

等离子髓核成形术对兔退变腰椎间盘内 磷脂酶 A2 活性的影响

任大江, 李 放, 张志成, 关 凯

(北京军区总医院骨科 全军创伤骨科研究所 100700 北京市)

【摘要】目的:观察等离子髓核成形术对兔退变椎间盘组织内磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)活性的影响, 探讨其治疗椎间盘源性腰痛的可能机制。**方法:**选取纯种新西兰大白兔 46 只, 随机分为模型组 38 只, 正常组 8 只, 模型组用 16 号注射针穿刺建立 L4/5、L5/6 椎间盘退变动物模型。将造模成功的 36 只兔分为模型治疗组及模型对照组, 每组 18 只, 模型治疗组行等离子髓核成形术, 对照组不做处理, 分别在术后即刻、1 周、1 个月时处死动物, 取 L4/5、L5/6 椎间盘进行 PLA2 活性检测, 正常组在实验结束时取 L4/5、L5/6 椎间盘进行 PLA2 活性检测。**结果:**正常组椎间盘组织中 PLA2 的活性为 80.68 ± 5.56 ; 模型治疗组消融术后即刻椎间盘组织内 PLA2 活性为 184.98 ± 9.43 , 术后 1 周为 154.39 ± 7.99 , 术后 1 个月为 142.64 ± 10.72 ; 模型对照组相应时间点椎间盘组织内 PLA2 活性分别为 194.86 ± 11.80 , 195.2 ± 13.90 , 225.98 ± 12.59 。模型组各时间点的 PLA2 活性均较正常组明显升高 ($P < 0.01$); 模型治疗组各时间点与相应时间点模型对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$); 模型治疗组术后 1 周的 PLA2 水平较术后即刻明显降低 ($P < 0.01$), 术后 1 个月较术后 1 周仍有降低。**结论:**等离子髓核成形术可以降低退变椎间盘内磷脂酶 A2 活性, 可能是治疗椎间盘源性腰痛的机制之一。

【关键词】椎间盘; 等离子髓核成形术; 动物模型; 磷脂酶 A2

中图分类号: R681.5, Q556 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-05-0377-04

The effect of coblation on the phospholipase A2 activity in the degenerative intervertebral disc in rabbit model/REN Dajiang, LI Fang, ZHANG Zhicheng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(5): 377~380

【Abstract】Objective: To explore the effect of coblation on the phospholipase A2 (PLA2) activity in degenerative intervertebral disc and investigate the possible mechanism of coblation in treatment of dicogenic back pain. **Method:** A total of 46 New Zealand White rabbits were divided into 2 groups at random: animal model group ($n=38$) and non-animal model group ($n=8$). The L4/5、L5/6 were exposed respectively in animal model group, then, the two levels were stabbed by 16-gauge hypodermic needle to establish the degenerative intervertebral disc. 36 animal models were successfully established which were further subdivided into 2 groups: coblation group ($n=18$), non-coblation group ($n=18$). Coblation was performed on the coblation group. The activity of PLA2 in the intervertebral disc of L4/5、L5/6 was determined at 3 different time intervals after coblation: at once, 1 week, 1 month. The same procedure was also processed at the end of the experimental study in the non-coblation group. **Result:** The activity of PLA2 in non-animal model group and animal model non-coblation group was 80.68 ± 5.56 and 194.86 ± 11.80 , there was significant difference between two groups ($P < 0.01$). In the animal model group, activity of PLA2 in both coblation and non-coblation groups was 184.98 ± 9.43 and 194.86 ± 11.80 at once after coblation, 154.39 ± 7.99 and 195.20 ± 13.90 a week after coblation, 142.63 ± 10.72 and 225.98 ± 12.59 a month after coblation. The activity of PLA2 in 1 week was significantly lower than that at the real time ($P < 0.01$) in coblation group. There was a statistical significance of the activity of PLA2 between coblation group and non-coblation group ($P < 0.05$) at corresponding different time intervals. The activity of PLA2 in 1 month was still lower than that in 1 week. **Conclusion:** The coblation could degrade the activity of PLA2 in the degenerative intervertebral disc. It maybe one of the possible mechanisms of coblation in treatment of dicogenic back pain.

