

大鼠尾椎间盘退变造模器械的研发与应用

徐浩伟,王善金,易宇阳,张树宝,胡 韬,吴德升

(同济大学医学院附属东方医院脊柱外科 200120 上海市)

【摘要】目的:研制一种简便、微创、针刺深度可控的大鼠椎间盘退变模型的造模器械。**方法:**自行设计一种新型针刺大鼠尾椎间盘退变的造模器械,由 C 型套环和针筒两部分构成。取 3 月龄雄性 SD 大鼠 20 只,分为针刺组(10 只)和对照组(10 只),将造模器械的 C 型套环套在鼠尾上,用 21G 针对针刺组的大鼠尾椎 Co6/7、Co8/9 椎间盘分别行横贯(10mm)和半横贯穿刺(5mm);对照组大鼠尾椎无任何处理。造模前和造模后 4 周时对两组大鼠的尾部行 X 线片和 MRI 检查,在 X 线片上测量椎间盘高度,计算目标椎间盘高度指数(DHI)比;在 MRI T2 像上采用 Pfirrmann 评分评价目标椎间盘退变情况。再处死大鼠取目标椎间盘固定切片后行番红 O 染色,观察椎间盘退变情况;对非针刺节段尾椎间盘内注射造影剂(碘海醇)后,X 线下显影并用针抽吸髓核组织。**结果:**造模过程中大鼠无死亡,术后无感染等并发症。向大鼠椎间盘注射碘海醇后造影显影良好,可以抽取一定量的髓核组织。造模后 4 周,针刺组 Co6/7 和 Co8/9 的 DHI 比分别为 0.65 ± 0.07 和 0.73 ± 0.09 、Pfirrmann 退变评分分别为 4.3 ± 0.82 和 3.5 ± 0.71 分,对照组分别为 0.98 ± 0.02 和 0.97 ± 0.02 、 1.1 ± 0.32 分和 1.1 ± 0.32 分,两组同节段比较均有显著性差异($P<0.05$),针刺组两个节段间比较有显著性差异($P<0.05$),对照组两个节段间比较无显著性差异($P>0.05$)。番红 O 染色针刺组 Co6/7 髓核消失,与纤维环界限不清,终板骨化;针刺组 Co8/9 穿刺侧髓核和纤维结构紊乱,另一侧髓核与纤维环较完整;对照组 Co6/7 和 Co8/9 髓核、纤维环和终板形状完整,结构清晰。**结论:**造模器械穿刺可以成功建立大鼠尾椎间盘退变模型,且横贯穿刺较半横贯穿刺椎间盘退变重;利用该造模器械可以向椎间盘内注射造影剂或药物,抽取髓核。

【关键词】椎间盘退变;造模器械;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2020.05.09

中图分类号:R681.5,R331 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2020)-05-0447-07

Development and application of a new mold for rat tail disc degeneration/XU Haowei, WANG Shan-jin, YI Yuyang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2020, 30(5): 447-453

【Abstract】Objectives: To invent a modeling instrument for simple, minimally invasive, stable and controllable model of rat intervertebral disc degeneration. **Methods:** A new type of molding instrument for rat caudal intervertebral disc was designed, which was composed of C-ring and spiral needle tube. Twenty 3-month-old male SD rats were divided into the control group($n=10$) and the acupuncture group($n=10$). The c-type sleeve ring of the modeling instrument was placed on the tails of rats, and a 21G needle was used for spiral puncture, then the model puncture instrument was used to perform transverse puncture(10mm) and semi-transverse puncture(5mm) on the Co6/7 and Co8/9 intervertebral discs in the experimental group. There was no treatment of caudal vertebra in control group. Before and 4 weeks after modeling, the X-ray and MRI were performed for both groups. The disc height was measured on the X-ray and the percentage of the target disc height index(DHI) was calculated. The Pfirrmann score was used to evaluate the disc degeneration scores on the MRI T2 image. Then the rats were killed, and the sections of the target intervertebral disc were taken and stained with safranin O to observe the degeneration of the intervertebral disc. After injecting contrast agent (iohexol) into the non-acupuncture caudal disc segment, the nucleus pulposus tissue was developed under X-ray and aspirated by needle. **Results:** No rats died under anesthesia, and no postoperative complication such as

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81572181);上海市卫生计生系统优秀人才培养计划(编号:2017YQ070);浦东新区卫生系统重点学科建设资助(编号:PWZzk2017-08)

第一作者简介:男(1994-),住院医师,在读硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(021)38804518 E-mail:xuhaowei1122@163.com

