

综述

化学法制备椎间盘退变动物模型的研究进展

王 娜¹, 赵丹慧¹, 吴成爱¹, 田 伟²

(1 北京市创伤骨科研究所分子骨科实验室; 2 北京积水潭医院脊柱外科 100035 北京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.04.17

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-04-0334-03

椎间盘退变是腰椎退变性疾患的病理基础。简单可靠的动物模型不仅能为深入探寻椎间盘退变的发病机制及病理过程提供良好的实验模板,而且能对新的治疗手段和治疗药物进行有效筛选及准确评估。制备椎间盘退变动物模型的方法有多种,其中通过刀切、穿刺以及化学等方法损伤椎间盘自身结构建立的诱发性退变模型目前应用最为广泛^[1-3]。刀切或穿刺损伤椎间盘的方法相对经济^[4-7],但对动物创伤较大,安全性低^[8]。使用特定型号的针穿刺可产生相对温和而缓慢的退变^[9],但不足之处是穿刺时深度及程度不易控制。应用化学制剂诱导椎间盘产生退变具有重复性好、不需复杂的仪器设备、退变程度可控等优点,成为目前常用的方法之一^[10]。

1 应用木瓜凝乳蛋白酶制备椎间盘退变动物模型

木瓜凝乳蛋白酶是较早报道的根据髓核化学溶解术的原理制备椎间盘退变模型的方法。通过注入木瓜凝乳蛋白酶诱导椎间盘产生退变已经在兔和狗等动物实验中得以证实^[2]。木瓜凝乳蛋白酶可选择性破坏蛋白多糖,造成髓核蛋白粘稠度下降,纤维环层状排列松弛,进而椎间盘细胞形态发生改变,脊柱生物力学稳定性降低^[9]。Nitobe 等^[10]使用木瓜凝乳蛋白酶对犬椎间盘细胞进行体外培养结果显示,髓核和纤维环中大多数细胞在加入木瓜凝乳蛋白酶后数小时内无明显改变,仅部分出现轻度肿胀及液泡数量增多;加入木瓜凝乳蛋白酶 24h 后细胞膜广泛损伤,甚至部分坏死,蛋白聚糖及基质蛋白被快速降解。Kiester 等^[11]将不同剂量木瓜凝乳蛋白酶注入兔椎间盘内,观察到木瓜凝乳蛋白酶剂量为 20pKat 时血中硫酸角质素水平未见明显变化,100pKat 和 200pKat 时中度增多,500pKat 时硫酸角质素水平显著增高,而超过 500pKat 时未再发现有进一步的变化。适当剂量的木瓜凝乳蛋白酶可导致蛋白多糖快速分解,同时出现椎间盘容积减小,生物力学改变;大剂量时其蛋白酶活性则造成椎间盘的大面积破坏^[9]。但生理状态下椎间盘细胞不能产生木瓜凝乳蛋白酶,因此该模型不能完全模拟椎间盘的生理性退变。另外木瓜凝乳蛋白酶

的蛋白酶活性也缺乏基质特异性,因此目前已逐渐被软骨素酶 ABC 等替代。

2 应用软骨素酶 ABC 制备椎间盘退变动物模型

软骨素酶 ABC 能够特异性降解硫酸软骨素、硫酸皮肤素、透明质酸等多种粘多糖,从而导致椎间盘蛋白聚糖降解,退变发生^[12]。Sakuma 等^[13]认为软骨素酶 ABC 作为一种分化因子,具有与白介素-1 协同刺激内在胶原酶的作用。Norcross 等^[14]将软骨素酶 ABC 注入大鼠尾椎间盘,2 周时即观察到椎间盘重量明显减轻,蛋白聚糖含量减少,髓核细胞丢失,椎间盘硬度增加。2007 年 Hoogendoorn 等^[15]将 0.25U/ml 软骨素酶 ABC 注入山羊腰椎间盘内,分别在注射后 4、8、12、18 和 26 周进行椎间盘的重量、MRI 及组织学检测,结果显示 4、8 周时椎间盘重量和 MRI 检测无明显改变,而组织学检查有退变信号出现;12 周时所有研究指标均出现了退变信号,且退变程度增加至 18 周,26 周时退变水平下降。同时又将 0.2、0.25、0.3 和 0.35U/ml 四个不同剂量软骨素酶 ABC 注入山羊腰椎间盘内,在注射后 12 周进行椎间盘的重量、MRI 及组织学等检测,结果显示椎间盘退变程度与注射的软骨素酶 ABC 浓度呈正相关。2008 年 Hoogendoorn 等^[15]再次将 0.25U/ml 软骨素酶 ABC 注入山羊腰椎间盘内,在注射后 18 和 26 周时对椎间盘进行了 MRI、组织学及生物力学等评价,研究结果与初次实验结果^[12]一致,证实了软骨素酶 ABC 建立椎间盘退变动物模型具有良好的重复性。Takahashi 等^[16]应用软骨素酶 ABC 对日本兔进行了 2 组实验。一组将 4U 软骨素酶 ABC 注入兔腰椎间盘后分别于 1、3、5、7 和 10d 观察;另一组将软骨素酶 ABC 以 0.0002、0.001、0.005、0.5、1、2、4 及 8U 剂量分别注入兔腰椎间盘后 7d 时观察。结果显示,第 1 组在 3、5、7 和 10d 时椎间盘的硫酸软骨素和髓核含水量呈现了渐进性下降;第 2 组的 0.0002、0.001、0.005、0.5、1、2、4 及 8U 剂量在 7d 时均出现了不同程度的椎间盘内髓核溶解现象。结果表明应用软骨素酶 ABC 建立兔椎间盘退变模型时,0.0002U 或更高剂量的软骨素酶 ABC 在注入椎间盘后至少 3d 即有髓核溶解作用出现。

