

脊柱轴线力学失稳诱导椎间盘退变小鼠模型的建立及评价

付方达^{1,2} 邵晶奕² 童培建^{1,2} 肖鲁伟^{1,2} 吴承亮^{1,2△} 阮红峰^{1,2△}

[摘要] 目的:建立一个操作简单、重复性好、可靠性高的脊柱轴线力学失稳诱导椎间盘退变的小鼠模型并对其进行评价。方法:通过手术去除小鼠棘上和棘间韧带致其脊柱轴线力学失稳来诱导构建椎间盘退变(IDD)模型,并于造模后不同时间点收集腰椎样本,通过番红 O/固绿染色观察 IDD 过程中椎间盘形态学改变,免疫组化法检测椎间盘基质代谢相关蛋白(Col1,Col2 和基质降解酶 Mmp13)和 Hif 信号关键蛋白(Hif1 α ,Vegf)在椎间盘组织中的表达模式变化,对模型进行评价。结果:椎间盘番红 O/固绿染色表明,对照组椎间盘组织形态结构完整,内外层纤维环排列整齐,细胞外基质染色均匀;而 IDD 模型组纤维环出现撕裂、纤维排列紊乱等状况,番红 O 染色变浅。免疫组化结果表明,对照组椎间盘纤维环中 Col1,Col2,Mmp13 在正常椎间盘中均有表达。与对照组比较,模型组纤维环中 Col2 表达显著降低,而 Col1 和 Mmp13 表达均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。Hif 信号检测发现,在正常椎间盘组织中,Hif1 α 于外侧纤维环中呈低表达,后期表达逐渐降低,而 Vegf 表达于纤维环和髓核组织;与对照组比较,造模 4 周 IDD 模型组纤维环组织中 Hif1 α 表达升高,同时伴随 Vegf 表达的增加,尤其是在内侧纤维环区域,而造模 6~8 周后,Vegf 在纤维环内外侧的表达进一步升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:应用去除棘上和棘间韧带方式使小鼠脊柱轴线力学失稳,成功建立力学异常 IDD 小鼠模型。该模型操作简单、重复性好,可为进一步揭示 IDD 的病理发生机制及临床治疗提供可靠的动物模型。

[关键词] 椎间盘退变;脊柱轴线力学失稳;动物模型;纤维环组织

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)01-0001-07

Establishment and Evaluation of a Mouse Model of Intervertebral Disc Degeneration with Spinal Axial Mechanical Anstability

FU Fangda^{1,2} SHAO Jingyi² TONG Peijian^{1,2} XIAO Luwei^{1,2}
WU Chengliang^{1,2△} RUAN Hongfeng^{1,2△}

¹ The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China;

² The First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.

Abstract Objective: To establish and evaluate a simple, reproducible and reliable mouse model of intervertebral disc degeneration induced by spinal axial mechanical instability. **Methods:** The model of intervertebral disc degeneration (IDD) was established by surgically removing the supraspinal and interspinous ligaments of the mice and causing mechanical instability of the spinal axis. Samples of lumbar vertebrae were collected at different times after model establishment. Morphological changes of intervertebral disc during IDD were observed by safranin O-fast green staining. Immunohistochemical method was used to detect the expression patterns of intervertebral disc Matrix metabolism-related proteins (type I collagen, type II collagen and Matrix degrading enzyme Mmp13) and the key proteins of Hif signaling pathway (Hif1 α , Vegf) in intervertebral disc tissue. **Results:** Safranin O-fast green staining showed that morphological structure of intervertebral disc was intact, the inner and outer annulus fibrosus was arranged neatly, and the extracellular matrix was equally stained in control group. The annulus fibrosus was torn and fiber arrangement was disordered, and the safranin O staining became thinner in IDD model group. The immunohistochemical results showed that type I collagen, type II collagen, Mmp13 all expressed in normal intervertebral disc of the

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LQ17H270005)

国家自然科学基金资助项目(81573994)

¹ 浙江中医药大学附属第一医院(杭州,310006)

² 浙江中医药大学第一临床医学院

△通信作者 E-mail: rhf@zcmu.edu.cn(阮红峰)

wcl@zcmu.edu.cn(吴承亮)

tebral disc tissue. **Results:** Safranin O-fast green staining showed that morphological structure of intervertebral disc was intact, the inner and outer annulus fibrosus was arranged neatly, and the extracellular matrix was equally stained in control group. The annulus fibrosus was torn and fiber arrangement was disordered, and the safranin O staining became thinner in IDD model group. The immunohistochemical results showed that type I collagen, type II collagen, Mmp13 all expressed in normal intervertebral disc of the

control group. Compared with the control group, the expression of type II collagen in the annulus fibrosus of the model group was significantly decreased, while the expression of type I collagen and Mmp13 were significantly increased ($P < 0.05$). Hif signaling pathway activity detection showed that the low expression of Hif1 α was located in the outer annulus fibrosus in normal intervertebral disc tissue, gradually decreased in the later stage, while the expression of Vegf was located at the the annulus fibrosus and nucleus pulposus tissues. Compared with the control group, the expression of Hif1 α and Vegf in the annulus fibrosus tissue, especially in the inner annulus fibrosus had increased in 4 weeks model group. The expression of Vegf in the inner and outer annulus fibrosus had further increased after 6~8 weeks of modeling, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The lumbar spine instability IDD mouse model has successfully established by removing the supraspinous and interspinous ligaments. The model is simple and reproducible, providing a reliable animal model for further exploring the pathogenesis preclinical treatment of IDD.