第一作者简介: 男 (1974-) 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 脊柱外科

电话: (010)66721629-8001 E-mail: militarymedical@126.com

【Key words】Intervertebral Disc; Coblation; Animal Model; Phospholipase A2

【Author's address】Department of Orthopaedics, Beijing Military Area General Hospital, Beijing, 100700, China

等离子髓核成形术治疗椎间盘源性疼痛的原理是采用射频对髓核组织消融,降低退变椎间盘内压力而发挥治疗作用。但临床上我们观察到一些椎间盘严重退变、纤维环撕裂、椎间盘内压不高的患者,在接受该治疗后疼痛症状也得到明显缓解或消失^[1]。磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)作为重要的炎症介质和致痛物质,与椎间盘退变疾病的病理改变密切相关^[2]。本研究对兔椎间盘退变模型进行等离子髓核成形术治疗,对比术前、术后椎间盘组织内 PLA2 活性的变化,旨在探讨等离子髓核成形术对椎间盘源性腰痛可能的治疗机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

选取 2 月龄新西兰纯种大耳白兔 46 只(由北京维通利华实验动物技术有限公司提供),雌雄各半,体重 2.0~2.5kg,单笼饲养。随机分为模型组 38 只;正常组 8 只。

1.2 动物模型建立

模型组所有动物先摄脊柱 X 线片及 MRI 检查,在髂棘后外侧切口,显露 L4/5、L5/6 节段,用持针器钳夹 16 号注射针(针尖到针持距离为 5mm)在纤维环背外侧刺入,深度 5mm。关闭切口。术后连续 3d 给予庆大霉素肌注,监测动物的一般情况、肢体活动及切口愈合情况。术后 4 周,再次行 MRI 及 X 线检查,证实造模成功 36 只:X 线片显示手术干预节段椎间隙变窄,椎间盘上下软骨终板出现不同程度钙化,椎体前缘出现轻度唇缘样增生;MRI 扫描显示椎间盘 T2 加权像呈低信号改变,椎间隙高度下降(图 1)。随机分为模型治疗组(18 只)和模型对照组(18 只),模型治疗组行等离子髓核成形术,模型对照组不进行任何治疗。

1.3 等离子髓核成形术

动物常规麻醉,术区备皮,左侧卧位,C 型臂 X 线透视下克氏针定位 L4/5、L5/6 节段,并进行标记。使用 Athrocare 公司的颈椎穿刺针进行穿刺,L5/6 穿刺点为髂棘顶点,可触及一长约 1cm 的平台,在平台背侧进针,方向与纵轴成约 40°

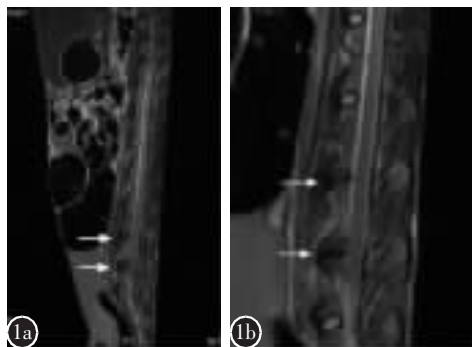


图 1 造模后 4 周 MRI 检查示 L4/5、L5/6 椎间盘 T2 加权像呈低信号改变,椎间隙变窄(b 为局部放大图像)

