

富含半胱氨酸的分泌型酸性蛋白基因敲除动物模型在腰椎间盘突出所致下腰痛研究中的应用*

马云龙 宋春雨^① 综述 刘晓光**^② 祝斌 审校

(北京大学第三医院疼痛科, 北京 100191)

文献标识: A 文章编号: 1009-6604(2020)08-0750-05

doi: 10.3969/j.issn.1009-6604.2020.08.018

椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IVDD) 是一种由遗传因素、机械因素及环境因素等共同导致椎间盘 (intervertebral disc, IVD) 细胞衰老及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成与分解代谢失衡的过程, 常与下腰痛 (low back pain, LBP) 及其伴随出现的精神睡眠障碍密切相关^[1,2]。动物模型的建立为深入理解 IVDD 的发生与进展, 探索延缓 IVDD 及其相关的机体功能障碍等研究提供了可能。虽然已有多种动物模型用于 IVDD 和 LBP 的实验研究, 但多数为侵袭性建模方法, 可能对实验动物产生较大创伤并干扰实验结果的评价与解释, 有关 IVDD 所致 LBP 的功能学研究报道也较少^[3,4]。此外, 这些模型均无法良好地模拟人类 IVD 自发性退变并产生 LBP 的渐进性特征。富含半胱氨酸的分泌型酸性蛋白 (secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC) 基因敲除的小鼠 (SPARC-null) 可缓慢地发生 IVDD 和 LBP, 产生类似于人类 IVDD 所致 LBP 的自发性与渐进性过程^[5,6], 而且建模过程并不会对实验动物产生过多伤害, 可能是研究 IVDD 与 LBP 相互关系的一种理想动物模型。本文对 SPARC 基因敲除的小鼠模型在 IVDD 所致 LBP 研究中的应用进行文献总结。

1 SPARC 在 IVDD 和 LBP 中的潜在作用

SPARC 又被称为骨连接蛋白或基底膜蛋白 40, 主要表达于骨、肠黏膜、愈合伤口等组织中。人类

SPARC 由一个坐落于 5q31 ~ q33 染色体的 25.6kb 长单基因编码, 包含 10 个外显子和 9 个内含子, 基因结构包括四部分: 氨基末端包含大容量低亲和的钙结合域, 一个富含半胱氨酸结构域, 一个亲水结构域和羧基末端包含与胶原结合的细胞外钙离子域^[7]。SPARC 的表达与基质蛋白 (如胶原蛋白) 关系密切, 后者是 ECM 的主要结构成分并参与维持 ECM 的机械稳定性。SPARC 通过分子结构中氨基和羧基末端结构域直接与结构基质蛋白结合来影响前胶原加工及胶原纤维的形成、沉积和重塑过程^[8-10], 还可调节多种细胞因子和基质金属蛋白酶的表达^[11,12], 从而干扰 ECM 内环境中的合成与分解代谢平衡, 最终影响细胞与 ECM 的相互作用和 ECM 的重塑。鉴于此, 已有大量研究报道 SPARC 在调节骨矿物组织与软骨组织代谢、线粒体功能变化、皮肤弹性改变、眼压调节及细胞黏附与迁移等多种生理过程中的重要作用^[13-17]。此外, SPARC 在多种恶性肿瘤、结缔组织疾病、早期白内障形成、青光眼、糖尿病相关病变、成骨不全症、心肌与骨骼肌疾病及伤口愈合不良等多种疾病的发生发展和治疗方面也扮演着重要角色^[8,12,14,15,18-21]。

IVD 由纤维环 (annulus fibrosus, AF)、髓核 (nucleus pulposus, NP) 和软骨终板 3 部分组成, 作为脊柱的重要组成结构参与脊柱纵向屈伸、侧向弯曲和旋转等活动; 组织学上, IVD 由间盘固有细胞、胶原蛋白 (I ~ V 和 X ~ XII 型胶原) 及蛋白多糖等

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81802686); 中央保健科研课题基金 (W2017BJ53)