Keywords: intervertebral disc degeneration; lumbar spinal instability; animal model; annulus fibrosus

下腰痛是最常见的肌肉骨骼系统问题之一,给家庭和社会医药资源造成严重负担^[1,2]。影像学检测发现,约 67% 的下腰痛患者出现椎间盘退变(Intervertebral Disc Degeneration, IDD)^[2]。因 IDD 的病理机制尚未明确,建立可靠的 IDD 模型对明确其病理机制和下腰痛治疗有重要意义。本研究通过手术去除小鼠棘上、棘间韧带,建立力学失稳 IDD 模型,并从形态、基质代谢等方面对其进行评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2 月龄 SPF 级雄性 C57 小鼠 36 只,体质量(20.0 \pm 1.0)g 由浙江中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号为 ACXK(沪)2015-0016。由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(沪)2013-0016。饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障实验室,实验动物使用许可证号为 SYXK(浙)2013-0184,环境温度(22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%~60%,光照 12 h/12 h 明暗交替,自由饮食。

1.2 试剂与仪器

硫酸庆大霉素注射液(2 mL, 8×10^4 U, 广东南国药业有限公司);戊巴比妥钠(达文生物公司 DW-PS-05);烤片机(WEXIS 公司 FL220);光学显微镜(上海光学仪器六厂 XSP-2CA);电热恒温培养箱(DRP-9082);电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司 DHG-9123A);组织包埋机(Thermo scientific 公司 EC350-2);切片机(Thermo scientific 公司 HM325)。

1.3 实验分组和 IDD 术式步骤

小鼠随机分为对照组和 IDD 模型组,每组 18 只。IDD 模型的手术步骤:采用 0.5% 戊巴比妥钠(25 mg/kg)腹腔注射对小鼠进行麻醉,背部剪毛和清洁后,用碘伏消毒背部皮肤,沿脊柱方向向下纵向切开皮肤,钝性剥离筋膜,暴露小鼠竖脊肌,轴向钝性分离两侧竖脊肌(必要时切断部分竖脊肌),彻底暴露小鼠腰椎棘突,完全剪断 L₃~L₅ 节段的棘突,去除棘上以及棘间韧带,碘伏消毒,检查内脏有无出血,腹膜是否完整后,将肌肉,筋膜,皮肤逐层缝合,最后于伤口处涂抹盐酸庆

大霉素预防感染,对照组不剪断棘突,仅分离两侧竖脊肌,其余操作与模型组相同。分别于术后 4, 6 和 8 周处死小鼠(每组每个时间点 6 只),获得腰椎样本用于后续指标检测。

1.4 检测指标

1.4.1 微型电子计算机断层扫描(μ CT) 椎间盘组织用 4% 多聚甲醛固定 3 d 后,通过高分辨率 μ CT 扫描软件(Skyscan 1176, Bruker μ CT, Kontich, 比利时)进行影像学检查。用于测量椎间盘的扫描仪设定为 90 kV 的电压,电流为 300 μ A,每像素分辨率为 9 μ m。通过第 T₁₂ 椎的肋骨来定位 L_{4~5} 椎间盘。使用 NRecon v1.6 软件(Skyscan 公司, 美国)重建和分析图像。使用三维模型可视化软件 CTVol v2.0 (Skyscan 公司, 美国)分析 L_{4~5} 椎间盘的平均高度。

1.4.2 组织病理形态学检测 上述椎间盘组织经 μ CT 扫描后,流水冲洗过夜,脱钙 20 d 左右,直至针头刺入无突破感为度(表明椎间盘组织脱钙完全)。随后进行酒精逐级脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、5 μ m 切片。通过番红 O/固绿染色来观察椎间盘组织形态结构变化,其步骤大致如下:将上述切片于 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烤片 3~5 h 后;二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,苏木精染色 5 min,水冲洗后 1% 盐酸乙醇分化 30 s,水冲洗后 1% 氨水返蓝 30 s;水冲洗后 0.02% 固绿染色 5 min,1% 乙酸中酸化 10 s,擦净多余液体后换至 1% 番红 O 染液中,持续 20 min,染色完成后用 95% 乙醇洗净,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光镜下观察椎间盘形态变化。

1.4.3 椎间盘软骨基质含量和基质降解酶含量的检测 将获得的切片脱蜡复水后置于柠檬酸钠缓冲液热修复,依照兔链霉卵白素-生物素法检测系统(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号 SP-9001)说明书进行操作,大致步骤如下:切片置于 0.3% 的 Triton X-100 作用 5 min,3% H₂O₂ 作用 10 min,血清室温封闭 15 min,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日拿出室温恢复 30 min 后,PBST 缓冲液清洗,滴加适量的生物素标记山羊抗兔 IgG 聚合物,室温孵育 30 min;PBST 缓冲液

