

基础研究

椎体间纤维性融合重建兔脊柱稳定性的初步探索

牛伟民, 于德水, 李名武, 董明岩

(辽宁医学院附属第一医院脊柱科 121000 辽宁锦州市)

【摘要】目的:研究椎体间纤维性融合后脊柱节段的稳定性,探讨椎体间纤维性融合在治疗脊柱节段失稳中的可行性。**方法:**将 18 只 6 月龄新西兰白兔随机分为两组,均摘除 L4/5 椎间盘髓核,A 组在椎间植入环状聚乳酸-聚羟基乙酸(poly L-lactic-co-glycolic-acid, PLGA)可吸收支架;B 组单纯髓核摘除。于术前、术后 4 周、12 周行 X 线检查,运用 Image J 软件测量椎间盘高度指数(DHI)并计算其百分数(%DHI),分别于术后 4 周、8 周、12 周处死 3 只动物,行组织病理及免疫组化观察。**结果:**1 只动物死亡,17 只实验动物术后存活至预期时间,未补充实验动物。12 周时,侧位 X 线片示两组椎间高度较术前均有下降,两组椎间高度的差异有统计学意义($P < 0.05$),A、B 两组屈伸活动度与术前相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。X 线片显示 A 组手术节段椎体无明显移位及反向成角,B 组 1 只兔子出现前屈位腰椎后凸曲度增加,手术节段椎间隙变窄并邻近软骨终板钙化。细胞组织学观察:术后 4 周时 A 组见新生血管及纤维组织生成,有少量类软骨细胞出现,未观察到 PLGA 支架结构;B 组见较多纤维细胞生成。术后 8 周时,A 组出现软骨细胞,纤维组织排列不规则,并见少量的胶原纤维及成纤维细胞;B 组纤维组织进一步增生,形成瘢痕样组织。术后 12 周时,A 组大量的胶原纤维、软骨组织交互长入,排列杂乱无序,此时的胶原纤维较 8 周时增多;B 组仍为纤维细胞和瘢痕组织,且 I 型胶原表达高于 II 型胶原。**结论:**椎体间植入 PLGA 并利用其与椎体骨髓血的诱导成骨作用短期内可以形成椎间纤维融合;短期内观察椎间纤维融合能够维持一定的脊柱节段稳定性并保留部分生理活动功能,但中远期效果有待进一步观察。

【关键词】纤维性融合;聚乳酸聚酯;脊柱节段失稳;新西兰兔

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.12.11

中图分类号:R681.5,R329.3 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2012)-12-1108-05

Primary research of intervertebral fibrous fusion for rabbit spine segmental instability: an experimental study/NIU Weimin, YU Deshui, LI Mingwu, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(12): 1108-1112

【Abstract】 Objectives: To investigate the spinal stability and the feasibility of fibrous fusion for spine segmental instability. **Methods:** 18 New Zealand white rabbits (6 months old) were randomly divided into 2 groups: nucleotomy and PLGA implantation after drilling holes on the vertebral endplate (group A) and nucleotomy alone (group B). In group A, after L4/5 nucleotomy, a ring-like PLGA scaffold was implanted. X-ray was performed before and 12 weeks after the operation. The DHI was measured by using Image J software while evaluating the disc height, segmental stability, segmental range of motion (ROM), and immunohistochemical analysis was performed at 4, 8, and 12 weeks and their results were recorded. **Results:** 17 animals were survived after operation (no additional animal). 12 weeks later, disc height decreased in both groups, showing significant difference between group A and group B ($P < 0.05$), no significant difference of ROM between two groups with preoperation ($P > 0.05$). The flexion-tension lateral X-ray of group A did not show vertebral surge or reverse angle. But in group B, 1 animal's flexion lateral X-ray showed recurvature deformity and adjacent segment endplate calcification, and the operation intervertebral space became narrower than the preoperative. No PLGA scaffold structure was found at 4 weeks postoperatively, fibrillar tissue formation was evidenced in both groups, but few of chondrocyte-like cells and neocapillaries proliferated in group A. At 8 weeks postoperatively, chondrocyte cells and a large number of disordered fiber tissues occurred, a few of collagenous fiber