** 通讯作者, E-mail: xgliudoctor@163.com

① 麻醉科

② 骨科

基质蛋白为主的 ECM 组成^[22]。IVDD 是椎间盘突出症、椎管狭窄症、脊柱不稳定等脊柱相关疾病的重要病理基础,其病理学改变主要表现为活跃细胞数量减少、参与 ECM 合成与组装的基质蛋白含量减少和分布变化、参与 ECM 降解的多种基质蛋白酶表达增高、细胞表型改变以及炎症反应等^[23]。目前,腰椎 IVDD 被认为是慢性轴性和(或)根性 LBP 的主要影响因素^[1,24]。IVDD 引起 LBP 可能机制包括脊柱不稳对椎小关节、椎旁肌肉和韧带的刺激,IVD 细胞分泌促炎因子增加及免疫细胞局部浸润和激活所致炎症级联反应的放大,伤害刺激诱导 IVD 内新生血管及神经纤维支配的增加,以及持续伤害刺激对脊髓或髓上结构和功能的敏化等^[25,26]。

Gruber 等^[27]2004 年首次报道 SPARC 在人类 IVD 组织中表达的证据,他们选取各年龄层(新生儿至老年人群)接受手术患者的 IVD 组织进行免疫组学研究,结果显示新生儿至 0.19 岁龄的 IVD 中,SPARC 在所有 AF 外环细胞中均有阳性表达,在 NP 和 AF 内环细胞中阳性表达率较低,分别为 76.0% 和 76.4%;与此相比,4.7~76 岁龄的 AF 细胞中,SPARC 的总体阳性表达率为 66.7% ($P = 0.04$)。随后,该团队进一步研究显示靶向敲除 SPARC 基因的小鼠在 14、19 和 20 个月时表现出间盘退化表型,组织学观察显示,正常对照小鼠的 AF 组织中胶原纤维直径均匀、纤维边缘规则,SPARC 基因敲除小鼠 AF 组织中胶原纤维的大小和直径范围广泛、边缘不规则^[5]。此外,Tajerian 等^[28]研究显示,IVD 所致 LBP 表型的小鼠和人类均存在 SPARC 启动子甲基化增加的情况,为直接确定 SPARC 启动子区甲基化对基因启动子活性的影响,将启动子区域亚克隆至荧光素酶报告质粒中,比较甲基化或模拟甲基化质粒转染至人胚肾 HEK293 细胞内荧光素酶活性变化,结果显示甲基化或模拟甲基化处理的细胞内荧光素酶相对活性较未处理组显著降低 ($P < 0.01$),提示 SPARC 启动子区甲基化可沉默基因启动子活性,这些结果表明 SPARC 启动子甲基化所致 SPARC 蛋白失活在人类和动物 IVDD 和 LBP 中具有潜在作用。

2 SPARC-null 小鼠模型建模方法及表征特点

20 世纪 80 年代,Norose 等^[20]率先确立 SPARC-null 小鼠模型的传统建模方法。通过分离 129SV 小鼠的 SPARC 基因中含外显子 2~5 的 BamHI 片段

构建靶向载体,于外显子 4 起始端插入 2 个新霉素耐药基因表达盒,将 pMC1 单纯疱疹病毒胸苷激酶构建体克隆至基因组片段的 3' 端生成构建体,并转染至 CCE 胚胎干细胞;在条件培养基中将转染的细胞培养在 G418 耐药 STO 胚胎成纤维细胞上,筛选耐药菌落并分离 DNA,并应用 Southernblot 鉴定靶基因敲除的细胞;应用 NsiI 消化基因组 DNA 产生野生型和突变型等位基因,将携带 SPARC 基因敲除的胚胎干细胞注射至 C57BL/6J 小鼠的胚泡期胚胎以产生嵌合体;将含嵌合体的雄性小鼠与雌性 C57BL/6J 小鼠回交产生第 1 代 (F1) 杂合子小鼠 (SPARC +/ -),再将 F1 小鼠 (SPARC +/ -) 继续回交以产生第 2 代 (F2) 纯合子基因突变型 (SPARC -/-) 和野生型 (SPARC +/ +) 小鼠;连续回交 10 代以上获得基因高度同源的纯合突变型小鼠,该小鼠既不产生 SPARC 的 mRNA,也不产生相应蛋白^[20]。

