

基础研究

CT引导下经皮纤维环穿刺建立兔腰椎间盘退变模型

崔运能^{1,2}, 李绍林^{1,2}, 周荣平^{2,3}, 王亮^{2,3}, 金大地^{2,3}

(1 南方医科大学第三附属医院影像中心 510630 广州市; 2 广东省骨科研究院 510630 广州市;

3 南方医科大学第三附属医院骨科 510630 广州市)

【摘要】目的:在 CT 引导下经皮纤维环穿刺建立兔腰椎间盘退变模型,并通过影像学和病理学验证其退变过程及效果。**方法:**3 月龄新西兰大白兔 18 只,体重 2.7~3.3kg,雌雄不限,术前均行 X 线及 MRI 检查。每只兔在螺旋 CT 引导下,用 18G 穿刺针经侧方皮下穿刺兔 L5/6 椎间盘(穿刺组),确认刺入椎间盘纤维环深度约为 5mm,并对 L4/5 椎间盘进行假性穿刺(穿刺达椎间盘边缘,但不刺入纤维环内;假穿刺组),L3/4 椎间盘作为对照椎间盘(对照组)。术后 4 周、8 周、12 周随机选取 6 只兔行 X 线片及 MRI 检查,观察各组椎间隙高度、邻近骨质改变及椎间盘信号改变,以“术后椎间隙高度/术前椎间隙高度 $\times 100$ ”计算椎间盘高度相对值(DHRV),并进行椎间盘改良 Thompson 分级法分级;X 线片及 MRI 检查结束 24h 内处死动物,选取对照、假穿刺和穿刺组椎间盘进行组织形态学及免疫组织化学分析。**结果:**对照组及假穿刺组术后 4、8、12 周,X 线片示椎间隙高度无降低,无终板骨质硬化与骨赘形成;MRI T2 加权成像图像示各椎间盘均呈高信号;组织学检查见髓核细胞数量较多,分布均匀,纤维环排列呈同心圆层状;免疫组化分析髓核呈 I 型胶原染色强阳性,II 型胶原染色阴性,在各时间点表现无明显差别。穿刺组椎间盘在术后 4 周 X 线片即可见椎间隙高度轻度降低(DHRV=70.78 $\pm$ 4.55),MRI 示椎间盘信号强度轻度下降,组织学上见纤维环结构紊乱、髓核细胞轻度减少;术后 8 周椎间隙高度明显降低(DHRV=50.63 $\pm$ 4.04),开始出现终板骨质硬化,MRI 示椎间盘信号强度明显下降,组织学上髓核被胶原组织分裂为含较多椭圆形细胞的细胞岛,出现纤维软骨细胞,纤维环层状结构变形、部分断裂;术后 12 周椎间隙高度继续下降(DHRV=44.78 $\pm$ 2.61),骨赘形成、终板骨质硬化明显,MRI 示椎间盘信号强度继续减弱,组织学上见髓核被纤维软骨组织所代替,纤维环层状组织碎裂、解体;免疫组织化学分析示术后 4、8、12 周髓核 I 型胶原染色逐渐增强,II 型胶原染色逐渐减弱。各时间点对照组椎间盘的 DHRV 及改良 Thompson 分级与假穿刺组比较均无统计学差异($P>0.05$);穿刺组在术后不同时间点的 DHRV 降低、改良 Thompson 分级增高与对照组及假穿刺组比较均有统计学差异($P<0.05$);随着穿刺时间的延长,穿刺组 DHRV 呈进行性降低趋势,改良 Thompson 分级进行性升高,两者在术后 4、8、12 周间均有统计学差异($P<0.05$)。**结论:**CT 引导下经皮纤维环穿刺法诱导兔椎间盘退变模型构建成功,操作方法简单、创伤小,经影像学及病理学证实其退变过程为渐进性。

【关键词】椎间盘退变;纤维环穿刺;螺旋 CT;MRI;兔

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2014.03.08

中图分类号:R681.5,R319 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2014)-03-0234-10

Establishment of rabbit lumbar intervertebral disc degeneration model induced by penetration under CT guidance/CUI Yunneng, LI Shaolin, ZHOU Rongping, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(3): 234-243

【Abstract】 Objectives: To establish a rabbit model of disc degeneration by induced annulus fibrosus penetration under CT guidance, and to verify its degenerative procedure radiology and pathology. **Methods:** Eighteen New Zealand white rabbits aged about 3 months and weighing 2.7-3.3kg were used in our experiment, all of them were taken radiographic and MRI examinations preoperatively. The L5/6 discs(stabbed group) were punctured by 18-gauge needle into a depth of about 5mm in the lateral annulus fibrosus guided by spiral CT. The L3/4 discs(sham group) were punctured at the margin of the disc with no injury to the annulus fibrosus,

第一作者简介:男(1979-),主治医师,研究方向:影像学

电话:(020)62784750 E-mail:letitb@163.com

通讯作者:金大地 E-mail:nyorthop@163.com

while the L4/5 discs were taken as control group. Each six rabbits were executed randomly at 4, 8 and 12 weeks postoperatively after radiographic and MRI examinations at 24 hours. The intervertebral space, the changes of vertebrae on radiography and signal intensity of discs on MR images in all groups were analyzed. The disc height relative value(DHRV) was calculated based on intervertebral space of pre- and post- operation($\text{DHRV} = \text{postoperative intervertebral space} / \text{preoperative intervertebral space} \times 100$), and modified Thompson scoring based on MRI were performed in all groups. Histological and immunohistochemical analysis was assessed in each group. **Results:** At 4, 8, 12 weeks postoperatively, the discs in control and sham groups showed no decrease of the intervertebral space, no endplate sclerosis and formation of osteophyte of vertebrae on radiography. On MR T2 weighted images, the discs in both control and sham groups showed high signal intensity. Histologically, nucleus pulposus contained a great number of cells with even distribution, and annulus fibrosus presented as concentric lamellae shape. Immunohistochemistry demonstrated strong positive type I and negative type II collagen in nucleus pulposus of control and sham groups at each time point. At 4 weeks postoperatively, disc height decreased slightly($\text{DHRV} = 70.78 \pm 4.55$), and MRI showed lower signal intensity in stabbed discs. Histologically, cell count of nucleus pulposus decreased slightly, while annulus fibrosus became disorganized. At 8 weeks postoperatively, significant decrease of intervertebral space was evidenced($\text{DHRV} = 50.63 \pm 4.04$), and endplate osteosclerosis was seen either. MRI revealed a moderate decrease of T2 weight signal intensity images. Histologically, nucleus pulposus was separated by proteoglycan matrix into multiple elliptical shape of cell islands, and the concentric fibrous lamellae distorted, or even fractured. Fibrochondrocyte was found in nucleus pulposus. At 12 weeks postoperatively, successional decrease of intervertebral space($\text{DHRV} = 44.78 \pm 4.55$) was found, with obvious endplate sclerosis and formation of vertebrae osteophyte. The T2 weighted signal intensity of the stabbed discs decreased continuously. Histologically, nucleus pulposus was replaced by fibrocartilage tissue, while the fibrous lamellae was induced into fragmentation, and its architecture disintegrated. Immunohistochemical analysis exhibited a progressive increase of type I collagen and a progressive decrease of type II collagen at 4, 8, 12 weeks postoperatively. The statistic analysis revealed that there was no significant difference of DHRV and modified Thompson scoring between control and sham groups at each time point. But the stabbed group demonstrated decrease of DHRV and increase of modified Thompson scoring, showing significant difference compared with those of control and sham groups at each time point ($P < 0.05$). There was a progressive decrease of DHRV and a progressive increase of modified Thompson scoring in stabbed group, respectively. Both DHRV and modified Thompson scoring in stabbed group showed statistic differences between 4, 8, 12 weeks postoperatively($P < 0.05$). **Conclusions:** The percutaneous puncture of annulus fibrosus under CT guidance can induce disc degeneration in rabbit. The procedure is feasible and minimal invasive, which can be confirmed by radiology and pathology.