清洗后,滴加适量的辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育 30 min;PBST 缓冲液冲洗后,加入适量新鲜配制的 DAB 显色液,室温孵育 5~8 min. 自来水冲洗终止显色,苏木素染色液孵育 20 s,分化返蓝。脱水,透明,封片。所用一抗包括二型胶原(Col2)一抗(苏州睿赢生物技术有限公司,货号 RLT1022,1:2 000 稀释),一型胶原(Col1)一抗(Abcam 公司,货号 ab34710,1:600 稀释)及 Mmp13 一抗(武汉华美生物工程有限公司,货号 CSB-PA07029A0Rb,1:200 稀释),显微镜下观察并拍照。每张切片任选不重复的 5 个视野,测量其相对平均光密度,取平均值作为测量值。

1.4.4 椎间盘 Hif 信号的检测 将 1.4.1 节获得的切片脱蜡复水后置于柠檬酸钠缓冲液热修复,根据上节中步骤进行免疫组织化学检测 Hif1 α 和 Vegf 表达情况。所用一抗包括 Hif1 α 一抗(Abcam 公司,货号 ab82832,1:100 稀释)和 Vegf 一抗(武汉华美生物工程有限公司,CSB-PA08249A0Rb,1:100 稀释),显微镜下观察并拍照。每张切片任选不重复的 5 个视野,测量阳性细胞表达率(Hif1 α)和相对平均光密度(Vegf),取平均值作为测量值。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS12.0 统计软件对数据进行统计分析。组间两两比较采用 Students-*t* 检验分析。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IDD 模型中椎间盘组织的影像学改变

通常情况下,椎间盘高度的下降与 IDD 程度正相关。 μ CT 结果表明:与对照组比较,IDD 造模 8 周后模型组的椎间盘高度明显下降(见图 1)。通过对椎间盘平均高度进行分析(黑色线段标识处)表明,IDD 模型组平均高度是对照组的 83%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

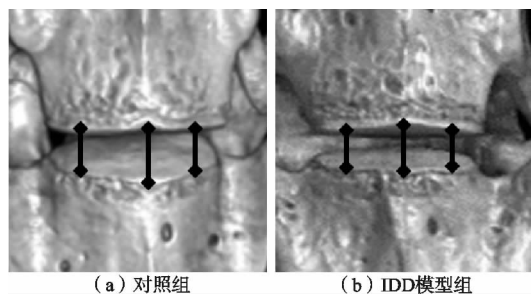


图 1 IDD 模型中椎间盘的大体影像学改变

2.2 IDD 模型中椎间盘组织的病理形态学改变

正常椎间盘由位于中心的髓核(Nucleus Pulposus, NP)、外层环绕的纤维环(Annulus Fibrosus, AF)及二者之间的过渡区构成,两者之间无血液供应^[4],椎间盘和椎体间由一层透明软骨构成的软骨终板隔离。番红 O/固绿染色,染色背景为绿色,内圈纤维环、髓核以及软骨终板等富含蛋白多糖的部位染色为红色。染

色结果表明,对照组椎间盘组织形态结构完整,多层纤维环排列整齐,细胞外基质番红 O 染色均一(见图 2);IDD 造模 4 周后,模型组纤维环出现严重的撕裂、褶皱,纤维排列紊乱(黑色尖头标识处),纤维环处番红 O 染色变浅(黄色箭头标识处);IDD 造模 6 周和 8 周后,模型组的变化更加严重,纤维环处番红 O 染色进一步变浅,在软骨终板区域出现大片的软骨缺失区域,类似于骨髓腔结构(黄色尖头标识处)。

2.3 IDD 模型中椎间盘组织的基质含量的变化

椎间盘内含大量以 Col1 和 Col2 为主的胶原纤维,其对整个椎间盘的组织形态起到维持和支撑的作用^[5]。免疫组织化学染色结果显示(见图 3),对照组中 Col1 均匀分布于内侧和外侧纤维环;IDD 造模后,Col1 在纤维环,尤其是内侧纤维环区域的表达增加,随着造模时间推移其表达进一步增加。在对照组,Col2 主要纤维环内侧表达;与对照组比较,IDD 模型组纤维环区域的 Col2 表达降低。进一步对表达强度进行灰度分析发现,IDD 模型组 Col1 表达显著高于对照组,Col2 表达显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 IDD 过程中基质降解酶含量的变化

椎间盘中基质金属蛋白酶(Mmps)表达异常是 IDD 的重要原因之一^[3]。在 IDD 病理发生中,Mmps 在椎间盘基质降解中起重要作用^[6]。Mmp13 的免疫组织化学染色结果表明,Mmp13 在正常椎间盘组织中基本不表达,而在 4 周模型组椎间盘内侧纤维环区域表达明显增加,到 6 周时表达水平和范围均有所减少,8 周后模型组表达和对照组基本无明显差别(见图 4)。灰度统计分析表明,与对照组比较,4 周和 6 周的模型组 Mmp13 表达差异有统计学意义($P < 0.05$),而 8 周时差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 Hif 信号在 IDD 中的表达变化

