

综述

胸腰椎椎体骨折动物模型的研究进展

Advancement in animal model for the thoracolumbar spine fracture

崔健超¹, 江晓兵¹, 杨志东¹, 梁 德¹, 任 辉², 沈耿杨², 唐晶晶¹, 林顺鑫²

(1 广州中医药大学第一附属医院脊柱外科 510405 广州市; 2 广州中医药大学 510405 广州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.07.19

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-07-0666-04

胸腰椎椎体骨折是脊柱骨折的常见类型, 其与外伤和骨质疏松症密切相关。通常外伤性胸腰椎骨折多由车祸、高处坠落等高能损伤所致, 而骨质疏松性胸腰椎骨折则多由低能损伤所致, 甚至单纯站立位也可导致椎体骨折^[1]。胸腰椎椎体骨折可导致不同程度的疼痛、功能障碍以及瘫痪等并发症^[2], 约有 20%~40% 的患者伴有神经损伤^[3]。胸腰椎椎体骨折已成为脊柱外科医生和科学家的研究重点。但由于人体研究受诸多因素影响, 故动物实验则成为研究的替代方式, 本综述主要收集近 15 年国内外动物胸腰椎椎体骨折的造模方式, 并对各自方法的特点进行总结与评价。

1 造模动物的选择条件

理想胸腰椎椎体骨折模型的动物选择, 应该尽量满足以下条件。(1)重复性: 即便在不同实验人员或不同时期, 只要在相同或相似条件干预下, 模型均能很好地被重复建立; (2)相似性: ①宏观表现相似性, 所选动物建模后所表现的症状、体征及各项检查均与人类相似; ②微观表现相似性, 动物模型的椎体骨微细结构变化和骨代谢机理在造模前后的变化情况与人类相仿; ③干预措施相似性, 建模方式尽可能与临床发病病因相似; (3)可行性: ①客观可行性: 所选动物应价格低廉、获取途径简便以及造模时间较短; ②操作可行性: 所选动物应能耐受所需的造模干预措施, 其中对于活体造模则要求动物能耐受该类手术且造模后便于取材; 而对于离体造模则要求保留有完整的研究结构。

尽管目前常用于模拟人体生理病理的动物模型已能较好地模拟胸腰椎椎体骨折, 但是仍未能达到完全模拟的程度, 并且它们之间各有长短, 这要求学者根据不同的研究要求进行适当的取舍。

2 常用的胸腰椎椎体骨折模型动物特点

第一作者简介: 男(1987-), 医学硕士, 研究方向: 脊柱外科、骨质疏松症

电话: (020)36591604 E-mail: spine_dr.cui@qq.com

通讯作者: 梁德 E-mail: 249943192@qq.com

2.1 小鼠

小鼠是动物模型中最常用的一种, 即便其购买、饲养方便, 价格低廉, 但是由于其骨骼太小^[4], 手术器械要求精度高, 极易造成脊髓不同程度的损伤。另外, 由于血清标本量及骨标本量太少, 所以对于标本的检测需要更为苛刻的技术。所以小鼠通过手术建立胸腰椎椎体外伤性骨折模型, 所面临的挑战仍较为巨大。尽管手术造模难度较大, 但是由于小鼠基因组结构与人类相近^[5], 且低骨量小鼠极易发生自发性骨折^[6], 所以通过建立骨质疏松转基因小鼠模型, 使其自发骨折, 则成为小鼠椎体骨折模型的突破点。V. Geoffroy 等^[7]利用雄性 C57B1/6 与 BALB/c 杂交小鼠与雌性 C57B1/6 与 BALB/c F1 杂交小鼠交配, 同种繁殖 6 代后获得雌性 Runx2 基因高表达小鼠, 通过 X 线拍摄, 4 周龄小鼠则出现散在的椎体压缩骨折, 到 13 周时, 则出现胸腰段广泛的骨折, 并且从组织形态学探讨中, 也得到与人类胸腰段骨折相似的表现。同样地, SAMP6 小鼠衰老加快, 与老年性骨质疏松症相类似, 随着月龄增加, 骨量迅速丢失且出现快速自发性椎体骨折^[8-10]。