【Key words】 Intervertebral disc degeneration; Anular fibrosus stabbing; Spiral CT; Magnetic resonance imaging; Rabbit

【Author's address】 Imaging Center, Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, 510630, China

椎间盘退变是导致人类丧失劳动能力的重要疾病^[1],确切的病因及病理生理机制仍未完全阐明^[2]。为研究椎间盘退变的原理,许多学者构建了多种动物模型,目前常用的动物模型是直视下手术切开椎旁肌暴露并破坏椎间盘,此法的优点为方法直观、效果确切,但对实验动物创伤大、手术操作复杂。本研究旨在制作一种创伤小、实验操作简便的椎间盘退变动物模型,并通过影像学及病理学检查证实其退变过程。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

发育良好的 3 月龄新西兰兔 18 只,体重 2.7~3.3kg,雌雄不限,由南方医科大学动物实验中心提供(编号为 SCXK-2006-0015),经南方医科大学动物实验委员会允许用于研究椎间盘之用。每只兔的 L3/4 椎间盘作为对照椎间盘(对照组),不进行任何手术操作;L4/5 椎间盘作为假性穿刺椎间盘(假穿刺组),穿刺达椎间盘边缘、不刺入纤

维环即中止手术操作;L5/6 椎间盘作为穿刺椎间盘(穿刺组)。

1.2 手术器械及实验设备

18G 及 22G 穿刺针(中国瑞祥医疗器械公司),CT 扫描仪(日本东芝公司 Asteion/VF 螺旋 CT 机),磁共振扫描仪(中国宁波鑫高益磁共振公司 OPER 0.35T 磁共振扫描仪),DR 机(中国北京万东公司的新东方 1000 DR X 线机)。

1.3 术前准备与术前检查

用速眠新 II 1.5ml 和阿托品 0.5mg 混合液按 0.6ml/kg 肌肉注射给药镇静动物后,经耳缘静脉给予 3%戊巴比妥钠(30mg/kg)进行静脉麻醉。麻醉后即行腰椎 X 线侧位片及 MRI 检查,检查时使兔左侧卧位,固定好放于检查台上,注意保持实验动物腰椎成直线,投照或扫描时视野须包括全部腰椎(L1~L7)。MRI 使用膝关节正交线圈,快速自旋回波(FSE)序列 T2 加权成像,行腰椎矢状位扫描,中间的扫描线必须经过椎间盘的中份,具体参数:重复时间(TR)3000ms,回波时间(TE)125ms,视野 180mm,层厚 3mm,层间距 1mm,视野为 16cm×16cm,矩阵为 256×196,激励次数为 2,成像时间为 5:36。将获取的影像资料传输到 PACS 系统(南方 PACS 系统),初步观察实验动物腰椎 X 线及磁共振成像图像,确认实验动物无椎体畸形。

1.4 手术操作

术前 X 线及 MRI 检查结束后,麻醉的动物左

侧卧位,放于 CT 扫描床上,常规消毒铺巾。连接兔双侧髂棘连线,在此线与脊柱相交处经皮穿刺入 22G 针头,作为定位标记物。行 CT 扫描,在 CT 定位图上确认目标椎间盘与定位针头的距离。在体表上往头侧方向利用游标卡尺确认距离、并进行标记。在实验兔皮肤放松无皱折的情况下,经标记点偏外侧方将 18G 穿刺针头穿过皮肤,并继续沿着与表面垂直的方向轻轻刺入浅层的皮下组织内,此时穿刺方向应偏于前内侧;确认穿刺针方向后,再加大力量,使穿刺针进入深层的肌肉。在 CT 定位图及轴位图上确认穿刺针的位置及方向后,向目标(L5/6)椎间隙继续刺入穿刺针,待针头穿刺阻力较大时,即表示接触到兔椎体组织,行 CT 扫描,观察穿刺针头的位置与目标椎间盘的距离,适当调整穿刺针的方向,再进行 CT 图像采集、确认穿刺针头到达椎间盘边缘,行 CT 扫描,确认为目标椎间盘、且穿刺方向的延长线通过椎间盘中心,略用力刺入纤维环内,此时再行 CT 扫描,控制刺入深度约为 5mm;轻轻拔出穿刺针,在 CT 扫描下确认针头已经离开椎间盘,位于椎间盘边缘,再连续按照所述的方法穿刺纤维环 3 次(图 1)。最后一次穿刺结束后,抽出针尖,可见到针孔内有残留的椎间盘髓核组织,大体观察残留的髓核均呈乳白色。对 L4/5 椎间盘进行假性穿刺,即仅穿刺达椎间盘边缘,不损伤纤维环。L3/4 为对照椎间盘,不作任何处理。手术完毕后,伤口用碘伏消