基金项目:辽宁省教育厅科研项目(2009A9452)

第一作者简介:男(1984-),在读硕士研究生,研究方向:脊柱生物力学

电话:(0416)4197365 E-mail:nwm_012@163.com

通讯作者:董明岩 E-mail:djd8209@163.com

and fibrocyte cells were found in group A, while fiber cells and scar tissues in group B. Amount of collagenous fiber and cartilage interactively compacted into the intervertebral space, and the collagenous fiber increased than before in group A while still fiber cells and scar tissues in group B, that more type I collagen than type II collagen was evidenced. **Conclusions:** Bone marrow blood of vertebrae can form relatively effective fiber fusion as well as reconstructive segmental stability, which can preserve segmental motion, but its long term effects need further research.

【Key words】 Fibrous Fusion; Poly L-lactic-co-glycolic acid(PLGA); New Zea-land white rabbits; Spine segmental instability

【Author's address】 Department of Orthopedic, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, 121000, China

脊柱节段失稳,是指在正常负荷作用下,脊柱失去其维持正常活动范围和活动方式的能力,一般不伴有明显畸形和神经功能障碍^[1]。现有的手术治疗方法只能在手术后短期内达到缓解症状和维持脊柱运动功能和稳定性,大部分手术患者其手术邻近椎间盘相继出现的退行性变和生物力学特性改变^[2]越来越引起学者们的重视。随着可吸收材料在临床上的广泛应用以及生物力学的不断发展,传统的治疗脊柱节段失稳的融合方法其弊端日益凸显。基于此,非融合技术逐渐应用于临床。笔者于 2009 年 9 月~2011 年 12 月进行了动物实验,旨在探索椎体间纤维性融合在治疗脊柱节段失稳中的可行性。

1 材料与方法

1.1 聚乳酸聚酯可吸收多孔支架

聚乳酸-聚羟基乙酸 (poly L-lactic-co-glycolic acid, PLGA) 可吸收多孔支架由成都迪康公司提供,将其制备成直径 5mm,厚 1mm 的圆环状(图 1),置于 75%酒精中浸泡 2h,中间更换酒精一次,然后用 250ml 生理盐水反复冲洗,将其放于器械台上用盐水纱布覆盖备用。

1.2 实验动物及其分组

本研究采用 6 月龄清洁级新西兰白兔 18 只,雌雄不限,体重 2.5~3.0kg,所有手术均由同一个脊柱外科医师完成。实验动物由辽宁医学院实验中心提供,随机分为 A 组和 B 组予不同处理。

1.3 手术方法

10%水合氯醛(10ml/kg)腹腔麻醉,经腹膜外入路^[3]暴露椎间盘。左侧缘切开 L4/5 纤维环并向前方掀起,适度撑开椎间隙后,去除髓核组织,A 组用小刮匙刮除上下缘中央局部软骨终板直达椎体骨面,生理盐水冲洗后,置入聚乳酸聚酯可吸收

多孔支架;B 组原位缝合纤维环,逐层缝合切口。术后肌注青霉素 80 万 U/d,连续 3d 以预防切口感染。

1.4 影像学评价

分别于术前、术后 4 周、术后 12 周摄取实验动物腰椎侧位及前屈位 X 线片。技术参数:65kV, 24mAs, 距离 100cm, 投照中心位于髂嵴上方 5cm,保持各检测时间点成像条件一致。影像资料(digital radiography, DR)由 Image J 软件处理,观察手术处理节段的椎间高度、脊柱活动度(ROM)及椎体序列。参照文献^[4]测定椎间盘高度指数(disc high index, DHI), 计算并比较两组的椎间盘高度指数百分数(%DHI): %DHI=术后 DHI÷术前 DHI 均值×100%; ROM 为术前及术后 4 周时手术节段的屈、伸角度。

1.5 组织学观察

每组分别于术后 4 周、8 周和 12 周各处死 3 只动物,取出术区椎间盘与相邻椎体,用福尔马林固定 24h,脱钙液脱钙两周后石蜡包埋、切片,应用 HE 染色行组织形态学常规观察、免疫组化染色观察 I、II 型胶原表达情况。