2.2 大鼠

大鼠的饲养方式简便, 购买方便, 价格较低廉, 其骨标本量和血清标本量较小鼠多, 生命力顽强, 可耐受一定的手术打击, 是椎体骨折模型实验中较为理想的载体。尽管是正常椎体骨组织, 但是长期载荷情况下, 椎体因反复受压、骨小梁断裂, 可出现椎体缓慢性的塌陷^[11,12]。同样地在大鼠活体内, Pollintine 及 Kummari 等通过载荷实验, 发现大鼠椎体内骨小梁断裂、松质骨压缩, 最后皮质骨沿着薄弱处形成裂隙, 最后蠕变成一个塌陷椎体, 其显微结构与人类脊柱压缩骨折的病理表现相近, 这为研究骨折微环境提供了相近的模型^[13,14]。而椎体蠕变压缩通常伴有不同程度的骨代谢性疾病, 所以, 附加一定的骨代谢疾病干预措施, 对于研究、探讨复杂因素骨折的机理有一定的指导意义。Kim 等^[15]切除大鼠卵巢, 建立去卵巢骨质疏松大鼠模型, 对离体椎体施加固定载荷, 使骨折形变程度更为明显, 同时其加载时间及负荷则进一步减少。但是, 这些造模方式均以离体实验为主, 对于研究骨折愈合机理及干预因素, 缺乏参考依据。而国内学者盛俊东, 着眼于骨折愈合机

理,在活体椎体骨皮质开小窗,刮除椎体内全部松质骨,从而建立出椎体骨折模型^[16]。围绕着该实验模型,其先后通过去卵巢法建立骨质疏松性椎体骨折模型以及在骨折区域内施加 BMP,从而成功探讨骨折特点及骨折愈合机理^[16-17]。但由于大鼠的活动体位以爬行为主,缺乏轴向压缩应力,所以即便椎体内骨强度严重降低,也未能诱发椎体压缩形变畸形。

2.3 兔

兔模型主要包括家兔和新西兰兔两大类,缘其体积较大,骨标本量充足,手术造模难度远较大鼠小,并且其血液标本较多,可满足多次采血的要求。更重要的是,性成熟后兔具有与人类相接近的哈弗氏系统^[18]和骨骼转化迅速^[19]等特点,现在已经成为骨科常见疾病的造模载体。国内学者早以针对兔活体行骨折模型研究,张淑娴等对麻醉后成年兔经腹膜后显露椎体,横向切断椎体前缘,术后 2 周拍片可见椎体明显压缩^[20]。建模成功后,通过对模型的深入研究,如影像学表现和病理图片,发现骨折在不同愈合分期中,骨小梁的变化与人类的相接近^[21-23]。手术沿椎体前缘横断损伤后,脊柱稳定性仍存在,由于兔前肢欠发达,负重集中在后肢,生活体位以半直立屈曲位为主,脊柱在此负重状态下,椎体受压,最终表现成压缩状态^[20]。另外赵刚及全仁夫通过兔活体椎体内刮除松质骨,建立了椎体骨缺损模型,这为探讨生物力学性能及骨折愈合机制提供了特定的活体模型^[24,25]。

2.4 猪

由于猪骨骼的生理病理以及解剖结构与人类有较多相似点,所以其在骨科研究领域中的地位正日渐提升。Manrique 等在活体猪中透视下经皮穿刺达椎体内创造一个骨缺损区,建立了大型动物的椎体骨折模型^[26]。但是,由于猪受体重和体积的限制,饲养和实际操作中遇到诸多不便,所以目前多转变成以小型猪或离体标本的研究为主。Sami 等游离出猪椎体,予以纵向应力建立爆裂骨折椎体模型^[27],并通过有限元途径探讨骨折后椎体的应力特点^[28],这为单一椎体骨折手术方式的研究提供了一个参考模型。但是在临床中,胸腰椎骨折往往影响范围更广,针对运动单元或长节段脊柱的整合研究,成为受损机理及力学探讨的目标。Lundin 等对两个相邻椎体及之间椎间盘作轴向应力,磁共振和形态学检查见除椎体损伤外,还沿着椎体终板出现不同程度的椎间盘损伤^[29],这与临床影像学所见以及尸体研究^[30]相吻合,更为接近临床实际。当然,临床外力也不仅仅是作用于一个运动节段,往往表现得更为复杂,多个椎体之间的挤压以及多个椎间盘的相互缓冲作用会成为研究的混杂因素,Boisclair 等^[31]就通过离体 3 个连续椎体纵向压缩,建立爆裂骨折模型,研究不同应力及角度对模型的影响,为建立骨折不同分型提供造模上的参数及基础。该模型模拟临床疾病的复杂病因,与临床更为接近,对于研究特定分型时,可以根据不同的需求仔细选择。