通讯作者:王善金 E-mail:kingspine@163.com

infection was found. Iohexol was injected into the intervertebral discs of rats, and the contrast and development were good. A certain amount of nucleus pulposus tissue could be extracted by needle. 4 weeks after modeling, the rate of DHI of Co6/7 and Co8/9 in the acupuncture group was 0.65 ± 0.07 and 0.73 ± 0.09 , respectively. The Pfirrmann regression scores were 4.3 ± 0.82 and 3.5 ± 0.71 points, respectively. The results were 0.98 ± 0.02 and 0.97 ± 0.02 , 1.1 ± 0.32 and 1.1 ± 0.32 points, in the control group, respectively. There were significant differences in the comparison of the same segments between the two groups ($P < 0.05$). There were significant differences in the comparison of the two segments in the acupuncture group ($P < 0.05$), and no significant difference in the comparison between the two segments in the control group ($P > 0.05$). In the acupuncture group, Co6/7 nucleus disappeared, the boundary between the nucleus and the annulus fibrosus was unclear, and the endplate became ossified. The nucleus pulposus and fibrous structure on the side of Co8/9 puncture were disordered, the nucleus pulposus and annulus fibrosus on the other side were relatively intact. In the control group, Co6/7 and Co8/9 nucleus pulposus, annulus fibrosus and endplate had complete shape and clear structure. **Conclusions:** The model of caudal intervertebral disc degeneration can be successfully established by instrument-setting puncture, and the severity of degeneration aggravated as the puncture depth increased. The molding device can also be used to extract the nucleus pulposus by intradermal injection of contrast agents or drugs.

[Key words] Intervertebral disc degeneration; Modeling; Acupuncture; Rat

[Author's address] Department of Spinal Surgery, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai, 200120, China

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是引起腰背部疼痛的主要原因之一,在中老年人中常见,严重影响患者的生活质量^[1]。目前 IDD 的病因和病理机制尚未完全阐明,建立可靠的 IDD 动物模型尤为重要。近年来,学者们针对建立 IDD 动物模型开展了大量的研究工作,报道了多种构建模型的方法,如针刺损伤^[2]、基因修饰或基因敲除^[3]、化学试剂注射^[4]、加压^[5]等均可促使椎间盘退变。其中针刺法因其方便简单是目前建立 IDD 模型的主要方法,但是有时针刺深浅不一,使用的针粗细不同,以及人为的一些因素,导致椎间盘退变不均匀,从而影响了实验的准确性。我们研制了一种 IDD 动物模型的建模器械,应用于大鼠尾椎间盘退变模型的制作,旨在为研究 IDD 的病因及治疗提供良好的动物模型。

1 材料和方法

1.1 造模器械的研发

造模器械包括 C 型套环和针筒。C 型套环为中空半圆柱体结构,其中部有纵向的轨道用于穿刺针的环鼠尾穿刺,头侧有横向的轨道用于定位针的穿刺以及套环的移动,在套环本体上还开设有定位刻度针筒与螺旋刻度穿刺针筒(图 1)。使用时,先将 C 型套环套设在鼠尾上,定位针柄插在针柄插接孔内,从皮肤穿刺直到定位到尾骨

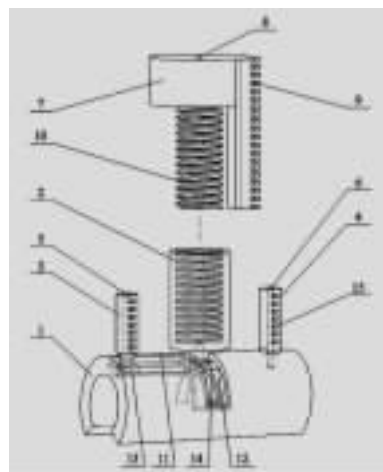


图 1 造模器械的结构示意图(1,C 形套环;2,螺纹套筒;3,第一个带刻度定位插接筒;4,第二个带刻度定位插接筒;5,第一个定位针孔;6,第二个定位针孔;7,带刻度螺纹穿刺筒;8,穿刺针孔;9,刻度凸块;10,套筒外螺纹;11,轴向轨道;12,周向轨道;13,插接筒滑块;14,套筒滑块;15,刻度孔)

Figure 1 The structural schematic diagram of the model (1. C-shaped sleeve ring; 2. Threaded sleeve; 3. The first cartridge with calibration positioning; 4. The second cartridge with calibration positioning; 5. The first positioning pinhole; 6. The second positioning pinhole; 7. Puncture cylinder with graduated thread; 8. Puncture pinhole; 9. Calibration bump; 10. Socket external thread; 11. Axial track; 12. Circumferential orbit; 13. Insert and connect cylinder slider; 14. Sleeve slider; 15. Calibration hole)

