 2** 髓核组织 Saf-O 染色结果 **a** 正常髓核均匀染红 **b** 轻度退变髓核染色较弱 **c** 严重退变髓核只在细胞结节区域染红,细胞外染色不明显(标尺 100 μ m)

Figure 1 HE staining of the intervertebral disk **a** normal annulus fibrosus(AF) arranges fine and close **b** normal Nucleus pulposus (NP) with abundant extracellular matrix **c** tiny fracture in mild degenerated AF **d** small-size clones in mild degenerated NP **e** more fracture and inflammation infiltration in advanced degenerated AF **f** huge clones in advanced degenerated NP(Bar 100 μ m) **Figure 2** Saf-O staining of Nucleus pulposus **a** normal tissue stained red evenly **b** mild degenerated less stained red **c** advanced degenerated stained red mainly in the huge clones(Bar 100 μ m)

轻度退变组与对照组髓核细胞中 S1PR1/2/3 的 mRNA 表达差异无显著性,严重退变组髓核细胞中 S1PR1、S1PR2 的 mRNA 表达显著性低于对照组和轻度退变组 ($P<0.05$);S1PR3 的变化趋势与前者一致,但是差异无统计学意义($P=0.06$)。

三组髓核细胞中 S1PR 蛋白水平的表达变化见图 4,变化趋势与 PCR 结果一致,即对照组和轻度退变组髓核细胞中 S1PR1/2/3 都有表达,两组差异不大;严重退变组髓核细胞中 S1PR 的水平明显低于前两组。

免疫细胞化学检查发现髓核细胞主要表达 S1PR2/3,S1PR1 表达强度较弱,3 种受体都集中在细胞膜上和细胞内(图 5)。

3 讨论

髓核细胞外基质是椎间盘结构和功能的基础,健康髓核基质的主要成分是 II 型胶原和蛋白聚糖,基质的减少和成分的改变会导致椎间盘组织生物力学特性的改变,引起广泛的椎间盘退行性变^[8]。在退变的进展中,髓核细胞表达谱的变化