1.6 统计学分析

应用统计软件包 SPSS 17.0, 采用纵向资料裂区设计方差分析法,将不同时间点的数据统一进行统计学比较,各组间的比较 Fisher's 方差分析,均数间比较用 *t* 检验,检验水准设定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 动物情况

所有动物顺利完成手术,手术时间 45~90min,出血量 5~10ml。所有动物手术切口 I/甲愈合,1 只雌性兔子于术后 2 周死亡(未再补充);

3只兔子(1雄2雌)术后发生左侧后肢不完全性运动功能障碍,均于术后5d内恢复。

2.2 影像学观察与测量

术后4周及12周时X线片示两组椎间盘高度指数均较术前有所下降,两组椎间盘高度指数差异有统计学意义($P<0.05$,表1);两组腰椎活动度与术前相比差异无统计学意义($P>0.05$,表2)。A组手术节段未显示明显移位及反向成角,手术节段椎体终板下骨显示不同程度硬化;B组1只兔子腰椎出现后凸曲度增加,手术节段椎间隙变窄并终板下骨质硬化,邻近节断软骨终板出现钙化(图2)。

2.3 组织学与免疫组化观察

A组:4周时手术部位见大量成纤维细胞及少量胶原纤维生成(图3a);8周时手术部位可见类软骨细胞出现,纤维组织排列不规则,并见少量的胶原纤维及成纤维细胞,未观察到PLGA支架材料结构(图3b);12周时可见大量的胶原纤维、软骨组织交互长入,排列杂乱无序,此时的胶原纤维较8周时增多(图3c)。B组:4周时髓核摘除区为新生肉芽组织,有较多纤维细胞生成(图4a);8周时纤维细胞进一步增生(图4b);第12周时手术区域仍为大量纤维细胞和瘢痕组织,且I型胶原表达高于II型胶原(图4c)。

表1 手术节段%DHI
Table 1 %DHI of operation segmental

	A组 Group A	B组 Group B
术前 pre-operation	(100±0)%	(100±0)%
术后4周 4 weeks after operation	(85±2.6)% ^{①③}	(71±2.9)% ^{①③}
术后12周 12 weeks after operation	(71±2.4)% ^{①②③}	(60±1.5)% ^{①②③}

注:①与同组术前比较 $P<0.05$,②与同组术后4周比较 $P<0.05$;
③与A组同时点比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with pre-operation, $P<0.05$; ②Compared with 4 weeks after operation, $P<0.05$; ③Compared with group A, $P<0.05$

表2 术前及术后手术节段ROM ($\bar{x}\pm s, ^\circ$)
Table 2 Pre- and post-operative ROM of operative segment

	A组 Group A		B组 Group B	
	屈 Flexion	伸 Tension	屈 Flexion	伸 Tension
术前 Pre-operative	12.10±2.59	5.86±1.21	11.90±2.65	6.00±0.75
术后 Post-operative	11.98±2.45	5.80±0.64	11.65±2.53	5.94±0.76

3 讨论

长期以来,脊柱融合术治疗脊柱不稳取得了满意的疗效^[5],其得益于脊柱序列和稳定性的维持。但是,术后部分患者出现顽固性腰背痛、邻近节段椎体滑脱且症状明显而需要再次手术干预,其主要原因是,脊柱融合术后脊柱的生物力学行为发生改变,导致邻近椎体的应力分布及运动模式产生变化,相邻节段应力相对集中、活动度代偿性增大和稳定性丢失等,最终导致邻近节段的椎间小关节和间盘退变加速^[6]。而且,内固定的强度越大,邻近节段越易出现不稳和退行性变^[6]。国外学者 Mummaneni 等^[7]通过建立 L1~L5 有限元模型的研究发现,融合术后邻近节段终板 von Mises 应力在屈曲压缩载荷下明显增加,其中后入路椎间融合术模型组 von Mises 应力增加了 117%。也有学者研究发现,邻近节段纤维环压力增加,是后入路椎间融合术后邻近节段继发性失稳和退变加速的主要原因^[8]。因此,广大学者一直在努力探索一种新方法,既能解决病变节段的问题,又能预防邻近节段退变 (adjacent segment degeneration, ASD)加速并保留融合节段的运动功能。在此背景下,保留运动功能的理念逐渐得到认可,多种非融合技术正初步运用于临床。目前应用于腰椎的非融合技术大致有:椎间盘假体(包括人工髓核及人工椎间盘)、小关节置换装置、棘突间撑开装置以及椎弓根螺钉动态稳定系统。目前国内应用较多的是棘突间撑开装置以及椎弓根螺钉动态稳定系统。但其生物力学性能尚处于研究和探索中,而且学者们关于非融合技术临床效果仍存在争议^[9]。国内学者近来报道,Coflex 系统棘突间固定术后,由于头侧邻近节段的刚度升高且稳定性增加,对其有一定保护作用^[10]。但也有研究显示,动态稳定不能有效地预防邻近节段退变加速,因为其只能保留手术节段有限的运动功能,上位椎间盘应力集中的问题仍未有效解决^[11,12]。

