

综述

实验动物椎间盘特征在选择椎间盘退变模型中的意义

The significance of intervertebral disc characteristic in selecting degenerative model of laboratory animal

赵丹慧¹, 吴成爱¹, 王娜¹, 田伟²

(1 北京市创伤骨科研究所; 2 北京积水潭医院 100035 北京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.09.17

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-09-0854-03

椎间盘退变是引起腰疼的主要原因^[1]。人类椎间盘在形态学、生物化学和生物力学等方面都随着年龄增加而发生以退变为特征的变化^[2,3]。椎间盘退变的病因至今尚不清楚。由于很难获得人椎间盘样品,特别是“正常人”的椎间盘组织,很多研究只能使用实验动物的椎间盘作为研究对象,包括大鼠、小鼠、沙鼠、家兔、犬、羊、猪、山羊和猴。由于上述实验动物都是四足动物,而人是直立行走动物;此外不同动物种属的椎间盘都有不同的解剖、生理、生化特点^[4],因此充分了解实验动物之间、实验动物与人之间椎间盘的差异,是正确选用实验动物以达到研究目的的前提。笔者在此介绍哺乳动物椎间盘在生长发育、解剖学、生物力学、生物化学、年龄及负荷方面与人的差异及其对椎间盘退变模型选择的意义。

1 椎间盘发育的差异

不同种属哺乳动物椎间盘在发育过程中,主要有两个方面的差异,即脊索细胞的差异和骨化中心的差异。

(1)脊索细胞不同:椎间盘的髓核细胞在不同发育阶段含有不同类型的混合细胞群,这一组织在发育过程中的变化在动物的不同种属、甚至于不同种系都有非常大的差异。所有哺乳动物的椎间盘发育过程都相同,由围绕着脊索的间充质聚集形成椎体柱。之后,大量细胞聚集发育成椎体环状纤维,其中少量细胞在发育过程中快速生长成椎体。脊索细胞在髓核部位扩增,并从其他区域逐渐消失。脊索细胞分泌富含透明质酸的基质,为髓核的扩增提供膨胀压力^[5]。人出生时椎间盘含有部分脊索细胞,但出生以后到成年期间数量快速下降,寿命长的脊索细胞维持在 4~10 年。成人髓核中没有脊索细胞代谢产生的压力。而动物中大多数种属包括大小鼠、猫、水貂、犬、猪、兔出生时髓核中都有脊索细胞,它们的脊索细胞长期或终生存在^[6]。牛和羊的情况与人类相似,出生时椎间盘含有部分脊索细胞,出

生以后数量快速下降。马出生时椎间盘没有脊索细胞。犬有两种类型:软骨营养不良犬(如腊肠犬)在出生后脊索细胞于 1 岁以内消失,通常伴有相应的疾病现象,如椎间盘突出和椎间盘退变;另一种是非软骨营养不良犬,其脊索细胞通常在 5~7 岁时消失,但年轻犬很少患椎间盘疾病^[6]。大、小鼠一生中椎间盘都含有脊索细胞^[4]。家兔在出生后至 12 个月椎间盘中都含有大量的脊索细胞^[7]。

(2)骨化中心不同:在种属之间的另一种差异是骨化中心的差异。大部分哺乳动物中,椎体的中心核形成原始的骨化中心。大部分哺乳动物的第二个骨化中心在椎体的头部和尾部,形成上下完整的骨板。而人类第二个骨化中心位于椎骨至外环的周边部分,在椎体外缘形成一个骨骺环。骨骺和骺板的融合在人类是在 25 岁,而很多哺乳动物在椎体终生保持完整的骨骺和骺板分离。这形成了人类软骨终板作用于椎体生长区的基础,而包括羊和牛在内的大部分其他种属骨骺板仍在椎体内^[4]。然而,大鼠在相同种属品系的不同克隆之间也有差异,Wistar 大鼠有完整的第二个骨化中心,而其他品系大鼠椎体的骨化中心则不完整^[4]。