靶向敲除 SPARC 基因能够加速年龄依赖性 IVDD 的发生,同时伴随出现年龄依赖性的慢性 LBP 行为特征,主要表现为轴性腰痛、放射性下肢痛和运动障碍^[5,6,29]。针对 SPARC-null 小鼠对疼痛刺激的反应特点进行分类评估,该模型小鼠表现出对冷刺激和脊柱轴向拉伸引起的疼痛高度敏感,而对机械性或热刺激不敏感^[28]。该模型对刺激的敏感性存在位点特异性,小鼠的后爪和背部对冷刺激敏感性显著高于尾部^[6,30]。Millecamps 等^[30]进行的一项横断面、多队列、行为学和组织学研究探讨 LBP 与腰椎 IVD 退变程度之间的关系,研究选取 6~78 周龄 SPARC-null 和野生型对照小鼠,评估 IVD 退变程度、轴性疼痛及放射疼痛等行为体征。SPARC-null 小鼠在 18、24、36 周相比于同周龄对照小鼠,对轴向拉伸刺激以及后爪对冷刺激耐受性均呈显著降低趋势(轴向拉伸耐受性对比:3 个周龄组 P 均 < 0.001 ;后爪对冷刺激耐受性对比:3 个周龄组 P 均 < 0.01);虽然对照组和 SPARC-null 组小鼠间盘退变评分随年龄增长均逐渐增高,但直到 78 周龄,SPARC-null 组间盘退变评分显著高于对照组 ($P < 0.001$),提示 SPARC-null 组小鼠间盘退变程度更加严重。这些结果表明,SPARC-null 小鼠 IVD 退变程度呈现年龄依赖性增加。与此同时,2 组小鼠对轴向拉伸的耐受性与 IVD 退变程度相关,但后爪对冷刺激的耐受性与 IVD 退变程度并不相关。36 周龄以内的 SPARC-null 小鼠相比年龄匹配的对照组小鼠,对轴向拉伸的耐受性较差,但 54 周龄 2 组小鼠

对轴向拉伸的敏感性无明显差别($P > 0.05$);后爪对冷刺激敏感性在 18 周龄的 SPARC-null 小鼠中出现显著升高($P < 0.01$),而且随年龄的增长而持续增加。Miyagi 等^[31]选取不同年龄层小鼠研究慢性 IVD 所致 LBP 的潜在分子机制;通过检测后爪皮肤对冷、热和机械刺激的敏感性以评价放射性疼痛;应用握力实验和悬尾实验以评估轴向 LBP;免疫组化检测神经纤维标记物 PGP 9.5 和感觉神经肽降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)以识别 IVD 神经支配;定量分析背根神经节中 CGRP 和神经肽 Y 的免疫反应活性以及脊髓背角神经元中的 CGRP 和星形胶质细胞标记物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和小胶质细胞标记物离子钙接头蛋白-1 的免疫反应活性,以评估感觉神经系统的可塑性。结果显示 SPARC-null 小鼠表现出对冷刺激敏感、轴向疼痛不适、IVD 内和 IVD 周围感觉神经支配的年龄依赖性增加、背根神经节中 CGRP 和神经肽 Y 的年龄依赖性上调、脊髓背角神经元中降钙素基因相关肽、GFAP 和离子钙接头蛋白-1 的年龄依赖性增加。这些结果表明,退化 IVD 中感觉神经纤维支配增加、背根神经节和脊髓背角神经元的神经可塑性可能是慢性椎间盘源性 LBP 的病理生物学基础。

3 SPARC-null 小鼠模型在 IVDD 与 LBP 行为学评价中的应用

IVDD 和慢性 LBP 常引起多裂肌内的炎症反应和(或)结构重塑过程,近期学者应用 SPARC-null 模型探讨 IVDD 和慢性 LBP 与腰椎多裂肌内炎症信号和结构蛋白变化的相互作用关系。James 等^[32]的一项纵向病例对照研究探讨自发性 IVDD 对多裂肌内炎症信号活性的影响及后者与 IVDD 进展和严重程度的相关性,同时评估运动或锻炼在此发挥的预防作用。研究选取 SPARC-null 小鼠和对照小鼠并分为静止组和运动组,在小鼠 9 个月大时对 2 组进行核磁扫描以确定 IVDD,并从 L₂₋₆ 节段获取多裂肌肌肉片段并检测炎症相关指标。结果显示,SPARC-null 小鼠与野生型对照组小鼠相比,多裂肌内促炎因子 IL-1 β ($P < 0.0001$)、IL-6($P = 0.012$)、TGF- β 1($P = 0.009$)和脂联素($P < 0.0001$)表达显著增高,其中 IL-1 β 的表达水平与 IVDD 严重程度显著相关($P < 0.0001$),运动后能够下调多个促炎因子的表达水平。这些结果表明 IVDD 能够增强多裂肌内炎