Ando 等^[17]通过手术使兔椎间盘发生退变突出后,将软骨素酶 ABC 注入该突出的椎间盘内进行 MRI 与组织学检查,结果显示注入椎间盘内的软骨素酶 ABC 进一

第一作者简介:女(1977-),医学硕士,研究方向:骨科基础研究
电话:(010)58516538 E-mail:lodestarwn@yahoo.com.cn
通讯作者:田伟 E-mail:tianweia@163bj.com

步诱导了突出椎间盘的髓核溶解作用,但该诱导作用在注射后 12 周末时减轻,椎间盘出现了轻微恢复,表明软骨素酶 ABC 未破坏退变椎间盘基质再生能力。Boxberger 等^[18]将 0.00025U 软骨素酶 ABC 与对照 PBS 分别注入大鼠腰椎间盘髓核中,并于注射后 4、12 周进行生物化学、组织化学及生物力学等检测,结果显示 4 周时注射软骨素酶 ABC 与对照相比髓核粘多糖减少了 43%,椎间盘平均重量减少了 12%,力学参数中拉伸与压缩系数下降,运动范围及蠕变系数增大;到 12 周时粘多糖水平有所恢复,虽仍低于对照,但高于 4 周时水平,压缩系数与蠕变系数也出现部分恢复,运动范围则恢复到对照水平。研究结果提示随着软骨素酶 ABC 作用的减弱,退变将出现自发性恢复。在使用软骨素酶 ABC 制备的动物模型进行治疗研究时,干预时间的选择对于疗效的评判显得尤为重要。

3 应用纤连蛋白片段(Fn-f)制备椎间盘退变动物模型

纤连蛋白是一种大的纤维状糖蛋白,能同时与细胞基质中多种成分结合,并可促进细胞基质中其他成分沉积。研究发现,退变椎间盘中纤连蛋白增多,且常以片段存在^[19]。在纤维环穿刺建立的兔椎间盘退变模型中,正常对照椎间盘中几乎无 Fn-f 存在,而纤维环穿刺椎间盘中有 4 倍表达^[20]。在这些研究基础上,Anderson 等^[21]将 N 端 30kDa Fn-f 注入兔腰椎间盘中央区,分别于 2、4、8、12、16 周进行腰椎间盘的 X 线、组织学、生化和基因表达的研究,结果显示,4 周时椎间盘细胞结构和细胞外基质开始出现破坏,氨基葡聚糖(GAG)含量增加了约 1.7 倍;8 到 16 周聚集蛋白聚糖和 II 型胶原基因表达与 GAG 含量逐步下调,髓核和纤维环的正常结构渐进性丢失;12 和 16 周时 X 线有明显的退变表现,Fn-f 注射区前侧有骨赘形成;16 周时纤维环出现层间裂隙,髓核被纤维组织替代,GAG 含量降低为对照的 2/5。这些渐进性进展与在人类椎间盘退变中的发现非常类似。退变椎间盘内有 Fn-f 表达^[20]。椎间盘内注射 Fn-f 建立椎间盘退变模型能更好地模拟椎间盘退变的自然过程,更加符合椎间盘退变的生物化学特性^[21]。30kDa 的 N 端 Fn-f 对体外培养的新西兰兔椎间盘细胞,同样观察到椎间盘细胞的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖基因表达水平下调^[22],与体内研究结果^[21]一致。

