

颜昊,贾永伟,翟伟峰. 椎间盘退变动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 387-392.

Yan H, Jia YW, Zhai WF. Advances in animal models of intervertebral disc degeneration [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 387-392.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.03.014

椎间盘退变动物模型的研究进展

颜昊¹, 贾永伟^{1,2*}, 翟伟峰²

(1. 上海中医药大学, 上海 200000; 2. 上海中医药大学附属光华医院脊柱外科, 上海 200052)

【摘要】 椎间盘退变(intervertebral disc degeneration,IDD)近年来因其发病率的不断升高以及发病年龄提前得到广泛关注,其引起的脊柱疾病,不同程度上的降低了人类生活质量。其退变机制的不确定性使得其治疗方式较为复杂,为进一步探究椎间盘退变的病因病理,本文将借助国内外关于椎间盘退变性疾病的相关文献,对目前主要的造模方法做一综述,希望通过比较不同椎间盘退变动物模型之间的差异,选择出能够全面模拟人类椎间盘退变的造模方法。

【关键词】 椎间盘退变;动物模型;造模方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 03-0387-06

Advances in animal models of intervertebral disc degeneration

YAN Hao¹, JIA Yongwei^{1,2*}, ZHAI Weifeng²

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200000, China. 2. Department of Spine Surgery, Guanghua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200052)

Corresponding author: JIA Yongwei. E-mail: spinejia@163.com

【Abstract】 In recent years, owing to the increasing incidence of intervertebral disc degeneration and age-related early onset, spinal diseases caused by intervertebral disc degeneration have reduced quality of life. The uncertainty of the mechanism of degeneration increases the complexity of the treatment method. To further explore the causes of intervertebral disc degeneration and its pathology, we conducted a literature review to explore the differences between animal models of intervertebral disc degeneration to enable the optimal simulation of human intervertebral disc degeneration to be identified.

【Keywords】 intervertebral disc degeneration; animal models; building methods

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

椎间盘退变是临床上常见的疾病,其发病机制尚不明确,且给社会劳动力带来沉重负担,对社会经济造成一定影响^[1]。随着我国人口老龄化程度的加剧以及人们生活方式的改变,其发病率逐渐增多,椎间盘退变已经成为脊柱外科医生研究的热点问题。动物模型是研究椎间盘退变的病因、发病规律和病理学变化的重要手段,目前椎间盘退变模型已有数十种构建方法,然而,至今仍未有一种公认的理想模型,本文结合国内外实验动物模型的差异

和优缺点作一综述,为今后动物模型的选择与构建提供参考。

1 实验动物的选择

目前用于构建椎间盘退变模型的动物主要分为大型动物与小型动物。常用于实验动物的排名如下:小鼠腰椎(12%),大鼠腰椎(15%),小鼠尾巴(18%),狒狒(19%),牛尾巴(22%),兔子(26%),绵羊(31%)以及大鼠尾巴(46%)^[2]。

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81972118),上海市卫生和计划生育委员会面上项目(201840361),上海市长宁区科学技术委员会重点项目(CNKW2017Z05)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81972118), Shanghai Municipal Health Bureau(201840361), the Key Project of Changning Science & Technology Association(CNKW2017Z05).

【作者简介】 颜昊(1991—),男,在读硕士研究生,研究方向:脊柱相关疾病。Email:372580500@qq.com

【通信作者】 贾永伟(1972—),男,主任医师,博士、硕士研究生导师,研究方向:脊柱老年病、脊柱生物力学、有限元分析方面。

Email:spinejia@163.com

1.1 大型动物

1.1.1 灵长类

灵长类动物的生活特性和人类相近,脊柱的生理构造和生物力学环境与人类有很高的相似度^[3]。Lauerman 等^[4]通过对平均年龄为 15.7 岁的狒狒进行影像观察,发现狒狒的驼背程度及椎间盘退变程度与年龄呈正相关,与人类的椎间盘退变规律相似。郭常安等^[5]以恒河猴为对象进行纤维环切开,发现恒河猴生理特性与人类较接近。虽然灵长类动物在椎间盘退变实验中最理想的实验模型,其椎间盘的解剖结构与人类较类似,且存在自发性退变、直立行走应力等相同因素,但造模的价格昂贵,不适合大数量的实验要求,且伦理难以通过。