本研究旨在通过椎体间纤维融合,模拟椎间盘的生物力学性能,重建脊柱失稳节段的稳定性,并最大限度地保留手术节段的运动功能,从而达到预防邻近节段退变(ASD)加速的目的,而组织工程椎间盘实验研究目前亦处于起步阶段^[13-17]。国内学者阮狄克等^[16]应用 PLGA 细胞支架构建组织工程椎间盘在 Beagle 犬椎间盘原位植入,减缓了椎间盘退变的进展,维持了脊柱节段的稳定性

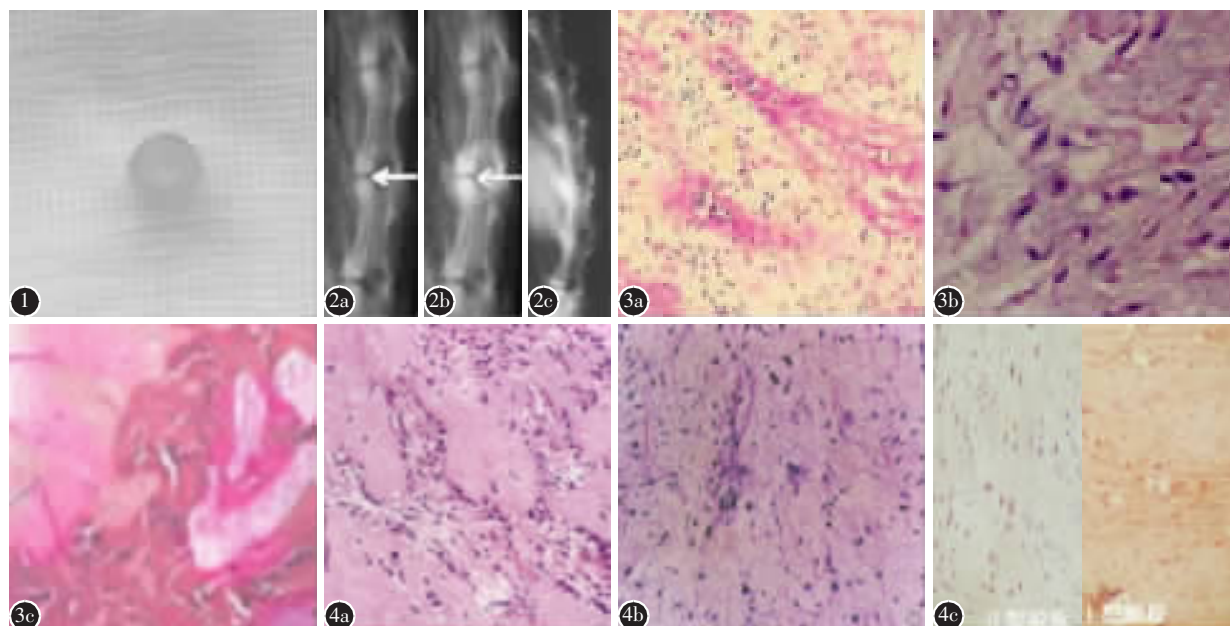


图 1 环状聚乳酸聚酯可吸收支架 **图 2** 箭头所指为手术节段(L4/5) **a** 术前 X 线片示椎间隙无狭窄,未见终板下骨质硬化 **b** A 组术后 12 周 X 线片示手术节段椎间隙变窄,终板下骨质硬化 **c** B 组 1 只兔子术后 12 周出现后凸曲度增加,手术节段椎间隙变窄并终板下骨质硬化,邻近节断软骨终板出现钙化 **图 3** A 组组织学切片(HE $\times 400$) **a** 术后 4 周,可见新生血管及纤维组织生成,出现少量类软骨细胞,未观察到 PLGA 支架材料结构 **b** 软骨细胞出现,纤维组织排列不规则,并见少量的胶原纤维及成纤维细胞 **c** 12 周时大量的胶原纤维、软骨组织交互长入,排列杂乱无序,此时的胶原纤维较 8 周时增多 **图 4** B 组组织学切片 **a** 4 周时髓核摘除区有较多纤维细胞生成(HE $\times 400$) **b** 8 周时纤维细胞进一步增生(HE $\times 400$) **c** 12 周时手术区域仍为大量纤维细胞和瘢痕组织,且 I 型胶原表达高于 II 型胶原(免疫荧光染色 $\times 400$)

Figure 1 Circle PLGA scaffolds **Figure 2** Operation segment(L4/5, white arrow) **a** Preoperative X-ray showed neither endplate calcification nor intervertebral space narrow **b** Postoperative X-ray showed 12 weeks after operation, operation segment space became narrow, subendplate bone sclerosis occurred **c** In group B, 1 animal's flexion lateral X-ray showed recurvature deformity and adjacent segment endplate calcification as well as the operation intervertebral space became narrower than the preoperative **Figure 3** Histologic slices of group A(HE $\times 400$) **a** 4 weeks after operation, no PLGA scaffolds structure was found, fibrillar connective tissue formation was evidenced, and few of chondrocyte-like cells