

软骨终板通透性对体外培养大鼠髓核细胞生物学特性的影响

牛朋彦, 熊 伟, 李 锋, 张 帆, 姚广清, 张 勇

(华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科 430030 武汉市)

【摘要】目的:观察软骨终板营养通路通透性对外培养大鼠髓核细胞生物学特性的影响。**方法:**4 周龄雄性 SD 大鼠 20 只, 处死后立即手术切取腰段椎间盘(包括邻近的软骨终板), 每只 6 个, 随机分为 A、B、C 3 组, 其中 A 组为正常对照组, B 组用骨蜡封闭上软骨终板, C 组用骨蜡封闭上、下软骨终板, 3 组椎间盘在体外进行整体器官培养。于培养前和培养 7d、14d 时, 分别用 Mitotracker Green 荧光探针和 RT-PCR 方法评估椎间盘髓核细胞的活力和髓核 II 型胶原及蛋白多糖 mRNA 的表达; 于培养前和培养 14d 时用免疫组化方法观察髓核蛋白多糖、II 型胶原和基质金属蛋白酶 3(MMP-3)的表达。**结果:**取材后培养前髓核细胞的荧光强度最高; 在体外培养 7d, 3 组髓核细胞的荧光强度较培养前变化均不明显, 3 组之间无显著性差异($P>0.05$); 培养 14d 时 A、B、C 组荧光强度较培养前分别降低约 19%、22% 和 30%, 与培养前比较差异均有显著性($P<0.05$), 其中 C 组与 A、B 两组比较有显著性差异($P<0.05$), A、B 两组比较差异无显著性($P>0.05$)。免疫组织化学观察显示在培养 14d 时 3 组髓核蛋白多糖和 II 型胶原的染色强度与培养前比较均有所降低, MMP-3 阳性染色增加, 蛋白多糖、II 型胶原和 MMP-3 染色强度的变化以 C 组最为明显。3 组髓核细胞 II 型胶原和蛋白多糖 mRNA 的表达在培养 7d 和 14d 时均较培养前显著降低($P<0.05$), 其中 7d 时 3 组之间无显著性差异($P>0.05$), 14d 时 A、B 两组间无显著性差异($P>0.05$), C 组与 A、B 组比较有显著性差异($P<0.05$)。**结论:**降低体外培养大鼠椎间盘上下软骨终板的通透性, 可在短期内影响髓核细胞的生物学特性, 加速椎间盘的退变。

【关键词】椎间盘退变; 器官培养模型; 营养通路; 终板; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.07.16

中图分类号: R364.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-07-0597-06

Effect of vertebral endplates' permeability on the biologic characters of rat nucleus pulposus cells cultured in vitro NIU Pengyan, XIONG Wei, LI Feng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(7): 597~602

【Abstract】 Objective: To observe the effect of vertebral endplates' permeability on the biologic characters of rat nucleus pulposus cells cultured in vitro. **Method:** Lumbar intervertebral discs, plus adjacent vertebral endplates, were harvested from 20 male Sprague-Dawley (SD) rats (4 weeks old, $n=6/\text{animal}$). The intervertebral discs were randomly divided into three groups: control group (group A), superior endplate blocked with bone wax (group B), and superior and inferior endplates blocked with bone wax (group C), all specimens were cultured in vitro. The cell viability, the expression of mRNA of collagen II and aggrecan were assessed by using Mitotracker Green probe and RT-PCR before culturing and on the 7th and 14th days after culturing. The expression of collagen II, aggrecan and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) were assessed by using immunohistochemistry staining methods before culturing and the 14th day after culturing. **Result:** The fluorescence intensity of fresh intervertebral disc was the maximum. There was no significant difference with respect to fluorescence intensity between three groups and fresh disc on the 7th day ($P>0.05$), and no significant difference was found among three groups ($P>0.05$). There was a significant decrease with respect to fluorescence intensity between three groups (group A: 19%, group B: 22%, group C: 30%) and fresh disc on the 14th day ($P<0.05$). A

基金项目: 湖北省自然科学基金一般项目 (编号: 2009CDB131)