症反应,与 IVDD 的严重程度密切相关;运动本身能够通过降低多裂肌内的炎症因子并延缓 IVDD 进展。该团队后续进一步研究显示,SPARC-null 小鼠的 L₁₋₂ 和 L₃₋₄ 节段分别呈现重度和轻度 IVDD,对这两节段多裂肌样本进行检测显示,重度 IVDD 节段的多裂肌内结缔组织厚度增加,胶原蛋白 III($P = 0.02$)、纤维连接蛋白($P = 0.03$)、结缔组织生长因子($P < 0.0001$)、P 物质($P < 0.05$)及金属蛋白酶组织抑制剂-1($P = 0.02$)和金属蛋白酶组织抑制剂-2($P = 0.03$)表达水平显著增高;然而,运动组小鼠结缔组织厚度呈现缩小趋势,且前述参与形成多裂肌纤维网络的相关蛋白表达也出现下调。这些结果表明,慢性 IVDD 能够促进多裂肌内部纤维化结构改变,运动同样可以改善这些结构重塑过程,改善 IVDD 的进展及与其相关的 LBP^[33]。

此外,多项研究也在 SPARC-null 动物模型上评价部分镇痛药物对 IVDD 所致轴性疼痛和放射性疼痛的改善作用。Millecamps 等^[29]对 6 月龄 SPARC-null 小鼠和野生型小鼠(对照组)经腹腔注射阿片类药物吗啡(6mg/kg),药物作用至 90min 时 SPARC-null 小鼠后爪皮肤对冷刺激的敏感性较对照组显著降低($P < 0.05$)。同样,Tajerian 等^[34]在此模型上评价吗啡和 α 2 肾上腺素能受体激动剂可乐定联合应用对轴性疼痛和放射性疼痛的影响,结果显示吗啡:可乐定(100:1)联合应用不仅在改善轴性疼痛方面表现出协同效应,还可改善放射性疼痛的治疗窗。Krock 等^[35]应用此模型研究抑制 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)对延缓 IVDD 及改善 LBP 行为学特征的影响,研究选取 7~9 月龄雄性 SPARC-null 和野生型对照小鼠,应用 TLR4 抑制剂 TAK242 连续治疗 8 周,每周分别应用握力试验和丙酮试验评估轴向疼痛和放射性疼痛,治疗结束后检测脊髓内和腰椎 IVD 的组织细胞学改变以及相关蛋白表达变化。结果显示,与野生型对照小鼠相比,SPARC-null 小鼠的轴性疼痛($P < 0.01$)和放射性疼痛($P < 0.01$)阈值基态水平较低,慢性抑制 TLR4 能够降低 SPARC-null 的上述疼痛表征。分子水平分析显示,SPARC-null 小鼠与对照组相比脊髓背角神经元中 CGRP 和 GFAP 表达明显增加($P < 0.05$),但 TLR4 抑制剂处理 SPARC-null 组小鼠后两者均出现显著减少(药物处理组与药物未处理组对比:CGRP 水平 $P < 0.05$;GFAP 水平 $P < 0.01$);SPARC-null 小鼠 IVD 组织较对照组小鼠分泌较高

水平促炎因子 (SPARC-null 组与对照组小鼠对比: IL-1 α 水平 $P < 0.01$; IL-1 β 水平 $P < 0.05$), 模型小鼠中的这些因子经 TLR4 抑制剂处理后较药物未处理组均显著降低 (药物处理组与药物未处理组对比: IL-1 α 水平 $P < 0.01$; IL-1 β 水平 $P < 0.05$)。这些结果表明, 慢性抑制 TLR4 可降低 SPARC-null 小鼠 LBP、疼痛相关神经可塑性和 IVD 的炎症反应。

4 SPARC-null 小鼠模型的其他表型

虽然 SPARC-null 小鼠在 IVDD 和 LBP 的研究应用具有一定优势, 但由于 SPARC 也参与调节机体多种生理过程的调节, 因此, 存在其他表型特征。1 月龄 SPARC-null 小鼠表现出皮肤胶原纤维直径减少、皮肤抗拉强度降低, 这可能影响皮肤对疼痛刺激的敏感性, 从而干扰疼痛行为学检测结果的准确性^[15]。SPARC-null 小鼠可能还有成骨不全表现, SPARC 基因单核苷酸多态性所致 SPARC 表达缺失, 可能致使小鼠骨矿化基质减少, 随年龄的增长骨小梁体积减少、总骨形成率降低从而出现成骨不全^[36], 而且 SPARC 的误义突变也可导致隐性成骨不全^[19]。此外, SPARC 缺乏可致 B 型淋巴细胞增殖受损, 从而影响机体正常骨髓基质功能^[37]。