角;L4/5 穿刺点为 L5/6 穿刺点向头侧移动约 2cm,正位透视针尖未过中线,侧位透视针尖位于椎间盘中 2/3 处。穿刺成功后退出针芯,接等离子刀,调整消融变量为 1 档,治疗刀头前端插入起点为进入侧纤维环内层、终点为对侧纤维环内层,脚踏消融(Coblation)键,缓慢插入治疗刀头至终点,此过程为 3~5s,此时可见气泡自穿刺针口溢出,将治疗刀头按进入速度缓慢撤出至起点,此过程脚踏热凝(Coagulation)键。按穿刺针圆口的 6 点、8 点、10 点、12 点、2 点、4 点为标记,将此过程重复 6 次。进行多点消融。刀头治疗路径控制在 5mm 范围内。治疗结束后动物回笼饲养。连续 3d 给予庆大霉素肌注。观察动物的一般情况、神经功能情况、穿刺口愈合情况。

1.4 标本制备

模型治疗组分别于髓核成形术终止后即刻、术后 1 周、术后 1 个月各随机处死 6 只动物,模型对照组在对应时间点各处死 6 只动物。剖开背部皮肤,分离背部肌肉,暴露出脊柱后,找到最下面一对肋骨作为标记,分别在 L1 椎体上方和 L6 椎体下方剪断脊柱,取出脊柱后剔除椎骨上附着的肌肉,去除横突及每个椎体的附件,仅保留椎体及与之相连的椎间盘。无菌条件下用手术刀沿椎间盘两端与骨质连接面的外侧小心切取完整的 L4/5、L5/6 椎间盘。正常组动物最后全部处死后取 L4/5、L5/6 椎间盘。-20℃下保存。

1.5 磷脂酶 A2 活性的测定^[3]

1.5.1 试剂配制 (1) 底物缓冲液:含卵磷脂(PC)3.75mmol/L (3.1188g),甘氨酸 0.1mmol/L

(7.507g), 硼酸 3.57mmol/L(0.22078g), 去氧胆酸钠 6.03mmol/L(2.4998g), 加蒸馏水 1000ml, 60℃ 水浴 30min, 用 1M 氢氧化钠调 pH 值至 8.52。(2) PLA2 稀释液: 除不含 PC 外, 其他试剂与底物缓冲液相同。(3) NaOH 溶液: 1mol/L (40g 溶于 1000ml 蒸馏水)。(4) HCl 溶液: 0.005mol/L(0.1825g HCl 溶于 1000ml 蒸馏水)。

1.5.2 组织匀浆制备 将模型组(模型治疗组及模型对照组)及正常组冻存的每一个椎间盘依次按如下步骤操作: 样本快速复温后称重, 剪碎成 1×1×1mm 小组织块, 每克组织加 PLA2 稀释液 4ml, 放入冰冻组织匀浆机中 4℃ 下 4000r/min 速度匀浆 10min 后, 吸取全部上清液, 向上清液中加入 0.4ml PLA2 稀释液后再次以 8000r/min 速度离心 20min, 取上清液, 4℃ 下保存待用。

1.5.3 PLA2 活性测定(微量酸滴定法) 每个样本上清液在 60℃ 水浴 30min 后冷却, 置 4℃ 冰箱冷却备用。取 2 只 25ml 烧杯分别作为测定管和对照管, 按表 1 加入试剂, 混匀后用高灵敏度 pH 计(德国 Inolab, DH740 PH 灵敏度: 0.001)分别测定两管的 pH 值, 用新标定的稀盐酸(0.005mol/L)将对照管的 pH 值滴定到与测定管的 pH 值相同, 以所消耗的盐酸体积计算测定管中 PLA2 的活性。一个 PLA2 活性单位规定为在 37℃ 下, 每分钟每毫升样本反应消耗 1nmol 盐酸的量 (1U=1nmol·ml⁻¹·min⁻¹), 即:

$$PLA2(U) = N \times V \times 10^6 \times 2.5 / t = 208.33 \times V (V、N \text{ 分别为所消耗盐酸的体积 ml 数和 HCl 浓度, } t \text{ 为反应时间})。$$