第一作者简介: 男 (1981-), 硕士研究生, 研究方向: 脊柱外科 (现工作于湖北省宜昌市第一人民医院)

电话: (027) 83663412 E-mail: jack291@yahoo.cn

通讯作者: 熊伟 E-mail: bearxwcjcx@gmail.com

significant downregulated mRNA expression of collagen II and aggrecan in three groups on the 7th and 14th days was noted ($P<0.05$). No significant difference was found among three groups on the 7th day and between group A and B on the 14th day ($P>0.05$), but for group C, significant difference was noted compared with group A and B on the 14th day ($P<0.05$). **Conclusion:** Decreasing the permeability of bilateral vertebral endplates of rat intervertebral discs cultured in vitro can accelerate disc degeneration through affecting the biologic characters of nucleus pulposus cells in the short term.

【Key words】 Disc degeneration; Organ culture model; Nutritional pathway; Endplate; Rat

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China

椎间盘退变作为腰背痛的常见病因之一,其发病机制尚不明确,椎间盘营养供应受损可能在椎间盘退变的病理生理机制中发挥重要作用^[1]。动物模型常被用于研究椎间盘退变的病理生理机制和探索相关的治疗方法。体外椎间盘器官培养模型能够较好地调控机械力学和化学因素作用的临界条件^[2],而且相对接近生理条件,正逐渐成为活体动物模型的一种重要的替代模型。本研究旨在观察软骨终板通透性对体外培养大鼠髓核细胞生物学特性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

骨形成蛋白 7 (BMP7/OP-1) (PeproTech), 线粒体绿色荧光探针 (Mitotracker Green, Molecular Probes), 兔抗鼠 II 型胶原单克隆抗体 SP 免疫组织化学试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司), 兔抗鼠蛋白多糖多克隆抗体 (Sigma), 基质金属蛋白酶 3 (MMP-3) 多克隆抗体 (Santa Cruz), Trizol、逆转录试剂盒 (Invitrogen)。Eppendorf PCR 扩增仪, Biorad 凝胶图像分析系统, Nikon 倒置相差显微镜, OLYMPUS 激光共聚焦显微镜。

1.2 椎间盘的取材及培养

4 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 220~240g, 共 20 只 (华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)。戊巴比妥钠 (100mg/kg) 腹腔注射处死, 立即在无菌条件下将大鼠胸腰段脊柱整段取出, 在解剖显微镜下 ($\times 10$) 下完整切取腰椎间盘 ($n=6$ /只), 包括髓核、纤维环及上下软骨终板。用无菌注射器吸取含肝素的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 冲洗椎间盘表面的碎屑及终板上的血凝块后, 将椎间盘放入含 10% 青霉素-链霉素 (1000U/ml 青霉素, 1mg/ml 链霉素) 的高渗 HBSS 中漂洗 2min。将切取的椎间盘随机分为 3 组, 其

中 A 组为正常对照组, B 组椎间盘上软骨终板用骨蜡封闭, C 组椎间盘上、下软骨终板均用骨蜡封闭。将 3 组椎间盘放入 12 孔细胞培养板, 加入 DMEM/F12 培养基 (含 20% 胎牛血清, 5ng/ml OP-1, 25 μ g/ml 抗坏血酸以及 50 μ g/ml 庆大霉素)。置 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱进行整体培养, 每 3d 更换一次培养液。用 NaCl 将培养基渗透压调整到 410mOsm/kg^[2]。

1.3 细胞活力测定

分别在培养前和培养 7d、14d 时, 3 组各取 5 个椎间盘用 HBSS 漂洗 2 次后, 放入已加入 Mitotracker Green (Molecular Probes, Eugene, OR) (5 μ mol/L) 的无血清培养基中, 在 37℃ 共孵育 20min。将椎间盘放入不含荧光染料的新鲜培养基中孵育 20min, 以除去未结合的荧光染料。在解剖显微镜下用尖刀切开椎间盘纤维环, 用无菌小刮匙将髓核刮出, 浸入载玻片上的 HBSS (50 μ l) 中, 盖上盖玻片, 用激光共聚焦显微镜 (激发波长为 488nm) 进行观察并定量荧光染色强度^[3]。