and neocapillaries proliferated **b** At 8 weeks postoperation, chondrocyte cells and a large number of disordered fiber tissue occurred, a few of collagenous fiber and fibrocyte cells were found **c** At 12 weeks postoperation, a mount of collagenous fiber and cartilage interactively compacted into the intervertebral space, and the collagenous fiber increased than before **Figure 4** Histologic slices of group B **a** Fibrillar cells were evidenced at 4 weeks postoperation (HE $\times 400$) **b** Fibrillar cells increased than before at 8 weeks postoperation(HE $\times 400$) **c** Still fibrillar cells and scar tissue in the operation space at 12 weeks postoperation, and more type I collagen than type II collagen was evidenced($\times 400$)

及生理活动功能,为椎间盘退变性疾病的治疗揭示了一个新方向。叶君健课题组发现将细胞组织工程细胞或细胞支架复合体植入退变缺损的椎间盘内,能够逆转和修复椎间盘细胞病理性改变^[17],为退变的椎间盘组织和功能恢复提供了全新的治疗策略。又有学者研究发现,在骨髓血流通的区域有骨细胞及软骨细胞,无骨髓血流通的区域(骨蜡充填)为纤维瘢痕组织^[18]。受此启发,本实验在摘除兔 L4/5 椎间盘的髓核组织后,搔刮椎体终板至

渗血状态,植入与椎体大小相匹配的环状 PLGA 材质支架,在特定的时间点观察椎间隙细胞组织学变化,并观察影像学改变以判断手术节段力学稳定性。实验结果表明,A 组通过刮除软骨终板并植入 PLGA 后,手术节段的椎间高度得到了有效维持,椎间隙内有大量类软骨组织形成。大量研究指出,PLGA 是一种广泛应用的组织工程材料,具有良好的机械强度、生物相容性和可控性^[19],已被广泛应用于组织工程支架材料、手术缝合线、药物

缓释载体、缝合补强材料和骨折内固定材料等。还有研究者建议利用其骨传导作用,将 PLGA 作为骨诱导因子的载体^[20]。据此我们推测,本研究中 A 组手术节段椎间隙内类软骨组织的形成,可能与椎体内红骨髓的造血和诱导成骨作用及 PLGA 支架的骨传导作用有关;PLGA 支架在 8 周内有效维持了手术节段椎间高度,局部纤维环张力与术前近似,从而有效减少了邻近节段纤维环的压力变化,有助于预防邻近节段退变加速。B 组未植入 PLGA 支架,椎间高度较术前明显丢失,局部纤维环张力较术前降低,导致邻近节段纤维环压力增高,最终出现 1 只兔子手术节段椎间隙狭窄、腰椎后凸增加并终板下骨骨质硬化及邻近节段软骨终板钙化等 ASD 的征象。