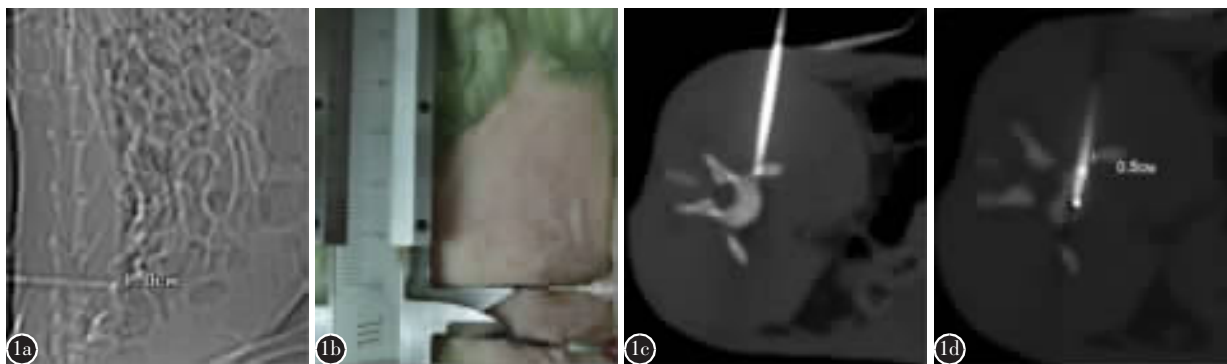


图 1 CT 引导下椎间盘穿刺图 a 穿刺入定位针(22G)后行 CT 扫描,确认目标椎间盘与定位针的距离 b 利用游标卡尺在体表上确认距离并标记 c CT 引导下调整穿刺针的方向,向目标椎间隙穿刺,确认针头到达椎间盘边缘 d 穿刺针进入椎间盘中央,在 CT 横断位图上确认穿刺位置及深度

Figure 1 CT-guided puncture of intervertebral disc a Puncture, and CT scan, then measure the distance from target disc center to located needle b Puncture, then measure and confirm the distance from the needle to cutaneously c Adjust the orientation of the needle under CT guidance, puncture towards the target disc, and confirm the pinhead of needle after touching the margin of the disc d Puncture into the centre of the disc, and confirm the position and depth of the pinhead on CT axial image

毒,外辅料覆盖或用创口贴保护,将动物放回实验中心继续饲养。术后无动物出现活动障碍或死亡。

1.5 影像学观察

术后 4、8、12 周,均随机选取 6 只实验兔,麻醉后行腰椎 X 线片及 MRI 检查(具体参数同前)。在 PACS 系统上测量各组术前、术后各时间点腰椎侧位 X 线片椎间隙前缘、中部、后缘高度,取其平均值作为椎间隙高度,以“术后椎间隙高度/术前椎间隙高度 $\times 100$ ”计算椎间盘高度相对值(DHRV)表示椎间盘的高度变化,实验结果以平均数 $\pm$ 标准差表示,同时观察各组椎间盘相邻的终板及椎体边缘骨赘情况。在 MRI 图像上观察各组椎间盘髓核与纤维环的形态及信号变化,椎间盘退变情况用改良 Thompson 分级法^[3]进行评估。

1.6 病理学检查

大体观察:分别于术后 4、8、12 周,在拍摄 X 线片及 MRI 检查后 24h 内处死动物,分离出从 L1 到 L7 的整体腰椎。观察 3 组椎间盘的外形及周围骨赘形成情况,并切开各组椎间盘进行大体观察。

HE 染色:取各组椎间盘组织,以 4%多聚甲醛固定,常规逐级脱水,0.5mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液脱钙 20d,石蜡包埋组织,以 4 μ m 厚度切片连续横断面切片,每个标本选取至少 2 片以上髓核与纤维环组织较完整的切片进行常规 HE 染色。用光学显微镜观察纤维环及髓核的形态学改变。

1.7 免疫组化检查

选取上述石蜡切片的椎间盘组织(选取标准同上),行二甲苯脱蜡、逐级乙醇水化;滴加按 1:100 比例配制好的 I 型或 II 型胶原一抗,在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用辣根过氧化物酶-生物素标记的二抗孵育;DAB 显色,边显色边观察。细胞核用苏木素复染,中性树胶封固观察。在光学显微镜下观察髓核及纤维环组织的染色情况。髓核细胞或纤维细胞周围基质染色呈棕黄色即为强阳性,反之为弱阳性,无染色者为阴性。

1.8 统计学分析

实验数据用 SPSS 17.0 统计学软件处理。DHRV 值采用单因素的方差分析,用 SNK 法进行组间比较。椎间盘 MRI 分级资料采用秩和检验进行分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 影像学检查

2.1.1 腰椎侧位 X 线片检查 穿刺组 DHRV 在术后 4、8、12 周呈进行性下降趋势,不同时间点的差异有统计学意义($P<0.05$);与相同时间点的对照组、假穿刺组比较,穿刺组 DHRV 明显降低($P<0.05$,表 1)。术后 4、8、12 周,对照组及假穿刺组的椎间隙高度基本与术前一致,未见终板骨质硬化及骨赘形成,各时间点对对照组与假穿刺组的 DHRV 无统计学差异($P>0.05$)。穿刺组:术后 4 周后椎间隙高度轻度降低,但未见相邻椎体终板硬化及骨赘形成;术后 8 周,椎间隙高度明显下降,并出现轻度的终板骨质硬化;术后 12 周,椎间隙高度仍继续变小,相邻椎体出现明显的终板骨质硬化及骨赘形成(图 2)。

2.1.2 腰椎 MRI T2 加权图像观察 术后 4、8、12 周,对照组及假穿刺组的椎间盘髓核均呈明显的高信号,与纤维环分界清晰,其信号强度与术前相比无明显下降,椎间盘改良 Thompson 分级无明显升高;各时间点对对照组及假穿刺组的改良 Thompson 分级无统计学差异($P>0.05$)。穿刺组椎间盘髓核信号强度在术后 4 周即轻度下降;术后 8 周髓核信号强度明显下降,髓核与纤维环分界不清;术后 12 周髓核信号强度继续下降,部分椎间盘失去正常形态,未见髓核组织信号(图 2)。术后 4、8、12 周,穿刺组椎间盘 T2 加权信号强度呈进行性降低趋势,改良 Thompson 分级逐渐增高,不同时间点的差异有统计学意义($P<0.05$);与相同时间点的对照组、假穿刺组比较,穿刺组的改良 Thompson 分级增高($P<0.05$,表 2)。

表 1 术后不同时间点 3 组的椎间盘高度相对值

Table 1 The disc height relative value for different group at each time point postoperatively ($\bar{x}\pm s, n=6$)

	4周 4w	8周 8w	12周 12w
对照组 Control group	97.99 $\pm$ 3.00	90.01 $\pm$ 6.92	92.58 $\pm$ 5.07
假穿刺组 Sham group	93.92 $\pm$ 3.15	77.73 $\pm$ 6.76	80.01 $\pm$ 4.06
穿刺组 Stabbed group	70.78 $\pm$ 4.55 ^{①②}	50.63 $\pm$ 4.04 ^{①②}	44.78 $\pm$ 2.61 ^{①②}

注:①与同时时间点对对照组及假穿刺组比较 $P<0.05$;②穿刺组术后各时间点之间比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control and sham groups at each time point, $P<0.05$; ②Compared between 4, 8, 12 weeks postoperatively in stabbed group, $P<0.05$