上,双侧取平均值,穿刺定位针开始螺旋进针,如能超过之前定位的刻度说明针刺入纤维环中,如不能超过定位针所定位的深度说明穿刺间隙不对,此时可沿 C 型套筒横向移动继续探查,直至穿刺进入纤维环。需要向鼠尾注射液体时,换上微量注射器可将药物注入鼠尾椎间盘中,如需抽取髓核组织直接吸取即可。

1.2 实验动物及分组

本研究得到了同济大学附属东方医院伦理委员会的批准。3 月龄雄性 SD 大鼠 20 只(由上海杰思捷实验动物中心提供),平均体重 300g,经 MRI 和 X 线片检查无椎间盘退变及椎间隙狭窄等情况。随机分为对照组 10 只,针刺组 10 只,针刺组大鼠按穿刺深度分为半横贯穿刺和横贯穿刺。

1.3 主要实验设备及仪器

0.8mm 无菌针头(爱诺医疗器械有限公司),定制穿刺套件(专利号:201821919400.2),1.5T 超导型磁共振扫描仪(飞利浦公司),X 线机(西门子 FD-X),超净工作台(BJ-1CD 型,上海)。

1.4 模型的建立

大鼠标准饲养 2 周,X 线片定位尾椎椎间隙并标记。大鼠称重,用 4% 水合氯醛腹腔注射(3.5ml/kg)麻醉。麻醉成功后固定大鼠呈俯卧位,碘伏消毒鼠尾,使用 21G 定制穿刺器械对针刺组大鼠尾椎 Co6/7、Co8/9 的椎间盘分别行横贯和半横贯穿刺,穿刺针平行于椎体垂直皮肤进针,从皮肤开始向椎间盘方向半横贯穿刺深度为 5mm,横贯穿刺为 10mm 刚好穿透对侧皮肤,停留 30s 后拔出。对照组大鼠尾椎无任何处理。在术后 4 周处死大鼠做完影像学检查后,对非针刺节段尾椎间盘内注射造影剂(碘海醇)X 线下显影,并用针抽吸髓核组织。造模后按标准饲养条件下单笼清洁级饲养(同济大学附属东方医院实验动物中心)。

1.5 影像学检查

术前及术后 4 周麻醉下所有大鼠鼠尾行 X 线片和 MRI 检查。应用 Scion Image 软件在 X 线片上测量并计算出椎间盘高度指数(DHI)(上位椎体下缘中心到下位椎体的上缘中心连线/上位椎体上缘中心到下位椎体的下缘中心连线(图 2)。再求出 DHI 比(术后 DHI/术前 DHI)来评价椎间盘的高度变化。在 MRI T2 像上观察大鼠尾椎间盘的退变情况,并用 Pfirrmann 分级对其椎间盘

退变程度进行评价,分为 I~V 级,分别对应 1~5 分,级数或分数越高,椎间盘退变越严重。

1.6 组织学检查

所有大鼠影像学检查结束后处死,完整取出包括部分上下椎体的 Co6/7、Co8/9 椎间盘,10%中性甲醛室温下固定 24h,用 10%EDTA 脱钙 3 周,每个标本矢状位纵切片 5 张,每张切片厚 2 μ m,行番红 O 染色,光镜下观察椎间盘形态变化。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行分析统计,椎 DHI 比和 Pfirrmann 分级评分采用 Kruskal-Wallis 检验和 Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

所有大鼠术后均成活,未发生明显感染。套针刺装置可以通过控制螺旋的圈数,精准控制针刺深度(图 3、4a、4b)。还可以向尾椎间盘内注射造影剂以及抽取适量髓核组织(图 4c、4d)。

X 线检查:4 周时横贯穿刺的椎间盘(Co6/7)和半横贯穿刺的椎间盘(Co8/9)高度都有所下降,且 Co6/7 比 Co8/9 降低更明显;针刺组 Co6/7 和 Co8/9 在 4 周时 DHI 比与对照组比较均显著性减小($P<0.05$),针刺组 Co6/7 的 DHI%与 Co8/9 比较显著性减小($P<0.05$)(表 1)。MRI 检查:对照组尾椎间盘在 MRI T2 像上髓核呈高信号,终板呈低信号,两者界限清晰,4 周时各椎体椎间隙无明显变化,T2 像上 Co6/7、Co8/9 髓核信号无明显变化;针刺组 T2 像上 Co6/7 和 Co8/9 髓核信号在术后 4 周明显降低降低(图 5),Co6/7 和 Co8/9 的 Pfirrmann 分级评分值与对照组比较均显著性减