临床上,骨质疏松症常伴随出现脊柱椎体骨折,所以

诱发该类病理性的椎体骨折从而探讨力学性能,也是建模目的。既往传统的建模方式,是利用活体通过去势、激素等方式建立骨质疏松模型,然后取标本做轴向压缩从而建立骨质疏松椎体压缩骨折模型。但这种方式的造模周期长、饲养困难,较少被采纳。而程自申等则把离体椎体浸泡在乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液中脱钙,再行压缩实验从而快速建立骨质疏松压缩骨折模型^[32]。该法简便易行,重复性高,所以被广泛用于相关力学研究范畴中。

2.5 羊

常用于动物实验的羊包括有山羊和绵羊。两者均性格温顺,饲养容易,体格较大,可在实验中反复取出骨组织标本和血尿标本;椎体结构与人类相似,易于植入人工假体,所以除了研究不同的分子生物机理外,还可用于外科技术的探讨。与大部分其他大型动物离体造模相似,闫石等对游离胸腰段中 L1 做预损伤,并施加纵向压力从而建立椎体骨折模型^[33]。另一方面,活体实验则虽然仍以建立骨缺损为主,但是闫宏伟等^[34]结合山羊的生活习性以及 wolf 定律,活体骨缺损模型建立后将笼底一侧垫高至 40° 坡度,将饲料置于最高处顶端,使山羊在术后模拟人类活动直立行走的姿势。这有助于研究动物体位改变对骨折愈合的影响及进行其他机理性探讨。

2.6 非人类灵长类动物

灵长类动物与人类属于近亲关系,在进化史上一脉相承^[35];并且大部分灵长类动物生活中多保持直立状态,骨骼的生物力学特点及骨代谢特点均与人类相近,所以在医学研究中价值最大,意义最深。然而,由于动物伦理及法律保护方面的限制,其来源十分有限;且其价格昂贵、饲养困难,所以目前尽管其实验价值最高,仍无法用于胸腰椎骨折模型建立及研究实验中^[36]。

3 造模方法

除了动物的选择外,造模方式也多种多样,如转基因法、骨缺损法、骨横断法、离体压缩暴力法等。

3.1 转基因法

转基因法主要是指通过基因工程技术,使骨转换中的基因无法表达或过度表达,促使骨量快速丢失,使其自发出现椎体骨折。由于该项技术需要多次繁衍,受基因组研究复杂程度的影响,所以对手术造模困难的小鼠较为适用^[7]。

3.2 骨缺损法

骨缺损法是指通过手术刮除目标椎体内松质骨结构,人为创造骨缺损区域,但由于该方式对骨皮质破坏甚少,或仅残留一个小缺口,对力学性能的改变与真正椎体骨折有一定的区别^[26],所以它仅能通过观察及干预缺损区域,从而探讨骨折愈合机理^[34]。因该项技术需要手术操作,所以要求动物的体格应能允许常规手术器械的操作,故可在大鼠、兔、猪和羊等大中型动物中使用^[34]。

3.3 骨横断法

骨横断法是指在活体内,在椎体前缘横行离断椎体,造成横断骨折,从而观察该椎体的力学变化情况及愈合情况^[13,14]。由于这项技术同属手术操作,所以也要求在大中型动物中使用。值得注意的是,考虑与临床常见骨折表现的相似性,这种造模方式可选择性地造成骨皮质和骨松质的破坏及骨缺损的区域,所以能更好地模拟临床的常见骨折类型^[14]。

3.4 离体压缩暴力法

离体压缩暴力法主要是指在动物尸体中取出椎体标本,施加纵向载荷以建立骨折模型。这种方法多用于探讨骨折发生机理、应力改变及外固定技术,却无法探讨骨折愈合机理及愈合后力学改变情况^[7]。由于该类型骨折模型属于离体模型,受机器限制,建议用于较大动物。当然,椎体骨折除了受外伤影响外,还可能受自身病理性因素影响,所以提前建立骨质疏松模型也是椎体骨折干预措施之一。