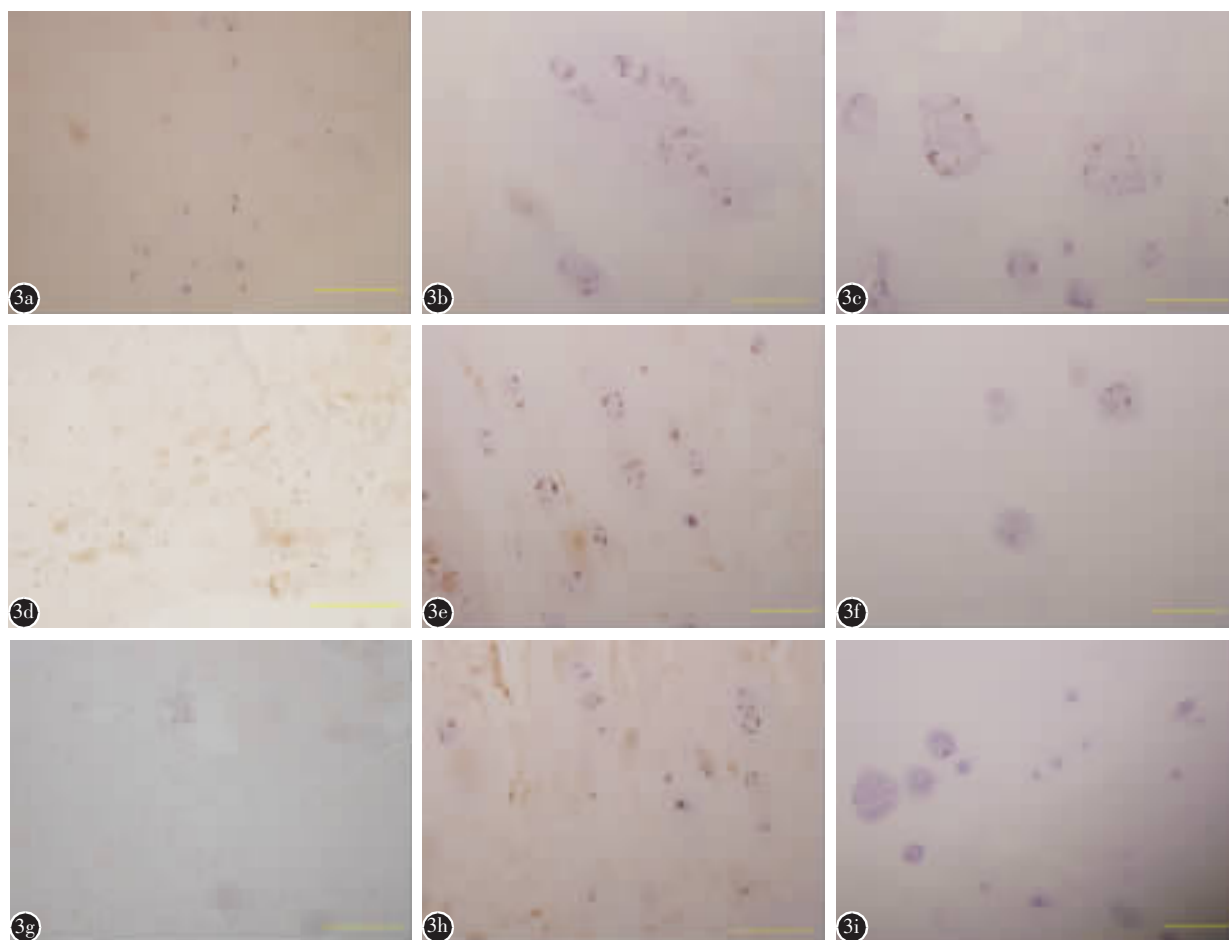


图 3 免疫组织化学染色检测 3 种 S1PR 受体在不同退变程度的髓核组织中的表达水平 **a~c** 对照组椎间盘髓核组织中细胞为细小空泡或梭形, S1PR1 (**3a**)、S1PR2 (**3b**)、S1PR3 (**3c**) 表达均为阳性 **d~f** 轻度退变的髓核组织细胞呈小的集落, S1PR1 弱阳性表达 (**3d**), S1PR2/3 阳性表达 (**3e**、**3f**) **g~i** 严重退变的髓核组织中细胞呈大的集落, S1PR1 (**3g**)、S1PR2 (**3h**)、S1PR3 (**3i**) 表达均为阴性 (标尺 100 μ m)

Figure 3 The expression of S1PR in NP was evaluated by Immunohistochemistry **a~c** Control group NP with tiny vacuolar or spindle shaped cells, S1PR1(**3a**), S1PR2(**3b**), S1PR3(**3c**) are all positively expressed **d~f** Mild degenerated NP with small cell clones, S1PR1 weakly positive(**3d**), S1PR2/3 positive(**3e**, **3f**) **g~i** Advanced degenerated NP with huge cell clones, S1PR1(**3g**), S1PR2(**3h**), S1PR3(**3i**) are all negatively expressed, bar 100 μ m

对基质的合成起关键的调节作用。相关的研究有利于加深对椎间盘退变的认识, 为椎间盘退变的控制和治疗提供新的药物作用靶点, 是目前椎间盘退变的研究热点^[9-11]。

分析退变过程中细胞表达谱的变化, 首先要对椎间盘组织的退变程度进行评价和分组。目前对椎间盘退变程度的评价标准很多, 主要从大体形态、影像学和组织学 3 个方面进行。本研究根据经典的 Priffmann 分级对椎间盘退变程度进行了评价和分组, 组织学研究发现, 不同 Priffmann 分级的标本组织学的特点不同, 这与之前的研究结论基本一致^[12,13], 说明 Priffmannn 分级可以作为评

价椎间盘退变的可靠方法。Priffmann 分级的依据是 MRI T2 像上椎间盘的信号强度, 与组织中亲水性细胞基质的含量直接相关, 而亲水性细胞外基质也是组织学分析中的重要指标, 并且对细胞的形态和功能产生作用。

本研究首次分析 S1PR 在不同退变程度的椎间盘组织中的表达差异。收集手术切除的椎间盘标本, 根据 Priffmann 分级对标本的退变程度进行评价并分组, 通过免疫组织化学、PCR、Western-blot 检测对比不同退变程度的髓核细胞中 S1PR 的表达水平, 发现髓核组织主要表达 S1PR2/3, 且随着椎间盘退变的进展, 3 种 S1PR 在髓核组织和