1.1.2 牛、羊

牛、羊脊柱的解剖结构、大小与人类相似,且取材方便。Paul 等^[6]发现成年山羊椎间盘中只有软骨细胞以及成纤维细胞,并未发现脊索细胞,这一点与人类相似。另一方面,山羊椎间盘中所测到的水、糖胺聚糖以及胶原蛋白含量与成人椎间盘高度吻合^[7],因此可作为一种理想的研究对象,相比于其他动物,牛羊类较为强壮,对一些手术类造模方式易于耐受,但是应用牛或羊作为动物模型,实验的经济成本会有所提高。

1.1.3 猪

国内将猪作为动物模型的研究较少,在国外比较早期文献中获知,猪与绵羊脊椎单个节段的左右轴转向程度与人类较相似(C1-C2 运动度最大),但在猪、牛、绵羊等大型动物中,从颈椎到腰椎骨性终板的前后直径是几乎相同的,而人类的前后直径呈逐步增加^[8]。脊索细胞在椎间盘退变的情况下具有保护作用,而猪椎间盘内的脊索细胞在出生后长期或者终身存在^[9]。猪由于在生理学方面与人类极为相似,且其体型较大,易于操作,在国外作为模型动物得到了广泛的应用^[10-11]。

1.1.4 犬类

犬类应用于椎间盘动物模型主要有软骨营养不良犬和非软骨营养不良犬。在软骨营养不良犬的幼犬(<1岁)中发现了退化的迹象,如比格犬与腊肠犬从出生时脊索细胞开始减少,到成年期完全丧失,而非软骨营养不良犬中老年犬(5~7岁)才出现退化的迹象^[12]。其次犬在自发性椎间盘退变中的相对糖胺聚糖含量和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)活性与人相似:随着椎间盘退变严重程度的提高, MMP 活性增加而糖胺聚糖含

量降低^[13]。所以在自发性退变模型上,犬类是不错的选择,但会因此提高实验成本,相对的动物培育周期延长,且在其他造模方式上,犬类椎间盘的大小与人类形成差异。

1.2 小型动物

1.2.1 鼠类

目前最常用的主要为大、小鼠,沙鼠。Lim 等^[14]对 SD 大鼠取出部分脊柱运动段,在体外进行 14 d 培养,所培养的纤维环、髓核、终板存活率保持 95% 以上。Ariga 等^[15]对小鼠椎间盘进行了机械应力实验,发现软骨终板中软骨细胞凋亡与机械应力有关,且该过程与椎间盘退变存在一定联系。Gruber 等^[16]发现沙鼠的椎间盘退变与年龄相关,其主要原因与沙鼠的高盐含量、低水饮食习惯有关,从而引发椎间盘的营养障碍,但高盐、低水饮食因素是否能普遍代表人类椎间盘疾病特点仍存在争议。大小鼠作为动物模型可以控制经济成本;且品系培养方便,培养周期短,基因纯合度高,但大小鼠椎间盘大小与人类差异较大,对实验的操作有一定技术要求,其较小的椎间盘会给影像学及病理学等检测带来困难。

1.2.2 兔类

兔类作为动物模型用于体内模型较多, Lipson 等^[17]发现造模前兔椎间盘含水量及蛋白聚糖单体大小与人类相似,损伤后兔椎间盘含水量在前两天短暂恢复,透明质酸含量则迅速下降,但蛋白聚糖含量未见明显改变。Bayliss 等^[18]研究表明随着兔的衰老,其纤维软骨细胞代谢及蛋白聚糖分泌量的变化,进一步导致生物化学成分发生改变,这点与人类的椎间盘退变过程也较类似。Kroeber 等^[19]发现相比于啮齿类动物的尾巴模型,兔模型与包含小关节、椎旁肌肉和韧带的人椎间盘同源性更高。作为实验动物,兔类的饲养方便,品系及遗传学控制较好,能缩减成本,且相对于鼠类,兔类的椎间盘较大易于实验操作。

总体来说,由于在实际实验中需比较动物环境要求、遗传学控制、饲养特点、经济成本、是否易于操作以及伦理要求等因素,目前鼠类和兔类暂时是比较适合进行椎间盘退变实验的动物。

2 动物模型的建立

椎间盘退变的动物模型根据造模方法不同分为体内模型与体外模型。体内模型包括:力学改变模型、结构改变模型、自发退变模型、全身疾病模型。体外模型包括:体外细胞模型、体外器官模型。