总之,通过短期动物实验研究,椎体间纤维融合在一定程度上维持了脊柱节段稳定性,并最大限度地保留了手术节段的运动功能,有效预防了邻近节段退变加速。但是,本实验观察期较短,且四足动物的脊柱生物力学与人存在差异,其脊柱在抗剪切力方面可能优于人类,承受的轴向压缩载荷远远小于人类,实验中动物脊柱中后柱结构均未破坏,影像学资料均为动物处死后获得,与生理状态下存在差异,深入的、中远期的实验研究有待于继续开展,并尽可能的在灵长类直立大动物中进行。

4 参考文献

1. 龙厚清, 刘少喻. 脊柱疾病分类诊断学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007. 164-167.
2. Huang RC, Sandhu HS. The current status of lumbar total disc replacement[J]. Orthop Clin North Am, 2004, 35(1): 33-42.
3. 王非, 瞿东滨, 金大地. 侧方入路显露兔腰椎间盘及椎间盘内的注射方法[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 3(20): 304-306.
4. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting marrow stroma cell embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc[J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 335-345.
5. 袁文. 脊柱非融合技术是融合术的终结者吗[J]? 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(1): 11.
6. 王义生. 脊柱融合术与非融合术不是相互替代而是互补[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(1): 7-8.
7. Mummaneni PV, Haid RW. The future in the care of the cervical spine: inter-body fusion and arthroplasty[J]. Neurosurg Spine, 2004, 1(2): 155-159.
8. Weinhoffer SL, Guyer RD, Herbert M, et al. Intradiscal pressure measurements above an instrumented fusion: A cadaveric study[J]. Spine, 1995, 20(5): 526-531.
9. 李放. 慎重选择非融合技术, 认真进行临床研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(8): 618-619.
10. 李淳德, 孙浩林, 于峥嵘[J]. 北京大学学报(医学版), 2011, 43(5): 657-660.
11. Kim CH, Chung CK, Jahng TA. Comparisons of outcomes after single or multilevel dynamic stabilization: effects on adjacent segment[J]. J Spinal Disord Tech, 2011, 24(1): 64-67.
12. Liu CL, Zhong ZC, Hu HW, et al. Effect of the cord pretension of the Dynesys dynamic stabilization system on the biomechanics of the lumbar spine: a finite element analysis[J]. European Spine Journal, 2011, 20(11): 1850-1858.
13. Mizuno H, Roy AK, Vacanti CA, et al. Tissue-engineered composites of annulus fibrous and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement [J]. Spine, 2004, 29 (12): 1290-1298.
14. Nesti LJ, Li WJ, Shanti RM, et al. Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid -nanofibrous scaffold(HANFS) amalgam[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 15 (9):1527-1537.
15. Wilke HJ, Heuer F, Neidlinger-Wilke C, et al. Is a collagen scaffold for a tissue engineered nucleus replacement capable of restoring disc height and stability in an animal model[J]? Eur Spine J, 2006, 15(Suppl 3): S433-S438.
16. 阮狄克, 辛洪奎, 张超, 等. 组织工程椎间盘体内原位植入的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(7): 581-585.
17. 陈清河, 叶君健. 组织工程髓核移植治疗椎间盘退变[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(35): 6602-6606.
18. Xiao DM, Xu ZS, Lin BW, et al. Reparation of experimental models of osseous nonunion [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9(30): 214-215.
19. Singh L, Kumar V, Ratner BD. Generation of porous micro-cellular 85/15 poly (DL-lactide-co-glycolide) foams for biomedical applications[J]. Biomaterials, 2004, 25(13): 2611-2617.
20. 吴哲, 刘畅, 郭雷, 等. 聚乳酸-聚羟基乙酸植入大鼠拔牙创对骨愈合的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2007, 33 (2): 234-236.

(收稿日期:2012-03-25 末次修回日期:2012-11-19)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)