

应用纤连蛋白片段建立椎间盘退变动物模型

王 娜¹, 吴成爱¹, 赵丹慧¹, 田 伟², 肖 斌², 黎广平¹, 江晓舟², 陶剑锋¹

(1 北京市创伤骨科研究所 100035 北京市; 2 北京积水潭医院 100035 北京市)

【摘要】目的:探讨应用 N 端 30kDa 纤连蛋白片段(Fn-f)建立模拟人类椎间盘退变规律的椎间盘退变动物模型的可行性,为椎间盘退变的防治提供实验模型及实验依据。**方法:**选取雄性 6 月龄新西兰大白兔 28 只,麻醉后使用 30G 微量注射针和微量注射器,在透视引导下经皮将 25 μ l 1.5 μ mol/L Fn-f(Fn-f 组)或 25 μ l 磷酸缓冲液(PBS, 0.01mol/L, pH 值 7.2; PBS 组)随机分别注射入不同节段的腰椎间盘中心区。分别于注射 4、8、12、16 周后获取椎间盘,对椎间盘进行组织学检测(HE、Masson 三色及番红 O 染色),并以 RT-PCR 法对椎间盘聚集蛋白聚糖和 II 型胶原的基因表达水平进行分析。**结果:**与注射 PBS 椎间盘相比,注射 Fn-f 椎间盘造模后 4 周时椎间盘的髓核、纤维环结构以及胞外基质蛋白聚糖等无明显差别;8 周时髓核细胞数量减少、细胞簇状分布,被胞外基质分隔开来,纤维环层状结构排列部分出现紊乱,蛋白聚糖染色变浅;12 和 16 周时髓核细胞数量明显减少,细胞变圆,呈明显的成簇聚集分布,纤维环排列明显不规整,各层间出现裂隙,甚至断裂,蛋白聚糖染色明显变浅,甚至部分未见染色。Fn-f 组椎间盘聚集蛋白聚糖 mRNA 表达水平在 8、12 和 16 周 3 个时间点均明显低于 PBS 组($P<0.05$); II 型胶原 mRNA 表达水平在 12 和 16 周时明显低于 PBS 对照组($P<0.05$)。**结论:**透视引导下兔椎间盘内注射 N 端 30kDa Fn-f 可诱导椎间盘产生渐进性退行性病变,该法建立的动物模型可作为研究椎间盘退变的发病机制及防治的实验模板。

【关键词】椎间盘退变;动物模型;纤连蛋白片段;大白兔

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.01.11

中图分类号: R332, R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-01-0047-07

Experimental intervertebral disc degeneration induced by fibronectin fragment in rabbit/WANG Na, WU Cheng'ai, ZHAO Danhui, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(1): 47-53

【Abstract】 Objectives: To investigate the feasibility of establishing an experimental animal model by using N-terminal fibronectin fragment (Fn-f) which induces the pathologic hallmarks of human intervertebral disc degeneration, and to facilitate the investigations of intervertebral disc degeneration. **Methods:** 25 μ l of 1.5 μ mol/L Fn-f or phosphate buffered saline (PBS) was injected into the central region of isolated lumbar discs in 28 male New Zealand white rabbits of six-month-old under a percutaneous X-guided by using a microsyringe with a 30-gauge needle. Euthanasia was performed at 4-, 8-, 12-, and 16-week, and the histology and gene expression of disc tissue was tested. **Results:** Histology studies revealed a progressive loss of the normal architecture of the nucleus pulposus(NP) and annulus fibrosus(NF) after injecting Fn-f during 16 weeks compared with PBS injected discs. The pathological sections of the NP region in Fn-f-treated discs at the 4th week showed plenty of nuclear cells clumped loosely with uniform distribution. And rich extracellular matrix was evidenced. At the 8th week, the number of nuclear cells decreased and clustered. At the 12th and 16th week, the Fn-f injected discs showed decreased nuclear cells number and proteoglycan matrix. The NP cells became rounded and clustered. The AF region of the Fn-f-treated discs demonstrated progressive loss of the normal lamellar organization and breakage. Significantly down-regulated expression of aggrecan gene in the Fn-f-treated discs was evidenced at the 8th week, 12th week and 16th week, and the expression of type-II collagen gene in Fn-f-treated discs was significantly down-regulated at the 12th week and 16th week compared with PBS treated control discs. **Conclusions:** 30 kDa of N-terminal Fn-f injection into the central region of rabbit discs results in slowly progressive intervertebral disc degeneration, which is similar to

基金项目:国家科技支撑计划项目课题(编号:2012BA110B02),国家自然科学基金(编号:30973037)

第一作者简介:女(1977-),医学硕士,助理研究员,研究方向:骨科基础研究

电话:(010)58516158 E-mail:lodestarwn@yahoo.com.cn

通讯作者:田伟 E-mail:tianweia@163bj.com

that observed in human disc degeneration and can be used for further study.