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计学软件进行分析。同组间不同时间点两两比较采用 (Fisher LSD 检验); 不同组相同时间点比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 1 磷脂酶 A2 活性测定程序

试剂	对照管	测定管
底物缓冲液	8ml	8ml
0.5mol/L 氯化钙	—	0.2ml
15mmol/L 乙二胺四乙酸	1.1ml	—
样本	0.4ml	0.4ml
37℃ 水浴 60min		
0.5mol/L 氯化钙	0.2ml	—
15mmol/L 乙二胺四乙酸	—	1.1ml

2 结果

模型组及正常组椎间盘组织内 PLA2 活性水平见表 2。模型组各时间点的 PLA2 活性均较正常组明显升高 ($P < 0.01$); 模型治疗组各时间点与相应时间点模型对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$); 模型治疗组术后 1 周的 PLA2 水平较术后即刻明显降低 ($P < 0.01$), 术后 1 个月较术后 1 周仍有降低, 但两者比较没有统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 2 正常组及模型组椎间盘组织内 PLA2 活性水平 ($\bar{x} \pm s$)

	PLA2 活性
正常组	80.68±5.56
模型对照组	
术后即时	194.86±11.80 ^①
术后 1 周	195.20±13.90 ^①
术后 1 月	225.98±12.59 ^①
模型治疗组	
术后即时	184.98±9.43 ^{①②}
术后 1 周	154.39±7.99 ^{①②③}
术后 1 月	142.63±10.72 ^{①②④}

注: ①与正常组比较 $P < 0.01$; ②与模型对照组相应时间点比较 $P < 0.01$; ③与同组术后即时比较 $P < 0.01$; ④与术后 1 周时比较 $P > 0.01$

3 讨论

研究表明^[4,5], 对于腰椎间盘突出疾患, 传统的机械压迫学说无法解释所有引起腰腿痛症状的原因。近年来, 局部损伤组织释放的化学介质引发疼痛的观点得到普遍认可^[6]。参与椎间盘退变的炎症介质很多, 其中 PLA2 作为重要的炎症介质和致痛物质, 与椎间盘退变和突出、神经根性症状的产生、周围神经损伤及椎间盘源性下腰痛等密切相关^[2]。

PLA2 是一种脂解酶, 由 Saal 等^[7]于 1990 年在突出椎间盘组织中首先发现, 其强烈的神经根炎症损害作用引起了科研工作者的广泛兴趣。当细胞受到某些刺激或其他介质的作用及细胞损伤的情况下, 细胞的磷脂酶(主要来自中性粒细胞溶酶体)被激活, 它能特异性结合膜磷脂上糖磷脂 2 位(sn-2)酰基部位, 将花生四烯酸游离出来, 后者进一步降解为前列腺素(PGs)、血栓素(TX)、白三烯(LT)及血小板活化因子(PAF)等促炎细胞因子, 这些活性物质通过各自的作用途径, 继续诱生成更多的炎症因子, 形成级联瀑布效应, 促进炎症的发展。PLA2 被认为是这一链式反应中的限

速酶^[8]。因此, PLA2 不仅是重要的炎症介质和致痛物质, 也被认为是局部组织炎症的特殊标志, 其在腰椎间盘突出组织中活性的改变也是衡量椎间盘发生退变的重要指征。本实验中, 我们比较了正常椎间盘组织和退变模型椎间盘组织中 PLA2 的水平, 发现两者具有显著性差异, 后者 PLA2 活性明显要高于前者, 提示 PLA2 的高表达与腰椎间盘突出、突出存在着密不可分的关系。

长期以来, 腰椎间盘突出性腰背疼痛均以对症处理及外科手术为主要治疗手段。保守治疗通常不能很好地解决疾病的根本原因, 使患者长期遭受病痛。外科治疗遵循减压与稳定的原则, 但要以牺牲部分或整个椎间盘的结构与功能为代价; 而异体椎间盘移植术、人工髓核置换术及人工椎间盘假体置换术等也存在着明显的弊端和缺陷, 且长期疗效有待进一步观察。近年发展起来的包括等离子髓核成形术在内的微创手术治疗方法, 借助高科技设备及药物, 以最小痛苦, 力求得到与外科手术治疗相似的临床疗效。