椎间盘是人体最大的封闭的无血管组织,低氧环境是椎间盘内组织重要的生理环境^[7,8]。临床腰椎间盘突出组织 HIF-1 α 检测发现,其在正常椎间盘中表达很少或几乎不表达,而在退变椎间盘内阳性表达为 45%,提示其与椎间盘的退变呈正相关。本研究中对 Hif 信号的免疫组织检测表明,对照组 Hif1 α 仅少量的表达于椎间盘纤维环中外侧纤维环;与对照组相比,在 4 周的 IDD 模型组纤维环中 Hif1 α 表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而造模 6 到 8 周后 Hif1 α 表达出现明显下降(见图 5)。血管内皮生长因子(Vegf)是一种具有促进血管形成的刺激因子,在缺氧环境下,Hif1 α 入核,促使其下游基因 Vegf 的表达发挥基因调控作用,刺激了新生血管的产生,从而改善组织的缺氧环境^[9]。为明确 Vegf 在本模型中的作用,Vegf 免疫组织结果表明(见图 6),Vegf 在对照组椎间

盘组织中主要表达于内侧纤维环;在 IDD 造模 4、6 和 8 周时,Vegf 在内侧纤维环的表达水平增加,和对照

组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。IDD 模型中椎间盘高度及各种蛋白表达强度的统计结果见图 7。

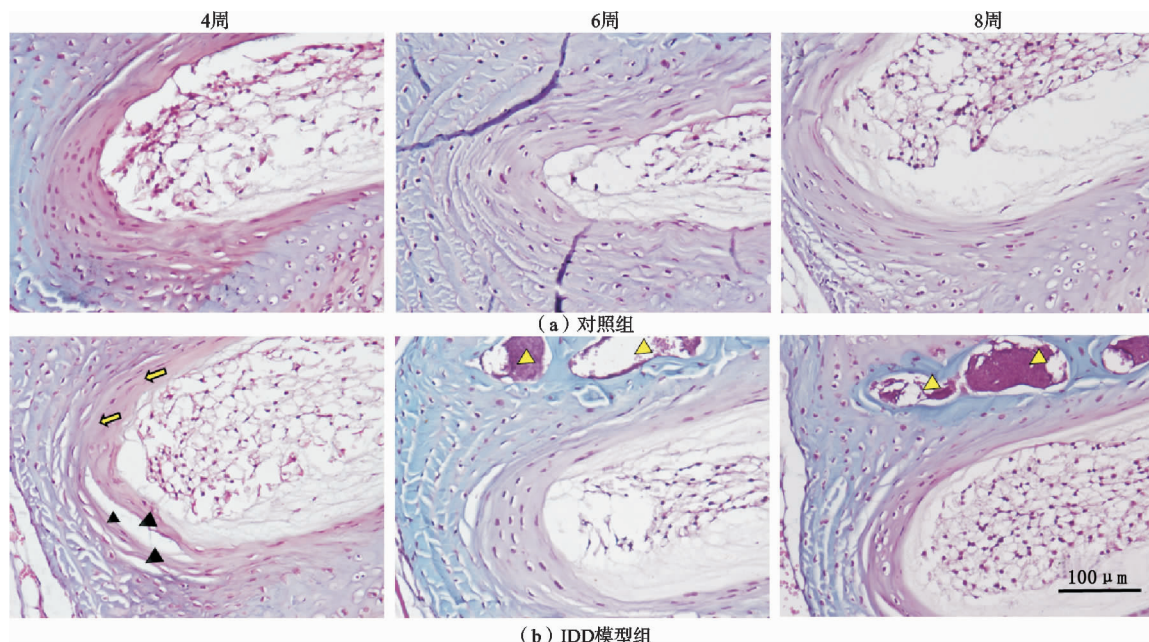


图 2 小鼠椎间盘番红 O/固绿染色(200 \times)