[Key words] Intervertebral disc degeneration; Animal model; Fibronectin fragment; White rabbits

[Author's address] Beijing Institute of Traumatology and Orthopedics, Beijing, 100035, China

随着社会老龄化及职业特点的转型,椎间盘退行性病变的患病群体不断扩大,发病呈低龄化和职业化趋势,严重影响患者的生活质量,给社会及家庭造成经济损失^[1,2]。简单可靠的动物模型不仅能为深入探寻椎间盘退变的发病机制及病理过程提供良好的实验模板,而且能对新的治疗手段和治疗药物进行有效筛选及准确评估。椎间盘退变是一个多因素参与的复杂过程,动物模型的制备已有近 80 年的历史,但至今尚无公认的理想椎间盘退变动物模型。本研究采用 N 端 30kDa 纤连蛋白片段(Fn-f),在透视引导下注入兔椎间盘内,旨在建立一种能够更好地模拟人类椎间盘退变规律的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器

6 月龄雄性新西兰大白兔共 28 只,体重 2.5kg 左右,由北京市实验动物研究中心提供。主要试剂:N 端 30kDa 纤连蛋白片段(30kDa Fibronectin Proteolytic Fragment,Fn-f;Sigma),RNA 提取试剂盒(RNeasy kit,Qiagen),反转录试剂盒(Promega),PCR 试剂盒(Sigma),苏木素-伊红(HE)、Masson 三色及番红 O 染色套装(贝索生物技术有限公司),引物合成委托北京华大基因公司完成。主要仪器:分光光度计(Eppendorf),PCR 仪(Eppendorf),低温高速离心机(Sigma),30G 微量注射针及微量注射器(Hamilton)。

1.2 动物模型建立

将新西兰大白兔随机分为 4 组,每组 7 只。常规备皮后采用氯氨酮 50mg/kg、安定 5mg/kg 联合肌肉注射进行麻醉。麻醉后使用 21G 普通注射针作为引导针,从椎间盘后外侧方向进针,经皮肤、肌肉达椎旁间盘水平。在透视引导下将带有微量注射器的 30G 针穿过 21G 引导针缓慢刺破纤维环,到达椎间盘中心区(图 1)。正侧位透视均显示 30G 针进入位置满意后,将 25 μ l 1.5 μ mol/L N 端 30kDa Fn-f 注射入兔腰椎间盘内(Fn-f 组),同样体积的 0.01mol/L pH 值 7.2 的磷酸缓冲液(PBS)作为对照(PBS 组)。每只兔选择 L1~L5 水平的 4

个椎间盘,间隔 1~2 个椎间盘随机分别注入 Fn-f 或 PBS。

1.3 兔椎间盘的组织学分析

分别于造模后 4、8、12、16 周时分批处死兔,每个时间点 3 只,分离获取完整椎间盘。将椎间盘置于 4%多聚甲醛中固定 24h,于 0.5mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA,pH 值 7.4)中 4℃脱钙 4 周。椎间盘常规脱水,石蜡包埋、8 μ m 连续横断面切片。挑选其中髓核与纤维环较完整的切片,每个标本取 3 张以上的切片分别进行 HE、Masson 三色及番红 O 染色。

1.4 兔椎间盘聚集蛋白聚糖和 II 型胶原基因表达的测定^[3]

分别于造模后 4、8、12、16 周时分批处死兔,每个时间点 4 只,分离获取完整椎间盘。将椎间盘周围的其他组织小心剔除后,液氮快速冷冻后研磨成粉。使用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,测定 OD260nm 值进行定量,每个椎间盘共提取 40 μ g 左右总 RNA。每个椎间盘取 1 μ g 使用反转录试剂盒进行反转录,反转录产物 cDNA 作为 PCR 扩增模板。用 Primer 5 软件设计兔聚集蛋白聚糖和 II 型胶原基因引物,引物序列:II 型胶原为 5'-TACTGGATAGACCCCAACCA-3',3'-TGGTAGGTGATGTTCTGGGA-5';聚集蛋白聚糖为 5'-GAGGTCGTGCTGAAAGGTGT-3',3'-GTGTG-

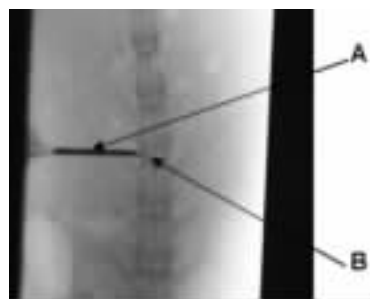


图 1 透视引导下将 Fn-f 或 PBS 注射入兔椎间盘内(A 为 21G 引导针,B 为 30G 微量注射针)

Figure 1 A percutaneous X-guided needle puncture and injection of Fn-f or PBS into the central region of separate lumbar discs using a microsyringe with a 30-gauge needle and 21-gauge needle (A: 21-gauge needle, B:30-gauge needle)

