

· 基础研究 ·

大鼠肾虚型椎间盘软骨终板退变病证结合模型的构建与评价

夏炳江, 沈兴潮, 胡松峰, 韦金忠, 许杨

(绍兴市中医院, 浙江 绍兴 312000)

摘要 **目的:**探讨采用切除双侧卵巢结合阻断软骨终板营养供应法构建大鼠肾虚型椎间盘软骨终板(cartilage endplate, CEP)退变病证结合模型的可行性。**方法:**将 108 只 12 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠随机分为空白组、CEP 退变模型组、病证结合模型组, 每组 36 只。CEP 退变模型组大鼠于椎间盘 CEP 下方骨质处注射无水酒精, 病证结合模型组大鼠摘除双侧卵巢并于椎间盘 CEP 下方骨质处注射无水酒精, 空白组大鼠不做任何处理。造模后观察并记录大鼠表现特征, 测定肾虚症状体征量化评分。分别于造模后 4 周、8 周, 从各组随机抽取 6 只大鼠, 先摄尾椎 X 线片, 测算尾椎骨密度; 再处死大鼠, 取出尾椎, 行 Micro-CT 扫描测算骨小梁数目(trabecular number, TN)、骨小梁分离度(trabecular separation, TS)、骨小梁厚度(trabecular thickness, TT); 再从各组随机抽取 6 只大鼠, 切取造模椎间盘, 采用 HE 染色观察各组大鼠椎间盘 CEP 组织退变情况, 采用实时定量聚合酶链反应法检测椎间盘 CEP 组织聚集蛋白聚糖和含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs, ADAMTS)-5 基因表达量。**结果:**①一般情况。在造模过程中, 所有大鼠均无意外死亡发生。CEP 退变模型组 1 只大鼠术后 3 d 出现尾部切口愈合不良、坏死现象, 换药后 1 周左右切口愈合; 其余大鼠尾部切口均愈合良好。②大鼠表现特征。造模后, 病证结合模型组大鼠逐渐出现毛发枯槁易脱落、饮食增多、精神倦怠、两眼无神、大便干结变硬、活动减少、反应迟钝等肾虚表现, 空白组与 CEP 退变模型组大鼠无上述表现。③肾虚症状体征量化评分。时间因素和分组因素存在交互效应($F=14.326$, $P=0.000$)。3 组大鼠肾虚症状体征量化评分总体比较, 差异有统计学意义, 即存在分组效应($F=22.317$, $P=0.000$)。造模后不同时间点大鼠肾虚症状体征量化评分的差异有统计学意义, 即存在时间效应($F=50.279$, $P=0.000$)。造模后, 3 组大鼠肾虚症状体征量化评分随时间变化趋势不一致, 空白组大鼠肾虚症状体征量化评分随时间未见明显变化[(1.00±0.71)分, (1.40±0.55)分, (1.80±0.84)分, (2.00±1.00)分, $F=1.573$, $P=0.235$], CEP 退变模型组和病证结合模型组大鼠肾虚症状体征量化评分随时间均呈升高趋势[(0.80±0.45)分, (1.20±0.45)分, (1.60±0.55)分, (2.20±0.84)分, $F=5.095$, $P=0.012$; (1.40±0.55)分, (3.40±1.14)分, (4.60±0.55)分, (6.80±0.84)分, $F=39.256$, $P=0.000$]。造模后 2 周, 3 组大鼠肾虚症状体征量化评分比较, 差异无统计学意义($F=1.400$, $P=0.284$)。造模后 4 周、6 周、8 周, 3 组大鼠肾虚症状体征量化评分比较, 组间差异均有统计学意义(造模后 4 周: $F=12.333$, $P=0.001$; 造模后 6 周: $F=32.462$, $P=0.000$; 造模后 8 周: $F=46.083$, $P=0.000$); 空白组和 CEP 退变模型组大鼠肾虚症状体征量化评分均低于病证结合模型组(造模后 4 周: $LSD-t=4.082$, $P=0.002$; $LSD-t=4.491$, $P=0.001$ 。造模后 6 周: $LSD-t=6.725$, $P=0.000$; $LSD-t=7.206$, $P=0.000$ 。造模后 8 周: $LSD-t=8.485$, $P=0.000$; $LSD-t=8.132$, $P=0.000$); 空白组与 CEP 退变模型组大鼠肾虚症状体征量化评分比较, 差异均无统计学意义(造模后 4 周: $LSD-t=0.408$, $P=0.690$; 造模后 6 周: $LSD-t=0.480$, $P=0.640$; 造模后 8 周: $LSD-t=0.354$, $P=0.730$)。④尾椎骨密度。造模后 4 周, 3 组大鼠尾椎骨密度比较, 差异有统计学意义[(4.15±0.44)g·cm⁻³, (4.04±0.38)g·cm⁻³, (3.30±0.33)g·cm⁻³, $F=7.719$, $P=0.007$]; 空白组和 CEP 退变模型组大鼠尾椎骨密度均高于病证结合模型组($LSD-t=3.682$, $P=0.003$; $LSD-t=3.028$, $P=0.011$); 空白组大鼠尾椎骨密度与 CEP 退变模型组比较, 差异无统计学意义($LSD-t=0.655$, $P=0.525$)。造模后 8 周, 3 组大鼠尾椎骨密度比较, 差异有统计学意义[(4.12±0.42)g·cm⁻³, (3.88±0.53)g·cm⁻³, (2.86±0.63)g·cm⁻³, $F=7.927$, $P=0.006$]; 空白组和 CEP 退变模型组大鼠尾椎骨密度均高于病证结合模型组($LSD-t=3.749$, $P=0.003$; $LSD-t=3.035$, $P=0.010$); 空白组大鼠尾椎骨密度与 CEP 退变模型组比较, 差异无统计学意义($LSD-t=0.714$, $P=0.489$)。⑤骨微结构指标。造模后 4 周, 3 组大鼠 TN、TS 比较, 组间差异均具有统计学意义[TN: (5.01±0.12)个·mm⁻¹, (4.81±0.12)个·mm⁻¹, (3.86±0.17)个·mm⁻¹, $F=95.936$, $P=0.000$; TS: (0.20±0.03)μm, (0.24±0.02)μm, (0.30±0.04)μm, $F=10.807$, $P=0.002$]; 空白组和 CEP 退变模型组大鼠 TN 高于病证结合模型组($LSD-t=12.991$, $P=0.000$; $LSD-t=10.657$, $P=0.000$), TS 低于病证结合模型组($LSD-t=4.623$, $P=0.001$; $LSD-t=2.736$, $P=0.018$); 空白组大鼠 TN 和 TS 与 CEP 退变模型组比较, 组间差

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQ18H270006)