3.5 其他附加方法

目前对于骨质疏松的建模方法已非常完善,常见的包括去势、激素性、转基因以及离体椎体的 EDTA 脱钙法。

4 总结及展望

随着经济发达以及人口老年化,高能量及低能量所致的脊柱胸腰椎骨折的发病率日益增高,其致死率、致残率严重威胁着人类的生存健康^[36]。目前在对胸腰椎骨折的发病及愈合机理进行研究时动物模型具有重要意义。但由于胸腰椎椎体骨折动物模型的造模方式较为特殊,其受选材及技术限制,目前对动物模型的研究还缺乏系统的归纳及评价。

纵观过去 15 年国内外各位学者的研究,既往学者考虑到实验各项客观因素,如造模操作难度、动物购入及饲养难度等,在建立胸腰椎椎体骨折模型时多选用小鼠^[7]、大鼠^[13]、兔^[20]、猪^[28]、羊^[33]等动物,受限于灵长类动物的法律管理条例,即便其自身与人类相似度高,仍未能应用于科研实验。另外,综合分析各种动物的生活习性,与人类最相近的是灵长类动物,其次为半直立行走的兔子,而其余的动物多无长期直立行走的习性。所以在选择动物模型时候,选择兔子或者有意识的使动物尽量保持在类直立状态^[34],可能模拟与人类相似的力学载荷状态,从而在研究骨折后期结果时具有重要意义。

在研究胸腰椎骨折时,模型动物和造模方法的选择十分重要。只有当模型能够模拟临床疾病的发病机制、组织形态学、生物力学变化特点时,动物模型实验得出的结果才有一定的指导价值。然而,上述所总结的这些动物及方法各有优缺点且各有侧重,所建立的模型也仅能模拟较少部分的椎体骨折临床特点。在后续的动物模型研究中,还需要不断根据临床研究要点对动物模型进行优化,以尽量排除混杂因素。

5 参考文献

1. Ren HL, Jiang JM, Chen JT, et al. Risk factors of new symptomatic vertebral compression fractures in osteoporotic patients undergone percutaneous vertebroplasty[J]. Eur Spine J, 2015, 24(4): 750-758.
2. McLain RF. Functional outcomes after surgery for spinal fractures: return to work and activity[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2004, 29(4): 470-477.
3. Hsu JM, Joseph T, Ellis AM. Thoracolumbar fracture in blunt trauma patients: guidelines for diagnosis and imaging [J]. Injury, 2003, 34(6): 426-433.
4. 朱彦昭, 史晓林, 吴建民. 骨质疏松症模型的动物选择[J]. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(6): 631-634.
5. 程少丹, 王拥军, 唐德志, 等. OPG 基因敲除小鼠骨质疏松情况的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(1): 16-19.
6. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis[J]. Endocr Rev, 2000, 21(2): 115-137.
7. Geoffroy V, Chappard D, Marty C, et al. Strontium ranelate decreases the incidence of new caudal vertebral fractures in a growing mouse model with spontaneous fractures by improving bone microarchitecture[J]. Osteoporos Int, 2011, 22(1): 289-297.
8. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis[J]. Osteoporos Int, 2005, 16(2): 129-138.
9. Silva MJ, Brodt MD, Uthgenannt BA. Morphological and mechanical properties of caudal vertebrae in the SAMP6 mouse model of senile osteoporosis[J]. Bone, 2004, 35(2): 425-431.
10. Chen H, Kubo KY. Segmental variations in trabecular bone density and microstructure of the spine in senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis[J]. Exp Gerontol, 2012, 47(4): 317-322.
11. Yamamoto E, Paul CR, Chan DD, et al. Development of residual strains in human vertebral trabecular bone after prolonged static and cyclic loading at low load levels [J]. J Biomech, 2006, 39(10): 1812-1818.
12. Kim DG, Shertok D, Ching TB, et al. Variability of tissue mineral density can determine physiological creep of human vertebral cancellous bone[J]. J Biomech, 2011, 44(9): 1660-1665.
13. Lynch JA, Silva MJ. In vivo static creep loading of the rat forelimb reduces ulnar structural properties at time-zero and induces damage-dependent woven bone formation [J]. Bone, 2008, 42(5): 942-949.
14. Kummari SR, Davis AJ, Vega LA, et al. Trabecular microfracture precedes cortical shell failure in the rat caudal vertebra under cyclic overloading[J]. Calcif Tissue Int, 2009, 85(2): 127-133.
15. Kim DG, Navalgund AR, Tee BC, et al. Increased variability of bone tissue mineral density resulting from estrogen defi