图 2 椎间盘高度指数(DHI)=BC/AD

Figure 2 Disc height index(DHI)=BC/AD

少($P<0.05$),针刺组 Co6/7 的 Pfirrmann 评分显著性高于 Co8/9(表 2, $P<0.05$)。

组织学结果:对照组 Co6/7 和 Co8/9 椎间盘髓核形状保持完整,髓核细胞形态分布正常,纤维环层状结构明显保持,纹路较清晰,软骨终板组织没有退变。针刺组 Co6/7 椎间盘髓核消失,髓核与纤维环的界限不清,终板骨化明显,甚至发生了骨质破坏,退变得十分严重;Co8/9 可见针头穿破纤维环后留下的针道髓核与纤维环退变较为严重,并可见胶原纤维扭曲、紊乱,有贯穿断裂,而没有针刺的另一侧髓核与纤维环组织的完整性维持得较好(图 6)。

3 讨论

腰椎间盘突出相关疾病引起的腰腿痛是劳动能力丧失和生活质量下降的常见原因,给家庭和社会造成极大的经济负担。建立合适的 IDD 动物

模型来研究各种阻断或逆转椎间盘退行性变的治疗方法尤为重要。正常的椎间盘组织是由髓核、纤维环及软骨终板组成。髓核组织中含有蛋白聚糖、Ⅱ型胶原和水,Ⅱ型胶原可以保持髓核的体积,使髓核能在不同的外力下具有相应形变的作用,在传递应力中起着重要作用^[6]。软骨终板为无血管的组织,是椎间盘与椎体之间重要的形态和功能上明显的连接处。可以承受传导应力,并且可以通过扩散作用提供髓核必需的营养^[7]。研究发现,椎

表 1 两组大鼠不同节段椎间盘高度指数百分比

($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Percentage of disc height index in different segments of the rats in the two groups

	针刺组 Acupuncture group	对照组 Control group	P值 P value
Co6/7	0.65±0.07	0.98±0.02	<0.001
Co8/9	0.73±0.09	0.97±0.02	<0.001