通讯作者: 夏炳江 E-mail: xiahj2006@163.com

异均无统计学意义(TN:LSD- $t=0.432, P=0.924$; TS:LSD- $t=1.887, P=0.084$)。造模后 8 周, 3 组大鼠 TN、TS 比较, 组间差异均具有统计学意义[TN:(4.91 ± 0.26) 个 $\cdot\text{mm}^{-1}$, (4.61 ± 0.55) 个 $\cdot\text{mm}^{-1}$, (3.05 ± 0.44) 个 $\cdot\text{mm}^{-1}$, $F=27.088, P=0.000$; TS:(0.22 ± 0.04) μm , (0.23 ± 0.02) μm , (0.29 ± 0.03) μm , $F=7.679, P=0.002$]; 空白组和 CEP 退变模型组大鼠 TN 高于病证结合模型组(LSD- $t=6.854, P=0.000$; LSD- $t=5.750, P=0.000$), TS 低于病证结合模型组(LSD- $t=3.623, P=0.003$; LSD- $t=3.106, P=0.009$); 空白组大鼠 TN 和 TS 与 CEP 退变模型组比较, 组间差异均无统计学意义(TN:LSD- $t=1.104, P=0.291$; TS:LSD- $t=0.518, P=0.614$)。造模后 4 周、8 周, 3 组大鼠 TT 比较, 组间差异均无统计学意义[造模后 4 周:(0.08 ± 0.02) μm , (0.09 ± 0.01) μm , (0.10 ± 0.01) μm , $F=1.462, P=0.304$; 造模后 8 周:(0.09 ± 0.01) μm , (0.09 ± 0.02) μm , (0.08 ± 0.01) μm , $F=2.400, P=0.171$]。⑥椎间盘 CEP 组织形态。造模后, CEP 退变模型组和病证结合模型组大鼠尾椎 CEP 均出现退变, 表现为软骨细胞排列不规则, 软骨细胞簇聚, 潮线模糊, 染色不均, 软骨钙化层增厚等, 而病证结合模型组退变更明显。⑦椎间盘 CEP 组织聚集蛋白聚糖和 ADAMTS-5 基因的表达。造模后 4 周、8 周, 3 组大鼠椎间盘 CEP 组织聚集蛋白聚糖基因表达量比较, 组间差异均有统计学意义(造模后 4 周: $1.07 \pm 0.19, 0.74 \pm 0.09, 0.51 \pm 0.07, F=23.498, P=0.000$; 造模后 8 周: $1.03 \pm 0.22, 0.65 \pm 0.08, 0.43 \pm 0.07, F=23.538, P=0.000$); 空白组大鼠聚集蛋白聚糖基因表达量高于 CEP 退变模型组和病证结合模型组(造模后 4 周:LSD- $t=4.045, P=0.002$; LSD- $t=6.815, P=0.000$ 。造模后 8 周:LSD- $t=4.329, P=0.001$; LSD- $t=6.774, P=0.000$), CEP 退变模型组大鼠聚集蛋白聚糖基因表达量高于病证结合模型组(造模后 4 周:LSD- $t=2.770, P=0.017$ 。造模后 8 周:LSD- $t=2.445, P=0.031$)。造模后 4 周、8 周, 3 组大鼠椎间盘 CEP 组织 ADAMTS-5 基因表达量比较, 组间差异均有统计学意义(造模后 4 周: $1.06 \pm 0.07, 1.30 \pm 0.08, 1.81 \pm 0.15, F=64.344, P=0.000$; 造模后 8 周: $1.13 \pm 0.09, 1.59 \pm 0.13, 2.14 \pm 0.10, F=110.156, P=0.000$); 空白组大鼠 ADAMTS-5 基因表达量低于 CEP 退变模型组与病证结合模型组大鼠(造模后 4 周:LSD- $t=3.543, P=0.004$; LSD- $t=11.104, P=0.000$ 。造模后 8 周:LSD- $t=6.702, P=0.000$; LSD- $t=14.821, P=0.000$), CEP 退变模型组大鼠 ADAMTS-5 基因表达量低于病证结合模型组(造模后 4 周:LSD- $t=7.562, P=0.000$; 造模后 8 周:LSD- $t=8.119, P=0.000$)。结论: 切除双侧卵巢结合阻断 CEP 营养供应法是构建大鼠肾虚型椎间盘 CEP 退变病证结合模型的一种可行方法。

关键词 椎间盘退行性变; 软骨终板退变; 肾虚; 聚集蛋白聚糖; 含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶; 骨小梁数目; 骨小梁分离度; 骨小梁厚度; 大鼠, Sprague-Dawley; 疾病模型, 动物; 动物实验

Construction and evaluation of disease-syndrome combination rat model of intervertebral disc cartilage endplate degeneration due to kidney deficiency

XIA Bingjiang, SHEN Xingchao, HU Songfeng, WEI Jinzhong, XU Yang

Shaoxing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shaoxing 312000, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the feasibility of building a disease-syndrome (DS) combination rat model of intervertebral disc (IVD) cartilage endplate (CEP) degeneration due to kidney deficiency by removing bilateral ovaries and blocking the supply of nutrients to CEPs. **Methods:** One hundred and eight 12-week-old SPF-grade female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into blank group, CEP degeneration model group and DS combination model group, 36 cases in each group. The rats in CEP degeneration model group were intervened by injection anhydrous ethanol into bone below the CEP of IVD. The ones in DS combination model group were removed bilateral ovaries and followed by the same injection as mentioned above. Those in blank group received no intervention. After modeling, the apparent characteristics of the rats were observed and recorded, followed by the measurement of quantified symptom and sign scores of kidney deficiency. Six rats were randomly selected from each group at the 4th and 8th weeks after the modeling respectively, followed by the examination of bone mineral density (BMD) of the caudal vertebrae by X-ray scanning. The rats were sacrificed and the caudal vertebrae were harvested for measuring the trabecular number (TN), trabecular separation (TS) and trabecular thickness (TT) by Micro-CT scanning. Another six rats randomly selected from each group were sacrificed to isolate the IVDs. The hematoxylin-eosin (HE) staining was performed for observing the degeneration of CEPs, and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed for detecting the mRNA expression levels of aggrecan (ACAN) and a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs (ADAMTS)-5 in CEP tissues of IVDs. **Results:** During the modeling, no accidental death occurred in all rats. One rat in CEP degeneration model group presented with poor healing and necrosis at the caudal incision at 3 days after the surgery, and the incision healed about one week after external medication. The incisions of the remaining rats healed well. After modeling, the rats in DS combination model group gradually exhibited such kidney deficiency symptoms as withered hair with a tendency to fall out, increased food intake, mental fatigue, dim eyes, dry stool, reduced