1.4 蛋白多糖、II 型胶原和 MMP-3 表达的检测

分别在培养前和培养 14d 时, 3 组各取 5 个椎间盘, 用 4% 多聚甲醛固定过夜, 乙烯二胺四乙酸钠 (EDTA) 脱钙液脱钙后行石蜡包埋、正中矢状位切片, 片厚 4 μ m, 脱蜡至蒸馏水。每个椎间盘取 9 张包含髓核区域的切片, 采用常规免疫组化 SP 法进行染色, 检测蛋白多糖、II 型胶原和 MMP-3 的表达情况。免疫组织化学染色步骤按试剂盒说明进行。PBS 代替一抗作阴性对照。蛋白多糖、II 型胶原和 MMP-3 的阳性表达, 以髓核组织内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性染色, 苏木素复染后胞核为蓝色。

1.5 蛋白多糖、II 型胶原 mRNA 的检测

分别在培养前和培养 7d、14d 时, 3 组各取 5 个椎间盘, 在解剖显微镜下 ($\times 10$) 切开椎间盘纤

维环,将髓核取出,应用 Trizol 法分别提取髓核的总 RNA。各取 1 μ g RNA 样品用逆转录试剂盒(Toyobo 公司)将 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。根据 Gene Bank 的资料设计 II 型胶原、蛋白多糖和内参 GAPDH 的引物序列(表 1)。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 60s, 55 $^{\circ}$ C 退火, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。RT-PCR 产物经含溴化乙锭的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统拍照、测定灰度值并计算相对强度。

表 1 RT-PCR 检测中相关基因的引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)
II 型胶原	上游 5' -TCCTAAGGGTGCCAATGGTGA-3'	112bp
	下游 5' -GGACCAACTTTGCCTTGAGGAC-3'	
蛋白多糖	上游 5' -GGGTGAGGTCTTTTATGCCA-3'	276bp
	下游 5' -GCTTTGCAGTGAGGATCACA-3'	
GAPDH	上游 5' -AGAACATCATCCCTGCATCC-3'	398bp
	下游 5' -TTACTCCTTGAGGCCATGT-3'	

1.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计学软件, 两组数据比较用 t 检验, 多组数据两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

Mitotracker Green 荧光测定结果显示, 新鲜取材的大鼠椎间盘髓核细胞的数量及活力较好, 表现出较高的荧光强度(图 1a)。体外培养 7d, 3 组椎间盘髓核细胞的荧光强度较培养前变化均不明显(图 1b~d)。14d 时 3 组髓核细胞荧光强度均明显降低, 其中 A、B 组荧光强度相近(图 1e、f), C 组荧光强度下降最为明显, 较培养前、同时时间点 A 组和 B 组均下降(图 1g)。3 组髓核细胞不同时间点 Mitotracker Green 荧光定量测定结果见表 2, 体外培养 7d 时 A、B、C 3 组荧光强度较培养前无明显降低, 3 组之间无显著性差异($P > 0.05$); 培养 14d 时, A、B、C 组的荧光强度较培养前分别降低约 19%、22% 和 30%, 与培养前比较差异有显著性