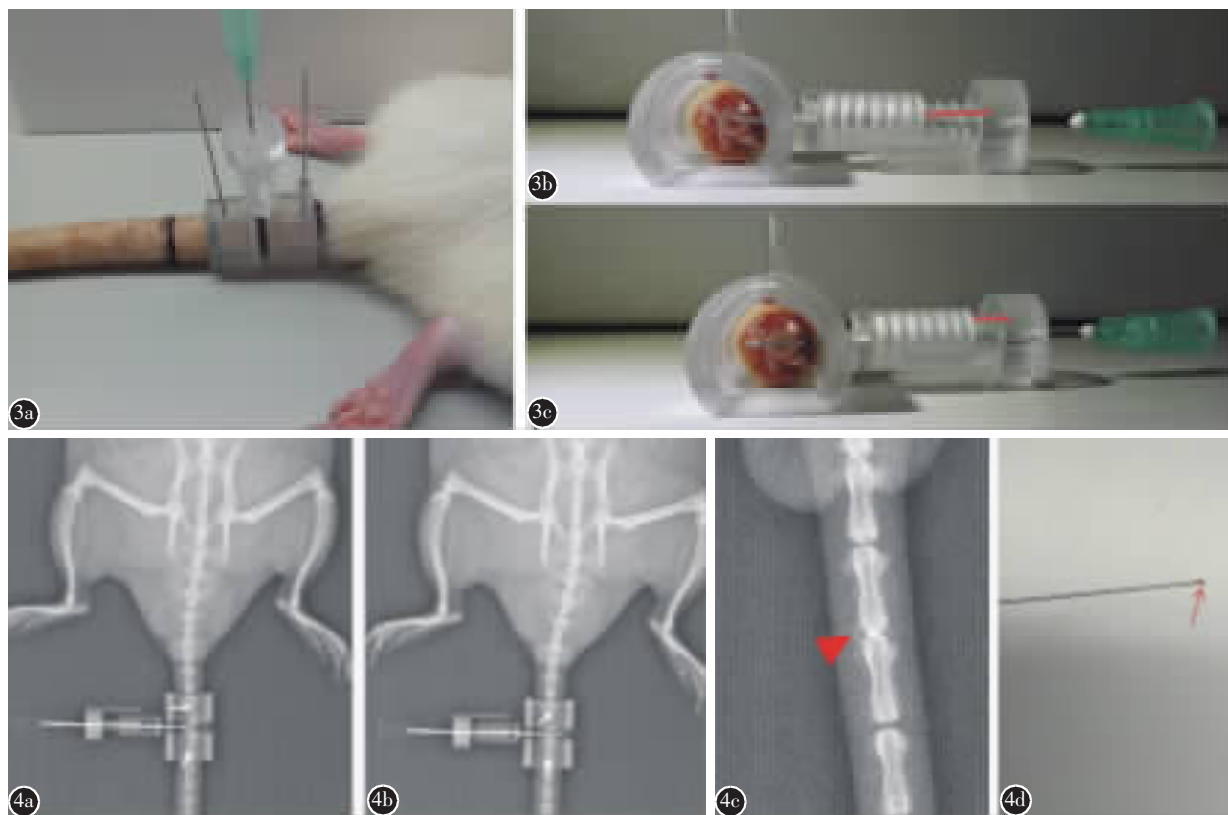


图 3 a 针刺大鼠模型手术操作图 b 半横贯穿刺 c 横贯穿刺(“-”不同螺旋的长度来控制针刺深度) 图 4 a X 线透视下半横贯穿针刺大鼠尾椎 b X 线透视下横贯针刺大鼠尾椎 c “▲”注射造影剂后的 X 线显影 d “→”抽取适量髓核组织

Figure 3 a A schematic diagram of the rat model of acupuncture b Semi-transverse puncture c Transverse puncture (“-” different spiral lengths to control acupuncture depth) **Figure 4** a Semi transverse acupuncture of rat tail intervertebral disc using X-ray b Transverse acupuncture of rat tail intervertebral disc using X-ray c “▲” after contrast agent was injected d “→” appropriate amount of nucleus pulposus tissue was extracted

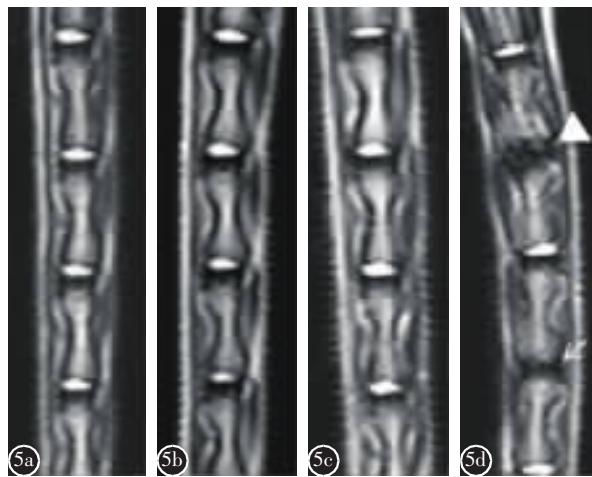


图 5 术前和术后 4 周两组大鼠尾椎 MRI T2 加权像 a 术前对照组 b 术前针刺组 c 4 周后对照组 d 术后 4 周针刺组 ("▲"Co6/7 横贯穿刺, "→"Co8/9 半横贯穿刺)

Figure 5 T2-weighted MRI images of each segment of the control group and acupuncture group a Control group before surgery b Acupuncture group before surgery c Control group after 4 weeks d Acupuncture group at 4 weeks after surgery ("▲" Co6/7, transverse puncture of the nucleus pulposus; "→" Co8/9, semi-transverse puncture of the nucleus pulposus)

间盘结构的损伤多先发生在纤维环, 纤维环的放射性撕裂往往最容易导致椎间盘退变, 因为这种撕裂损伤打破了椎间盘组织的压力平衡。髓核沿着损坏的纤维环突出, 压迫其周围的神经从而造成人类一系列腰腿痛的症状^[8]。

表 2 两组大鼠不同节段椎间盘等级评分

Table 2 The grade of intervertebral disc degeneration in different segments of the rats in the two groups

Pfirrmann 分级 Pfirrmann grades	对照组 (n=10) Control group		针刺组 (n=10) Acupuncture group	
	Co6/7	Co8/9	Co6/7	Co8/9
I	9(90%)	9(90%)	0	0
II	1(10%)	1(10%)	0	0
III	0	0	2(20%)	6(60%)
IV	0	0	3(30%)	3(30%)
V	0	0	5(50%)	1(10%)
$\bar{x} \pm s$	1.1±0.32	1.1±0.32	4.3±0.82 ^①	3.5±0.71 ^{②③}

注: ①与对照组 Co6/7 比较 $P<0.05$; ②与对照组 Co8/9 比较 $P<0.05$; ③与同组 Co6/7 比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control group Co6/7, $P<0.05$; ② compared with control group Co8/9, $P<0.05$; ③compared with acupuncture group Co6/7, $P<0.05$