movement and slow response, which, however, failed to be observed in rats of blank group and CEP degeneration model group. There was interaction between the time factor and the group factor in quantified symptom and sign scores ($F = 14.326, P = 0.000$). The overall comparison of the quantified symptom and sign scores among the three groups revealed a statistically significant difference, implying the presence of group effect ($F = 22.317, P = 0.000$). After modeling, the difference in symptom and sign scores quantified at different time points was statistically significant, confirming the presence of time effect ($F = 50.279, P = 0.000$). The variation trends of the quantified symptom and sign scores were inconsistent with each other over time in the three groups, specifically in blank group, the scores did not change significantly over time ($1.00 \pm 0.71, 1.40 \pm 0.55, 1.80 \pm 0.84, 2.00 \pm 1.00, F = 1.573, P = 0.235$), whereas those in CEP degeneration model group and DS combination model group displayed an upward trend over time ($0.80 \pm 0.45, 1.20 \pm 0.45, 1.60 \pm 0.55, 2.20 \pm 0.84, F = 5.095, P = 0.012; 1.40 \pm 0.55, 3.40 \pm 1.14, 4.60 \pm 0.55, 6.80 \pm 0.84, F = 39.256, P = 0.000$). Two weeks after modeling, there was no statistical difference in the quantified symptom and sign scores among the three groups ($F = 1.400, P = 0.284$). However, the differences among the three groups at the 4th, 6th and 8th weeks after modeling were statistically significant (4th week after modeling: $F = 12.333, P = 0.001$; 6th week after modeling: $F = 32.462, P = 0.000$; 8th week after modeling: $F = 46.083, P = 0.000$). The quantified symptom and sign scores of the blank group and CEP degeneration model group were lower than those of the DS combination model group (4th week after modeling: $LSD - t = 4.082, P = 0.002$; $LSD - t = 4.491, P = 0.001$; 6th week after modeling: $LSD - t = 6.725, P = 0.000$; $LSD - t = 7.206, P = 0.000$; 8th week after modeling: $LSD - t = 8.485, P = 0.000$; $LSD - t = 8.132, P = 0.000$). The scores were not significantly different from each other between blank group and CEP degeneration model group (4th week after modeling: $LSD - t = 0.408, P = 0.690$; 6th week after modeling: $LSD - t = 0.480, P = 0.640$; 8th week after modeling: $LSD - t = 0.354, P = 0.730$). Four weeks after modeling, there was statistical difference in the BMD of caudal vertebrae among the three groups ($4.15 \pm 0.44, 4.04 \pm 0.38, 3.30 \pm 0.33 \text{ g/cm}^3, F = 7.719, P = 0.007$). The BMD of caudal vertebrae in blank group and CEP degeneration model group were both higher than that of the DS combination model group ($LSD - t = 3.682, P = 0.003$; $LSD - t = 3.028, P = 0.011$). Compared with the CEP degeneration model group, the blank group exhibited no statistically significant difference in the BMD of caudal vertebrae ($LSD - t = 0.655, P = 0.525$). Eight weeks after modeling, the difference in BMD of caudal vertebrae among the three groups were statistically significant ($4.12 \pm 0.42, 3.88 \pm 0.53, 2.86 \pm 0.63 \text{ g/cm}^3, F = 7.927, P = 0.006$). The BMD of caudal vertebrae in blank group and CEP degeneration model group both increased compared with that in DS combination model group ($LSD - t = 3.749, P = 0.003$; $LSD - t = 3.035, P = 0.010$). Compared with the CEP degeneration model group, the blank group exhibited no statistically significant difference in the BMD of caudal vertebrae ($LSD - t = 0.714, P = 0.489$). Four weeks after modeling, the TN and TS showed statistically significant differences among the three groups (TN: $5.01 \pm 0.12, 4.81 \pm 0.12, 3.86 \pm 0.17 \text{ trabeculae/mm}, F = 95.936, P = 0.000$; TS: $0.20 \pm 0.03, 0.24 \pm 0.02, 0.30 \pm 0.04 \mu\text{m}, F = 10.807, P = 0.002$). The TN was higher and the TS was lower in blank group and CEP degeneration model group compared to DS combination model group ($LSD - t = 12.991, P = 0.000$; $LSD - t = 10.657, P = 0.000$; $LSD - t = 4.623, P = 0.001$; $LSD - t = 2.736, P = 0.018$). There was no statistical difference in TN and TS between blank group and CEP degeneration model group (TN: $LSD - t = 0.432, P = 0.924$; TS: $LSD - t = 1.887, P = 0.084$). Eight weeks after modeling, the comparison of the TN and TS among the three groups showed statistically significant differences (TN: $4.91 \pm 0.26, 4.61 \pm 0.55, 3.05 \pm 0.44 \text{ trabeculae/mm}, F = 27.088, P = 0.000$; TS: $0.22 \pm 0.04, 0.23 \pm 0.02, 0.29 \pm 0.03 \mu\text{m}, F = 7.679, P = 0.002$). Compared with the DS combination model group, both blank group and CEP degeneration model group exhibited increased TN ($LSD - t = 6.854, P = 0.000$; $LSD - t = 5.750, P = 0.000$), but decreased TS ($LSD - t = 3.623, P = 0.003$; $LSD - t = 3.106, P = 0.009$). There was no statistical difference in TN and TS between blank group and CEP degeneration model group (TN: $LSD - t = 1.104, P = 0.291$; TS: $LSD - t = 0.518, P = 0.614$). At the 4th and 8th week after modeling, no statistically significant difference was observed in TT among the three groups (4th week after modeling: $0.08 \pm 0.02, 0.09 \pm 0.01, 0.10 \pm 0.01 \mu\text{m}, F = 1.462, P = 0.304$; 8th week after modeling: $0.09 \pm 0.01, 0.09 \pm 0.02, 0.08 \pm 0.01 \mu\text{m}, F = 2.400, P = 0.171$). After modeling, the rats in CEP degeneration model group and DS combination model group exhibited CEP degeneration in caudal vertebrae, manifested as irregularly arranged and clustered chondrocyte, blurred tidal line, uneven staining as well as calcified and thickened cartilage, and the degeneration in DS combination model group was more severe. At the 4th and 8th week after modeling, the mRNA expression level of ACAN presented statistically significant differences among the three groups (4th week after modeling: $1.07 \pm 0.19, 0.74 \pm 0.09, 0.51 \pm 0.07, F = 23.498, P = 0.000$; 8th week after modeling: $1.03 \pm 0.22, 0.65 \pm 0.08, 0.43 \pm 0.07, F = 23.538, P = 0.000$). The mRNA expression level of ACAN was higher in blank group compared to CEP degeneration model group and DS combination model group (4th week after modeling: $LSD - t = 4.045, P = 0.002$; $LSD - t = 6.815, P = 0.000$. 8th week after modeling: $LSD - t = 4.329, P = 0.001$; $LSD - t = 6.774, P = 0.000$), and was higher in CEP degeneration model group compared to DS combination model group (4th week after modeling: $LSD - t = 2.770, P = 0.017$; 8th week

after modeling: $LSD - t = 2.445, P = 0.031$). At the 4th and 8th week after modeling, there was statistical difference in the mRNA expression level of ADAMTS-5 among the three groups (4th week after modeling: $1.06 \pm 0.07, 1.30 \pm 0.08, 1.81 \pm 0.15, F = 64.344, P = 0.000$; 8th week after modeling: $1.13 \pm 0.09, 1.59 \pm 0.13, 2.14 \pm 0.10, F = 110.156, P = 0.000$). The mRNA expression level of ADAMTS-5 in blank group was down-regulated as compared with that in CEP degeneration model group and DS combination model group (4th week after modeling: $LSD - t = 3.543, P = 0.004; LSD - t = 11.104, P = 0.000$; 8th week after modeling: $LSD - t = 6.702, P = 0.000; LSD - t = 14.821, P = 0.000$), and the down-regulation revealed in CEP degeneration model group compared to DS combination model group (4th week after modeling: $LSD - t = 7.562, P = 0.000$; 8th week after modeling: $LSD - t = 8.119, P = 0.000$). **Conclusion:** The removal of bilateral ovaries combined with the blockage of nutrition supply to CEP is a feasible method for inducing the DS combination model of IVD CEP degeneration with kidney deficiency in rats.