细胞中的表达水平明显下降。这之前 Stradner 等^[4]的研究在软骨细胞中发现的结果基本一致。这一方面是由于髓核细胞和软骨细胞有相似的细胞生物学特性(丰富的细胞外基质成分),也可能是因为关节炎和椎间盘退变这一类退行性病变的共同病理改变(炎性细胞因子作用,新生血管的渗透),另外也有文献指出两种疾病的还有相同的易

感基因^[14]。

炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 在椎间盘退变的过程中发挥重要的作用,因此抑制炎症因子的作用也是目前药物作用的重要靶点。已有研究^[4,15]发现 S1P 可以通过其受体结合,抑制 IL-1 β 在软骨细胞中引起的炎症反应,降低炎症介质 COX-2/PGF2 的表达,抑制炎症通路 NF-K κ 的活化,进而抑制 IL-1 β 引起的基质降解酶 (MMP 和 ADAMTS) 的表达上调。除了软骨细胞,S1P 的抗炎作用和免疫调节作用在很多组织和细胞中也得到了验证^[16,17]。因此,我们认为在髓核细胞中的 S1P 也可能可以通过其受体产生相似的抗炎作用,但这一结论还需要进一步的研究证实。

本研究通过收集椎间盘手术标本,结合影像学检查和组织学分析对椎间盘退变程度进行评价和分级;进而通过免疫组织化学、Real-time PCR、Western-blot 的方法比较不同退变程度的髓核组织细胞中 S1PR 的表达水平,发现髓核组织主要表达 S1PR2/3,而其表达水平与退变程度负相关。该研究结果为后续的椎间盘退变的相关研究提供

表 2 各组髓核细胞中 3 种 S1PR mRNA 表达的相对值

Table 2 The level of S1PRs mRNA(fold) in nucleus pulposus cells

	例数 Cases	S1PR1	S1PR2	S1PR3
对照组 Normal NP	3	5.34 $\pm$ 0.52	7.25 $\pm$ 0.04	1.92 $\pm$ 0.06
轻度退变组 Mild degenerated NP	18	4.35 $\pm$ 2.45	4.96 $\pm$ 3.44	2.19 $\pm$ 0.82
严重退变组 Advanced Degenerated NP	10	1.04 $\pm$ 0.80 ^②	1.06 $\pm$ 0.56 ^②	1.00 $\pm$ 0.86 ^①

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与轻度退变组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with the mild degenerated group, $P<0.05$

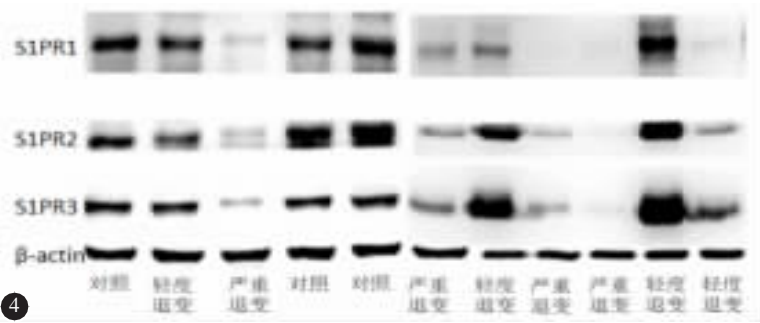


图 4 Western-bolt 检测不同退变程度的 11 例髓核细胞样品中 S1PR 在蛋白水平的表达情况:对照组和轻度退变的髓核细胞中 S1PR 的表达水平较高

Figure 4 Western blot is used to assess S1PR in nucleus pulposus cells with different degrees of degeneration from 11 samples,the expressions of S1PR1/2/3 all decrease in the advanced degenerated cells