5 小结

不可否认, 既往动物模型在研究 IVDD 或 LBP 单方面有良好的应用价值, 但大多数需对间盘和 (或) 神经进行物理性或化学性损伤, 无法良好模拟 IVD 的自然退变与 LBP 功能障碍之间的相互作用与内在联系。SPARC-null 小鼠模型基于 SPARC 基因敲除所致贯穿动物整个生命周期的一个缓慢性、年龄依赖性及自发性 IVDD 和 LBP 所建立, 其相比以往模型能更准确地模拟与评估人类中 IVDD 退变与功能障碍的动态演变过程, 已逐步应用于 IVDD 所致 LBP 的解剖学和疼痛行为学等相关研究。国内学者应用该模型的研究报告尚缺乏, 可能与该动物模型建模时间和经济成本高 (回交代数多、时间至少 2 年) 有关, 导致模型的获取有一定难度。合理选择优化的基因编辑技术对该模型进行改良可能一定程度上降低建模的时间和经济成本, 便于国内外学者的广泛应用和研究。此外, 因 SPARC 基因的多重功能, 对其进行靶向敲除产生的其他表型可能干扰研究结果的判读, 需要对相关实验结果进行合理的分析与解释。

参考文献

- Hartvigsen J, Hancock MJ, Kongsted A, et al. What low back pain is and why we need to pay attention. *Lancet*, 2018, 391 (10137): 2356 – 2367.
- 易端, 朱薇, 孟秀丽, 等. 腰椎间盘突出症患者疼痛与睡眠质量的相关性研究. *中国微创外科杂志*, 2019, 19 (11): 973 – 976.
- Lai A, Moon A, Purmessur D, et al. Annular puncture with tumor necrosis factor- α injection enhances painful behavior with disc degeneration in vivo. *Spine J*, 2016, 16 (3): 420 – 431.
- Lee S, Millecamps M, Foster DZ, et al. Long-term histological analysis of innervation and macrophage infiltration in a mouse model of intervertebral disc injury-induced low back pain. *J Orthop Res*, 2020, 38 (6): 1238 – 1247.
- Gruber HE, Sage EH, Norton HJ, et al. Targeted deletion of the SPARC gene accelerates disc degeneration in the aging mouse. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53 (9): 1131 – 1138.
- Millecamps M, Tajerian M, Naso L, et al. Lumbar intervertebral disc degeneration associated with axial and radiating low back pain in ageing SPARC-null mice. *Pain*, 2012, 153 (6): 1167 – 1179.
- Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol*, 2001, 19 (8): 816 – 827.
- Morrissey MA, Jayadev R, Miley GR, et al. SPARC promotes cell invasion in vivo by decreasing type IV collagen levels in the basement membrane. *PLoS Genet*, 2016, 12 (2): e1005905.
- Murphy-Ullrich JE, Sage EH. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol*, 2014, 37: 1 – 14.
- Trombetta-eSilva J, Rosset EA, Hepfer RG, et al. Decreased mechanical strength and collagen content in sparc-null periodontal ligament is reversed by inhibition of transglutaminase activity. *J Bone Miner Res*, 2015, 30 (10): 1914 – 1924.
- Tumbarello DA, Andrews MR, Brenton JD. SPARC regulates transforming growth factor beta induced (TGFBI) extracellular matrix deposition and paclitaxel response in ovarian cancer cells. *PLoS One*, 2016, 11 (9): e0162698.
- Swaminathan SS, Oh DJ, Kang MH, et al. TGF- β 2-mediated ocular hypertension is attenuated in SPARC-null mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55 (7): 4084 – 4097.
- Bedore J, Leask A, Seguin CA. Targeting the extracellular matrix: matricellular proteins regulate cell-extracellular matrix communication within distinct niches of the intervertebral disc. *Matrix Biol*, 2014, 37: 124 – 130.
- Melouane A, Yoshioka M, Kanzaki M, et al. Sparc, an EPS-induced gene, modulates the extracellular matrix and mitochondrial function via ILK/AMPK pathways in C2C12 cells. *Life Sci*, 2019, 229: 277 – 287.
- Rentz TJ, Poobalarahi F, Bornstein P, et al. SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal