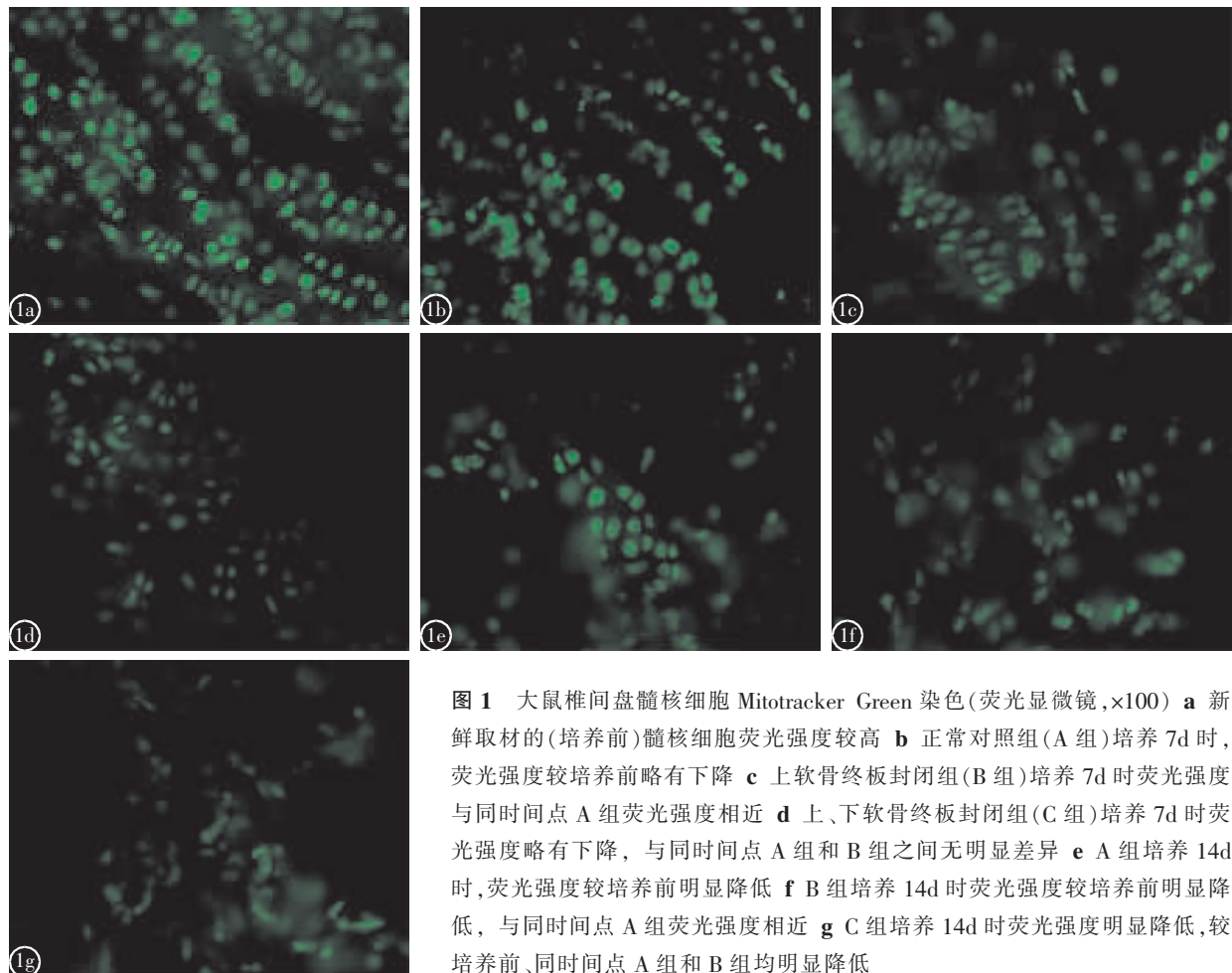


图 1 大鼠椎间盘髓核细胞 Mitotracker Green 染色(荧光显微镜, $\times 100$) a 新鲜取材的(培养前)髓核细胞荧光强度较高 b 正常对照组(A 组)培养 7d 时, 荧光强度较培养前略有下降 c 上软骨终板封闭组(B 组)培养 7d 时荧光强度与同时时间点 A 组荧光强度相近 d 上、下软骨终板封闭组(C 组)培养 7d 时荧光强度略有下降, 与同时时间点 A 组和 B 组之间无明显差异 e A 组培养 14d 时, 荧光强度较培养前明显降低 f B 组培养 14d 时荧光强度较培养前明显降低, 与同时时间点 A 组荧光强度相近 g C 组培养 14d 时荧光强度明显降低, 较培养前、同时时间点 A 组和 B 组均明显降低

表 2 不同时间点 3 组髓核细胞 Mitotracker Green 染色荧光强度值 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

	A组	B组	C组
培养前	11496±398	11496±398	11496±398
培养 7d 时	10492±609	10467±348	10382±368
培养 14d 时	9311±379 ^①	8966±306 ^①	8047±872 ^{①②}