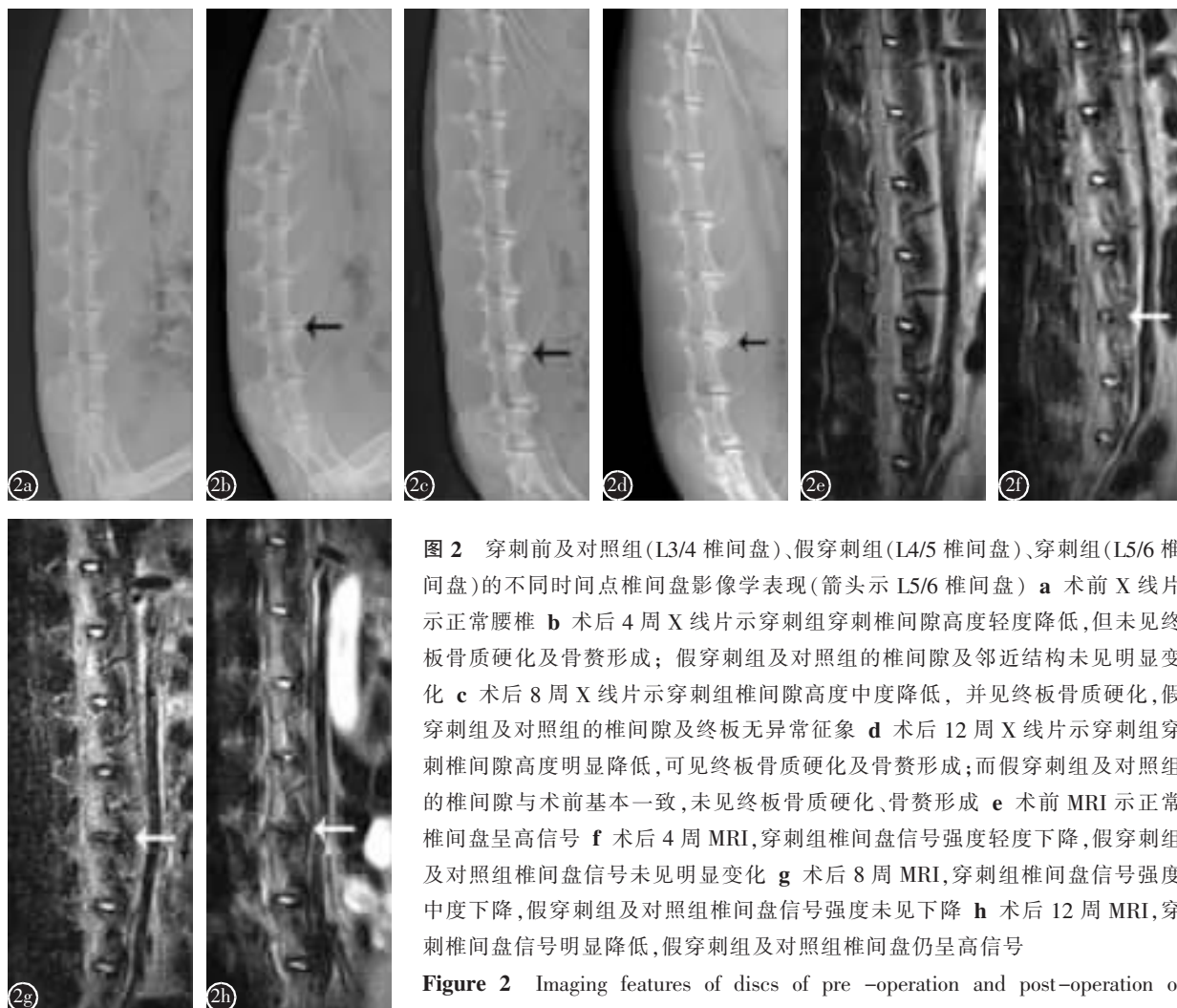


图 2 穿刺前及对照组(L3/4 椎间盘)、假穿刺组(L4/5 椎间盘)、穿刺组(L5/6 椎间盘)的不同时间点椎间盘影像学表现(箭头示 L5/6 椎间盘) **a** 术前 X 线片示正常腰椎 **b** 术后 4 周 X 线片示穿刺组穿刺椎间隙高度轻度降低,但未见终板骨质硬化及骨赘形成;假穿刺组及对照组的椎间隙及邻近结构未见明显变化 **c** 术后 8 周 X 线片示穿刺组椎间隙高度中度降低,并见终板骨质硬化,假穿刺组及对照组的椎间隙及终板无异常征象 **d** 术后 12 周 X 线片示穿刺组穿刺椎间隙高度明显降低,可见终板骨质硬化及骨赘形成;而假穿刺组及对照组的椎间隙与术前基本一致,未见终板骨质硬化、骨赘形成 **e** 术前 MRI 示正常椎间盘呈高信号 **f** 术后 4 周 MRI,穿刺组椎间盘信号强度轻度下降,假穿刺组及对照组椎间盘信号未见明显变化 **g** 术后 8 周 MRI,穿刺组椎间盘信号强度中度下降,假穿刺组及对照组椎间盘信号强度未见下降 **h** 术后 12 周 MRI,穿刺椎间盘信号明显降低,假穿刺组及对照组椎间盘仍呈高信号

Figure 2 Imaging features of discs of pre-operation and post-operation of different time point (arrow, L5/6 disc) **a** Radiography of normal lumbar spine

obtained preoperatively **b** Radiography obtained at 4 weeks postoperatively showed slightly decreasing of intervertebral space of stabbed disc, without endplate osteosclerosis or formation of osteophyte. The intervertebral space and enplate didn't show any changes compared with that of pre-operation **c** Radiography obtained at 8 weeks postoperatively showed moderately decreasing of stabbed disc height, with mild endplate osteosclerosis. There were no salient abnormalities in intervertebral space and endplate of sham and control discs **d** Radiography obtained at 12 weeks postoperatively showed obviously decreasing of stabbed disc height, with endplate osteosclerosis and formation of osteophyte. Sham and control discs remained the same, without decreasing of intervertebral space, endplate osteosclerosis or formation of osteophyte **e** MR image of normal discs obtained preoperatively showed high signal intensity **f** MR image obtained at 4 weeks postoperatively showed slightly decrease of signal intensity of stabbed disc. The signal of sham and control discs remained unchanged **g** MR image obtained at 8 weeks postoperatively showed moderately decreasing of signal intensity of stabbed disc. There was no decrease of signal intensity of sham and control discs **h** MR image obtained at 12 weeks postoperatively showed obviously decreasing of signal intensity of stabbed disc. Signal intensity of sham and control discs remained high as that of pre-operation