- fibroblasts. *J Biol Chem*, 2007, 282(30):22062 – 22071.
- 16 Rosset EM, Bradshaw AD. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biol*, 2016, 52 – 54:78 – 87.
 - 17 Melouane A, Carbonell A, Yoshioka M, et al. Implication of SPARC in the modulation of the extracellular matrix and mitochondrial function in muscle cells. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192714.
 - 18 Aseer KR, Silvester AJ, Kumar A, et al. SPARC paucity alleviates superoxide-mediated oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetogenic hepatocytes. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108:874 – 895.
 - 19 Mendoza-Londono R, Fahiminiya S, Majewski J, et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by missense mutations in SPARC. *Am J Hum Genet*, 2015, 96(6):979 – 985.
 - 20 Norose K, Clark JI, Syed NA, et al. SPARC deficiency leads to early-onset cataractogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39(13):2674 – 2680.
 - 21 Wong SL, Sukkar MB. The SPARC protein; an overview of its role in lung cancer and pulmonary fibrosis and its potential role in chronic airways disease. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(1):3 – 14.
 - 22 Wang WJ, Yu XH, Wang C, et al. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. *Clin Chim Acta*, 2015, 448:238 – 246.
 - 23 Kadow T, Sowa G, Vo N, et al. Molecular basis of intervertebral disc degeneration and herniations: what are the important translational questions? *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473(6):1903 – 1912.
 - 24 van den Berg R, Jongbloed LM, Kuchuk NO, et al. The association between self-reported low back pain and radiographic lumbar disc degeneration of the cohort hip and cohort knee (CHECK) study. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2017, 42(19):1464 – 1471.
 - 25 Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(1):44 – 56.
 - 26 Palada V, Ahmed AS, Finn A, et al. Characterization of neuroinflammation and periphery-to-CNS inflammatory cross-talk in patients with disc herniation and degenerative disc disease. *Brain Behav Immun*, 2019, 75:60 – 71.
 - 27 Gruber HE, Ingram JA, Leslie K, et al. Cellular, but not matrix, immunolocalization of SPARC in the human intervertebral disc: decreasing localization with aging and disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29(20):2223 – 2228.
 - 28 Tajerian M, Alvarado S, Millemcamps M, et al. DNA methylation of SPARC and chronic low back pain. *Mol Pain*, 2011, 7:65.
 - 29 Millemcamps M, Tajerian M, Sage EH, et al. Behavioral signs of chronic back pain in the SPARC-null mouse. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(2):5 – 102.
 - 30 Millemcamps M, Czerminski JT, Mathieu AP, et al. Behavioral signs of axial low back pain and motor impairment correlate with the severity of intervertebral disc degeneration in a mouse model. *Spine J*, 2015, 15(12):2524 – 2537.
 - 31 Miyagi M, Millemcamps M, Danco AT, et al. ISSLS Prize winner: Increased innervation and sensory nervous system plasticity in a mouse model of low back pain due to intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2014, 39(17):1345 – 1354.
 - 32 James G, Millemcamps M, Stone LS, et al. Dysregulation of the inflammatory mediators in the multifidus muscle after spontaneous intervertebral disc degeneration SPARC-null mice is ameliorated by physical activity. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2018, 43(20):E1184 – E1194.
 - 33 James G, Klyne DM, Millemcamps M, et al. ISSLS Prize in Basic science 2019: Physical activity attenuates fibrotic alterations to the multifidus muscle associated with intervertebral disc degeneration. *Eur Spine J*, 2019, 28(5):893 – 904.
 - 34 Tajerian M, Millemcamps M, Stone LS. Morphine and clonidine synergize to ameliorate low back pain in mice. *Pain Res Treat*, 2012, 2012:150842.
 - 35 Krock E, Millemcamps M, Currie JB, et al. Low back pain and disc degeneration are decreased following chronic toll-like receptor 4 inhibition in a mouse model. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(9):1236 – 1246.
 - 36 Dole NS, Kapinas K, Kessler CB, et al. A single nucleotide polymorphism in osteonectin 3' untranslated region regulates bone volume and is targeted by miR – 433. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(4):723 – 732.
 - 37 Luo Z, Zhou Y, Luo P, et al. SPARC deficiency affects bone marrow stromal function, resulting in impaired B lymphopoiesis. *J Leukoc Biol*, 2014, 96(1):73 – 82.

(收稿日期:2019 – 12 – 28)

(修回日期:2020 – 06 – 17)

(责任编辑:李贺琼)