GATGGGGTACCTGAC -5'; GAPDH 为 5'-GGT-GAAGGTCGGAGTGAA -3', 3'-TTCACGCCCAT-CACAAACA-5'。RT-PCR 反应体系: 2×mix PCR 缓冲液 12.5 μl, 上下游引物各 1 μl (10 pmol/μl), cDNA 1 μl, 使用无菌去离子水补足总体积至 25 μl。RT-PCR 反应程序: 预变性 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 50℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 11.0 统计软件分析 Fn-f 实验组和 PBS 对照组基因表达的变化。计量资料以均数±标准差表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P <$

0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学分析

HE 染色结果显示, PBS 组在造模后 4、8 和 12 周时髓核细胞数量多, 呈疏松团状聚集排列, 16 周时可见髓核细胞减少, 部分成簇排列(图 2); Fn-f 组椎间盘 4 周时无明显变化, 8 周开始出现退行性改变, 髓核和纤维环的正常结构渐进性丢失, 16 周时髓核甚至出现了部分坏死(图 3)。

Masson 三色染色结果显示, PBS 组在造模后 4 和 8 周时胶原纤维呈现明显的分层结构, 以规

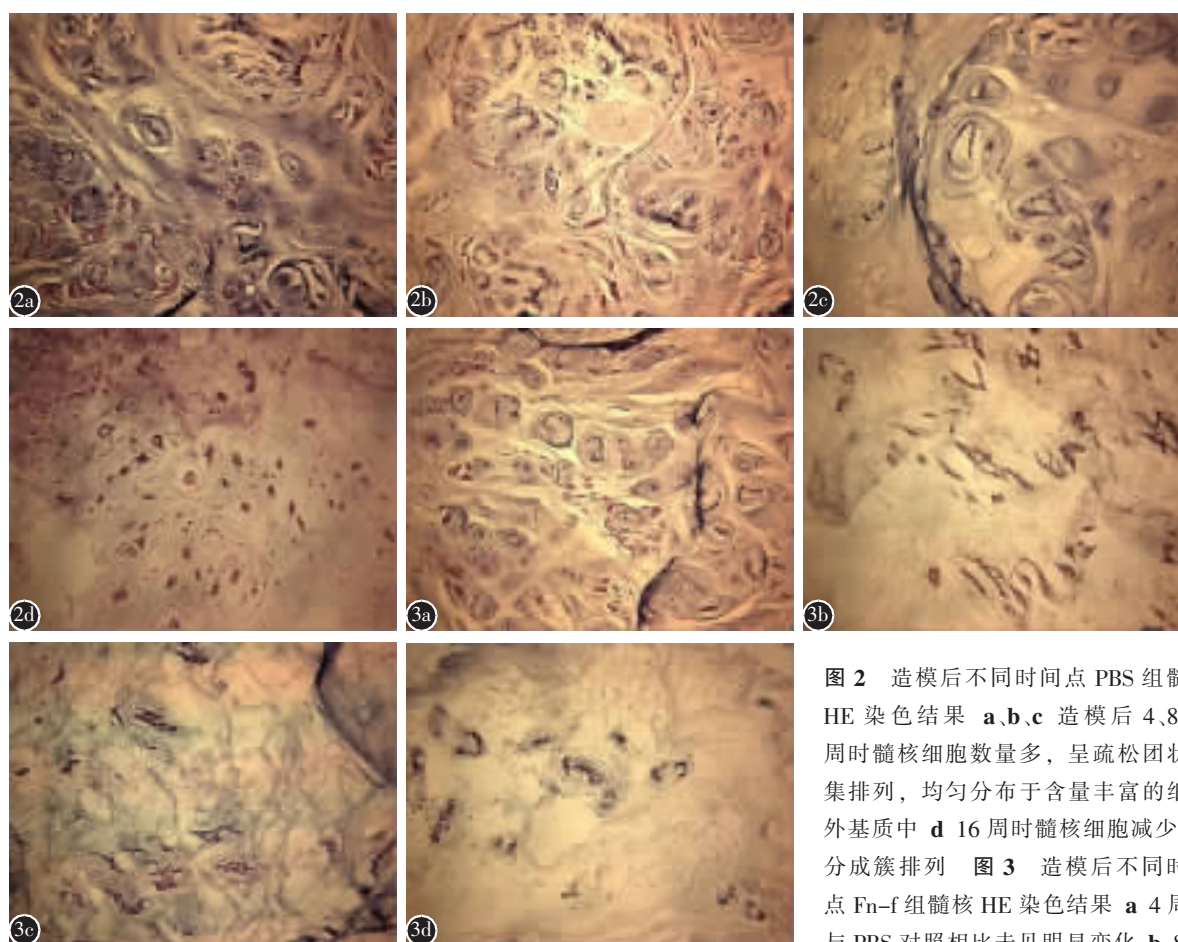


图 2 造模后不同时间点 PBS 组髓核 HE 染色结果 a、b、c 造模后 4、8、12 周时髓核细胞数量多, 呈疏松团状聚集排列, 均匀分布于含量丰富的细胞外基质中 d 16 周时髓核细胞减少, 部分成簇排列 图 3 造模后不同时间点 Fn-f 组髓核 HE 染色结果 a 4 周时与 PBS 对照相比未见明显变化 b 8 周