注: A 组, 正常对照组; B 组, 上终板封闭组; C 组, 上、下终板封闭组。①与培养前比较 $P<0.05$; ②与 A 组、B 组同时时间点比较 $P<0.05$

($P<0.05$), C 组与 A、B 组比较有显著性差异 ($P<0.05$), A、B 两组比较差异无显著性 ($P>0.05$)。

体外培养前椎间盘髓核呈凝胶样外观, 髓核细胞胞核明显, 呈“巢居”现象, 蛋白多糖和Ⅱ型胶原在髓核细胞周边区域有较强的棕黄色阳性表达(图 2a, 3a)。随着培养时间的延长, 髓核细胞数量开始减少, 在髓核区域则出现了增生的纤维结缔组织。体外培养 14d 时, 髓核仍呈凝胶样外观, A 组和 B 组细胞数较培养前有所减少, 蛋白多糖染色强度减弱(图 2b、c), 但不如 C 组减弱明显; C 组髓核细胞数减少, 蛋白多糖在髓核基质中的表达明显减弱(图 2d)。Ⅱ型胶原在 3 组髓核区域的表达均有所减弱, 但相对蛋白多糖仍然较强, 其中在 B 组和 C 组髓核的增生的结缔组织中也较强表达(图 3b~d)。MMP-3 阳性染色主要位于髓核细胞胞浆中, 在培养前髓核细胞中 MMP-3 的阳性染色很弱(图 4a); 培养 14d 时, 髓核细胞 MMP-3 阳性染色显著增加(图 4b、c), 其中 C 组几乎所有髓核细胞都表现为 MMP-3 阳性染色, 髓核区域因细胞质显著减少而被压缩(图 4d)。

在培养过程中, 各时间点 3 组大鼠椎间盘髓核Ⅱ型胶原和蛋白多糖的 mRNA 表达均较新鲜取材的椎间盘出现明显下降($P<0.05$)。体外培养 7d 时, A 组髓核蛋白多糖 mRNA 的表达水平非常低, 而Ⅱ型胶原 mRNA 的表达相对蛋白多糖仍较明显, 3 组之间无显著性差异 ($P>0.05$); 14d 时, 3 组髓核Ⅱ型胶原和蛋白多糖 mRNA 的表达较培养前和培养 7d 时明显下降($P<0.05$), A 组和 B 组之间无显著性差异 ($P>0.05$), C 组较 A 组和 B 组显著降低($P<0.05$)(表 3)。

3 讨论

椎间盘是人体内最大的无血管组织, 其营养主要依靠软骨终板通路和纤维环外周通路供应, 其中软骨终板通路是营养成分到达椎间盘的主要

表 3 不同时间点 3 组髓核组织基质蛋白 mRNA 表达的相对强度 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

	培养前	培养 7d 时	培养 14d 时
Ⅱ型胶原	1.42±0.12		
A 组		0.45±0.06 ^①	0.36±0.04 ^{①②}
B 组		0.40±0.10 ^①	0.32±0.08 ^{①②}
C 组		0.34±0.18 ^①	0.18±0.02 ^{①②③}
蛋白多糖	1.36±0.04		
A 组		0.28±0.08 ^①	0.14±0.02 ^{①②}
B 组		0.22±0.06 ^①	0.10±0.01 ^{①②}
C 组		0.15±0.02 ^①	0.04±0.08 ^{①②③}

注: ①与培养前比较 $P<0.05$; ②与培养 7d 时比较 $P<0.05$; ③与 A 组、B 组同时时间点比较 $P<0.05$

途径, 血管内的营养物质经软骨终板渗透入椎间盘, 营养髓核和内层纤维环^[4, 5]。影响椎间盘营养供应的因素包括血管、软骨终板、机械负荷、细胞和基质等因素。其中任何影响椎间盘软骨终板通透性的因素, 如吸烟^[6, 7]、血管疾病或血管缺乏、软骨终板的钙化或损伤等均可间接或直接损伤软骨终板的通透性, 从而使椎间盘营养受损导致椎间盘退变^[8]。