胡宝山等^[23]将 N 端 120kDa Fn-f 注射到兔椎间盘中,8 周时髓核与纤维环分界出现模糊,纤维环软骨样细胞向纤维细胞转变,髓核细胞开始减少;16 周时髓核细胞趋于消失,骨样组织增多,有骨赘形成。与其他化学髓核溶解术一样,Fn-f 最初也会影响髓核细胞和基质的构成,但不同的是这种改变是逐渐进行的,并且不出现恢复^[23]。

4 应用溴脱氧尿苷(BrdU)制备椎间盘退变动物模型

椎间盘老化尤其是蛋白多糖结构与排列紊乱存在着一个细胞基础,在椎间盘退变的早期阶段,椎间盘细胞衰老可能起了至关重要的始动作用^[24]。Gruber 等^[24]认为以细

胞衰老为基础制备的动物模型更能接近于人类椎间盘退变的生理过程。BrdU 可引起基因组的不稳定,从而导致哺乳动物细胞出现衰老样改变^[25]。Zhou 等^[25]将 BrdU 注入羊椎间盘中心区后在 2~14 周进行观察,MRI 显示注入 BrdU 的椎间盘 T2 加权像信号强度渐进性降低;X 线片检测注入 BrdU 的椎间盘有骨赘形成和椎间隙变窄;组织学和生化学检查显示椎间盘正常结构出现渐进性破坏,细胞密度、细胞增殖能力、含水量和蛋白多糖含量渐进性减少。研究结果表明,BrdU 可成功诱导椎间盘产生退行性变,且应用 BrdU 制备的模型是一种优于其它方法的更“生理性”的退变动物模型。

5 应用烟碱制备椎间盘退变动物模型

Oda 等^[26]将 8 周龄鼠置于被动吸烟装置中进行烟碱诱导椎间盘退变的研究,观察到 8 周时椎间盘出现纤维环层状结构断裂,软骨细胞体积变大,髓核内纤维组织增多,同时细胞炎性因子白介素-1 β 水平明显增加,提示椎间盘退变可能与吸烟有关。Nemoto 等^[27]制备的鼠吸烟模型也观察到了相似结果,且在停止吸烟 8 周后,椎间盘基质中的纤维连接组织和蛋白聚糖水平有所恢复,但纤维环的断裂现象无明显改变,白介素-1 β 水平仍然保持明显的升高水平。提示戒烟后椎间盘退变在一定程度上有所修复,但部分改变不可逆。

尽管化学法制备椎间盘退变动物模型有诸多优点,且对应用的化学制剂的研究也取得了一定进展,但同时也存在着一些问题与不足。采用化学制剂诱导椎间盘产生的退变大多是非生理性的,在模拟椎间盘退变的自然病程上有一定局限性;而且外来的化学试剂有可能影响到后面实验生化检测的准确性。此外与其他建模方法一样,应用不同化学制剂制备的动物模型与人类椎间盘退变之间的相关性和可比性也尚未完全明确。这些问题与不足使其应用受到了一定的限制。

椎间盘退变是一个多因素参与的缓慢过程,退变模型的制备已有近 80 年的历史,但至今尚无公认的理想动物模型^[18,28]。尽管通过化学方法建立的动物模型研究人类椎间盘退变受到一些方面的限制,但从中得出的结论对于获得椎间盘退变的病因和病理生理机制,以及制订保护策略和治疗手段仍然具有重要作用。将动物模型应用于椎间盘退变病理机制及防治研究的关键,取决于动物模型和人类椎间盘退变之间的相关性和可比性^[29]。随着新的能更充分模拟人类椎间盘退变生理过程的化学制剂的不断发现,以及不同化学制剂制备的模型与人类椎间盘退变之间相关性的进一步阐明,将为椎间盘退变动物模型以及退变病理和治疗等的深入研究开辟更为广阔的前景。