Keywords intervertebral disc degeneration; cartilage endplate degeneration; kidney deficiency; aggrecan; a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs; trabecular number; trabecular separation; trabecular thickness; rats, Sprague-Dawley; disease models, animal; animal experimentation

软骨终板(cartilage endplate, CEP)退变被认为是椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)的始动因素^[1-2],研究 CEP 退变可为早期防治 IDD 提供新的理论依据。中医学认为“肾虚”为腰痛的关键病机^[3],补肾中药治疗与 IDD 相关的疾病具有独特优势^[4],但要进一步探讨其作用机制或对其有效性和安全性进行验证,尚需进行大量的动物实验。病证结合动物模型以疾病模型为基础,具有较好的可靠性和稳定性,同时引入“证候”概念,能很好体现中医“证候”的阶段性及动态性变化,是研究中医临床疾病的良好平台和载体^[5]。目前,在 CEP 退变的研究领域尚缺乏适宜于中医药研究的病证结合动物模型。本文拟通过切除大鼠双侧卵巢并结合阻断 CEP 营养供应法而构建肾虚型 CEP 退变病证结合动物模型,以进一步研究病与证之间的内在规律。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 12 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 108 只,体重(200 ± 20)g,由浙江中医药大学动物实验中心提供,实验动物许可证号:SYXK(浙)2008-0115。所有大鼠普通颗粒饲料喂养,自然光照,自由进食进水。实验方案通过医院医学伦理委员会审查通过。

1.2 实验仪器与试剂 组织脱水机(日本樱花公司),轮转式切片机(德国 Leica 公司),荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国 ABI 公司),普通 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司),多光谱小动物活体成像仪(美国 Carestream Health 公司),Micro-CT(瑞士 Scanco Medical AG 公司),反转录试剂盒(大连 TaKaRa 公司),定量试剂盒(大连 TaKaRa 公司),PCR 引物[生工生物工程(上海)股份有限公

司]。

2 方法

2.1 动物分组与造模 将 108 只大鼠,按随机区组设计原则,随机分为空白组、CEP 退变模型组和病证结合模型组,每组 36 只。CEP 退变模型组大鼠采用椎间盘 CEP 下骨质无水酒精注射阻断 CEP 营养供应法构建 CEP 退变模型,具体方法如下:以氯胺酮($0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)行腹腔注射麻醉。麻醉成功后,在 X 线透视仪的辅助下定位手术区域[图 1(1)]。取大鼠尾部背侧正中纵形切口,长 1 ~ 1.5 cm,切开皮肤、皮下组织,显露椎体上、下方的 CEP 及椎间盘[图 1(2)]。分别于椎体两端距离 CEP 1 ~ 2 mm 处,用直径 0.6 mm 的硬质针行局部椎体内穿刺至骨髓腔[图 1(3)],针尾连接注射器,通过加压作用注入 50 μL 无水酒精。利用无水酒精的去血管化作用,使椎体内骨髓血管内皮细胞迅速脱水、蛋白变性凝固,小血管闭塞,从而造成微循环的破坏,CEP 营养供应阻断。病证结合模型组大鼠采用摘除大鼠双侧卵巢结合椎间盘 CEP 下骨质无水酒精注射阻断 CEP 营养供应法构建肾虚型 CEP 退变病证结合模型。CEP 退变模型组与病证结合模型组大鼠术后均肌肉注射 1 万单位青霉素预防感染,每天 1 次,持续 3 d,分笼常规饲养,自由活动。空白组大鼠不做任何处理。

2.2 肾虚模型鉴定

2.2.1 大鼠表观特征观察和肾虚症状体征量化评分测定 造模后观察并记录大鼠表观特征,包括大鼠毛发光泽度、饮水、精神状态、大便性状、活动状态等情况,结合文献[6]拟定大鼠肾虚症状体征量化评分表(表 1)进行评分测定。

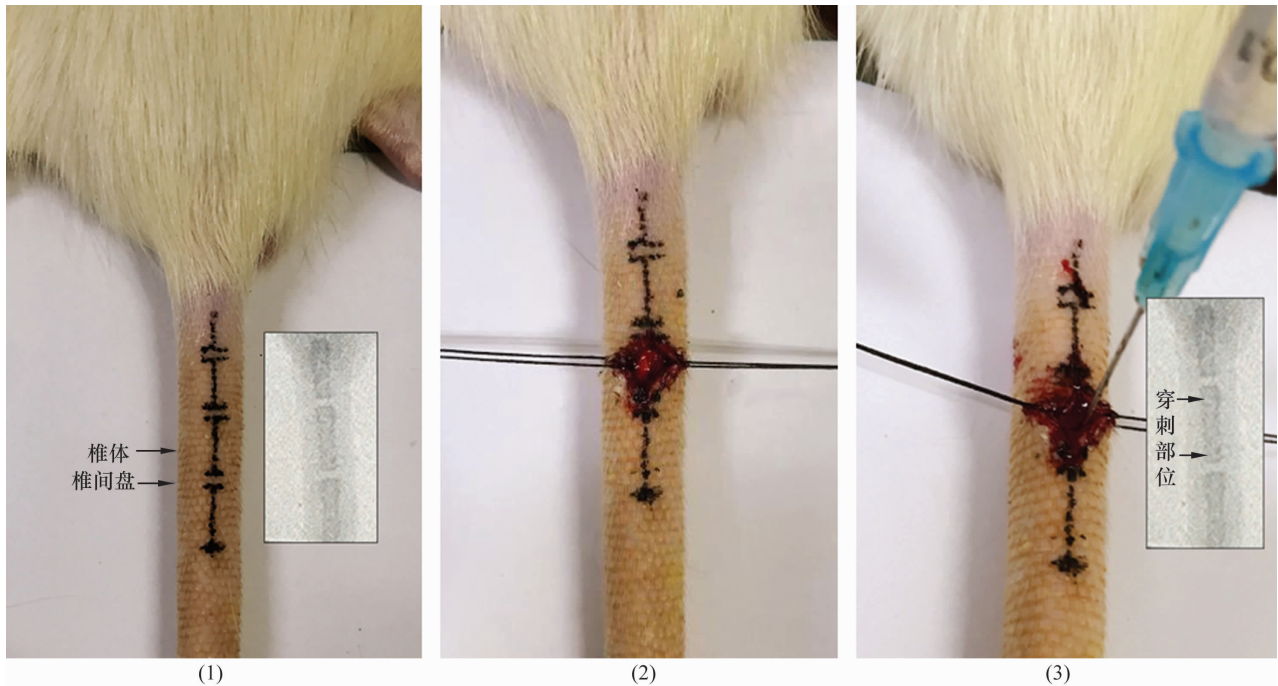


图 1 椎间盘软骨终板退变模型构建过程

注:(1)X 线透视下定位手术区域,并做好体表标记;(2)显露软骨终板及椎间盘;(3)椎体内穿刺并注射无水酒精。

表 1 大鼠肾虚症状体征量化评分表

症状与体征	正常(0~1 分)	轻度肾虚(2~4 分)	中度肾虚(5~7 分)	重度肾虚(8~10 分)
毛发光泽度	毛发柔顺有光泽	毛发缺少光泽	毛发干枯无光泽	毛发枯槁无光泽
饮水情况	饮水正常	饮水稍增多	饮水增多	大量饮水
精神状态	两眼有神	两眼呆滞	两眼无神	两眼呆滞、神疲
大便性状	大便软硬适中	大便质地较硬	大便质硬	大便干结
活动状态	活动适中	活动减少	倦怠思卧	行动迟缓
抓取时抵抗力	反抗有力	反抗较有力	反抗无力	反抗无力,易激怒

2.2.2 尾椎骨密度与骨微结构指标测算 分别于造模后 4 周、8 周,从各组随机抽取 6 只大鼠,以氯胺酮($0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)行腹腔注射麻醉后,采用多光谱小动物活体成像仪摄尾椎 X 线片,并利用成像仪自带软件测算尾椎骨密度。然后,采用二氧化碳窒息法处死大鼠,仔细分离软组织,取出尾椎,修剪去除椎体附件后将其固定在 Micro-CT 载物台上,采用 Micro-CT 扫描大鼠尾椎的骨微结构,选取感兴趣区域骨小梁的三维结构,应用 N-Recon 软件、CT-AN 软件测算骨小梁数目(trabecular number, TN)、骨小梁分离度(trabecular separation, TS)、骨小梁厚度(trabecular thickness, TT)。