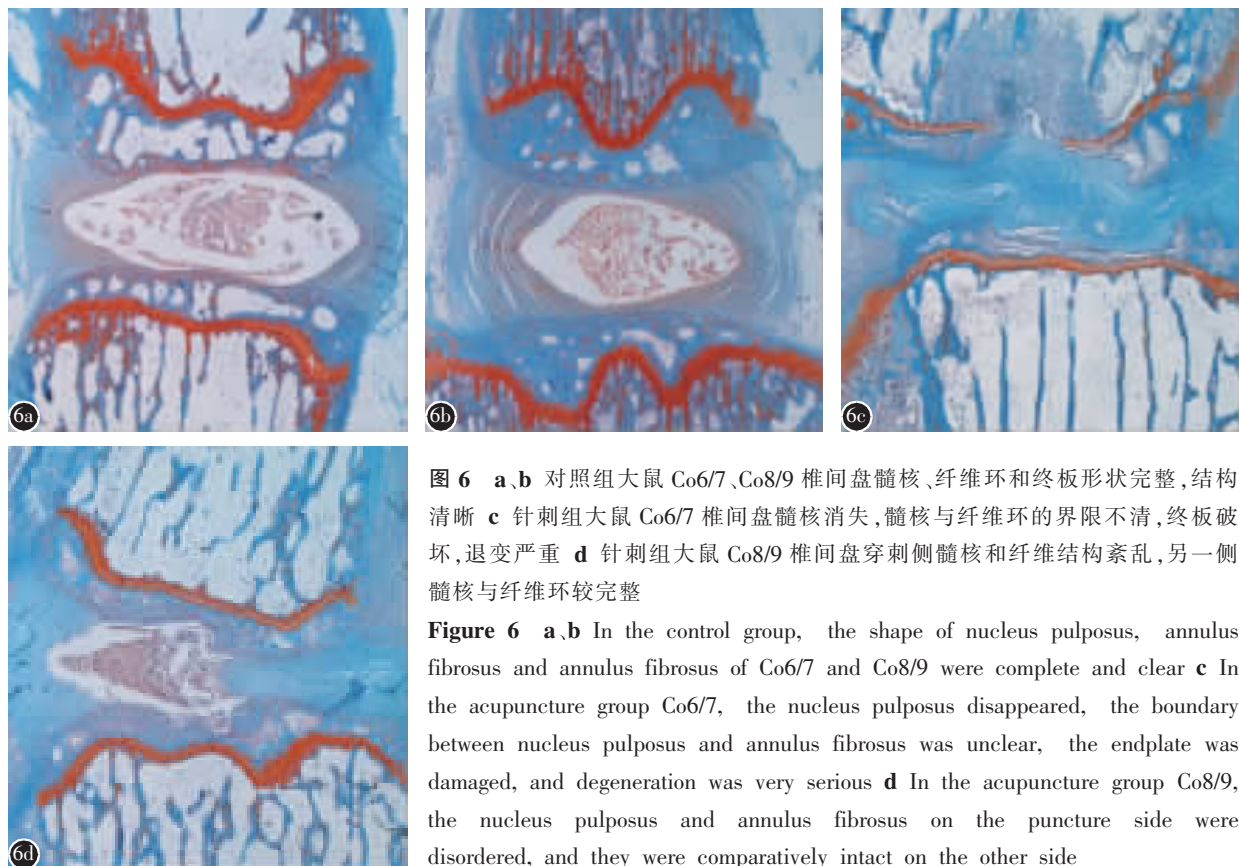


图 6 a、b 对照组大鼠 Co6/7、Co8/9 椎间盘髓核、纤维环和终板形状完整, 结构清晰 c 针刺组大鼠 Co6/7 椎间盘髓核消失, 髓核与纤维环的界限不清, 终板破坏, 退变严重 d 针刺组大鼠 Co8/9 椎间盘穿刺侧髓核和纤维结构紊乱, 另一侧髓核与纤维环较完整

Figure 6 a,b In the control group, the shape of nucleus pulposus, annulus fibrosus and annulus fibrosus of Co6/7 and Co8/9 were complete and clear c In the acupuncture group Co6/7, the nucleus pulposus disappeared, the boundary between nucleus pulposus and annulus fibrosus was unclear, the endplate was damaged, and degeneration was very serious d In the acupuncture group Co8/9, the nucleus pulposus and annulus fibrosus on the puncture side were disordered, and they were comparatively intact on the other side