6 参考文献

1. Singh K, Masuda K, An HS. Animal models for human disc degeneration[J]. Spine J, 2005, 5(6 Suppl): 267S-279S.

2. Lotz JC. Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned[J]. *Spine*, 2004, 29(23): 2742–2750.
3. Sobajima S, Koppel JF, Kim JS, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology [J]. *Spine*, 2005, 30(1): 15–24.
4. 王靖, 唐天骊, 姚啸生, 等. 纤维环穿刺诱导椎间盘退变动物模型的实验研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2006, 16(4): 284–287.
5. 吕浩然, 刘尚礼, 丁悦, 等. 动物模型椎间盘退变全程基因变化的对比[J]. *中国矫形外科杂志*, 2005, 13(11): 846–849.
6. Han B, Zhu K, Li FC, et al. A simple disc degeneration model induced by percutaneous needle puncture in the rat tail [J]. *Spine*, 2008, 33(18): 1925–1934.
7. Zhang H, La Marca F, Hollister S. Developing consistently reproducible intervertebral disc degeneration at rat caudal spine by using needle puncture [J]. *J Neurosurg Spine*, 2009, 10(6): 522–530.
8. Alini M, Eisenstein SM, Ito K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration [J]? *Eur Spine J*, 2008, 17(1): 2–19.
9. Lu DS, Luk KD, Lu WW, et al. Spinal flexibility increase after chymopapain injection is dose dependent; a possible alternative to anterior release in scoliosis [J]. *Spine*, 2004, 29(2): 123–128.
10. Nitobe T, Harata S, Okamoto Y, et al. Degradation and biosynthesis of proteoglycans in the nucleus pulposus of canine intervertebral disc after chymopapain treatment [J]. *Spine*, 1988, 13(11): 1332–1339.
11. Kiester DP, Williams JM, Andersson GB, et al. The dose-related effect of intradiscal chymopapain on rabbit intervertebral discs [J]. *Spine*, 1994, 19(7): 747–751.
12. Hoogendoorn RJ, Wuisman PI, Smit TH, et al. Experimental intervertebral disc degeneration induced by chondroitinase ABC in the goat [J]. *Spine*, 2007, 32(17): 1816–1825.
13. Sakuma M, Fujii N, Takabashi T, et al. Effect of chondroitinase ABC on matrix metalloproteinases and inflammatory mediators produced by intervertebral disc of rabbit in vitro [J]. *Spine*, 2002, 27(60): 576–580.
14. Norcross JP, Lester GE, Weinhold P, et al. An in vivo model of degenerative disc disease [J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(1): 183–188.
15. Hoogendoorn RJ, Helder MN, Kroeze RJ, et al. Reproducible long-term disc degeneration in a large animal model [J]. *Spine*, 2008, 33(9): 949–954.
16. Takahashi T, Kurihara H, Nakajima S, et al. Chemonucleolytic effects of chondroitinase ABC on normal rabbit intervertebral discs: course of action up to 10 days post injection and minimum effective dose [J]. *Spine*, 1996, 21(21): 2405–2411.
17. Ando T, Kato F, Mimatsu K, et al. Effects of chondroitinase ABC on degenerative intervertebral discs [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1995, (318): 214–221.
18. Boxberger JJ, Auerbach JD, Sen S, et al. An in vivo model of reduced nucleus pulposus glycosaminoglycan content in the rat lumbar intervertebral disc [J]. *Spine*, 2008, 33(2): 146–154.
19. Oegema TR Jr, Johnson SL, Aguiar DJ, et al. Fibronectin and its fragments increase with degeneration in the human intervertebral disc [J]. *Spine*, 2000, 25(21): 2742–2747.
20. Anderson DG, Izzo MW, Hall DJ, et al. Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs: analysis of a rabbit annular laceration model [J]. *Spine*, 2002, 27(12): 1291–1296.
21. Anderson DG, Li X, Tannoury T, et al. A fibronectin fragment stimulates intervertebral disc degeneration in vivo [J]. *Spine*, 2003, 28(20): 2338–2345.
22. Anderson DG, Li X, Balian G. A fibronectin fragment alters the metabolism by rabbit intervertebral disc cells in vitro [J]. *Spine*, 2005, 30(11): 1242–1246.
23. 胡宝山, 丁悦, 李春海, 等. 新型兔腰椎间盘退变模型的建立 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2006, 24(5): 546–549.
24. Gruber HE, Hanley EN Jr. Recent advances in disc cell biology [J]. *Spine*, 2003, 28(2): 186–193.
25. Zhou H, Hou S, Shang W, et al. A new in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration characterized by MRI, radiography, CT/discogram, biochemistry, and histology [J]. *Spine*, 2007, 32(8): 864–872.
26. Oda H, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model [J]. *J Orthop Sci*, 2004, 9(2): 135–141.
27. Nemoto Y, Matsuzaki H, Tokuhashi 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.
28. 张勇, 徐永清, 王非, 等. 椎间盘退变模型及其评估指标 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2009, 19(6): 476–479.
29. An HS, Masuda K. Relevance of in vitro and in vivo models for intervertebral disc degeneration [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88(Suppl 2): 88–94.

(收稿日期: 2009-10-13 修回日期: 2010-01-20)

(本文编辑 李伟霞)