时髓核细胞数量减少, 细胞出现簇状分布, 被胞外基质分隔开来 c、d 12 和 16 周时髓核细胞数量明显减少, 细胞变圆, 成簇聚集分布 (×200)

Figure 2 The pathological sections of the disc NP region treated with PBS a, b, c 4, 8 and 12-week time-point, there were plenty of nuclear cells clumped together loosely with uniform distribution, and the rich extracellular matrix d The number of nuclear cells decreased and clustered partially in the 16-week **Figure 3** The pathological sections of the disc NP region treated with Fn-f a At the 4-week, there was no obvious change b At the 8-week time point, there were plenty of nuclear cells clumped together loosely with uniform distribution, and the rich extracellular matrix, the number of nuclear cells was decreased and clustered c, d At the 12- and 16-week time points decreased of nuclear cells was noted, and the NP cell became rounded and clustered(HE ×200)

则整齐的同心圆排列;12 和 16 周时纤维环出现部分排列不规整,但分层结构无破坏(图 4)。而 Fn-f 组 4 周时纤维环排列规整,8 周开始纤维环排列即出现部分紊乱,到 12 和 16 周纤维环排列出现明显错乱,各层间出现裂隙,甚至断裂(图 5)。

番红 O 染色结果显示,PBS 组在造模后 4、8 和 12 周时髓核染色呈均匀的深红色,16 周时染色稍变浅(图 6)。Fn-f 组 4 周时呈深红染色,从 8 周开始染色逐渐变浅,12 和 16 周时染色明显变浅,到 16 周时甚至部分未见染色(图 7)。

2.2 聚集蛋白聚糖和 II 型胶原基因表达

见表 1。Fn-f 组聚集蛋白聚糖 mRNA 表达在

造模后 4 周时与 PBS 组无显著性差异 ($P>0.05$), 8、12 和 16 周时均明显低于 PBS 组 ($P<0.05$); II 型胶原基因表达在 4 和 8 周时与 PBS 组比较无显著性差异 ($P>0.05$), 12 和 16 周则明显低于 PBS 组 ($P<0.05$)。16 周时蛋白聚糖和 II 型胶原基因表达略高于 12 周,出现了略回升的趋势。

3 讨论

椎间盘退行性变是椎间盘突出症和其他腰椎疾患的病理基础,是大多数脊柱疾病发病的主要原因^[4]。尽管国内外学者对椎间盘退变进行了诸多研究,但其发病机制与病理生理过程至今尚未完全阐明,临床治疗效果也不甚理想。椎间盘退变