2.2 病理学检查

大体观察(图 3):对照组、假穿刺组椎间盘髓核在术后各时间点表现相似,均呈白色胶冻样,外周纤维环呈同心圆层状,包绕髓核组织,分界清

晰。穿刺组,术后 4 周椎间盘髓核失去光泽,颜色变灰暗,与纤维环分界不清;术后 8 周髓核组织明显萎缩,失去胶冻状外形,并见纤维环与髓核交界处较多的纤维组织及少量软骨组织;术后 12 周穿

表 2 术后不同时间点各组椎间盘 MRI 改良 Thompson 分级情况
Table 2 Modified Thompson scoring for different group at each time point postoperatively

Thompson 分级 Thompson scoring	对照组 Control group			假穿刺组 Sham group			穿刺组 ^{①②} Stabbed group		
	4W	8W	12W	4W	8W	12W	4W	8W	12W
I	6	4	4	4	1	4	0	0	0
II	0	2	2	2	4	2	5	0	0
III	0	0	0	0	1	0	1	4	1
IV	0	0	0	0	0	0	0	2	5

注:①各时间点与对照组及假穿刺组比较 $P<0.05$, ②穿刺组术后各时间点之间比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control and sham groups at each time point, $P<0.05$; ②Compared between 4, 8, 12 weeks postoperatively in stabbed group, $P<0.05$

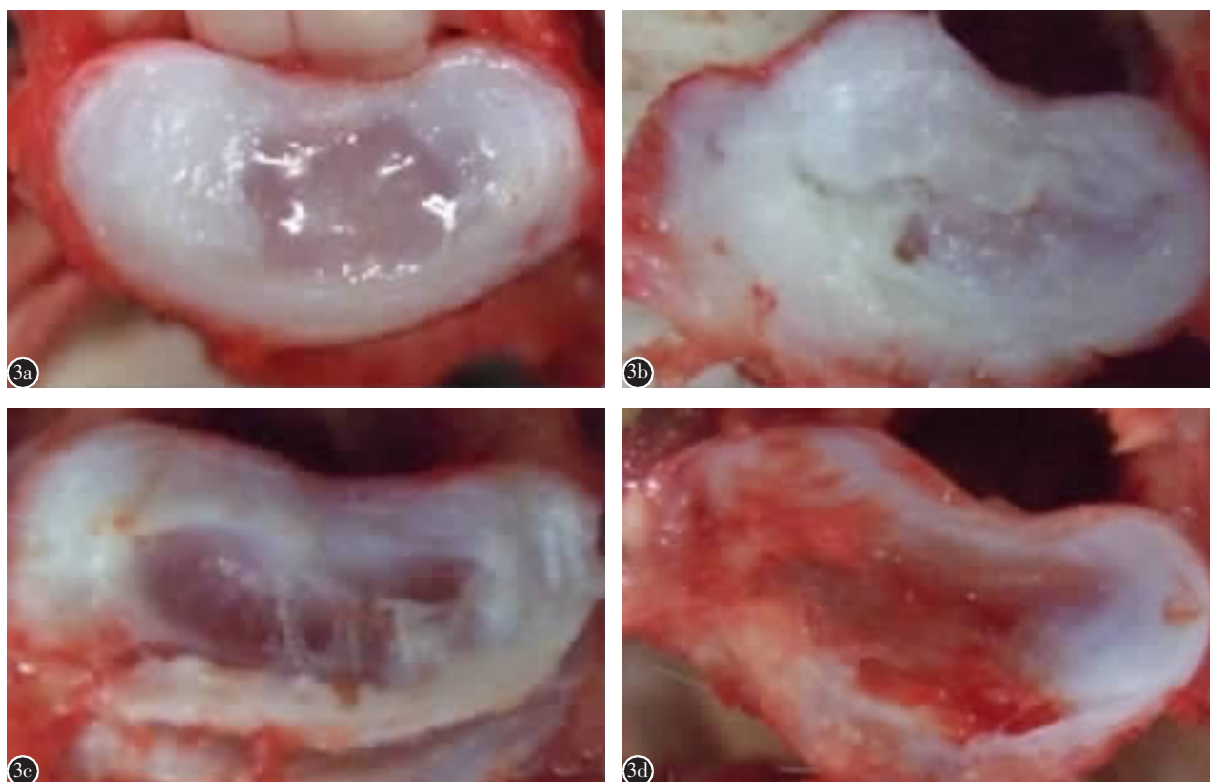


图 3 对照组及穿刺组椎间盘大体像 **a** 对照组, 正常椎间盘含丰富胶冻样物质的中央髓核, 与外周的呈明显同心圆层状排列的纤维环 **b** 穿刺组术后 4 周, 轻度退变的椎间盘。纤维环的层状纤维排列紊乱, 髓核水分下降, 在穿刺孔附近见软骨样组织 **c** 穿刺组术后 8 周, 中度退变的椎间盘, 纤维环可见纤维软骨组织形成, 髓核内可见纤维组织, 而在穿刺孔附近见骨样组织 **d** 穿刺组术后 12 周, 明显退变的椎间盘, 纤维环及髓核均见骨样组织形成, 椎体侧缘及前缘骨赘

Figure 3 Morphologic pathology of discs of control and stabbed group **a** Normal disc of control group showed nucleus pulposus with affluent gel-like nature, and fibrosus annulus fibrosus with obvious concentric fibrous lamellae **b** Mild degenerated disc of stabbed group at 4 weeks postoperatively showed disorganized fibrosus lamellae, and nucleus pulposus with decreased water content. Chondroid tissue was seen around the pin hole **c** Moderate degenerated disc of stabbed group at 8 weeks postoperatively. Photograph showed annulus fibrosus with fibrocartilage tissue formation, and fibrotic nucleus pulposus. Osteoid tissue formation was seen around the pin hole **d** Severe degenerated disc of stabbed group at 12 weeks postoperatively. Photograph showed osteoid tissue formation in both annulus fibrosus and nucleus pulposus, and osteophyte at lateral and anterior of vertebral body

刺组的椎间盘髓核组织基本消失,被纤维组织、骨样组织所代替,在穿刺针入口处周围的纤维环边缘上可见明显的骨赘形成。

HE染色(图4):对照组及假穿刺组椎间盘在术后各时间点表现无明显差别,其纤维环排列规则,髓核细胞数量较多,分布均匀。穿刺组术后4周纤维环层状组织结构紊乱,髓核细胞轻度减少;术后8周纤维环层状结构部分断裂,髓核被胶原组织分裂为含较多椭圆形细胞的细胞岛,出现纤维-软骨样细胞;术后12周纤维环层状组织碎裂、解体,髓核被蜂窝状纤维软骨样组织所代替。术后4、8、12周,随着时间的延长,椎间盘纤维组织逐渐增加,纤维组织向中心髓核区迁移,髓核体积缩小,最终消失。