2 解剖学的差异

不同种属之间存在解剖学的差异。椎间盘的形态、外观和大小,邻近的椎体组织都有不同。如:人椎体终板的前后径从颈椎到腰椎逐渐增大,而大型四足动物如动物的幼畜、成年羊和猪椎体终板的前后径在整个脊柱是相同的^[8]。因此,与人类相比,上述动物(除小牛之外)颈部椎体终板的前后径相对大,而腰部椎体终板前后径相对小。牛腰椎终板的前后径与人相近。灵长类和袋鼠腰椎终板的前后径相对小^[9]。椎间盘的大小影响到动物模型的选择是否合适,因此以椎间盘大小标定的尺度进行分析非常重要,有些小动物可能在生理上就不适合某些实验。从颈到腰区,大型四足动物的椎间盘高度相同,与人相比,大动物的终板在颈部相对大,而腰部相对小。在定量测定中,不同种属椎间盘的形状也有差异。人腰椎间盘在上下表面都是向外凸出型;而有些种属如牛和猪的椎间盘在上表面呈外凸出型,但在下表面则向椎间盘中心凹陷,从而使椎间盘看似

第一作者简介:女(1959-),研究员,医学硕士,研究方向:骨科基础研究

电话:(010)58516538 E-mail:zhaodanhui@263.net

一个“圆屋顶”的形状。人与犬全部椎间盘在外形上相似^[6]。人的软骨终板明显比犬的薄,软骨下骨明显比犬厚。不同种属动物脊柱的不同区,椎间盘的数量也不一致,如犬有 7 个腰椎,而人只有 5 个。此外,在同种动物脊柱内的不同部位椎间盘和椎体的特征变化很大,如大鼠腰、尾两个部位椎间盘大小差异很大^[10]。在选择和设计动物模型时,不同部位的生物力学、形态学和细胞学特点的差异对所研究的椎间盘都是非常重要的因素。例如,细胞的类型随椎间盘所在部位而不同,不仅表现在形态学不同,还表现在不同部位椎间盘的髓核细胞在代谢负荷等方面也都有差异^[11,12]。

3 生物力学的差异

解剖学的差异是影响不同部位脊柱生物力学行为的重要因素。将动物与人的运动区相比较,可以发现很多差异^[13]。例如对于所有动物和人,腰椎的轴向旋转运动区比胸椎和颈椎小^[14]。而人腰椎运动区的绝对值比牛、羊和猪的要大。这种差异在弯曲程度上最明显。生物力学研究中的弹性数据能直接测定椎间盘的变形程度,在椎间盘功能紊乱的研究中起着重要的作用,因此“弹性”也是退变和再生过程的因素之一。例如,腰骶节段的高弹性可能是反映该区域蛋白聚糖含量下降情况的因素之一。人躯干最具有弹性的运动发生在腰部,而灵长类、羊和猪则不同^[14]。三维弹性是研究体内外灌注功能的一个重要参数。有些动物种属由于局部弹性不好,可能不适合作为人类疾病的模型。

4 生物化学方面的种属差异

不同种属的椎间盘之间有很多固有的生物化学差异。如啮齿类动物的聚糖蛋白与其他哺乳动物相比缺乏延长的硫酸角蛋白附着点^[15]。分别用已经鉴定的人、牛和大鼠的球区蛋白聚糖的基因片段和氨基酸序列,分析猪、马、牛和羊同一个金属蛋白酶裂解点发现,硫酸角质素的金属蛋白酶裂解点有种属特异性,氨基酸序列之间存在明显的种属差异^[16]。基质金属蛋白酶-1 是一种在疾病和组织修复中起重要作用的胶原酶,是脊柱内椎间盘的成分,人椎间盘可以表达这种酶,而啮齿类动物则不能表达。有学者研究了兔、犬和绵羊椎间盘的成分,并证明了椎间盘的成分随衰老和在脊柱内的不同部位而发生变化,在胸腰部 and 腰骶部连接处的脊柱运动节段,无论活动范围大小,椎间盘中蛋白聚糖的浓度都明显降低^[17]。上述种属的动物随着衰老,全部腰椎间盘中蛋白聚糖普遍呈平稳下降。这种现象在胸腰部和腰骶部的椎间盘中尤其明显。