等离子髓核成形术的治疗原理是利用射频能量去除少量髓核组织, 并在髓核内部形成孔道, 最终使椎间盘内的压力降低, 从而发挥疗效。国内已有临床应用等离子髓核成形术治疗椎间盘源性疼痛短期疗效满意的报道^[9]。但我们在临床上应用等离子射频冷消融技术的过程中发现, 部分腰部疼痛患者 CT 及 MRI 等影像学资料提示未见神经根压迫, 椎间盘造影时造影剂注入量大于 2.0ml, 并出现造影剂广泛渗漏, 提示纤维环多处撕裂, 在行等离子消融治疗后患者疼痛症状也得到缓解或消失, 用椎间盘内减压的理论无法解释这一临床治疗结果, 通过查阅近些年来国内外相关文献亦无此报导。我们推测等离子髓核成形术治疗椎间盘源性腰痛的机制除了减压, 可能还存在其他途径。

本研究通过对椎间盘退变动物模型行等离子髓核成形术后分别在 3 个时间点(术后即刻、术后 1 周、术后 1 个月)测定椎间盘组织中 PLA2 的活性, 并与退变模型非治疗组相同时间点进行比较,

发现在行等离子髓核消融手术后即刻、1 周、1 个月时治疗组椎间盘内 PLA2 活性较对照组降低。提示对退变椎间盘行等离子消融可以降低椎间盘内重要的致炎介质 PLA2 的活性水平, 从而发挥临床治疗作用。和治疗术后即时比较, 在治疗手术后 1 周 PLA2 活性明显降低, 1 个月时进一步降低。我们认为在此过程中, 等离子消融的能量破坏了部分磷脂酶 A2 的活性, 遏制了炎症产生的级联瀑布效应, 故在手术后 1 周出现了 PLA2 水平的大幅度下降。

本研究证实等离子髓核成形术可以降低退变椎间盘内 PLA2 的活性, 其可能是治疗椎间盘源性腰痛的机制之一。

4 参考文献

1. 李放, 戴钢, 关凯等. 经皮穿刺等离子髓核成形术在腰腿痛治疗中的应用[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(9): 539-541.
2. Kawakami M, Tamaki T, Hashizume H, et al. The role of phospholipase A2 and nitric oxide in pain-related behavior produced by an allograft of intervertebral disc material to the sciatic nerve of the rat[J]. Spine, 1997, 22(10): 1074-1079.
3. 陈思峰, 吴中立. 体液和组织磷脂酶 A2 简便快速测定法[J]. 第二军医大学学报, 1989, 10(3): 254.
4. Olmarker K, Byrd G, Cornefjord M. Effects of methylprednisolone on nucleus pulposus-induced nerve root injury. Spine, 1994, 19(16): 1803-1808.
5. Luoma K, Riihimäki H, Luukkainen R, et al. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration [J]. Spine, 2000, 25(4): 487-492.
6. Takebayashi T, Cavanaugh JM, Ozaktay AC, et al. Effect of nucleus pulposus on the neural activity of dorsal root ganglion [J]. Spine, 2001, 26(8): 940-944.
7. Saal JS, Franson RC, Dobrow R, et al. High levels of inflammatory phospholipase A2 activity in lumbar disc herniation [J]. Spine, 1990, 15(2): 674-678.
8. 鲁玉来, 蔡钦林主编. 腰椎间盘突出症 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2001. 102-105.
9. 李放, 戴钢, 孙天胜, 等. 经皮髓核成形术治疗椎间盘源性疼痛的初步观察[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2004, 14(2): 108-110.

(收稿日期: 2008-03-12 修回日期: 2008-04-23)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)