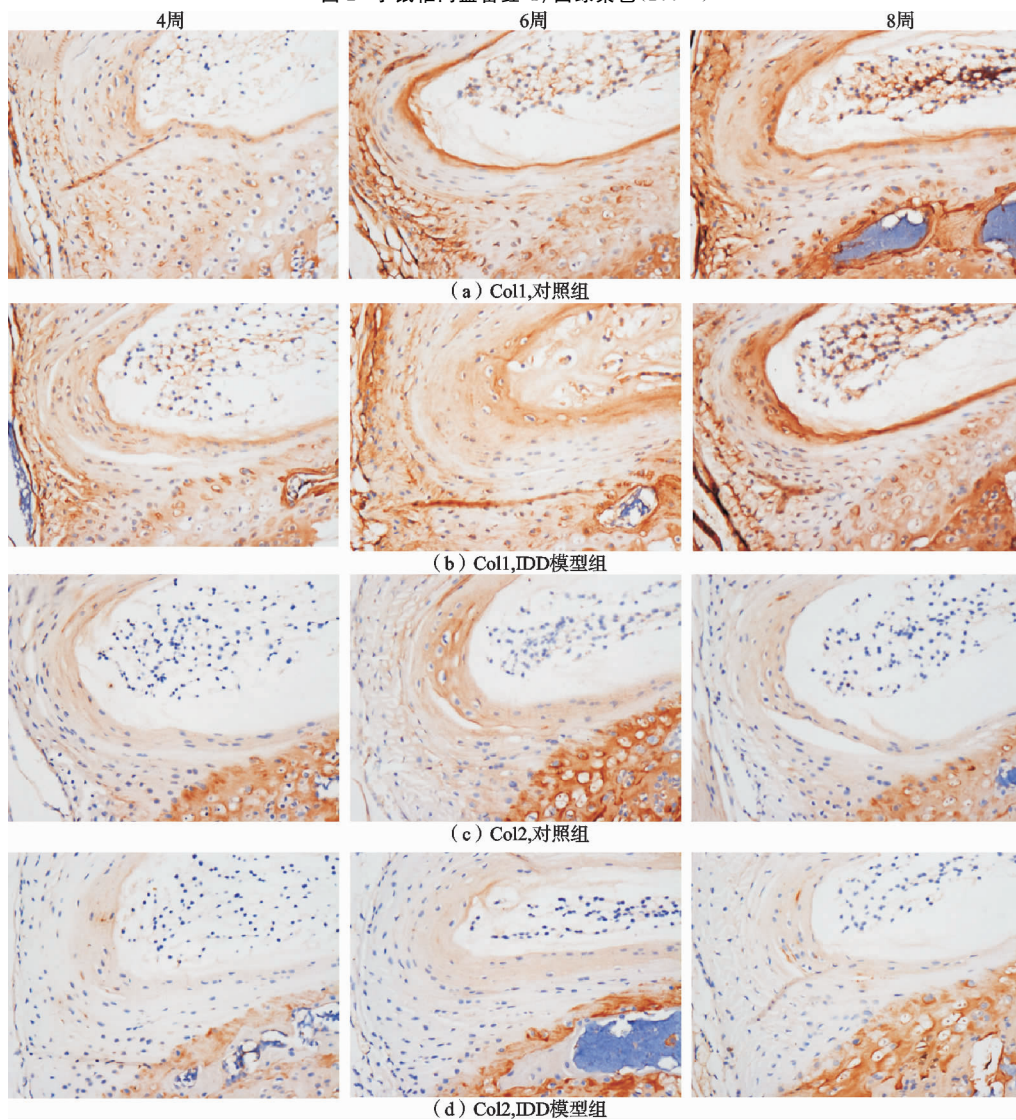


图 3 IDD 模型中椎间盘组织的基质含量的变化(200 \times)

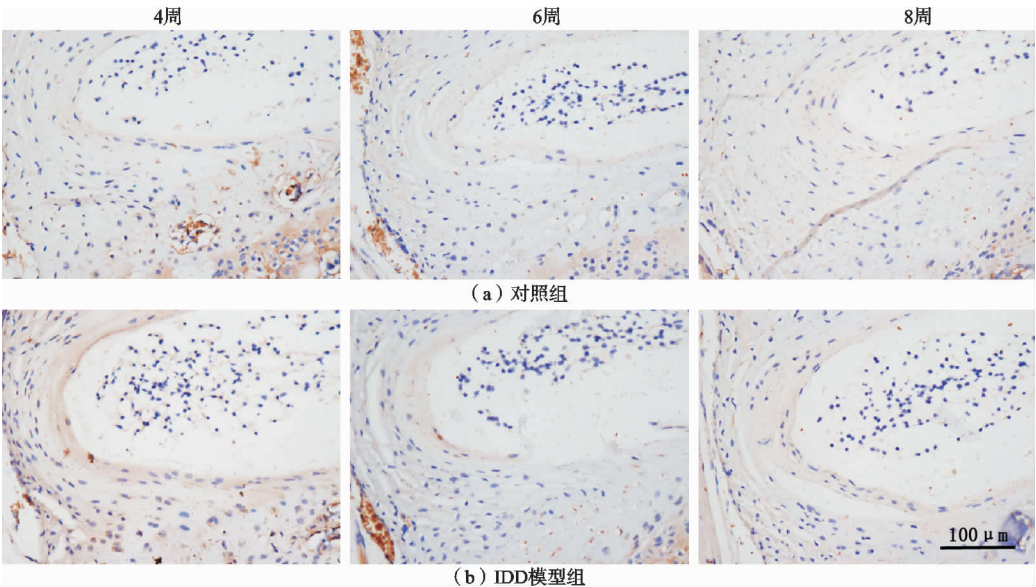


图 4 IDD 模型中 Mmp13 蛋白表达的变化(200×)