2.1 体内模型

2.1.1 力学改变模型

在长时间不正确姿势或者过度承受压力下,椎间盘退变的风险明显增高,因此部分学者采用机械应力等手段模拟出椎间盘退变模型,主要有:尾部折弯模型、双足直立模型、轴向加压模型和脊柱失稳模型。

(1) 尾部折弯模型:早在 1957 年, Lindblom 等^[20]将老鼠尾巴弯曲成“U”型以增加髓核、纤维环压力,诱发椎间盘退变,发现凹面的结缔组织出现损伤以及椎间盘细胞质减少。Court 等^[21]发现对尾部加压弯曲后会导致细胞死亡,蛋白聚糖基因表达降低且 II 型胶原蛋白表达对称性降低。但是,尾部折弯模型因鼠类尾部生理结构、压力结构与人类椎间盘存在明显差异,且弯曲部会存在结缔组织损伤、细胞数目减少等现象,目前应用较少。

(2) 双足直立模型:Cassidy 等^[22]对 21 只新生大鼠进行去前肢模拟椎间盘退变的实验,研究发现所有大鼠腰椎发生楔形变,且腰大肌中 I 型肌纤维转变为 II 型肌纤维,多裂肌中 II 型肌纤维转变为 I 型肌纤维。Moravec 等^[23]研究双足模型并未发现四足与两足大鼠之间存在明显的直立姿势差异。Bailey 等^[24]对双足直立模型再次进行研究后发现:四足和双足大鼠在站立次数或直立水平姿势移动量上较接近,认为直立姿势可能不是导致椎间盘退变的因素。因此,目前双足模型不被推荐作为椎间盘退变模型。

(3) 轴向加压模型:Iatridis 等^[25]应用 Ilizarov 型器械对 16 只大鼠尾巴进行持续加压,实验显示大鼠尾部椎间盘厚度、角度及松弛度降低,尾部椎间盘的机械性质及结构组成发生变化,与人类较相似,但实验椎间盘中蛋白聚糖含量增加,这与人类椎间盘退变蛋白聚糖含量降低恰恰相反。Kroeber 等^[19]对此模型进行了改进:在兔子腰椎上安装可控的静态轴向加压装置,14 d 及 28 d 时发现椎间盘高度降低、终板纤维化且凋亡细胞增多,在卸载装置 4 周后,这些变化表现为不可逆转。因轴向加压模型可控性及可重复性较高,且造模周期相对较短,其在国内外研究椎间盘退变中应用较多,但轴向加压模型通常采用手术方式来构建,存在一定技术要求,实际操作中需注意对感染的控制。

(4) 脊柱失稳模型:主要是通过椎体结构、椎旁肌刺激、脊柱融合的手段造成脊柱不稳,从而引发椎间盘退变的方法。Miyamoto 等^[26]通过切除小鼠棘突、棘上韧带、棘间韧带及剥离相应的椎旁肌使

脊柱失稳引发椎间盘退变,实验发现造模后椎间盘高度下降、软骨细胞增生,骨赘形成。Wada 等^[27]对兔的斜方肌反复电刺激使兔的颈椎反复伸展屈曲,造成颈椎失稳,研究发现纤维环出现了严重的分层以及骨赘形成。但是该模型造模时间相对过长,实验成本较高,且其退变因素是否包含手术的应激反应仍存在争议。

2.1.2 结构损伤模型

结构损伤模型通过物理或化学的方式使椎间盘结构破坏引发退变,目前分为物理损伤模型以及化学损伤模型。

(1) 物理损伤模型:

纤维环损伤模型:Keyes 等^[28]首次通过对纤维环的损伤引发椎间盘退变。此模型在后人不断的发展下主要分为纤维环局部损伤以及累及髓核的纤维环全层损伤。Osti 等^[29]对 21 只山羊在不损伤内层纤维环的情况下进行纤维环切开,在术后 4 ~ 12 月中所有纤维环均发生破裂,术后 18 月所有纤维环切开模型出现退变:椎间盘高度下降且髓核中蛋白聚糖含量减少,他们认为纤维环在椎间盘退变中发挥了重要作用。为进一步增加该方法的可控性和可重复性,近年来,部分学者采用针刺法来诱导椎间盘退变,获得了满意的结果^[30-31]。纤维环损伤模型是目前比较常用的造模方式,可短期内大量重复,但与人类自然退变的时间有明显差异,且对实验者的操作有一定技术要求。