- ciency influences creep behavior in a rat vertebral body [J]. Bone, 2012, 51(5): 868-875.
16. 盛俊东, 刘兴炎, 白孟海, 等. 骨质疏松性椎体骨折模型的建立 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11 (19): 3723-3726.
17. 盛俊东, 顾九君, 刘兴炎, 等. 骨形态发生蛋白-7 复合纤维蛋白对大鼠骨质疏松性椎体骨折愈合的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(4): 291-294.
18. 李冠武, 汤光宇, 李伟, 等. 去势法联合皮质激素快速诱导兔骨质疏松模型[J]. 临床放射学杂志, 2011, 30(7): 1055-1058.
19. Mashiba T, Burr DB, Turner CH, et al. Effects of human parathyroid hormone (1-34), LY333334, on bone mass, remodeling, and mechanical properties of cortical bone during the first remodeling cycle in rabbits[J]. Bone, 2001, 28(5): 538-547.
20. 张淑娟, 郭新全, 邱玉金, 等. 兔椎体骨折动物模型制备的初步探讨[J]. 动物医学进展, 2013, 34(7): 131-134.
21. 张淑娟, 郭新全, 孙西河, 等. 兔椎体骨折愈合过程的 X 线、MRI 表现与病理学变化对照研究 [J]. 中国临床医学影像杂志, 2007, 18(8): 559-562.
22. 赵万琛, 王静, 王超, 等. 兔椎体骨折愈合过程中 MRI 信号分型[J]. 动物医学进展, 2014, 35(4): 131-134.
23. 张淑娟, 王超, 王雪芹, 等. 低场强 MRI 对兔椎体骨折及其愈合程度的评价[J]. 动物医学进展, 2013, 34(11): 73-76.
24. 全仁夫, 倪月明, 郑宣, 等. 经皮椎体成形术后骨折椎体生物力学性能和组织形态研究[J]. 中医正骨, 2013, 25(12): 15-19.
25. 赵刚, 胡侦明, 许建波, 等. 聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥注入椎体成形的生物力学变化 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(49): 9655-9658.
26. Manrique E, Chaparro D, Cebrian JL, et al. In vivo tricalcium phosphate, bone morphogenetic protein and autologous bone marrow biomechanical enhancement in vertebral fractures in a porcine model[J]. Int Orthop, 2014, 38(9): 1993-1999.
27. Tarsuslugil SM, O'Hara RM, Dunne NJ, et al. Development of calcium phosphate cement for the augmentation of traumatically fractured porcine specimens using vertebroplasty[J]. J Biomech, 2013, 46(4): 711-715.
28. Tarsuslugil SM, O'Hara RM, Dunne NJ, et al. Experimental and computational approach investigating burst fracture augmentation using PMMA and calcium phosphate cements [J]. Ann Biomed Eng, 2014, 42(4): 751-762.
29. Lundin O, Ekstrom L, Hellstrom M, et al. Exposure of the porcine spine to mechanical compression: differences in injury pattern between adolescents and adults[J]. Eur Spine J, 2000, 9(6): 466-471.
30. Karlsson L, Lundin O, Ekstrom L, et al. Injuries in adolescent spine exposed to compressive loads: an experimental cadaveric study[J]. J Spinal Disord, 1998, 11(6): 501-507.
31. Boisclair D, Mac-Thiong JM, Parent S, et al. Effect of spinal level and loading conditions on the production of vertebral burst fractures in a porcine model [J]. J Biomech Eng, 2011, 133(9): 094503.
32. 程自申, 张智海, 刘莉, 等. 脱钙模拟椎体骨质疏松体外模型的建立[J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(3): 208-212.
33. 闫石, 苏峰, 张志敏. 经伤椎置钉对椎弓根皮质劈裂合并椎体骨折的生物力学稳定性的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36(4): 415-419.
34. 闫宏伟, 梅玉峰, 文波, 等. Cem-Ostetic™ 人工骨浆复合骨形态发生蛋白对山羊椎体骨缺损修复作用研究[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2009, 6(6): 1-5.
35. 朱彦昭, 史晓林, 吴建民. 骨质疏松症模型的动物选择[J]. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(6): 631-634.
36. Jones HL, Crawley AL, Noble PC, et al. A novel method for the reproducible production of thoracolumbar burst fractures in human cadaveric specimens[J]. Spine J, 2011, 11(5): 447-451.

(收稿日期:2015-04-14 修回日期:2015-05-04)

(本文编辑 彭向峰)