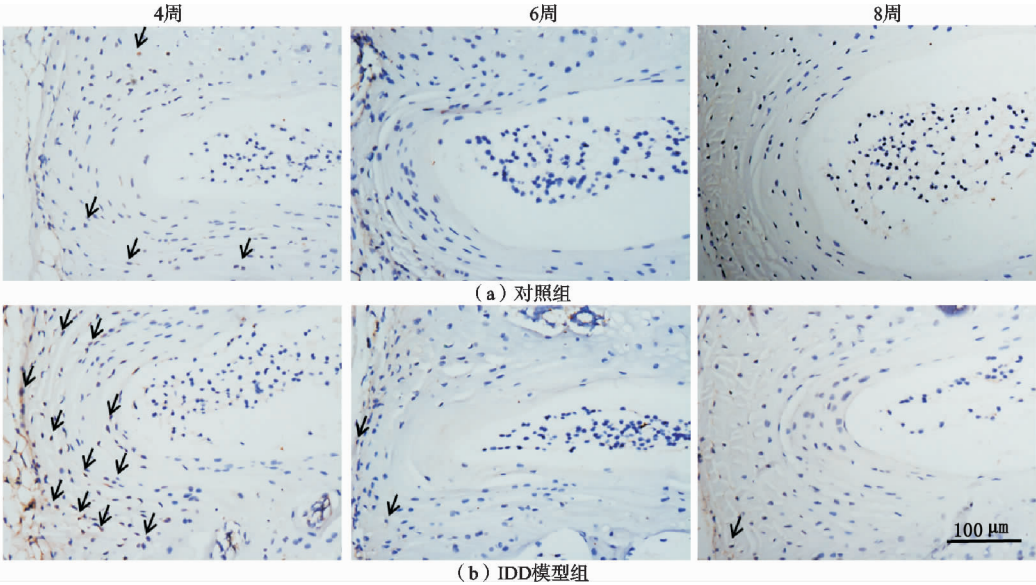


图 5 IDD 模型中 Hif1α 蛋白表达的变化(200×)

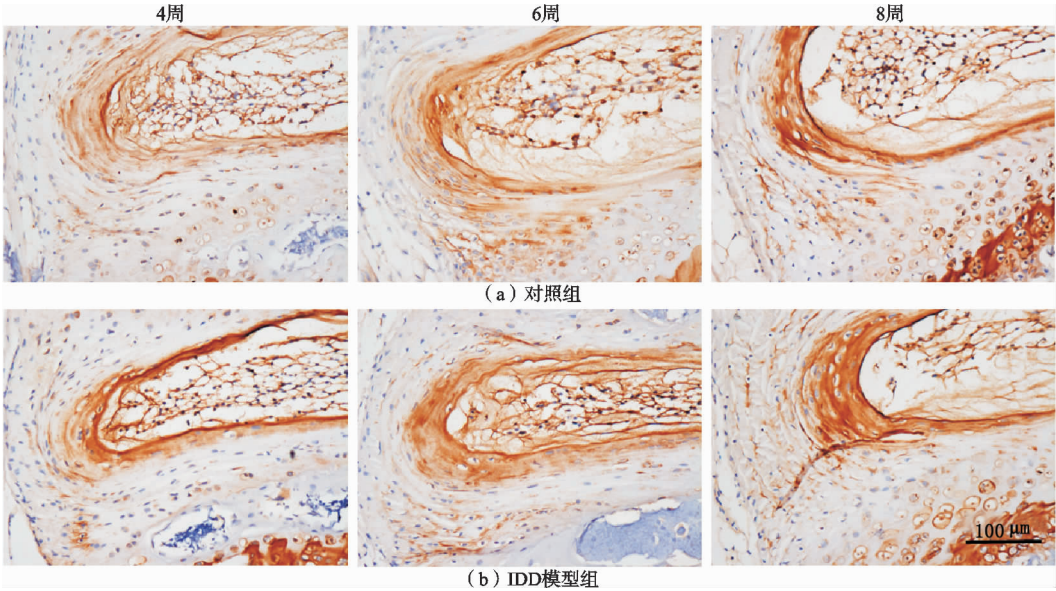


图 6 IDD 模型中 Vegf 蛋白表达的变化(200×)

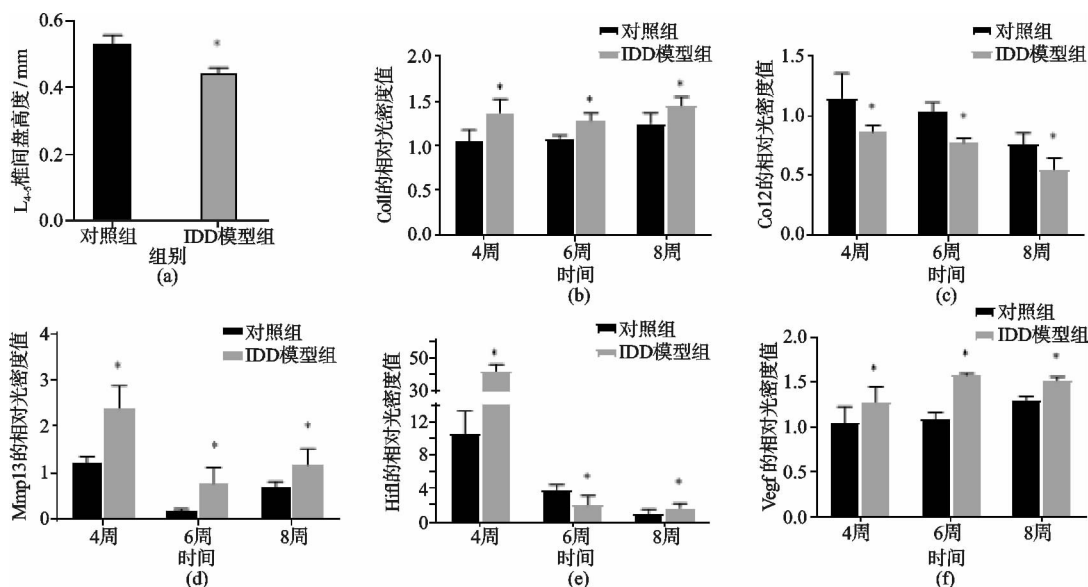


图7 IDD模型中椎间盘高度及各种蛋白表达强度的统计结果(*与对照组相比, $P < 0.05$)