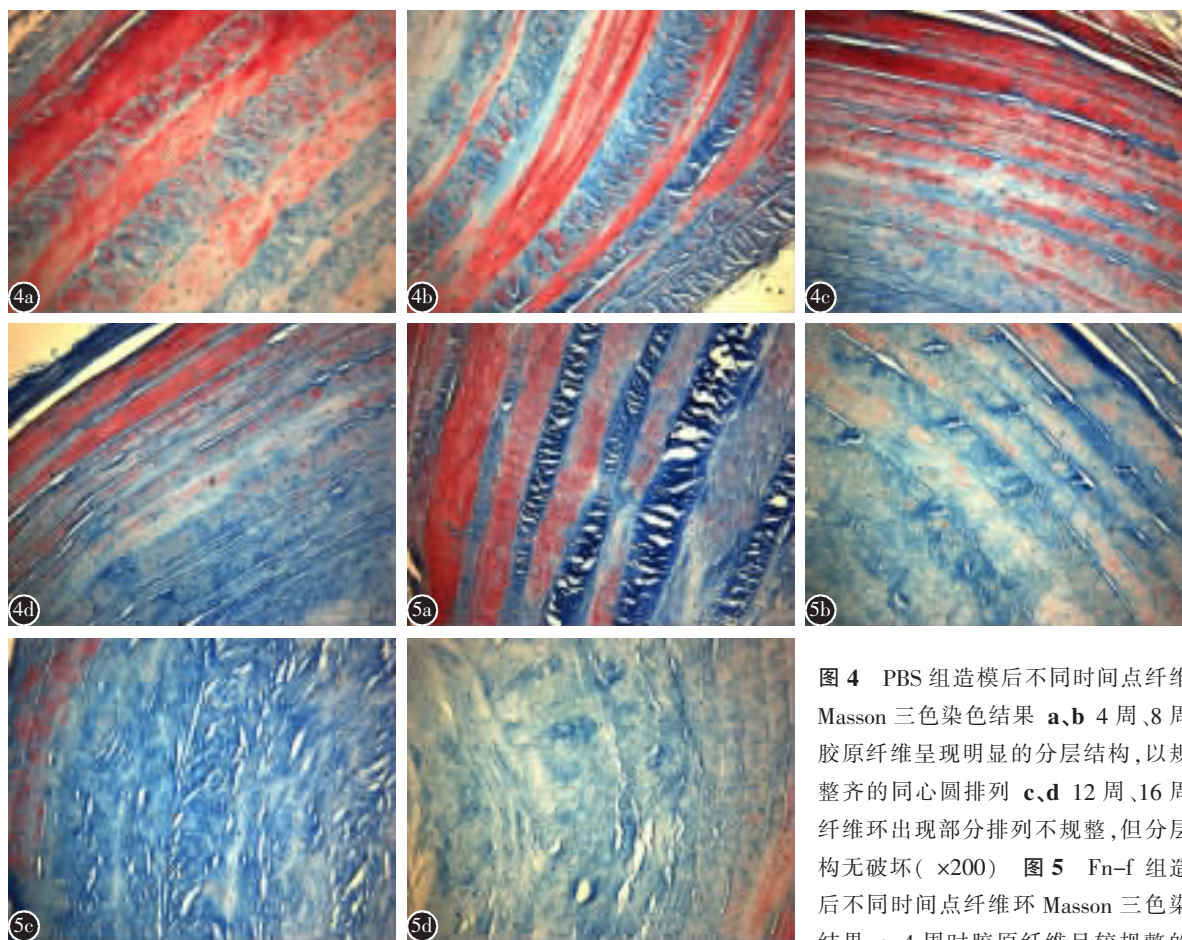


图 4 PBS 组造模后不同时间点纤维环 Masson 三色染色结果 a、b 4 周、8 周时胶原纤维呈现明显的分层结构,以规则整齐的同心圆排列 c、d 12 周、16 周时纤维环出现部分排列不规整,但分层结构无破坏(×200) 图 5 Fn-f 组造模后不同时间点纤维环 Masson 三色染色结果 a 4 周时胶原纤维呈较规整的层状排列,各层间界限清楚 b 8 周时层状结构部分破坏,排列出现轻度紊乱 c、d 12 周、16 周时层状结构破坏,排列出现明显错乱,层间界限模糊并出现裂隙(×200)

状排列,各层间界限清楚 b 8 周时层状结构部分破坏,排列出现轻度紊乱 c、d 12 周、16 周时层状结构破坏,排列出现明显错乱,层间界限模糊并出现裂隙(×200)

Figure 4 The pathological sections of the AF region treated with PBS. There were well-organized collagen lamellae at the 4-week(a), and 8-week(b), and disorganized collagen layers at 12-week(c) and 16-week(d) time points(Masson stain ×200) **Figure 5** The pathological sections of the AF region treated with Fn-f. At the 4-week(a) time points, there was well-organized collagen lamellae with well-defined border. Changes at the 8-week (b) time point showed the collagen layers disorganized partially. At the 12-(c) and 16-week(d) time points, collagen layers were disorganized obviously, and the alignment and formation of the AF were disrupted(Masson stain ×200)