2.3 椎间盘 CEP 退变模型鉴定

2.3.1 组织病理学观察 分别于造模后 4 周、8 周,从各组随机抽取 6 只大鼠,切取造模椎间盘(连同其上、下部分椎体组织),10% 磷酸盐缓冲液甲醛固定 72 h,14% 乙二胺四乙酸脱钙 2 周,常规脱水,石蜡包

埋,连续切片,厚约 $5 \mu\text{m}$,HE 染色观察各组大鼠椎间盘 CEP 组织退变情况。

2.3.2 椎间盘 CEP 组织聚集蛋白聚糖和 ADAMTS-5 基因表达检测 分别于造模后 4 周、8 周,从各组随机抽取 6 只大鼠,仔细分离造模椎间盘 CEP 组织,利用液氮迅速冷冻后将其研磨成粉。利用 Trizol 提取液提取总 RNA,以实时定量 PCR 法检测椎间盘 CEP 组织聚集蛋白聚糖和含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs, ADAMTS)-5 基因表达量。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参基因,引物序列见表 2。目标基因的基因表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法与 GAPDH 的表达水平进行校正。

2.4 数据统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。3 组大鼠肾虚症状体征量化评分的比较采用重复测量资料的方差分析;3 组

大鼠尾椎骨密度、骨微结构指标以及聚集蛋白聚糖和 ADAMTS-5 基因表达量的组间总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

表 2 大鼠椎间盘 CEP 组织聚集蛋白聚糖和 ADAMTS-5 基因引物

基因名称		序列(5'-3')
聚集蛋白聚糖	正向	GCAGCACAGACACTTCAGGA
	反向	CCCACCTTCTACAGGCAAGC
ADAMTS-5 ¹⁾	正向	AGAGTCCGAACGAGTTTAGG
	反向	GTGCCAGTCTGTGCGTC
GAPDH ²⁾	正向	AGCCGCATCTTCTGTGCAGTG
	反向	TGGTAACCAGGCGTCCGATACG

1) 含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶-5; 2) 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

3 结果

3.1 一般情况 在造模过程中,所有大鼠均无意外死亡发生。CEP 退变模型组 1 只大鼠术后 3 d 出现尾部切口愈合不良、坏死现象[图 2(1)],换药后 1 周左右切口愈合;其余大鼠尾部切口均愈合良好[图 2(2)]。

3.2 肾虚模型鉴定结果

3.2.1 大鼠表观特征 造模后,空白组与 CEP 退变模型组大鼠毛发柔顺有光泽,饮食适量,两眼有神,大便软硬适中,抓取时反抗有力,不易激惹;病证结合模型组大鼠逐渐出现毛发枯槁易脱落、饮食增多、精神倦怠、两眼无神、大便干结变硬、活动减少、反应迟钝等肾虚的表现。

3.2.2 肾虚症状体征量化评分 时间因素和分组因素存在交互效应。3 组大鼠肾虚症状体征量化评分总体比较,差异有统计学意义,即存在分组效应。造模后不同时间点大鼠肾虚症状体征量化评分的差异有统计学意义,即存在时间效应。造模后,3 组大鼠肾虚症状体征量化评分随时间变化趋势不一致,空白组大鼠肾虚症状体征量化评分随时间未见明显变化,



(1) 愈合不良切口

(2) 愈合良好切口

图 2 大鼠术后尾部皮肤切口外观

CEP 退变模型组和病证结合模型组大鼠肾虚症状体征量化评分随时间均呈升高趋势。造模后 2 周,3 组大鼠肾虚症状体征量化评分比较,差异无统计学意义。造模后 4 周、6 周、8 周,3 组大鼠肾虚症状体征量化评分比较,组间差异均有统计学意义;空白组和 CEP 退变模型组大鼠肾虚症状体征量化评分均低于病证结合模型组(造模后 4 周:LSD-*t*=4.082, $P=0.002$; LSD-*t*=4.491, $P=0.001$ 。造模后 6 周:LSD-*t*=6.725, $P=0.000$; LSD-*t*=7.206, $P=0.000$ 。造模后 8 周:LSD-*t*=8.485, $P=0.000$; LSD-*t*=8.132, $P=0.000$);空白组与 CEP 退变模型组大鼠肾虚症状体征量化评分比较,组间差异均无统计学意义(造模后 4 周:LSD-*t*=0.408, $P=0.690$;造模后 6 周:LSD-*t*=0.480, $P=0.640$;造模后 8 周:LSD-*t*=0.354, $P=0.730$)。见表 3。

3.2.3 尾椎骨密度 造模后 4 周,3 组大鼠尾椎骨密度比较,差异有统计学意义;空白组和 CEP 退变模型组大鼠尾椎骨密度均高于病证结合模型组(LSD-*t*=3.682, $P=0.003$; LSD-*t*=3.028, $P=0.011$);空白组大鼠尾椎骨密度与 CEP 退变模型组比较,差异无统计学意义(LSD-*t*=0.655, $P=0.525$)。造模后

表 3 3 组大鼠肾虚症状体征量化评分

组别	样本量/只	肾虚症状体征量化评分/($\bar{x} \pm s$, 分)					<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
		造模后 2 周	造模后 4 周	造模后 6 周	造模后 8 周	合计		
空白组	6	1.00 ± 0.71	1.40 ± 0.55	1.80 ± 0.84	2.00 ± 1.00	1.55 ± 0.83	1.573	0.235
CEP ¹⁾ 退变模型组	6	0.80 ± 0.45	1.20 ± 0.45	1.60 ± 0.55	2.20 ± 0.84	1.45 ± 0.76	5.095	0.012
病证结合模型组	6	1.40 ± 0.55	3.40 ± 1.14	4.60 ± 0.55	6.80 ± 0.84	4.05 ± 2.14	39.256	0.000
合计	18	1.07 ± 0.59	2.00 ± 1.25	2.67 ± 1.54	3.67 ± 2.44	1.83 ± 0.24	50.279 ²⁾	0.000 ²⁾
<i>F</i> 值		<i>F</i> = 1.400	<i>F</i> = 12.333	<i>F</i> = 32.462	<i>F</i> = 46.083	22.317 ²⁾	<i>F</i> = 14.326 ³⁾	
<i>P</i> 值		0.284	0.001	0.000	0.000	0.000 ²⁾	<i>P</i> = 0.000 ³⁾	

1) 软骨终板; 2) 主效应的 *F* 值和 *P* 值; 3) 交互效应的 *F* 值和 *P* 值。

8 周,3 组大鼠尾椎骨密度比较,差异有统计学意义;空白组和 CEP 退变模型组大鼠尾椎骨密度均高于病证结合模型组 ($LSD - t = 3.749, P = 0.003; LSD - t = 3.035, P = 0.010$);空白组大鼠尾椎骨密度与 CEP 退变模型组比较,差异无统计学意义 ($LSD - t = 0.714, P = 0.489$)。见表 4。

表 4 3 组大鼠尾椎骨密度

组别	样本量/ 只	尾椎骨密度/ $(\bar{x} \pm s, g \cdot cm^{-3})$	
		造模后 4 周	造模后 8 周
空白组	6	4.15 ± 0.44	4.12 ± 0.42
CEP ¹⁾ 退变模型组	6	4.04 ± 0.38	3.88 ± 0.53
病证结合模型组	6	3.30 ± 0.33	2.86 ± 0.63
F 值		7.719	7.927
P 值		0.007	0.006