3 讨论

椎间盘传递和吸附力学负重到脊柱以维持运动, NP是振动的主要吸收者,并将轴向压迫力向外周AF扩散,使后者承受弯曲或伸展运动中产生的拉力^[1,10]。IDD病理发生非常复杂,伴随着生物力学的改变和细胞外基质降解增多^[11]。流行病学调查表明,脊柱力学负重异常是IDD发生的主要原因之一,其引发椎间盘外基质大量丢失,进而使AF对NP的束缚力减弱的现象,是IDD的标志之一^[12]。本研究中,通过破坏小鼠棘突、棘上韧带及相关肌肉来诱发腰椎失稳模型,以模拟人体长期劳损而导致的腰椎力学稳态失衡的过程,来探究力学环境的改变诱发IDD的病理发生过程。IDD模型组小鼠腰椎间盘在力学失稳的情况下出现纤维环撕裂、纤维排列紊乱、软骨终板区域大片软骨缺失的现象,同时,椎间盘基质代谢出现显著异常,上述变化与临床IDD患者的表现非常相似。上述结果表明应用去除棘突及棘上、棘间韧带的方法可成功构建力学异常IDD小鼠模型。通过本方法改变正常脊柱关节和椎间盘的受力大小及分布情况,从而间接诱导IDD的发生,没有破坏椎间盘的生理结构,更符合临床上人类椎间盘退变大多数无直接损伤的特点,同时该模型具有操作简单、成功率较高、实验周期短、手术创伤小、术后小鼠存活率高等特点,为后续进一步利用转基因小鼠进行IDD造模,揭示IDD的病理发生机制及临床治疗提供可靠的动物模型。

正常椎间盘结构由上下软骨终板、外周的纤维环和中央的髓核三部分构成,纤维环位于椎间盘外侧,细胞主要以成纤维细胞为主,同时含有丰富的蛋白多糖、胶原纤维。其中Col1及Col2是椎间盘的重要组成部分,约占椎间盘胶原总量的80%^[13]。Col1抗牵张力强,有很好的延展性,能承受压力并有组织修复代偿功

能^[14]。纤维环Col1和Col2含量比例从内到外逐渐提高,纤维环具有这种特性是为了适应纤维环所受应力^[15]。IDD造模后,Col1和Col2的含量发生变化,纤维环抗牵张力下降,这是后期形成椎间盘突出的重要原因。Mmps是降解细胞外基质的关键性蛋白水解酶,在大多数生物过程中发挥着重要的作用^[16-18]。Mmp13作为主要的胶原蛋白酶,可以分解Col2的三维螺旋结构,从而在纤维环细胞外基质降解中发挥重要作用。Anderson等^[19]研究发现,手术损伤兔椎间盘6周后,椎间盘出现退变样改变。骆阳等^[20]研究发现,IDD中纤维环中Mmp13的表达水平明显升高。在本研究中发现小鼠经IDD造模处理后,纤维环的Col1含量的上升,Col2含量的下降,同时伴随着Mmp13的表达水平升高,因此推测由于Mmp13活性的升高导致细胞外基质合成和降解平衡失调及功能改变,引起细胞外基质中胶原组分的变化,从而破坏纤维环结构,最终导致IDD的发生。

椎间盘是人体内最大的无血管组织^[21],其营养主要通过骨终板处的微血管网供给;伴随着机体的不断老化,软骨终板日益逐渐骨化,氧气等大部分营养物质的供给及代谢废物的运输均受到阻滞,最终会使椎间盘区域形成低氧微环境^[12],而Hif信号在椎间盘退变中的作用仍不明确。有研究发现,Hif1α和Mmp2的表达在人类IDD中呈正相关,推测Hif1α可能在低氧环境下激活Mmp2,共同参与椎间盘基质降解,最终导致IDD的发生^[22]。也有研究认为,Hif信号在椎间盘退变中是起保护作用的,在软骨细胞特异性缺失Hif1α基因的条件性敲除小鼠Col2-CreER^{T2};Hif1α^{fx/fx}中的研究发现,Hif1α基因敲除小鼠出现IDD表现,并且随着小鼠年龄的增加这种变化逐渐加重^[23]。本研究中,Hif1α在IDD小鼠模型不同时间点呈先上升后下降的表达模

式,同时伴随着 Vegf 上升。因此,推测在 IDD 病理发生早期,椎间盘内氧分压下降,Hif1 α 的表达量持续增加,Hif1 α 表达的是机体自身应激保护反应,是对维持自身稳态有益的。随着 IDD 的加剧,Hif1 α 靶基因 Vegf 表达增多而促使新生微小血管入侵椎间盘组织,导致椎间盘局部由低氧环境转变为常氧环境,从而导致 Hif1 α 表达下降,不能对机体进一步发挥保护作用。