为了进一步研究软骨终板通透性在维持椎间盘微环境稳定性中的作用, 我们建立了大鼠椎间盘器官培养模型, 并利用骨蜡封闭椎间盘上软骨终板或上、下软骨终板, 降低其通透性, 以部分或完全阻断营养成分或代谢产物在该通路中的运输, 检测该模型在体外培养过程中髓核细胞生物学特性的变化。虽然软骨终板可以限制组织膨胀为髓核细胞保留更多的生理学环境, 但也限制了更好地为髓核细胞提供养分。因此, 我们取出椎间盘后立即放入含肝素的高渗液中冲洗, 以防止动物死后毛细血管芽被血凝块堵塞而影响通过软骨终板对椎间盘的正常营养供应和液体流通, 这对维持椎间盘的正常营养供应、机械力学性能和细胞活性可能是必需的^[9]。体内外研究结果均表明 OP-1 可以促进椎间盘细胞合成蛋白多糖和胶原, 增加基质中蛋白多糖的含量, 恢复退变椎间盘的高度和生物力学特性^[10, 11]。所以我们在培养基中添加了 OP-1, 并将血清浓度提高到 20%, 用来维持髓核细胞正常的生物合成活力和椎间盘器官培养模型在体外的培养时间。同时, 我们将培养基的渗透压提高到 410mOsm/kg, 因为我们的相关研究结果显示高渗透性负荷所模拟的力学负荷更接近于椎间盘在体内所处的力学环境, 而且还可以限