2.3 免疫组化检查

术后各时间点,对照组及假穿刺组椎间盘纤维环外层Ⅰ型胶原染色均呈强阳性,纤维环内层染色较弱,髓核中几乎无染色;而Ⅱ型胶原髓核呈强阳性染色,自髓核至纤维环,其染色逐渐减弱,纤维环外层无染色。随着造模时间的延长,穿刺组椎间盘纤维环内层及髓核Ⅰ型胶原染色逐渐增强,术后4周即可见髓核呈淡黄色,术后8周髓核颜色染色加深,呈黄色,术后12周则呈较深的棕黄色;髓核区Ⅱ型胶原染色逐渐减弱,术后4周髓核呈中等程度的黄色,术后8周髓核组织染色继续减弱,术后12周髓核染色非常淡薄、甚至不染色(图5);表明随着术后时间的延长,穿刺组髓核组织中Ⅰ型胶原含量逐渐增加,Ⅱ型胶原含量逐

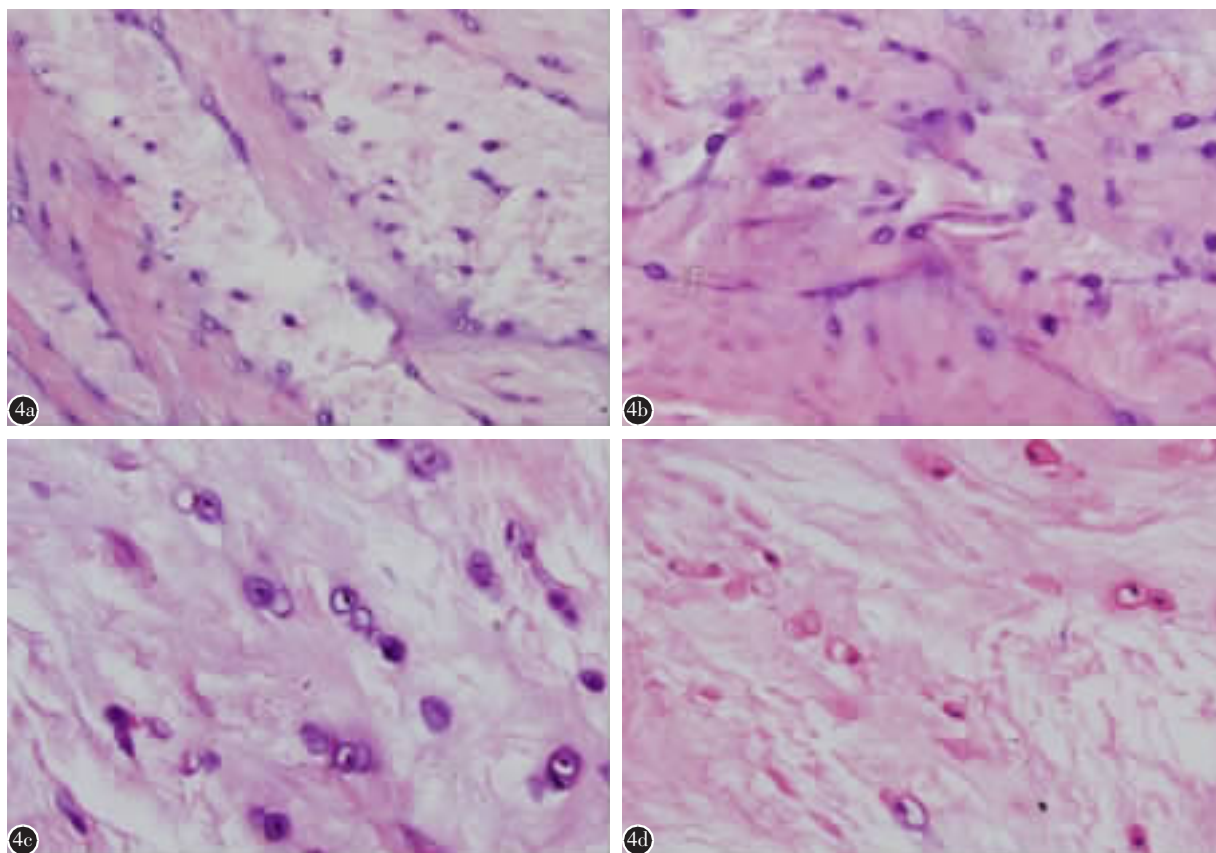


图4 对照组及穿刺组椎间盘组织病理学图像 a 对照组椎间盘,同心圆状排列的纤维环(HE染色 ×100) b 穿刺组术后4周椎间盘,结构紊乱的纤维环(HE染色 ×100) c 穿刺组术后8周椎间盘髓核,含较多椭圆形细胞的细胞岛(HE染色 ×200) d 穿刺组术后12周椎间盘髓核,见较多的纤维软骨组织(HE染色 ×200)

Figure 4 Pathologic images of discs of control and stabbed groups **a** Normal disc of control group with concentric appearance of fibrous lamellae(original magnification, ×100; HE stain) **b** Disc of stabbed group at 4 weeks postoperatively with disordered lamellae(original magnification, ×100; HE stain) **c** Nucleus pulposus of stabbed group at 8 weeks postoperatively with multiple elliptical shaped cell islands(original magnification, ×200; HE stain) **d** Nucleus pulposus of stabbed group at 12 weeks postoperatively with many fibrochondrocytes(original magnification, ×200; HE stain)