终板损伤模型:该模型主要是应用物理或化学的手段损伤软骨终板以减少椎间盘血供及营养诱发椎间盘退变。Cinotti 等^[32]对猪进行了多处终板穿刺与单处终板穿刺,实验显示两者均能引起椎间盘退变,但多处穿刺方法退变效果较明显,且髓核中尿酸含量与终板损伤程度呈负相关。Hutton 等^[33]对犬的上下终板之间注入骨水泥,结果发现造模的椎间盘并未出现明显的退变现象,髓核与纤维环中蛋白聚糖的含量显著增加。终板损伤模型对操作要求较高,可重复性较差,难以保证终板损伤程度一致,且也存在与椎间盘自然退变的差异的问题,目前应用较少。

髓核损伤模型:在纤维环穿刺基础上,刘航涛等^[34]经纤维环对髓核直接穿刺并抽吸髓核制作退变模型,造模后模型椎间盘间隙明显变窄,且 II 型胶原及蛋白多糖含量明显降低。Kim 等^[35]用钻头对大鼠椎间盘穿刺并抽吸髓核,在术后第 9 周观察到椎间盘损伤变性,伴随蛋白聚糖含量下降以及椎间盘高度变窄。对比纤维环穿刺方法,此方式操作

相对简单、椎间盘退变时间更短,且影像学表现及病理结果与人类椎间盘退变较相似,但此方法会合并纤维环损伤,加速椎间盘退变过程,与人类椎间盘退变时间较缓慢形成差异。

(2)化学损伤模型其主要方式是通过向椎间盘内注射酶类(软骨素酶 ABC、木瓜凝乳蛋白酶、肿瘤坏死因子 α 等)或非酶类药物(博来霉素等),使髓核细胞死亡、基质减少,诱发椎间盘退变^[36-38]。化学损伤模型操作相对简单,能够短期内诱发椎间盘退变,但退变方式同样与自然退变存在差异,对椎间盘造成一定程度损害,且可能影响一些实验生化指标。

2.1.3 自发退变模型

(1)自发退变动物模型:沙鼠是一种伴随年龄增长逐步出现腰椎退变的动物,其椎间盘退变具有出现早、发生率高、遗传性相对较高的特点,在最近研究中部分学者对其椎间盘形态学特征有了新的发现^[39]。犬类中软骨营养不良犬和非软骨营养不良犬均会出现椎间盘自然退变现象,软骨营养不良犬出现退变时间较非软骨营养不良犬早,且软骨营养不良犬椎间盘内的脊索细胞变化、组织病理特点与蛋白多糖含量与人类较相似。灵长类中狒狒与猕猴是不错的自发退变模型动物选择,其活动姿势主要为直立或半直立,在生物力学角度上是最贴近于人类椎间盘退变的模型动物。

(2)营养阻断模型:椎间盘营养供应主要来源于上下软骨终板以及终板外周血管,部分学者通过相应手段阻断椎间盘营养来诱发椎间盘退变。Gullbrand 等^[40]给新西兰白兔喂服尼莫地平或尼古丁,通过药物干预来研究终板内微血管的变化。石芳芳等^[41]通过结扎兔腰椎单侧或双侧血管诱导椎间盘退变,研究表明兔腰椎间盘退变与缺血程度、缺血时间成正比。营养阻断模型目前的应用并不广泛,主要因其操作相对复杂,造模时间较长,且部分学者对营养阻断诱发退变的因素存在一定质疑。

(3)基因敲除模型:基因敲除模型近年来成为研究的热门方向,Beierfuss 等^[42]在对兔子进行 APOE 基因敲除后,发现兔子体内的炎症因子不断增加,从而出现了椎间盘退变晚期症状。最近的研究中,一些学者发现敲除小鼠的 Tenomodulin (Tnmd)基因后其椎间盘出现了退变^[43]。在早期的研究中,基因敲除模型因为成功率低、技术要求高、经济成本高等缺点而不被推荐。而 CRISPR-Cas9 这一技术出现后,对生化以及分子结构研究提供新

的框架^[44]。使得大量且低廉的制造退变模型成为可能。基因敲除模型所表现出来的自然退变与人类较相似,目前有多种基因能诱发椎间盘退变,对单一基因诱发退变的情况需探讨是否存在其他基因影响因素。