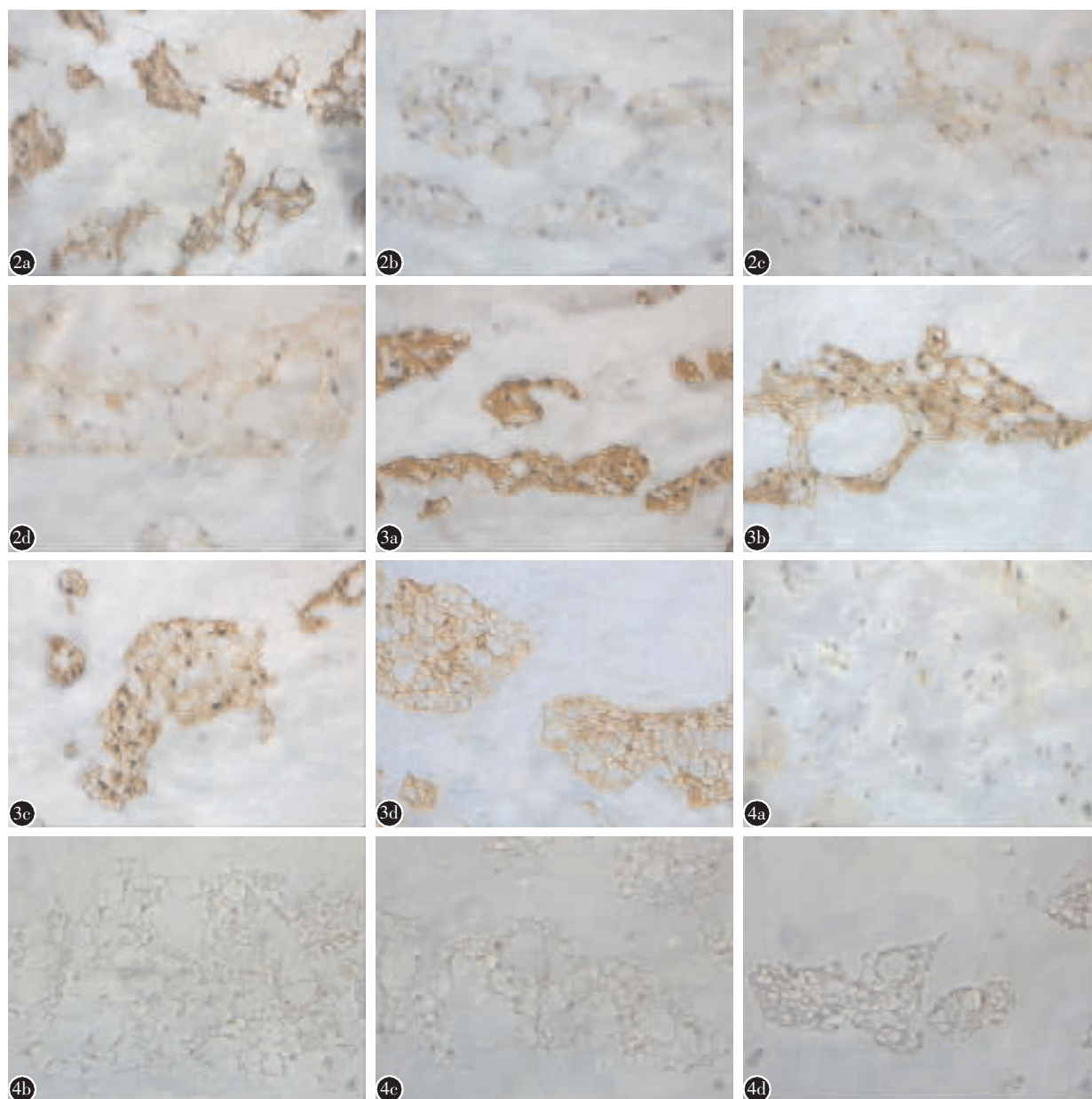


图 2 髓核蛋白多糖免疫组化染色结果($\times 40$) **a** 新鲜取材的大鼠椎间盘髓核组织中髓核细胞数量较多,蛋白多糖有较强的阳性表达(黄褐色) **b** A 组培养 14d 时,髓核细胞数目较培养前有所减少,蛋白多糖染色强度减弱 **c** B 组培养 14d 时,髓核细胞数目较培养前有所减少,髓核区域出现了少量增生的纤维结缔组织,蛋白多糖染色强度减弱,与同时时间点 A 组椎间盘染色强度相近 **d** C 组培养 14d 时,髓核细胞数目较培养前减少,髓核区域出现了大量增生的纤维结缔组织,蛋白多糖染色强度较 A、B 组椎间盘显著下降 **图 3** 椎间盘髓核 II 型胶原免疫组化染色结果($\times 40$) **a** 新鲜取材的大鼠椎间盘髓核组织中髓核细胞数量较多,II 型胶原染色强度较高 **b** A 组培养 14d 时,髓核细胞数目较培养前有所减少,II 型胶原染色强度较培养前有所减弱,但仍然较强 **c** B 组培养 14d 时,髓核细胞数目较培养前有所减少,髓核区域出现了少量增生的纤维结缔组织,II 型胶原染色强度减弱,但仍较高 **d** C 组培养 14d 时,髓核细胞数目较培养前减少,II 型胶原染色强度减弱,在髓核组织中大量增生的纤维结缔组织中也有表达 **图 4** 髓核 MMP-3 免疫组化染色结果($\times 40$) **a** 新鲜取材的大鼠椎间盘髓核组织中髓核细胞数量较多,MMP-3 的阳性表达较弱 **b** A 组培养 14d 时,髓核细胞数目较培养前有所减少,MMP-3 染色强度较培养前有所增强 **c** B 组培养 14d 时,髓核细胞数目较培养前有所减少,髓核区域出现了少量增生的纤维结缔组织,MMP-3 染色强度增加,与同时时间点 A 组椎间盘染色强度相近 **d** C 组培养 14d 时,髓核细胞数目较培养前减少,髓核区域出现了增生的纤维结缔组织,MMP-3 表达较强

制椎间盘膨胀^[12]。

本研究结果显示 3 组椎间盘在体外培养 7d 时髓核细胞的荧光强度较培养前变化均不明显,表明短期内营养供应受限对体外培养大鼠椎间盘的影响不大;但随着营养供应受限时间的延长,髓核细胞的活力和数量较培养前明显下降,髓核荧光强度明显下降,尤其是 C 组椎间盘。3 组椎间盘在培养 14d 时荧光强度较培养前均显著降低,与我们之前的相关研究结果^[12]一致。Junger 等^[13]在体外模拟生理负荷培养羊椎间盘(包括邻近终板)时也发现椎间盘器官培养模型营养供应受限(低糖培养)可使椎间盘细胞活力在短期内明显下降。本研究中, B 组椎间盘较 A 组椎间盘变化不明显,可能与未封闭的下软骨终板代偿相关,但其代偿能力的大小需进一步研究。