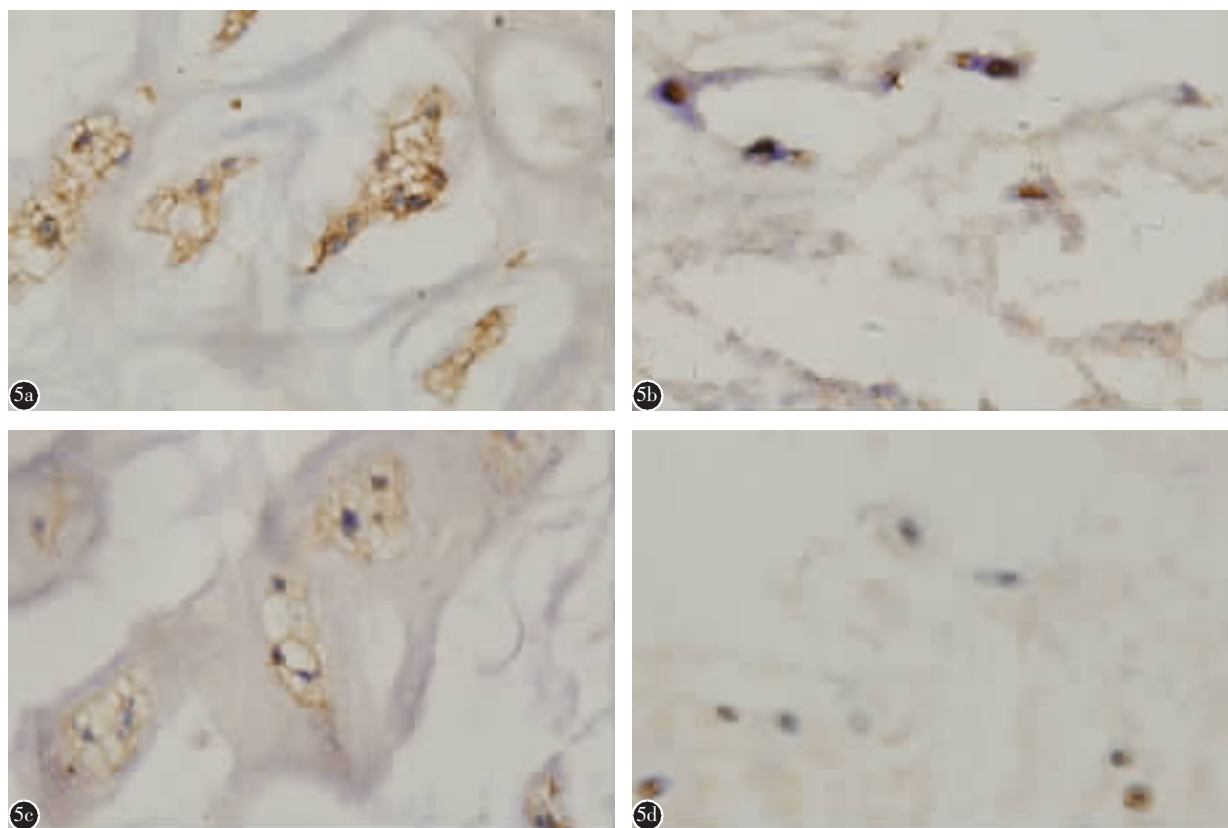


图 5 对照组及穿刺组术后 12 周椎间盘髓核免疫组织化学染色($\times 400$) a 对照组髓核, I 型胶原染色, 髓核细胞无染色 b 穿刺组术后 12 周椎间盘髓核, I 型胶原染色, 可见髓核区呈强阳性(棕黄色)的纤维软骨细胞 c 对照组髓核, II 型胶原染色, 髓核细胞呈强阳性(棕黄色) d 穿刺组术后 12 周椎间盘髓核, II 型胶原染色, 髓核区呈阳性染色的细胞减少

Figure 5 Immunohistochemical images of nucleus pulposus of control and stabbed groups at 12 weeks postoperatively(original magnification, $\times 400$) **a** Collagen type I immunostaining of normal nucleus pulposus of control group, showed negative staining of nucleus pulposus cells **b** Collagen type I immunostaining of nucleus pulposus of stabbed disc at 12 weeks postoperatively, showed positive staining fibrochondrocyte in nucleus pulposus **c** Collagen type II immunostaining of normal nucleus pulposus of control group showed strong staining of nucleus pulposus cells **d** Collagen type II immunostaining of nucleus pulposus of stabbed disc at 12 weeks postoperatively, showed decrease of account of cell of positive staining

渐减少。

3 讨论

3.1 模型构建的方法

为阐明椎间盘退变的病因, 人类曾构建出多种动物模型。鼠及兔是最常用于制作椎间盘退变模型的实验动物, 而纤维环穿刺法诱导椎间盘退变是最常用的构建方式。多数学者倾向于开放手术破坏动物椎间盘组织, 构建重复性高、易于标准化的模型, 这类方法可选用不同的穿刺针、且能准确控制穿刺的角度与深度, 故可使退变更缓慢, 更相对接近于人类椎间盘漫长退变过程, 但需要进

行软组织切开、暴露目标椎间盘, 不仅创伤较大, 导致实验动物病死率高, 也间接对动物的行为方式造成一定影响。手术中切除过多的椎旁韧带容易导致过多的骨赘形成, 不利于进行椎间盘退变治疗实验研究时药物的使用, 因开放手术进行二次药物注射或置入时, 通常需要在原手术区的对侧再实行开放手术^[4]; 重复的开放手术使实验更趋复杂, 影响椎间盘退变监测及治疗效果。另外, 开放手术构建模型耗时较长, 需要更娴熟的手术操作技巧及更完善的术后护理技术, 经济费用增高。

部分学者试图利用经皮穿刺的微创方法制作

椎间盘退变模型,减轻因损伤椎间盘以外结构所造成的对实验结果的误判,同时降低了实验动物的死亡率。其操作方法多为取相邻横突连线的中点经腹膜外入路进针,调整角度使穿刺准确,然后刺入目标椎间盘。此法的关键为控制穿刺针的位置与深度,但多数情况下不能直接观察穿刺针的进针情况,而仅能依靠手术操作者的感觉来判断。故虽然这种传统的经皮纤维环穿刺法简单易行,实验动物创伤小,但难以控制其穿刺的深度,有可能直接损伤髓核使椎间盘退变急剧,或因无法准确穿刺目标椎间盘而导致造模失败。

近年来,有学者利用透视法对经皮穿刺纤维环造模法进行改进。蒋新华等^[5]及 Kwon^[6]分别在透视引导下经皮纤维环穿刺成功构建了兔椎间盘退变模型;王娜等^[7]亦在透视下经皮穿刺将纤连蛋白片段成功注入兔椎间盘内。因其设备所限制,透视引导法仅能提供二维的平面图像,对椎间盘周围软组织结构显示欠佳的缺点,操作时存在不便之处。

螺旋 CT 扫描不仅可清晰显示椎体骨质结构,还能观察椎旁软组织结构。螺旋 CT 引导下穿刺法显示直观,具有三维效果,其观察角度更全面,故定位更准确,更方便控制穿刺针的方向与力度,可避开椎管、神经根等重要结构,准确刺入目标椎间盘,故其重复性更高。我们借助于螺旋 CT 定位准确、显示清晰的特点,不经开放手术即将穿刺针准确刺入纤维环内,并且可判断穿刺针刺入的深度,按我们设计的方案成功破坏了纤维环组织,初步达到预期的实验效果。

3.2 模型退变效果的评估

3.2.1 影像学指标 X 线无法直接观察到椎间盘组织,但可以通过椎间隙高度及骨质的改变,进而推测椎间盘的变化,准确判断椎间盘退变的严重程度^[8]。基于腰椎 X 线片上测量椎间隙高度改变的方法广泛应用于椎间盘退变动物实验研究中,并证明其与病理学、免疫组织化学检测有较高的一致性^[3,9]。我们在本研究中观察到,随着穿刺时间的延长,椎间隙呈进行性降低,提示纤维环穿刺后椎间盘退变的缓慢进行。在术后 8 周可见穿刺组椎间盘终板骨质硬化,在术后 12 周穿刺椎间盘出现边缘骨赘形成。