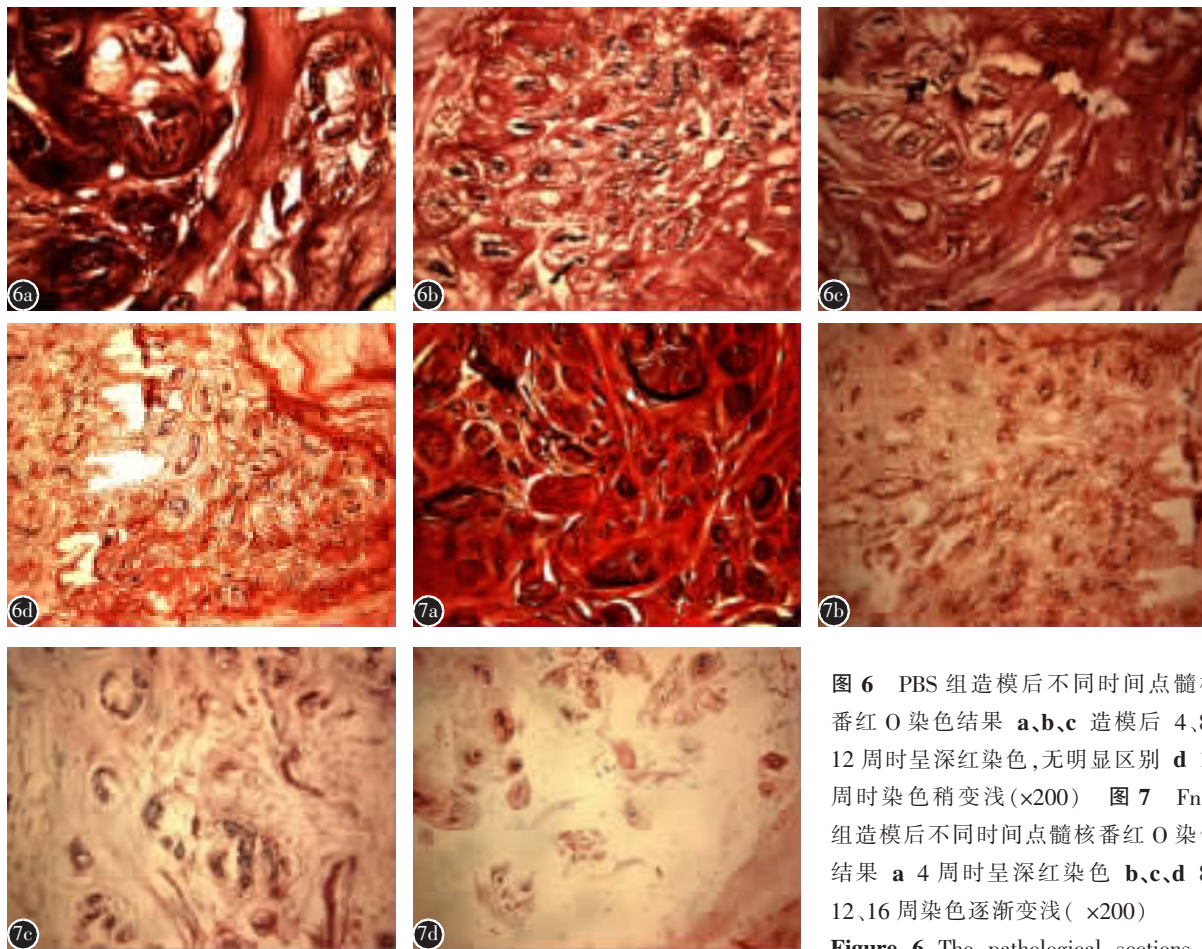


图 6 PBS 组造模后不同时间点髓核番红 O 染色结果 a、b、c 造模后 4、8、12 周时呈深红染色,无明显区别 d 16 周时染色稍变浅($\times 200$) 图 7 Fn-f 组造模后不同时间点髓核番红 O 染色结果 a 4 周时呈深红染色 b、c、d 8、12、16 周染色逐渐变浅($\times 200$)

Figure 6 The pathological sections of

the disc NP region injected with PBS. They were crimson and not distinct obviously in the 4-(a), 8-(b), 12-(c) week, and little hypochromic at the 16-week(d) time points(Safranin O stain, $\times 200$) Figure 7 The pathological sections of the disc NP region injected with Fn-f at 4-(a), 8-(b), 12-(c) and 16-week(d) time points. The staining of the NP showed hypochromic gradually during the 16 weeks time(Safranin O stain, $\times 200$)

表 1 PBS 组和 Fn-f 组聚集蛋白聚糖和 II 型胶原基因表达结果

Table 1 The expression of aggrecan and type II collagen gene at the 4-, 8-, 12-, and 16-week time point by RT-PCR

	聚集蛋白聚糖 Aggrecan		II 型胶原 Type II collagen	
	PBS组 Group of PBS	Fn-f 组 Group of Fn-f	PBS 组 Group of PBS	Fn-f 组 Group of Fn-f
4周 4 week	32.59 $\pm$ 3.18	30.25 $\pm$ 1.05	14.32 $\pm$ 0.80	15.73 $\pm$ 0.50
8周 8 week	30.26 $\pm$ 1.63	14.05 $\pm$ 1.76 ^①	12.57 $\pm$ 2.13	11.35 $\pm$ 1.21
12周 12 week	31.38 $\pm$ 1.71	1.73 $\pm$ 0.68 ^①	7.21 $\pm$ 0.79	1.97 $\pm$ 0.72 ^①
16周 16 week	31.38 $\pm$ 1.06	3.27 $\pm$ 0.10 ^①	8.08 $\pm$ 0.89	2.41 $\pm$ 1.07 ^①

注:①与 PBS 组比较 $P < 0.05$

Note: Compared with the PBS treated control discs, $P < 0.05$,

病程缓慢,单纯的临床研究难以在短时间内获取足够的实验对象,而且还存在药物、遗传、生活习惯等许多非控制性因素的影响,同时所涉及的伦理问题也不容忽视。因此,在实验动物活体内模拟椎间盘退变的发生发展,对动物模型进行相关研究,可为获得椎间盘退变的病因和病理生理机制,探寻新的治疗途径与手段提供实验依据。