大鼠尾椎间盘的解剖位置易于进行操作,故成为目前进行 IDD 的研究时的理想动物模型^[9]。不同学者通过不同的退变机制建立 IDD 模型,但存在一些不足。随着人们年龄的不断增加,IDD 也不断加速。因此,Gruber 等^[10]对沙鼠的颈椎间盘和腰椎间盘变化特征进行了评估,发现沙鼠随着年龄的增长颈椎和腰椎间盘都出现退变,而颈椎间盘狭窄和骨质增生明显多于腰椎,退变程度大于腰椎。提示沙鼠自发退变可能更适合建立颈椎椎间盘退变模型。软骨终板供应了髓核的营养,Yuan 等^[11]通过向大鼠软骨终板相邻的椎体骨髓中注射无水乙醇阻断了软骨终板的主要血供通道,3 个月后发现椎间隙狭窄,软骨终板钙化以及髓核细胞的退变。阻断终板的血供及营养通路可以造成 IDD,但不利于药物治疗等实验研究。在大鼠尾椎机械损伤的 IDD 模型中,连续两周的动态加压会导致椎间盘高度下降^[12]。Kim 等^[13]观察到动态压缩大鼠尾椎间盘 1h 后,Ⅱ型胶原基因表达在纤维环和髓核是不同的,且在髓核中明显减少。Keorochana 等^[14]比较了三种不同直径的针,经皮插入大鼠尾椎间盘引起的椎间盘退变。椎间盘退变的严重程度随针径的增加而增加,蛋白多糖随时间增加而减少。然而,现有的造模方法中,由于穿刺深度不一,穿刺针粗细不同,效率低,所以破坏效果不一致。Nemoto 等^[15]对 4 周龄大鼠被动吸烟 8 周,发现椎间盘出现破裂、纤维环错位,髓核纤维组织增多。此外,吸烟组椎间盘中白介素-1 β 的水平高于不吸烟组,在停止吸烟后椎间盘退变并没有自我恢复。Liu 等^[16]通过切除大鼠卵巢,发现切卵巢组大鼠椎间盘退变更加明显,通过补充雌激素,大鼠椎间盘退变也有所减轻。吸烟与去势虽然可以导致的椎间盘退变,但造模时间长,重复性差。

我们团队研发出一种简易大鼠尾椎间盘微创穿刺注射及提取装置(专利号:201821919400.2),其目的是解决现有造模器械的缺点,设计一种结构简单、固定稳定、定位精确、穿刺深度可控、同时带注射功能和提取大鼠尾椎髓核组织的大鼠尾椎间盘微创穿刺注射提取装置。本实用新型器械的优点是:(1)全透明塑料材质,可以看清大鼠尾巴上的四条血管,避免穿刺针扎到血管上。(2)C 形套筒可以套在鼠尾上来回移动,适应于不同粗细的鼠尾。(3)先用两个针穿刺皮肤到达尾椎骨头上。

取两针的平均穿刺深度,以确定皮肤到椎骨的距离,其次中间的穿刺针可以纵向移动穿刺。带刻度的螺旋进针可以限制进针深度,比以往的穿刺更加精准和简便。(4)本装置还具有注射功能,需要对大鼠注射液体时,可以向其椎间盘注射药物,针孔的出口可以设计连接微量注射器,便于定量给药。(5)本装置还具有提取髓核组织功能,需要对大鼠抽取髓核时,用微量注射器抽取适量组织,避免了传统处死大鼠取髓核组织的弊端。

我们从解剖学以及影像学的层面上证实了,本器械可以用螺旋套筒来简单精准地控制针刺深度,通过机械损伤直接破坏椎间盘大致可分为部分纤维环损伤和全层纤维环。全层纤维环伤的优点是产生撕脱,退变相对较快。部分纤维环损伤会导致较慢的退化过程。所以用损伤方法破坏椎间盘造成 IDD 时要考虑刺针的直径损伤深度等问题。崔力扬等^[17]使用 21G 穿刺针对 SD 大鼠腰椎进行 1.5mm 和 2.3mm 深的穿刺,穿刺后观察 8 周,纤维环全层针刺(2.3mm)腰椎间盘退变较严重。根据实验需要,我们的器械可以通过精准控制针刺深度,因而可以控制退变程度,如图 5,半横贯穿刺,导致一半的椎间盘胶原纤维扭曲、紊乱,退变明显,而另外一半结构完整。这样对一些特殊实验给药以及椎间盘局部退变的研究有着重要意义。Hu 等^[18]使用不同型号的针(21、25G)对 3 月龄大鼠尾椎间盘穿刺 5mm 深度,结果发现 25G 和 21G 针都可导致椎间盘退变,但 25G 针在 4 周内导致的椎间盘退变较轻;Zhang 等^[19]使用 21G 穿刺针对 3 月龄 SD 大鼠尾椎间盘穿刺,穿刺后 17d 时椎间盘即出现退变,直到 30 周退变也没有随着时间的推移而自发恢复。我们的器械可以通过调节针刺深度和更换针的直径来满足实验者的需要,制作出不同退变程度的模型,实用价值较高。