2.1.4 全身疾病模型

Wang 等^[45]将 3 月大的小鼠暴露于烟雾中以模拟人类长期吸烟的情况,研究发现小鼠椎体终板孔隙度增加,椎间盘细胞衰老加速,出现了蛋白聚糖水解以及 MMP 活性升高的情况。另一部分学者通过切除大鼠卵巢使骨质流失,降低骨密度以诱发椎间盘退变^[46]。全身疾病模型是一种研究椎间盘自然退变的方式,可控性及可重复性较差而较少应用。

2.2 体外模型

2.2.1 体外细胞培养模型

近年来建立体外模型技术已较为成熟,体外细胞模型根据培养方式不同分为单层细胞培养模型与三维细胞培养模型。Shinmei 等^[47]采用单层培养的方式研究 IL-1 α 对椎间盘中蛋白聚糖的影响。Gruber 等^[48]从人体中采集椎间盘细胞分别用单层培养与三维培养的方法进行研究,在三维培养中 I 型胶原与 II 型胶原含量明显增多。相比于单层培养方式,三维培养方式能够为细胞提供较复杂的培养环境,能够一定程度上减少细胞活力丧失程度、蛋白表达不稳定等特点。但不论单层培养或三维方式,均不能完全模拟真实人体环境,并且一定程度上忽略了力学等因素对椎间盘退变的影响。

2.2.2 体外器官培养模型

体外器官培养模型能够保持椎间盘自身的稳定性,较好的表达细胞表型。其根据是否保留椎体分为:椎间盘器官离体模型与脊柱运动节段离体模型;而椎间盘器官离体模型根据有无保留终板又分为:带终板椎间盘器官离体模型与去终板椎间盘器官离体模型,但是否保留终板以保证椎间盘营养供应,不同学者之间对此存在争议。Haschtmann 等^[49]认为椎间盘器官细胞活力丧失的因素在于没有保留器官的完整性,且缺少人体内的力学环境。与之对应的脊柱运动节段离体模型一定程度上保留了力学因素对退变的影响,更进一步的模拟了人体内的生理环境。体外器官培养模型是一种新型的造模方式,但其缺点也较明显,器官的体外培养不可避免的出现器官、细胞活力丧失的现象,不利于退变模型的长期研究,且忽略了缺血、微循环障碍等因素。

3 结论

退变模型的建立方式目前已较为完善,其中自发性退变模型退变机理与人类较为相似,但自发性退变的动物种类较为局限,其体型以及椎间盘应力方式均与人类形成差异,且构建退变模型的要求不具有广泛代表性;体内模型中物理损伤模型以及应力模型通过应力改变来模拟人体退变环境,但其必然对实验机体构成损伤,且部分需通过手术的方式来改变结构或应力,对操作基础有一定要求,且存在感染的风险,化学损伤模型同样存在缺乏代表性的问题;体外模型造模方式近年来逐步走向成熟,但如何解决现器官、细胞活力的丧失需要进一步讨论研究。

总的来说,退变模型的建立主要是为了反馈于人体椎间盘退变的研究,经过国内外学者数十年的努力,椎间盘退变模型已有数十种构建方法,这些造模方式在操作性、重复性以及经济性方面各有优劣,但是由于椎间盘退变机制尚不明确,且人体与动物之间存在的实际差异,无法彻底否定任何一种造模方式,因此,在研究中不仅需要根据实际的研究目的选择合适的动物及建模方式,更需要充分利用现代科学技术,不断完善动物模型的构建,更好的为临床服务。

参 考 文 献(References)

[1] Jin L, Balian G, Li XJ. Animal models for disc degeneration-an update [J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33(6): 543-554.

[2] O'Connell GD, Vresilovic EJ, Elliott DM. Comparison of animals used in disc research to human lumbar disc geometry [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32(3): 328-333.

[3] 赵鹏, 吴承亮, 肖鲁伟, 等. 椎间盘退变实验动物模型的研究发展与分析 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2013, 37(1): 103-106, 110.

Zhang P, Wu CL, Xiao LW, et al. Recent advances in research on animal models of intervertebral disc degeneration [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2013, 37(1): 103-106, 110.