1) 软骨终板。

3.2.4 骨微结构指标 造模后 4 周,3 组大鼠 TN、TS 比较,组间差异均具有统计学意义;空白组和 CEP 退变模型组大鼠 TN 高于病证结合模型组 ($LSD - t = 12.991, P = 0.000; LSD - t = 10.657, P = 0.000$), TS 低于病证结合模型组 ($LSD - t = 4.623, P = 0.001; LSD - t = 2.736, P = 0.018$);空白组大鼠 TN 和 TS 与 CEP 退变模型组比较,组间差异均无统计学意义

(TN: $LSD - t = 0.432, P = 0.924$; TS: $LSD - t = 1.887, P = 0.084$)。造模后 8 周,3 组大鼠 TN、TS 比较,组间差异均具有统计学意义;病证结合模型组大鼠 TN 低于空白组和 CEP 退变模型组 ($LSD - t = 6.854, P = 0.000; LSD - t = 5.750, P = 0.000$), TS 高于空白组和 CEP 退变模型组 ($LSD - t = 3.623, P = 0.003; LSD - t = 3.106, P = 0.009$);空白组大鼠 TN 和 TS 与 CEP 退变模型组比较,组间差异均无统计学意义 (TN: $LSD - t = 1.104, P = 0.291$; TS: $LSD - t = 0.518, P = 0.614$)。造模后 4 周、8 周,3 组大鼠 TT 比较,组间差异均无统计学意义。见表 5。

3.3 椎间盘 CEP 退变模型鉴定结果

3.3.1 椎间盘 CEP 组织形态 造模后 4 周、8 周,空白组软骨细胞分布均匀,潮线清晰,染色均匀;CEP 退变模型组软骨细胞排列不规则,有少量簇聚软骨细胞,潮线不清;病证结合模型组软骨细胞排列紊乱、簇聚,软骨钙化层增厚,潮线模糊,染色不均匀;CEP 退变模型组和病证结合模型组大鼠尾椎 CEP 均逐渐出现退变,病证结合模型组退变更明显 (图 3、图 4)。

3.3.2 椎间盘 CEP 组织聚集蛋白聚糖和 ADAMTS - 5 基因的表达 造模后 4 周、8 周,3 组大鼠椎间盘

表 5 3 组大鼠尾椎骨微结构指标

组别	样本量/ 只	造模后 4 周			造模后 8 周		
		TN ²⁾ / $(\bar{x} \pm s, \mu m^{-1})$	TS ³⁾ / $(\bar{x} \pm s, \mu m)$	TT ⁴⁾ / $(\bar{x} \pm s, \mu m)$	TN ²⁾ / $(\bar{x} \pm s, \mu m^{-1})$	TS ³⁾ / $(\bar{x} \pm s, \mu m)$	TT ⁴⁾ / $(\bar{x} \pm s, \mu m)$
空白组	6	5.01 ± 0.12	0.20 ± 0.03	0.08 ± 0.02	4.91 ± 0.26	0.22 ± 0.04	0.09 ± 0.01
CEP ¹⁾ 退变模型组	6	4.81 ± 0.12	0.24 ± 0.02	0.09 ± 0.01	4.61 ± 0.55	0.23 ± 0.02	0.09 ± 0.02
病证结合模型组	6	3.86 ± 0.17	0.30 ± 0.04	0.10 ± 0.01	3.05 ± 0.44	0.29 ± 0.03	0.08 ± 0.01
F 值		95.936	10.807	1.462	27.088	7.679	2.400
P 值		0.000	0.002	0.304	0.000	0.002	0.171

1) 软骨终板;2) 骨小梁数目;3) 骨小梁分离度;4) 骨小梁厚度。

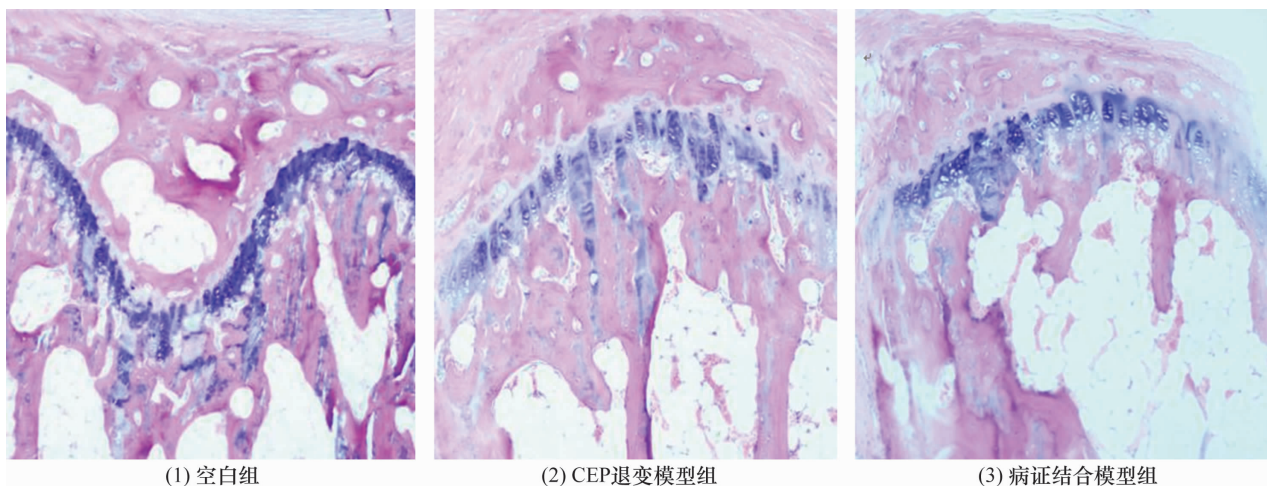


图 3 造模后 4 周 3 组大鼠软骨终板组织形态 (HE 染色 $\times 50$)

CEP 组织聚集蛋白聚糖基因表达量比较,组间差异均有统计学意义;空白组大鼠聚集蛋白聚糖基因表达量高于 CEP 退变模型组和病证结合模型组(造模后 4 周: $LSD - t = 4.045, P = 0.002$; $LSD - t = 6.815, P = 0.000$ 。造模后 8 周: $LSD - t = 4.329, P = 0.001$; $LSD - t = 6.774, P = 0.000$), CEP 退变模型组大鼠聚集蛋白聚糖基因表达量高于病证结合模型组(造模后 4 周: $LSD - t = 2.770, P = 0.017$ 。造模后 8 周: $LSD - t = 2.445, P = 0.031$)。造模后 4 周、8 周,3 组大鼠椎间盘 CEP 组织 ADAMTS-5 基因表达量比较,组间差异均有统计学意义;空白组大鼠 ADAMTS-5 基因表达量低于 CEP 退变模型组与病证结合模型组大鼠(造模后 4 周: $LSD - t = 3.543, P = 0.004$; $LSD - t = 11.104, P = 0.000$ 。造模后 8 周: $LSD - t = 6.702, P = 0.000$; $LSD - t = 14.821, P = 0.000$), CEP 退变模型组大鼠 ADAMTS-5 基因表达量低于病证结合模型组(造模后 4 周: $LSD - t = 7.562, P = 0.000$;造模后 8 周: $LSD - t = 8.119, P = 0.000$)。见表 6。