制备椎间盘退变动物模型的方法有多种,通过刀切、穿刺以及化学等方法损伤椎间盘自身结构建立的诱发性退变模型目前应用最为广泛^[5,9]。刀切或穿刺损伤椎间盘的方法相对经济^[7,8],但对动物创伤较大,安全性低,且不能反映出椎间盘退变的客观规律^[9]。自化学性髓核溶解术应用于椎间盘突出症的治疗以来,应用化学制剂诱导椎间盘产生退变的化学建模法国内外多见报道。化学

法建模不需要复杂的仪器设备,对动物创伤小,重复性好,而且退变程度可通过控制注射化学药物的剂量来控制,可实现相对缓慢而温和的退变,是目前建立椎间盘退变动物模型最常使用的方法之一^[10,11]。

2000 年 Oegema 等^[12]的研究发现,在退变椎间盘中纤连蛋白增多,且常常以片段存在。Anderson 等^[13]也发现在纤维环穿刺建立的兔椎间盘退变模型中,正常对照椎间盘中几乎无 Fn-f 存在,而纤维环穿刺椎间盘中有 4 倍表达。提示 Fn-f 和椎间盘退变的发生发展可能有一定关系。在此基础上,Anderson 等^[14]将 N 端 30kDa Fn-f 注入兔腰椎间盘中央区,结果显示,注射 30kDa Fn-f 的椎间盘细胞结构和细胞外基质出现破坏,髓核和纤维环的正常结构逐渐丢失,这些渐进性进展结果同在人类椎间盘退变中的发现非常类似。同时有研究者使用 30kDa 的 N 端 Fn-f 对椎间盘细胞进行体外培养,实验结果与体内研究一致^[15,16]。该法建立椎间盘退变模型最大的特点是使用存在于退变椎间盘内的一个生理性分子,能够更好地符合椎间盘退变的生物化学特性,与其他方法相比更接近椎间盘退变的客观规律^[14,17]。

蛋白聚糖和胶原是髓核细胞外基质中最重要的组成部分,其含量和组成与椎间盘的生物力学特性密切相关。聚集蛋白聚糖是椎间盘蛋白聚糖中最重要的一种,对保持椎间盘一定量的水分以承受压力负荷中起着至关重要的作用^[18]。Ⅱ型胶原在正常髓核胶原中的比例可达 80%,占椎间盘胶原总量的 40%。当细胞外基质合成与降解失衡,蛋白聚糖与Ⅱ型胶原表达减少时,髓核含水量降低,弹性降低,纤维环胶原变性,椎间盘承受应力的能力下降,退变发生^[18]。因此,蛋白聚糖与胶原的变化是导致椎间盘退变的关键因素之一。如何高效率调控与恢复椎间盘基质蛋白代谢已成为目前预防及治疗椎间盘退变的研究热点^[19-21]。本研究将 30kDa N 端 Fn-f 注射入兔椎间盘内,组织学观察到髓核细胞数量及细胞外基质蛋白聚糖含量逐渐降低;纤维环层状结构渐进性破坏、排列出现紊乱等病理改变。基因检测结果显示 Fn-f 组聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原 mRNA 表达水平出现了渐进性降低。这些变化与人类椎间盘退变的病理过程及生化改变规律相符合。另外,我们在实验后期还观察到聚集蛋白聚糖与Ⅱ型胶原基因表达

水平出现略回升趋势,Fn-f 的诱导作用出现了轻微恢复。结果与 Anderson 等^[14]研究结果一致。提示 30kDa N 端 Fn-f 未破坏退变椎间盘基质再生的能力,随着 Fn-f 作用的减弱,退变出现了自发性恢复。因此,在使用 Fn-f 制备的动物模型进行治疗研究时,干预时间的选择对于疗效的评判显得尤为重要。

以往以化学试剂的导入建模均采用外科手术暴露椎间盘的注射方法。操作人员需具备熟练的外科手术技术,操作复杂,耗时,对动物创伤大,容易感染;而且手术有可能造成椎间盘及周围组织的损伤,对研究结果的评判产生一定影响。本研究采用在透视引导下注射的方法,免除了对动物进行创伤性较大的外科手术与椎间盘的暴露,减少了感染的机会,安全性高,节省时间,克服了传统方法的不足。Elliott 等^[22]发现使用注射针穿刺对椎间盘造成的损伤程度与穿刺针的尺寸及椎间盘的重量和大小密切相关;27G 注射针对大鼠椎间盘产生了一定的力学作用,而 33G 注射针则大大降低了椎间盘的损伤,力学影响仅为 27G 注射针的 10%~20%。Anderson 等^[14]研究发现,33G 微量注射针对兔椎间盘穿刺后未见有明显的退变发生。Masuda 等^[23]使用 16、18 和 21G 针对兔椎间盘进行穿刺后,同样发现尺寸越小的注射针,对椎间盘造成的退变程度越轻微。本研究选取 30G 微量注射针,很大程度上降低了注射针对椎间盘损伤而导致椎间盘退变的可能,从而降低了注射对研究结果产生的影响。