基质金属蛋白酶(MMPs)对椎间盘基质的降解起主要作用,其中 MMP-3 可以直接降解细胞外基质成分,并能通过激活其他潜在的 MMPs 来间接影响细胞外基质的降解^[14]。最近临床研究发现随着椎间盘退变程度的增加, MMP-3 的表达逐渐增强^[15]。本研究中随着培养时间的延长,髓核细胞 MMP-3 阳性染色增加,尤其是 C 组培养 14d 时几乎所有的髓核细胞都表现为 MMP-3 阳性染色。随着 MMP-3 形成的增多,蛋白多糖和 II 型胶原的表达也不断减弱。

同样, RT-PCR 检测结果也显示随着培养时间的延长 II 型胶原和蛋白多糖 mRNA 的表达均出现了下降,尤其是 C 组椎间盘;其中 II 型胶原 mRNA 表达的下降不如蛋白多糖明显。

综上所述,大鼠椎间盘在体外培养过程中,阻断椎间盘上软骨终板通路的营养供应后,髓核细胞活力及相关基质的表达较正常对照组无显著变化,这可能与下软骨终板通路的代偿相关;但阻断其上、下软骨终板营养供应通路,在短期内(14d)即可影响髓核细胞的生物学特性,加速椎间盘的退变。

4 参考文献

1. Urban JP, Smith S, Fairbank JC. Nutrition of the intervertebral disc[J]. Spine, 2004, 29(23): 2700-2709.
2. Lee CR, Iatridis JC, Poveda L, et al. In vitro organ culture of the bovine intervertebral disc: effects of vertebral endplate and

potential for mechanobiology studies [J]. Spine, 2006, 31(5): 515-522.

3. Risbud MV, Izzo MW, Adams CS, et al. An organ culture system for the study of the nucleus pulposus: description of the system and evaluation of the cells [J]. Spine, 2003, 28(24): 2652-2659.
4. Brodin H. Paths of nutrition in articular cartilage and intervertebral discs[J]. Acta Orthop Scand, 1955, 24(3): 177-183.
5. Holm S, Maroudas A, Urban JP, et al. Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism [J]. Connect Tissue Res, 1981, 8(2): 101-119.
6. Fogelholm RR, Alho AV. Smoking and intervertebral disc degeneration[J]. Med Hypotheses, 2001, 56(4): 537-539.
7. Oda H, Matsuzaki H, Tokunashi Y, et al. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model[J]. J Orthop Sci, 2004, 9(2): 135-141.
8. Benneker LM, Heini PF, Alini M, et al. 2004 Young Investigator Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(2): 167-173.
9. Gantenbein B, Grunhagen T, Lee CR, et al. An in vitro organ culturing system for intervertebral disc explants with vertebral endplates: a feasibility study with ovine caudal discs[J]. Spine, 2006, 31(23): 2665-2673.
10. Masuda K, Imai Y, Okuma M, et al. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model[J]. Spine, 2006, 31(7): 742-754.
11. An HS, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits[J]. Spine, 2005, 30(1): 25-32.
12. 牛朋彦, 熊伟, 李锋, 等. 渗透压负荷对兔椎间盘器官培养模型的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2009, 19(10): 729-734.
13. Junger S, Gantenbein-Ritter B, Lezuo P, et al. Effect of limited nutrition on in situ intervertebral disc cells under simulated-physiological loading[J]. Spine, 2009, 34(12): 1264-1271.
14. Yurube T, Nishida K, Suzuki T, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-3 gene up-regulation in a rat tail compression loading-induced disc degeneration model [J]. J Orthop Res, 2010, 28(8): 1026-1032.
15. Zigouris A, Batistatou A, Alexiou GA, et al. Correlation of matrix metalloproteinases-1 and -3 with patient age and grade of lumbar disc herniation [J]. J Neurosurg Spine, 2011, 14(2): 268-272.

(收稿日期: 2011-02-09 末次修回日期: 2011-05-25)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)