4 讨 论

目前,中医药动物模型在中医药研究领域中得到

了广泛应用^[7],且在中医药理论指导下构建的病证结合模型已成为当前研究中医药动物模型的发展趋势^[8-9]。本研究通过去除大鼠卵巢的方法构建肾虚型疾病动物模型,在此基础上通过阻断 CEP 的营养供应途径模拟人类椎间盘 CEP 退变模型,试图构建肾虚型 CEP 退变病证结合模型。该模型的构建可进一步为研究椎间盘 CEP 退变发生的病理变化过程、中医药干预治疗以及预防提供一个科学的实验载体。

中医学认为肾为先天之本,藏精气,主骨、生髓、化血,主人体生长发育、生殖和调节机体代谢,为正气之根^[10],与现代医学的神经、内分泌、免疫、生殖、造血等多个系统有密切的关系^[11-13]。已有研究表明,肾虚可导致下丘脑-垂体-性腺轴各环节功能存在不同程度的紊乱^[14-15]。有学者已成功建立了肾虚型疾病动物模型,并把动物的行为学改变作为判别肾虚证模型构建成功的指标之一^[16-17]。《素问·宣明五气》曰:“肾主骨生髓”“其充在肾”,即肾精充足,骨髓生化有源,则骨骼得到骨髓的充养而坚固有力^[18]。若肾精虚少,骨髓化源不足,则不能滋养骨骼,易出现骨骼脆弱,导致骨质疏松等疾病的发生^[19-20]。因此,

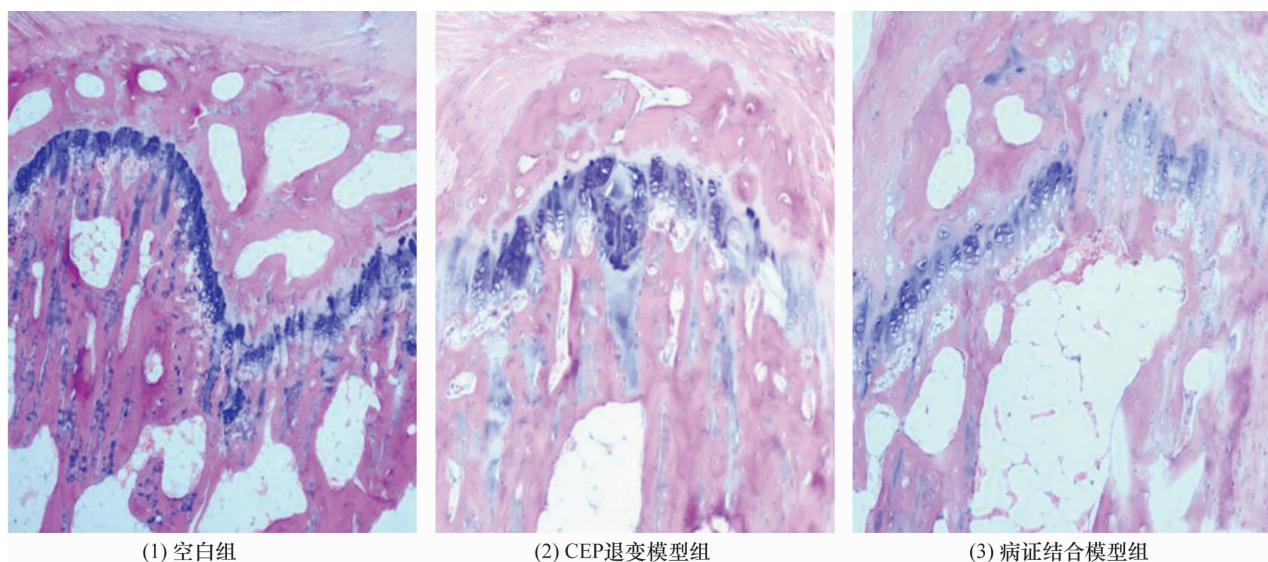


图4 造模后 8 周 3 组大鼠软骨终板组织形态(HE 染色 $\times 50$)

表6 3 组大鼠椎间盘 CEP 组织聚集蛋白聚糖和 ADAMTS-5 基因表达量

组别	样本量/ 只	聚集蛋白聚糖基因表达量($\bar{x} \pm s$)		ADAMTS ²⁾ -5 基因表达量($\bar{x} \pm s$)	
		造模后 4 周	造模后 8 周	造模后 4 周	造模后 8 周
空白组	6	1.07 ± 0.19	1.03 ± 0.22	1.06 ± 0.07	1.13 ± 0.09
CEP ¹⁾ 退变模型组	6	0.74 ± 0.09	0.65 ± 0.08	1.30 ± 0.08	1.59 ± 0.13
病证结合模型组	6	0.51 ± 0.07	0.43 ± 0.07	1.81 ± 0.15	2.14 ± 0.10
F 值		23.498	23.538	64.344	110.156
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

1) 软骨终板;2) 含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶。

本研究把骨骼的荣枯,即骨质疏松作为判定肾虚证的指标之一。本研究结果显示,造模后病证结合模型组大鼠逐渐表现出毛发枯槁易脱落、精神倦怠、两眼无神等与人类类似的肾虚证表现,且骨密度显著降低,骨微结构也发生了相应变化。这提示肾虚造模(去卵巢)大鼠出现了肾精亏虚,致使骨髓生化无源,骨骼不能得到充养,进而出现骨枯(骨质疏松),说明肾虚型模型构建成功。

在本研究中,应用无水酒精注射阻断大鼠 CEP 营养供应后,组织病理学提示 CEP 组织逐渐出现退变表现,表现为软骨细胞排列不规则,软骨细胞簇聚,潮线模糊,染色不均,CEP 钙化和骨化,软骨下骨骨板增厚等,提示 CEP 退变模型构建成功,这与袁维等^[21]的研究结果类似。此外,我们研究也发现,病证结合模型组较 CEP 退变模型组,椎间盘 CEP 组织退变程度更重,提示肾虚可以加速 CEP 退变,进一步印证了“肾主骨生髓”的理论。此外,有学者研究认为,骨密度与 IDD 程度呈负相关,即骨密度越低,IDD 程度越重^[22];其可能的发生机制为:骨密度降低,骨骼强度下降,引起骨性终板或椎体发生微小骨折,导致椎间盘营养供应破坏,从而影响椎间盘的代谢和血液循环,进而导致 IDD^[23]。

在造成软骨退变与破坏的众多影响因素中,基质降解酶活性增高是最主要和最直接的原因之一。聚集蛋白聚糖的降解被认为是软骨退变的重要指标^[24-26]。ADAMTS-5 是目前公认的最重要的聚集蛋白聚糖酶之一,在降解软骨聚集蛋白聚糖的过程中起重要作用^[27]。本研究采用无水酒精注射阻断 CEP 营养供应后,大鼠 CEP 组织中聚集蛋白聚糖基因表达量明显下降,而 ADAMTS-5 基因表达量明显上升,提示 CEP 细胞外基质出现了降解,从而导致 CEP 组织发生退变。此外,本研究结果显示,造模后病证结合模型组 CEP 组织中聚集蛋白聚糖基因表达量低于 CEP 退变模型组,而 ADAMTS-5 基因表达量高于 CEP 退变模型组,说明联合应用去卵巢法(肾虚)可进一步促进 CEP 退变。

本研究结果显示,切除双侧卵巢结合阻断 CEP 营养供应法是构建大鼠肾虚型椎间盘 CEP 退变病证结合模型的一种可行方法。

参考文献

[1] DELUCCA J F, CORTES D H, JACOBS N T, et al. Human

cartilage endplate permeability varies with degeneration and intervertebral disc site[J]. J Biomech, 2016, 49(4): 550-557.