综上所述,本研究成功建立了力学异常 IDD 小鼠模型,该模型操作简单、重复性好,可为进一步利用转基因小鼠揭示 IDD 的病理发生机制及临床治疗提供可靠的动物模型;同时,调控 Hif 信号的水平可能是干预 IDD 病理发生进程的关键环节。

参考文献

- [1] QASEEM A,WILT T J,MCLEAN R M,et al. Noninvasive treatments for acute,subacute,and chronic low back pain;a clinical practice guideline from the american college of physicians[J]. Ann Intern Med,2017,166(7):514-530.
- [2] 刘宗玮,温剑涛,张德宏,等. 腰椎间盘突出症椎间盘退变相关炎性因子研究进展[J]. 中医药临床杂志,2019,31(2):388-391.
- [3] RISBUD M V,SHAPIRO I M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration;pain and disc content[J]. Nat Rev Rheumatol,2014,10(1):44-56.
- [4] XIAO Z F,HE J B,SU G Y,et al. Osteoporosis of the vertebra and osteochondral remodeling of the endplate causes intervertebral disc degeneration in ovariectomized mice[J]. Arthritis Res Ther,2018,20(1):207-213.
- [5] 金新蒙,杨铁毅,王雷. 纤维环退变机制及生物学治疗的研究综述[J]. 中华骨与关节外科杂志,2019,12(2):156-160.
- [6] VO N V,HARTMAN R A,YURUBE T,et al. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration[J]. Spine J,2013,13(3):331-341.
- [7] BEKEREDJIAN R,WALTON C B,MACCANNELL K A,et al. Conditional HIF-1 α expression produces a reversible cardiomyopathy [J]. PLoS One,2010,5(7):e11693.
- [8] LI H,LIANG C Z,CHEN Q X. Regulatory role of hypoxia inducible factor in the biological behavior of nucleus pulposus cells[J]. Yonsei Med J,2013,54(4):807-812.
- [9] YANG J,ZHANG X,ZHANG Y,et al. HIF-2 α promotes epithelial-mesenchymal transition through regulating Twist2 binding to the promoter of E-cadherin in pancreatic cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res,2016,35:26-33.
- [10] VERGROSEN P P,KINGMA I,EMANUEL K S,et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degenera-

tion;a vicious circle[J]. Osteoarthritis Cartilage,2015,23(7):1057-1070.

- [11] 徐涛涛,廖菲,金红婷,等. 椎间盘退变与细胞死亡的相关研究进展[J]. 中国骨伤,2015,28(7):673-678.
- [12] KADOW T,SOWA G,VO N,et al. Molecular basis of intervertebral disc degeneration and herniations: what are the important translational questions? [J]. Clin Orthop Relat Res,2015,473(6):1903-1912.
- [13] 刘佳鑫,崔颖,徐海栋. 小鼠椎间盘退变模型实验进展[J]. 转化医学电子杂志,2018,5(3):52-54.
- [14] 王乐,徐无忌. 六味地黄丸对兔椎间盘退变模型椎间盘组织中 I、II 型胶原表达的影响[J]. 中医正骨,2016,28(8):1-7.
- [15] EYRE D R,MUIR H. Types I and II collagens in intervertebral disc interchanging radial distributions in annulus fibrosus[J]. Biochem J,1976,157(1):267-270.
- [16] SHIMOKAWA K I,KATAYAMA M,MATSUDA Y,et al. Identification of complexes of gelatinase A and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human follicular fluid [J]. Reprod Med Biol,2003,2(3):115-119.
- [17] DAVIRAN M,LONGWILL S M,CASELLA J F,et al. Rheological characterization of dynamic remodeling of the pericellular region by human mesenchymal stem cell-secreted enzymes in well-defined synthetic hydrogel scaffolds[J]. Soft Matter,2018,14(16):3078-3089.
- [18] SAHAY A S,JADHAV A T,SUNDRANI D P,et al. Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) are differentially expressed in different regions of normal and preeclampsia placentae [J]. J Cell Biochem,2018,119(8):6657-6664.
- [19] ANDERSON D G,IZZO M W,HALL D J,et al. Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs:analysis of a rabbit annular laceration model [J]. Spine (Phila Pa 1976),2002,27(12):1291-1296.
- [20] 骆阳,齐臻,罗鹏远,等. 甲状旁腺素(1-34)对卵巢切除大鼠腰椎间盘退变 MMP-1 及 MMP-13 表达的影响[J]. 河北医科大学学报,2018,39(1):29-33.
- [21] 华东方,徐敏铭,杨晨,等. 低氧通过 HIF-1 α 调控髓核细胞中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的表达[J]. 脊柱外科杂志,2017,15(4):233-238.
- [22] 吴伟平,江建明,瞿东滨,等. HIF-1 α ,MMP-2 在退变椎间盘髓核中的表达及相关意义[J]. 南方医科大学学报,2010,30(5):1152-1155.
- [23] 王晶,董芳芳,李晓锋,等. 低氧诱导因子 1 α 基因敲除小鼠椎间盘退变与益气化瘀方的干预[J]. 中国组织工程研究,2013,17(24):4481-4487.

(收稿日期:2019-09-07)