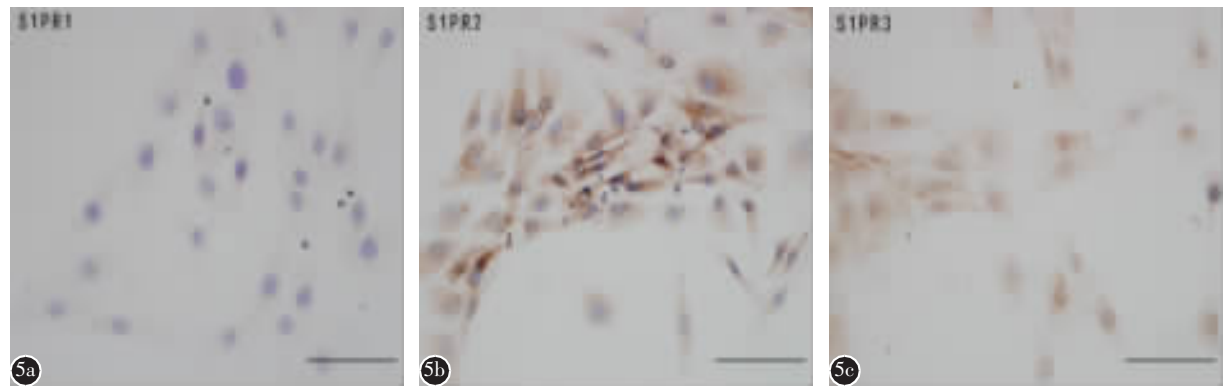


图 5 细胞免疫化学检查显示 S1PR 在髓核细胞中的定位:髓核细胞中 S1PR 主要在细胞质中和细胞膜(标尺 50 μ m) a S1PR1 b S1PR2 c S1PR3

Figure 5 The immunocytochemistry indicates S1PR location in NP cells: mainly locate in the membranes and cytoplasm of cells(Bar 50 μ m) a S1PR1 b S1PR2 c S1PR3

了基础,为临床预后判断提供了实验室依据。但 S1P 相关信号对髓核细胞的作用, S1PR 在髓核细胞中的功能还需要进一步的研究。

4 参考文献

1. Waddell G. Low back pain: a twentieth century health care enigma[J]. *Spine*, 1996, 21(24): 2820-2825.
2. Huang YC, Urban JP, Luk KD. Intervertebral disc regeneration: do nutrients lead the way[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(9): 561-566.
3. Mendelson K, Evans T, Hla T. Sphingosine 1-phosphate signalling[J]. *Development*, 2014, 141(1): 5-9.
4. Stradner MH, Gruber G, Angerer H, et al. Sphingosine 1-phosphate counteracts the effects of interleukin-1 β in human chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(8): 2113-2122.
5. Rodrigues-Pinto R, Richardson SM, Hoyland JA. An understanding of intervertebral disc development, maturation and cell phenotype provides clues to direct cell-based tissue regeneration therapies for disc degeneration [J]. *Eur Spine J*, 2014, 23(9): 1803-1814.
6. Sun Z, Zhang M, Zhao XH, et al. Immune cascades in human intervertebral disc: the pros and cons[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(6): 1009-1014.
7. David G, Ciurea AV, Iencean SM, et al. Angiogenesis in the degeneration of the lumbar intervertebral disc[J]. *J Med Life*, 2010, 3(2): 154-161.
8. 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.
9. Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1 β and TNF α expression profile[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(4): R77.
10. Tolofari SK, Richardson SM, Freemont AJ, et al. Expression of semaphorin 3A and its receptors in the human intervertebral disc: potential role in regulating neural ingrowth in the degenerate intervertebral disc[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(1): R1.
11. Rodrigues LM, Oliveira LZ, Pinhal MA. Expression of heparanase isoforms in intervertebral discs classified according to Pfirrmann grading system for disc degeneration[J]. *Spine*, 2013, 38(13): 1112-1118.
12. Rutges JP, Duit RA, Kummer JA, et al. A validated new histological classification for intervertebral disc degeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(12): 2039-2047.
13. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, et al. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science[J]. *Spine*, 2002, 27(23): 2631-2644.
14. Ikegawa S. The genetics of common degenerative skeletal disorders: osteoarthritis and degenerative disc disease[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2013, 14: 245-256.
15. Moon MH, Jeong JK, Lee YJ, et al. Sphingosine-1-phosphate inhibits interleukin-1 β -induced inflammation in human articular chondrocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(6): 1451-1458.
16. Ogawa R, Takahashi M, Hirose S, et al. A novel sphingosine-1-phosphate receptor agonist KRP-203 attenuates rat autoimmune myocarditis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(3): 621-628.
17. Hughes JE, Srinivasan S, Lynch KR, et al. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages[J]. *Circ Res*, 2008, 102(8): 950-958.

(收稿日期:2015-08-25 末次修回日期:2015-10-14)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)