[2] VERGROESEN P P, KINGMA I, EMANUEL K S, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(7): 1057-1070.

[3] 李满意, 张子扬, 娄玉铃. 腰痹的源流及相关历史文献复习(下)[J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5(6): 51-59.

[4] 李满意, 张子扬, 娄玉铃. 腰痹的源流及相关历史文献复习(上)[J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5(5): 39-46.

[5] 夏炳江, 童培建. 适宜中医药研究的椎间盘退变动物模型的构建[J]. 中医正骨, 2016, 28(11): 71-73.

[6] 黄正团, 曹颖颖. 基于恐伤肾的阿尔茨海默病肾虚证大鼠模型的建立与评价[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(21): 2286-2291.

[7] 李思汉, 李书楠, 周福, 等. 关于中医证候动物模型研究的思考[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3357-3361.

[8] 宋亚刚, 李艳, 崔琳琳, 等. 中医药病证结合动物模型的现代应用研究及思考[J]. 中草药, 2019, 50(16): 3971-3978.

[9] 林传权. 病证结合动物模型研究的进展及存在问题分析[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3601-3604.

[10] 徐德成, 马迎民, 范吉平. 中医“肾精”的现代医学内涵[J]. 中医杂志, 2017, 58(22): 1891-1897.

[11] 王媛媛, 蒙婷, 丁慧敏. 温经汤治疗肾虚型更年期综合征的效果及对生殖内分泌和免疫功能的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(17): 1847-1850.

[12] 成金枝, 张俊龙, 郭蕾, 等. 阿尔茨海默病肾虚证病证结合动物模型的制备及验证[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 1063-1066.

[13] 王宇航, 魏小丽, 宋石龙, 等. 机械推拿对慢性疲劳综合征肾虚型大鼠行为学及血清 IL-1 β 、IL-6 的影响[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(5): 1235-1237.

[14] 徐碧红, 李茂清, 熊思艺, 等. 补肾调经膏方对肾虚型卵巢早衰患者性激素水平的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(2): 167-172.

[15] 范怀玲, 林国清, 郑慧, 等. 电针关元对肾虚不孕大鼠性激素及其受体表达影响的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(5): 655-658.

[16] 袁普卫, 杨威, 康武林, 等. 豚鼠绝经后肾虚型原发性骨关节炎模型的建立[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1625-1630.

[17] 陶黎, 刘梅洁, 薛欣, 等. 益肾蠲痹丸对肾虚胶原诱导性关节炎大鼠踝关节骨质破坏的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(5): 420-426.

- [18] 柳源,刁永帅,冯奇,等.“肾主骨”理论的研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2019,46(7):1558-1561.
- [19] 黄文庭. 肾虚证与骨质疏松症的相关性研究[J]. 广西中医药,2017,40(5):1-2.
- [20] 梁文娜,李西海,李灿东. 血清 microRNA 与绝经后骨质疏松症肾虚证的关系[J]. 中医正骨, 2017, 29(10): 53-56.
- [21] 袁维,周小小,蔡攀,等. 终板下椎体缺血诱导兔椎间盘退行性变模型的建立及终板中内皮素 1 的表达[J]. 脊柱外科杂志,2020,18(2):118-124.
- [22] 张勇,杜世新,白新明,等. 绝经期骨质疏松症与腰间盘退变的相关性分析[J]. 颈腰痛杂志,2019,40(1):125-127.
- [23] 徐浩伟,王善金,张树宝,等. 骨质疏松与腰间盘退变相关性的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2020,26(3):445-448.
- [24] VERMA P, DALAL K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis [J]. J Cell Biochem, 2011, 112(12):3507-3514.
- [25] GROMA G, XIN W, GRSKOVIC I, et al. Abnormal bone quality in cartilage oligomeric matrix protein and matrilin 3 double-deficient mice caused by increased tissue inhibitor of metalloproteinases 3 deposition and delayed aggrecan degradation[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(8):2644-2654.
- [26] VAN MEURS J B. Osteoarthritis year in review 2016: genetics, genomics and epigenetics[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2017, 25(2):181-189.
- [27] STANTON H, ROGERSON M, EAST C J, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro[J]. Nature, 2005, 434(7033):648-652.

(收稿日期:2021-01-12 本文编辑:时红磊)

· 作者须知 ·

论文中对数据进行统计学处理时需要注意的问题

1 对基线资料进行统计学分析 搜集资料应严格遵守随机抽样设计,保证样本从同质的总体中随机抽取,除了对比因素外,其他可能影响结果的因素应尽可能齐同或基本接近,以保证组间的齐同可比性。因此,应对样本的基线资料进行统计学分析,以证明组间的齐同可比性。

2 选择正确的统计检验方法 研究目的不同、设计方法不同、资料类型不同,选用的统计检验方法则不同。例如:2组计量资料的比较应采用 t 检验;而多组(≥ 3 组)计量资料的比较应采用方差分析(即 F 检验),如果组间差异有统计学意义,想了解差异存在于哪两组之间,再进一步做 q 检验或LSD- t 检验。许多作者对多组计量资料进行比较时采用两两组间 t 检验的方法是错误的。又如:等级资料的比较应采用Ridit分析或秩和检验或行平均得分差检验。许多作者对等级资料进行比较时采用卡方检验的方法是错误的。

3 假设检验的推断结论不能绝对化 假设检验的结论是一种概率性的推断,无论是拒绝 H_0 还是不拒绝 H_0 ,都有可能发生错误(I型错误和II型错误)。因此,假设检验的推断结论不能绝对化。

4 P 值的大小并不表示实际差别的大小 研究结论包括统计结论和专业结论两部分。统计结论只说明有无统计学意义,而不能说明专业上的差异大小。 P 值的大小不能说明实际效果的“显著”或“不显著”。统计结果的解释和表达,应说对比组之间的差异有(或无)统计学意义,而不能说对比组之间有(或无)显著的差异。 $P \leq 0.01$ 比 $P \leq 0.05$ 更有理由拒绝 H_0 ,并不表示 $P \leq 0.01$ 时比 $P \leq 0.05$ 时实际差异更大。只有将统计结论和专业知识有机地结合起来,才能得出恰如其分的研究结论。若统计结论与专业结论一致,则最终结论也一致;若统计结论与专业结论不一致,则最终结论需根据专业知识而定。判断被试因素的有效性时,要求在统计学上和专业上都有意义。

5 假设检验的结果表达 P 值传统采用0.05和0.01这2个界值,现在提倡给出 P 的具体数值和检验统计量的具体数值(小数点后保留3位有效数字),主要理由是:①以前未推广统计软件之前,需要通过查表估计 P 值,现在使用统计软件会自动给出具体的 P 值和检验统计量的具体值(t 值、 F 值、 χ^2 值等)。②方便根据具体情况判断问题。例如 $P=0.051$ 与 $P=0.049$ 都是小概率,不能简单地断定 $P=0.051$ 无统计学意义而 $P=0.049$ 有统计学意义。③便于对同类研究结果进行综合分析。

6 统计学符号的使用 统计学符号的使用应按照GB 3358—82《统计名词及符号》的规定,具体可参阅本刊投稿须知中的有关要求。