[4] Lauerma WC, Platenberg RC, Cain JE, et al. Age-related disk degeneration: preliminary report of a naturally occurring baboon model [J]. *J Spinal Disord*, 1992, 5(2): 170-174.

[5] 郭常安, 胡有谷, 吴新彦. 腰椎间盘突出退变动物模型的建立 [J]. *中华外科杂志*, 2000, 38(7): 548-551.

Guo CA, Hu YG, Wu XY, et al. Establishment of animal model of lumbar intervertebral disc degeneration [J]. *Chin J Surg*, 2000, 38(7): 548-551.

[6] Paul CP, Zuiderbaan HA, Zandieh DB, et al. Simulated-physiological loading conditions preserve biological and mechanical properties of caprine lumbar intervertebral discs in ex vivo culture [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33147.

[7] Showalter BL, Beckstein JC, Martin JT, et al. Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: torsion mechanics and collagen content [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2012, 37(15): 900-907.

[8] Wilke HJ, Kettler A, Wenger KH, et al. Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine [J]. *Anat Rec*, 1997, 247(4): 542-555.

[9] Sheyn D, Ben DS, Tawackoli W, et al. Human iPSCs can be differentiated into notochordal cells that reduce intervertebral disc degeneration in a porcine model [J]. *Theranostics*, 2019, 9(25): 7506-7524.

[10] Barczewska M, Jezierska WK, Habich A, et al. Evaluation of regenerative processes in the pig model of intervertebral disc degeneration after transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Folia Neuropathol*, 2018, 56(2): 124-132.

[11] Flouzat-Lachaniette CH, Jullien N, Bouthors C, et al. A novel *in vivo* porcine model of intervertebral disc degeneration induced by cryoinjury [J]. *Int Orthop*, 2018, 42(9): 2263-2272.

[12] Gillett NA, Gerlach R, Cassidy JJ, et al. Age-related changes in the beagle spine [J]. *Acta Orthop Scand*, 1988, 59(5): 503-507.

[13] Bergknut N, Rutges JP, Kranenburg HJ, et al. The dog as an animal model for intervertebral disc degeneration? [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2012, 37(5): 351-358.

[14] Lim TH, Ramakrishnan PS, Kurriger GL, et al. Rat spinal motion segment in organ culture: a cell viability study [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006, 31(12): 1291-1297, 1298.

[15] Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001, 26(22): 2414-2420.

[16] Gruber HE, Gordon B, Norton HJ, et al. Analysis of cell death and vertebral end plate bone mineral density in the annulus of the aging sand rat [J]. *Spine J*, 2008, 8(3): 475-481.

[17] Lipson SJ, Muir H. 1980 Volvo award in basic science. Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1981, 6(3): 194-210.

[18] Bayliss MT, Johnstone B, O'Brien JP. 1988 Volvo award in basic science. Proteoglycan synthesis in the human intervertebral disc. Variation with age, region and pathology [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1988, 13(9): 972-981.

[19] Kroeber MW, Unglaub F, Wang H, et al. New *in vivo* animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27(23): 2684-2690.

[20] Lindblom K. Intervertebral-disc degeneration considered as a pressure atrophy [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1957, 39(4): 933-945.

[21] Court C, Colliou OK, Chin JR, et al. The effect of static *in vivo* bending on the murine intervertebral disc [J]. *Spine J*, 2001, 1(4): 239-245.