MRI 成像具有良好的软组织对比度,能根据信号特点分辨出椎间盘髓核及纤维环组织,是椎

间盘退变的简单易行、精确无创的检查手段,广泛用于各类椎间盘退变模型的检测。目前多采用 T2 加权像对椎间盘进行评估,在动物实验研究领域,改良 Thompson 分级法是目前椎间盘退变最常用的影像学评估法,它主要根据椎间盘的 MRI T2 加权像上信号强度进行分级,与病理学观察具有较高的一致性,能较好反映椎间盘退变的生理生化改变。本研究结果显示,术后 4 周穿刺组椎间盘 T2 加权图像上信号强度轻度下降,而在术后 8、12 周信号强度下降加剧,穿刺椎间盘的改良 Thompson 分级逐渐增高,说明穿刺的椎间盘正在发生退行性改变。

3.2.2 组织形态学及免疫组织化学指标 我们通过纤维环穿刺,破坏椎间盘复合体的完整性,使椎间盘组织发生退变;在 HE 染色光镜下可观察到,随着穿刺时间的延长,穿刺组椎间盘层状纤维环逐渐扭曲、断裂,纤维组织逐渐向中心的髓核区生长、范围扩大,纤维环结构模糊不清,髓核细胞进行性减少,同时向类成纤维细胞分化,发生形态及功能的变化;另外,我们通过免疫组织化学技术观察到穿刺组椎间盘 II 型胶原合成进行性减少, I 型胶原合成进行性增加。证实我们利用 18G 穿刺针破坏纤维环后,椎间盘发生了缓慢渐进的退行性改变。

实际上,在椎间盘退变过程中,除了组织结构、胶原蛋白成分发生改变外,髓核区的蛋白多糖酶、组织蛋白酶、金属蛋白酶的含量在早期即发生变化、并持续至退变晚期^[10]。退变椎间盘发生多种的基因表达变化亦为学术界的共识^[6,11];基因改变可通过聚合酶链式反应进行检测、验证。我们在实验中,没有进行其他分子生物学的检测,此为本文研究的不足之处。

综上所述,本研究证实通过 CT 引导下经皮纤维环穿刺法可诱导椎间盘退变,其退变缓慢渐进,重复性高,并在影像学、病理学上证明退变过程。本法操作简单、对椎间盘周围组织干扰低,创伤性小,可真实再现人类椎间盘退变的客观规律,为研究椎间盘病变提供了一种较理想的动物模型。

4 参考文献

1. Ferguson SJ, Steffen T. Biomechanics of the aging spine[J]. Eur Spine J. 2003, 12(Suppl 2): 97-103.

2. Singh K, Masuda K, An HS. Animal models for human disc degeneration[J]. Spine J, 2005, 5(6 Suppl): 267-279.
 3. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration [J]. Spine, 2005, 30(1): 5-14.
 4. Masuda K, Imai Y, Okuma M, et al. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model[J]. Spine, 2006, 31(7): 742-754.
 5. 蒋新华, 张伶, 陈建宇, 等. 透视引导下穿刺构建兔椎间盘退变模型的影像和病理变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(48): 8931-8934.
 6. Kwon YJ. A minimally invasive rabbit model of progressive and reproducible disc degeneration confirmed by radiology, gene expression, and histology[J]. J Korean Neurosurg Soc, 2013, 53(6): 323-330.
 7. 王娜, 吴成爱, 赵丹慧, 等. 应用纤连蛋白片段建立椎间盘退变动物模型[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23(1): 47-53.
 8. Benneker LM, Heini PF, Anderson SE, et al. Correlation of radiographic and MRI parameters to morphological and biochemical assessment of intervertebral disc degeneration[J]. Eur Spine J, 2005, 14(1): 27-35.
 9. Issy AC, Castania V, Castania M, et al. Experimental model of intervertebral disc degeneration by needle puncture in Wistar rats[J]. Braz J Med Biol Res, 2013, 46(3): 235-244.
 10. Patel KP, Sandy JD, Akeda K, et al. Aggrecanases and aggrecanase-generated fragments in the human intervertebral disc at early and advanced stages of disc degeneration [J]. Spine, 2007, 32(23): 2596-2603.
 11. Seki S, Asanuma-Abe Y, Masuda K, et al. Effect of small interference RNA (siRNA) for ADAMTS5 on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular needle-puncture model[J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(6): R166.
- (收稿日期:2013-12-09 修回日期:2014-01-28)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 李伟霞)

消息

第二届颈椎微创技术及显微外科操作学习班通知

近年来,随着脊柱微创技术的迅速发展,各种微创技术如:椎间盘镜、椎间孔镜、介入技术在颈椎外科中得到了较好的应用,并且收到了良好的疗效。另一方面,在颈椎外科手术中运用显微外科技术具有天然的优势,它提高了手术的精细度和安全性,在颈椎外科中熟练使用手术显微镜将使脊柱外科医生如虎添翼,而且通过显微外科技术的辅助,一些常规的开放手术可以通过微创的方式来完成。

2013年7月4~6日,我们在上海举办了第一届中国显微颈椎微创外科论坛暨国际显微颈椎微创外科操作学习班,首次在中国进行显微颈椎微创外科技术的解剖操作实践培训,收到了较好的效果。在此基础上,为了进一步推广和探讨微创技术及显微外科技术在颈椎外科中的应用,我们拟于2014年5月23~25日在上海举办第二届颈椎微创技术及显微外科操作学习班,学习班学员招收对象为有志于脊柱微创技术的骨科、脊柱外科、神经外科、疼痛科及介入科等相关科室的医生。为了让学员能够更好地掌握相关理论和操作技巧,此次学习班采用理论和实践操作相结合的小班课教学模式,以操作为主,理论教学为辅,学习班学员限20人。学习班内容包括:(1)颈椎微创介入消融技术;(2)椎间孔镜技术在颈椎外科中的应用;(3)椎间盘镜在颈椎外科中的应用;(4)显微外科技术在颈椎及上颈椎外科中的应用;(5)其他颈椎微创相关技术。操作班学员收取学费2000元/人,本次操作培训班非国家级继续教育项目,不授予学分。

学员报名联系方式:请在4月30日前通过电话或者E-mail进行报名。联系人:扶青松:15221016707;顾昕:13764131302;电话:(021)66307330;E-mail:jzwk7418@163.com。

有关论坛及培训班的更多详细情况请访问同济大学附属第十人民医院脊柱外科/脊柱微创中心网站:www.tongjispine.com。