5 种属间随年龄和退化而发生改变的差异

研究动物脊柱的年龄,必须密切观察自然发生的组织学和生物化学两种变化,在大量动物种属中,组织学、影像学 and 生物化学成分随年龄发生变化^[18]。犬椎间盘的病理学变化与人椎间盘的变化相似,人椎间盘退变的 5 个

Thompson 分级全部出现在犬椎间盘中,特别是软骨营养不良品系;但 1 岁以内生长发育中的犬椎间盘与人椎间盘情况不同。人的软骨终板比犬的厚,随着椎间盘退变,人的软骨终板出现了明显的不规则形状。人与犬髓核中发现 Thompson III 级的退变椎间盘全部出现放射状裂隙,纤维环中也发现 Thompson IV 级的退变椎间盘全部出现更广泛的裂隙^[6]。羊和家兔^[19]的椎间盘也有与人相类似之处^[20],随着衰老椎间盘纤维软骨细胞代谢及蛋白聚糖分泌量的变化,生物化学成分发生改变。此外,羊和犬的模型特征是椎间盘发生钙化,钙化点分布在腰椎区纤维环和髓核移行区,犬模型的钙化扩散到髓核,发病主要集中在脊柱胸腰部,而人椎间盘内钙化的特征主要分布在胸椎区^[4]。最近有研究表明,猪腰椎间盘随着年龄增加有明显的生物力学改变^[21]。

6 脊柱与椎间盘载荷的差异

人类上部体重作用于腰椎,而四足动物则完全不同。因此,人腰椎的负荷比四足动物大。然而,这种推论也不一定正确,原因是由于被动结构如与韧带相连肌肉收缩所产生的张力使得大量负荷作用脊柱^[22]。有学者认为,这种外来的负荷在四足动物如牛、羊和猪可能比人还要大,理论依据是:稳定一个水平排列的脊柱比稳定一个近似于纵向排列的脊柱需要更大的肌肉收缩力和被动张力。间接的证据是:将羊、牛和猪的椎体与人类椎体相比较,发现骨矿密度是人椎体的 4 倍。在目前的文献中,虽然没有直接的测定证据,但四足动物腰椎的负荷可能并不小或甚至大于人类的相应负荷,目前还没有统一的结论^[23]。

小体型的四足动物如家兔、大小鼠需要用小肌肉和韧带来稳定脊柱,这些动物的脊柱负荷可能比人类要小得多,这是因为小动物椎间盘的直径小,因此用来稳定脊柱所需要的力量也相对小。但其椎间盘内的压力可能与人类的相类似。动物尾部椎间盘主要承载由肌肉收缩或张力而产生的负荷。肌肉收缩力和所需要的被动张力越大,尾部椎间盘负荷增加也越大。目前缺少各种动物脊柱和尾部的体外测定数据。由于生物力学环境影响椎间盘细胞的生物学行为,因此,这些体外研究数据是至关重要的。在体内外椎间盘移植实验中,移植椎间盘的负荷能力决定它的抗断裂或抗破坏的性能^[14]。

由脊柱侧凸而导致的生物力学变化是椎间盘细胞代谢的重要决定因素,它可以影响到椎间盘成分^[24]。椎间盘高度明显影响溶质在椎间盘组织中的扩散及营养研究中的溶质的转运。

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。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,将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。因此,首先明确动物与人之间脊柱与椎间盘生理特征的差异,是正确选用实验动物以达到相对准确