[22] Cassidy JD, Yong HK, Kirkaldy-Willis WH, et al. A study of

- the effects of bipedism and upright posture on the lumbosacral spine and paravertebral muscles of the Wistar rat [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1988, 13(3): 301-308.
- [23] Moravec SJ, Cleall JF. An assessment of posture in bipedal rats [J]. *Am J Anat*, 1987, 180(4): 357-364.
- [24] Bailey AS, Adler F, Min LS, et al. A comparison between bipedal and quadrupedal rats: do bipedal rats actually assume an upright posture? [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001, 26(14): 308-313.
- [25] Iatridis JC, Mente PL, Stokes IA, et al. Compression-induced changes in intervertebral disc properties in a rat tail model [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1999, 24(10): 996-1002.
- [26] Miyamoto S, Yonenobu K, Ono K. Experimental cervical spondylosis in the mouse [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1991, 16(10): 495-500.
- [27] Wada E, Ebara S, Saito S, et al. Experimental spondylosis in the rabbit spine. Overuse could accelerate the spondylosis [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1992, 17(3): 1-6.
- [28] Keyes DC, Compere EL. The normal and pathological physiology of the nucleus pulposus of the intervertebral disc [J]. *J Bone Joint Surg*, 1932, 14(4): 897-938.
- [29] Osti OL, Vernon RB, Fraser RD. 1990 Volvo Award in experimental studies. Annulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1990, 15(8): 762-767.
- [30] Lei T, Zhang Y, Zhou Q, et al. A novel approach for the annulus needle puncture model of intervertebral disc degeneration in rabbits [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 900-909.
- [31] Luo TD, Marquez LA, Zabarsky ZK, et al. A percutaneous, minimally invasive annulus fibrosus needle puncture model of intervertebral disc degeneration in rabbits [J]. *J Orthop Surg*, 2018, 26(3): 1-8.
- [32] Cinotti G, Della RC, Romeo S, et al. Degenerative changes of porcine intervertebral disc induced by vertebral endplate injuries [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(2): 174-180.
- [33] Hutton WC, Ganey TM, Elmer WA, et al. Does long-term compressive loading on the intervertebral disc cause degeneration? [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2000, 25(23): 2993-3004.
- [34] 刘航涛, 王万明, 林智军, 等. 兔腰椎间盘髓核穿刺抽吸后的影像及组织病理学变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(9): 1313-1318.
- Liu HT, Wang WM, Lin ZJ, et al. Alterations in imaging and histopathology after aspiration of nucleus pulposus of rabbit lumbar intervertebral disc [J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*, 18(9): 1313-1318.
- [35] 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): 165.
- [36] Kiestner DP, Williams JM, Andersson GB, et al. The dose-related effect of intradiscal chymopapain on rabbit intervertebral discs [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1994, 19(7): 747-751.
- [37] Hu B, Xu C, Tian Y, et al. Inflammatory microRNA-194 and -515 attenuate the biosynthesis of chondroitin sulfate during human intervertebral disc degeneration [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49303-49317.
- [38] Wei F, Zhong R, Wang L, et al. Pingyangmycin-induced *in vivo* lumbar disc degeneration model of rhesus monkeys [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2015, 40(4): 199-210.
- [39] Gruber HE, Hanley EN Jr. Morphologic features of spontaneous annular tears and disc degeneration in the aging sand rat (*Psammomys obesus obesus*) [J]. *Biotech Histochem*, 2017, 92(6): 402-410.
- [40] Gullbrand SE, Peterson J, Mastropolo R, et al. Drug-induced changes to the vertebral endplate vasculature affect transport into the intervertebral disc *in vivo* [J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(12): 1694-1700.
- [41] 石芳芳, 陈琪, 刘东光, 等. 新型兔腰椎间盘缺血退变模型的建立 [J]. *临床骨科杂志*, 2018, 21(6): 744-748.
- Shi FF, Chen Q, Liu DG, et al. The establishment of a novel rabbit lumbar intervertebral disc ischemic degeneration model [J]. *J Clin Orthop*, 2018, 21(6): 744-748.
- [42] Beierfuss A, Hunjadi M, Ritsch A, et al. APOE-knockout in rabbits causes loss of cells in nucleus pulposus and enhances the levels of inflammatory catabolic cytokines damaging the intervertebral disc matrix [J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0225527.
- [43] Lin D, Alberton P, Delgado CM, et al. Loss of tenomodulin expression is a risk factor for age-related intervertebral disc degeneration [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3): e13091.
- [44] Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms [J]. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 505-529.
- [45] Wang D, Nasto LA, Roughley P, et al. Spine degeneration in a murine model of chronic human tobacco smokers [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(8): 896-905.
- [46] 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): 510-519.
- [47] Shinmei M, Kikuchi T, Yamagishi M, et al. The role of interleukin-1 on proteoglycan metabolism of rabbit annulus fibrosus cells cultured *in vitro* [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1988, 13(11): 1284-1290.
- [48] Gruber HE, Hanley EN Jr. Human disc cells in monolayer vs 3D culture; cell shape, division and matrix formation [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2000, 1: 1-6.
- [49] Haschtmann D, Stoyanov JV, Ettinger L, et al. Establishment of a novel intervertebral disc/endplate culture model: analysis of an *ex vivo in vitro* whole-organ rabbit culture system [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006, 31(25): 2918-2925.