本研究应用 SD 大鼠建模经济便宜,使用自行研制的造模器械对椎间盘定位准确,手术操作简单,X 线和 MRI 检查能准确地验证 IDD 的有效性和均一性。说明本新型针刺大鼠尾椎间盘退变造模器械是一种经济有效、重复性好、方便给药和提取组织的新器械,提供了一种良好的造模方法。但人类椎间盘退行性改变是复杂的病理生理过程,本造模方法也不能完美地复制这种临床情况,在选择合适的动物和造模方法时,还应不断优化使之更加接近人类椎间盘退变的自然进程,为研

究 IDD 的病因及治疗提供重要的实验基础。

4 参考文献

1. Rubin DL. Epidemiology and risk factors for spine pain [J]. *Neurol Clin*, 2007, 25(2): 353–371.
2. Cunha C, Lamas S, Goncalves RM, et al. Joint analysis of IVD herniation and degeneration by rat caudal needle puncture model[J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(2): 258–268.
3. Boyd LM, Richardson WJ, Allen KD, et al. Early-onset degeneration of the intervertebral disc and vertebral end plate in mice deficient in type IX collagen [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(1): 164–171.
4. Hoogendoorn RJ, Wuisman PI, Smit TH, et al. Experimental intervertebral disc degeneration induced by chondroitinase ABC in the goat[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2007, 32(17): 1816–1825.
5. Xia W, Zhang LL, Mo J, et al. Effect of static compression loads on intervertebral disc: an in vivo bent rat tail model[J]. *Orthop Surg*, 2018, 10(2): 134–143.
6. Lian C, Gao B, Wu Z, et al. Collagen type II is downregulated in the degenerative nucleus pulposus and contributes to the degeneration and apoptosis of human nucleus pulposus cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 4730–4736.
7. Fields AJ, Rodriguez D, Gary KN, et al. Influence of biochemical composition on endplate cartilage tensile properties in the human lumbar spine[J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(2): 245–252.
8. Kuschayev SV, Glushko T, Jarraya M, et al. ABCs of the degenerative spine[J]. *Insights Imaging*, 2018, 9(2): 253–274.
9. Zhang H, La Marca F, Hollister SJ, et al. Developing consistently reproducible intervertebral disc degeneration at rat caudal spine by using needle puncture [J]. *J Neurosurg Spine*, 2009, 10(6): 522–530.
10. Gruber HE, Phillips R, Ingram JA, et al. Spontaneous age-related cervical disc degeneration in the sand rat [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2014, 472(6): 1936–1942.
11. Yuan W, Che W, Jiang YQ, et al. Establishment of intervertebral disc degeneration model induced by ischemic sub-endplate in rat tail[J]. *Spine J*, 2015, 15(5): 1050–1059.
12. Ching CT, Chow DH, Yao FY, et al. The effect of cyclic compression on the mechanical properties of the intervertebral disc: an in vivo study in a rat tail model [J]. *Clin Biomech(Bristol, Avon)*, 2003, 18(3): 182–189.
13. Kim JS, Kroin JS, Li X, et al. The rat intervertebral disk degeneration pain model: relationships between biological and structural alterations and pain[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(5): R165.
14. Keorochana G, Johnson JS, Taghavi CE, et al. The effect of needle size inducing degeneration in the rat caudal disc: evaluation using radiograph, magnetic resonance imaging, histology, and immunohistochemistry[J]. *Spine J*, 2010, 10(11): 1014–1023.
15. Nemoto Y, Matsuzaki H, Tokuhasi Y, et al. Histological changes in intervertebral discs after smoking and cessation: experimental study using a rat passive smoking model [J]. *J Orthop Sci*, 2006, 11(2): 191–197.
16. Liu Q, Wang X, Hua Y, et al. Estrogen deficiency exacerbates intervertebral disc degeneration induced by spinal instability in rats[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2019, 44(9): E510–E519.
17. 崔力扬, 刘尚礼, 丁悦, 等. 大鼠腰椎间盘针刺退变模型的建立[J]. *中国矫形外科杂志*, 2007, 15(13): 1008–1011.
18. Hu MH, Yang KC, Chen YJ, et al. Optimization of puncture injury to rat caudal disc for mimicking early degeneration of intervertebral disc[J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(1): 202–211.
19. Zhang H, Yang S, Wang L, et al. Time course investigation of intervertebral disc degeneration produced by needle-stab injury of the rat caudal spine: laboratory investigation[J]. *J Neurosurg Spine*, 2011, 15(4): 404–413.

(收稿日期:2019-11-22 末次修回日期:2020-01-20)

(英文编审 唐翔宇/谭 啸)

(本文编辑 卢庆霞)