总之,透视引导下注射 N 端 30kDa Fn-f 建立椎间盘退变动物模型安全性好,对动物创伤小,操作相对简单,建立的动物模型退变的病因和发展过程与人椎间盘退变相似,符合重现椎间盘退变的客观规律,可作为研究椎间盘退变的发病及防治的一种良好的实验模板。但 N 端 30kDa Fn-f 并非是人椎间盘退变代谢过程中产生的唯一片段,因此不能完全充分地模拟人类椎间盘退变的成因及发展规律。

4 参考文献

1. Samartzis D, Cheung KM. Lumbar intervertebral disk degeneration[J]. Orthop Clin North Am, 2011, 42(4): xi-xii.
2. Napolitano M, Matera S, Bossio M, et al. Autologous platelet gel for tissue regeneration in degenerative disorders of the knee[J]. Blood Transfus, 2012, 10(1): 72-77.

3. Webster KA, Graham RM, Bishopric NH. BNip3 and signal-specific programmed death in the heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 38(1): 35-45.
4. Majumdar S, Link TM, Steinbach LS, et al. Diagnostic tools and imaging methods in intervertebral disc degeneration[J]. Orthop Clin North Am, 2011, 42(4): 501-511.
5. Singh K, Masuda K, An HS. Animal models for human disc degeneration[J]. Spine J, 2005, 5(6 Suppl): 267-279.
6. Lotz JC. Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned[J]. Spine, 2004, 29(23): 2742-2750.
7. Han B, Zhu K, Li FC, et al. A simple disc degeneration model induced by percutaneous needle puncture in the rat tail[J]. Spine, 2008, 33(18): 1925-1934.
8. Zhang H, La Marca F, Hollister S. Developing consistently reproducible intervertebral disc degeneration at rat caudal spine by using needle puncture[J]. J Neurosurg Spine, 2009, 10(6): 522-530.
9. Alini M, Eisenstein SM, Ito K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration[J]? Eur Spine J, 2008, 17(1): 2-19.
10. Hoogendoorn RJ, Wuisman PI, Smit TH, et al. Experimental intervertebral disc degeneration induced by chondroitinase ABC in the goat[J]. Spine, 2007, 32(17): 1816-1825.
11. Hoogendoorn RJ, Helder MN, Kroeze RJ, et al. Reproducible long-term disc degeneration in a large animal model[J]. Spine, 2008, 33(9): 949-954.
12. Oegema TR Jr, Johnson SL, Aguiar DJ, et al. Fibronectin and its fragments increase with degeneration in the human intervertebral disc[J]. Spine, 2000, 25(21): 2742-2747.
13. Anderson DG, Izzo MW, Hall DJ, et al. Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs: analysis of a rabbit annular laceration model[J]. Spine, 2002, 27(12): 1291-1296.
14. Anderson DG, Li X, Tannoury T, et al. A fibronectin fragment stimulates intervertebral disc degeneration in vivo[J]. Spine, 2003, 28(20): 2338-2345.
15. Anderson DG, Li X, Balian G. A fibronectin fragment alters the metabolism by rabbit intervertebral disc cells in vitro[J]. Spine, 2005, 30(11): 1242-1246.
16. Xia M, Zhu Y. Fibronectin fragment activation of ERK increasing integrin $\alpha(5)$ and $\beta(1)$ subunit expression to degenerate nucleus pulposus cells[J]. J Orthop Res, 2011, 29(4): 556-561.
17. 王娜, 赵丹慧, 吴成爱, 等. 化学法制备椎间盘退变动物模型的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(4): 334-336.
18. 熊晓芊, 邵增务, 杨述华. 聚集蛋白聚糖与椎间盘退变的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(1): 54-57.
19. Huang B, Zhuang Y, Li CQ, et al. Regeneration of the intervertebral disc with nucleus pulposus cell-seeded collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer constructs in a rabbit disc degeneration model[J]. Spine, 2011, 36(26): 2252-2259.
20. Melrose J, Shu C, Young C, et al. Mechanical destabilization induced by controlled annular incision of the intervertebral disc dysregulates metalloproteinase expression and induces disc degeneration[J]. Spine, 2012, 37(1): 18-25.
21. Leckie SK, Bechara BP, Hartman RA, et al. Injection of AAV2-BMP2 and AAV2-TIMP1 into the nucleus pulposus slows the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model[J]. Spine J, 2012, 12(1): 7-20.
22. Elliott DM, Yerramalli CS, Beckstein JC, et al. The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration[J]. Spine, 2008, 33(6): 588-596.
23. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration[J]. Spine, 2005, 30(1): 5-14.

(收稿日期:2012-08-01 末次修回日期:2012-11-21)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)