地进行科学模拟的前提。

7 参考文献

1. Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48(1): 5–10.
2. Adams MA, Freeman BJ, Morrison HP, et al. Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration[J]. *Spine*, 2000, 25(13): 1625–1636.
3. Bogduk N. Degenerative joint disease of the spine[J]. *Radiol Clin North Am*, 2012, 50(4): 613–628.
4. 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.
5. Behrens A, Haigh J, Mehta-Grigoriou F, et al. Impaired intervertebral disc formation in the absence of Jun[J]. *Development*, 2003, 130(1): 103–109.
6. Bergknut N, Rutges JP, Kranenburg HJ, et al. The dog as an animal model for intervertebral disc degeneration [J]? *Spine*, 2012, 37(5): 351–358.
7. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison[J]. *J Anat*, 2004, 205(5): 357–362.
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. Boszczyk BM, Boszczyk AA, Putz R. Comparative and functional anatomy of the mammalian lumbar spine[J]. *Anat Rec*, 2001, 264(2): 157–168.
10. Elliott DM, Sarver JJ. Young investigator award winner: validation of the mouse and rat disc as mechanical models of the human lumbar disc[J]. *Spine*, 2004, 29(7): 713–722.
11. Iatridis JC, MacLean JJ, Roughley PJ, et al. Effects of mechanical loading on intervertebral disc metabolism in vivo[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88(Suppl 2): 41–46.
12. Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, et al. Human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype [J]. *Spine*, 2005, 30(24): 2743–2748.
13. Wilke HJ, Kettler A, Claes LE. Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines [J]? *Spine*, 1997, 22(20): 2365–2374.
14. Taylor TK, Melrose J, Burkhardt D, et al. Spinal biomechanics and aging are major determinants of the proteoglycan metabolism of intervertebral disc cells[J]. *Spine*, 2000, 25(23): 3014–3020.
15. Barry FP, Neame PJ, Sasse J, et al. Length variation in the keratan sulfate domain of mammalian aggrecan[J]. *Matrix Biol*, 1994, 14(4): 323–328.
16. Flannery CR, Little CB, Caterson B. Molecular cloning and sequence analysis of the aggrecan interglobular domain from porcine, equine, bovine and ovine cartilage: comparison of proteinase-susceptible regions and sites of keratan sulfate substitution[J]. *Matrix Biol*, 1998, 16(8): 507–511.
17. Melrose J, Ghosh P, Taylor TK, et al. A comparative analysis of the differential spatial and temporal distributions of the large(aggrecan, versican) and small (decorin, biglycan, fibromodulin) proteoglycans of the intervertebral disc [J]. *J Anat*, 2001, 198(Pt 1): 3–15.
18. Ghosh P, Melrose J, Cole TC, et al. A comparison of the high buoyant density proteoglycans isolated from the intervertebral discs of chondrodystrophoid and non-chondrodystrophoid dogs[J]. *Matrix*, 1992, 12(2): 148–155.
19. Maeda S, Kokubun S. Changes with age in proteoglycan synthesis in cells cultured in vitro from the inner and outer rabbit annulus fibrosus: responses to interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist protein [J]. *Spine*, 2000, 25(2): 166–169.
20. 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*, 1988, 13(9): 972–981.
21. Park C, Kim YJ, Lee CS, et al. An in vitro animal study of the biomechanical responses of annulus fibrosus with aging[J]. *Spine*, 2005, 30(10): E259–E265.
22. Wilke HJ, Rohlmann A, Neller S, et al. ISSLS prize winner: a novel approach to determine trunk muscle forces during flexion and extension: a comparison of data from an in vitro experiment and in vivo measurements[J]. *Spine*, 2003, 28(23): 2585–2593.
23. 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.
24. Melrose J, Gurr KR, Cole TC, et al. The influence of scoliosis and ageing on proteoglycan heterogeneity in the human intervertebral disc[J]. *J Orthop Res*, 1991, 9(1): 68–77.

(收稿日期:2012-01-30 修回日期:2012-04-05)

(本文编辑 李伟霞)