

兔椎体软骨终板内血管三维影像结构研究

徐鸿明¹, 胡 斐², 王雍立¹, 金海明¹, 陶周善¹, 王向阳¹

(1 温州医科大学附属第二医院骨科 325000 温州市; 2 成都医学院第一附属医院内分泌科 610500 成都市)

【摘要】目的:研究兔椎体软骨终板内血管的三维影像结构。**方法:**选取 6 月龄日本大耳白兔(2.5~3kg)5 只,使用 Micro-CT 对通过腹主动脉注射硫酸钡造影剂后的兔 L4、L5 椎体及其终板进行 10mm 与 5mm 范围扫描,将扫描结果导入 Mimics 软件进行血管三维结构重建,观察椎体终板内血管的三维结构。10mm 与 5mm 范围扫描结果分别为 10mm 组和 5mm 组,从两组血管三维图中随机选取 5 个血管末端并测量其直径大小。**结果:**Mimics 软件重建的椎体终板内血管三维结构清晰可见。10mm 组终板内血管俯视图可见血管在终板内接触髓核部分的中心区域分布密集,管径粗,并向四周的接触纤维环部分的终板呈放射状辐射;矢状面上可见终板将椎体部分与椎间盘内纤维环及髓核部分明显分隔开,其内血管从椎体后方发出,沿终板后方向前方辐射长入。5mm 组图像可见终板内接触髓核部分的中心区域的血管与接触纤维环部分的外周区域的血管结构不同,接触纤维环部分的外周区域的血管形状为单一襻样结构,而终板内接触髓核部分的中心区域的血管是一种复杂的完全缠绕在一起的血管襻结构。5mm 组血管末端直径明显小于 10mm 组血管末端直径($P<0.001$)。**结论:**注射硫酸钡造影剂后用 Micro-CT 扫描建立终板内血管三维结构的方法可以清楚地显示兔终板内血管的三维结构,为进一步研究终板血管变化提供新的技术手段。

【关键词】椎体终板;血管;血管造影;硫酸钡;Micro-CT;兔

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.11.10

中图分类号: R322.7, R814.42 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-11-1013-05

3D structural study of vessels in rabbit's intervertebral endplate/XU Hongming, HU Fei, WANG Yongli, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(11): 1013-1017

【Abstract】 Objectives: To observe the 3D structure of the vessels in rabbit's endplate by injecting barium sulfate contrast agent and reconstructing the 3D structure. **Methods:** Five 6-month-old rabbits(2.5-3kg) were used in this study. The rabbit's endplate(L4, L5) was scanned by micro-CT which was injected with barium sulfate contrast agent in the abdominal aorta, and then the scanned data were imported into the Mimics Software for 3D reconstruction of the vascular structure in the rabbit's intervertebral endplate. Each sample needs to be scanned twice according to the size of the scan range (FOV: 10mm and 5mm). Then 5 blood vessels were randomly selected and the diameters were measured in each group. The data were divided into two subgroups (10mm and 5mm). **Results:** The 3D structure of the rabbit's intervertebral endplate vessels was observed by Mimics software. In the top view of the 10mm group, the vessels were observed as dense distribution in the central portion(nucleus pulposar) with larger diameter and diverged to the lateral portion(inner anular). In the sagittal plane, the vertebral body and intervertebral disc were clearly separated, and the vessels emitted from the rear of the vertebral body and ingrowth along the endplate divergent. In the 5mm group, the vessels in the central portion (nucleus pulposar) exhibited swollen and complex coil-like loops, which were different with the vessels in the lateral portion(inner anular) formed simple loops. The diameter of vessels in the 5mm group was significantly smaller than that in the 10mm group($P<0.001$). **Conclusions:** Our study suggests that the blood vessels in rabbit endplate can be clearly observed by the method described, which can provide a new technique for the further study of the intervertebral endplate vessels.

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81371988);浙江省自然科学基金项目(编号:LR12H06001);浙江省医药卫生重大科技计划(编号:WKJ-ZJ-1527)

第一作者简介:男(1989-),在读硕士,研究方向:脊柱外科

电话:(0577)88002814 E-mail:xuhongming26@hotmail.com

通讯作者:王向阳 E-mail:xiangyangwang@126.com

[Key words] Intervertebral endplate; Vessels; Angiography; Barium sulfate; Micro-CT; Rabbit

[Author's address] Department of Orthopaedic Surgery, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, 325027, China

椎间盘退变作为脊柱退行性疾病的始动因素, 可以导致椎间盘突出、椎管狭窄等多种临床疾病^[1]。研究发现椎间盘退变是多因素共同参与的结果, 如年龄、生物力学、营养等, 但其确切病因及病理生理机制目前仍不十分清楚^[2-5]。椎间盘营养物质供应不足被认为是椎间盘退变的主要原因之一^[6,7]。椎间盘营养物质主要依靠外 1/3 纤维环及终板血管供应^[8], 其中后者对于髓核组织的新陈代谢尤为重要^[9-11]。既往研究发现终板中心区域是最重要的供应营养物质的区域^[12]。Kobayashi 等^[13]通过注射墨汁的方法观察到绝大多数血管结构存在于终板内接触髓核部分的中央区域。故终板内的血管密度及结构作为一个敏感指标, 其病理改变与椎间盘退变紧密相关^[14]。目前对于终板内的血管研究, 绝大多数停留在二维层面^[8,15], 三维结构的探索最早见于 1996 年 Oki 等^[16]的研究, 国内学者亦采用血管铸型的方法对终板内血管进行研究^[17,18]。但该方法在标本制备过程中略显繁琐, 耗时久, 且实验过程中所使用到的浓盐酸、有机溶剂等试剂对于实验员均具有不小的毒害性。得到的铸型标本极易遭到破坏, 不能完整地保留血管在终板内的三维结构。本研究旨在建立一种简便、快速并安全的方法, 用于观察兔终板内的血管三维结构。

1 材料与方法

1.1 实验材料

6 月龄日本大耳白兔 (2.5~3kg) 5 只, 温州医科大学动物实验中心提供, 生产批号: SYXK (浙) 2014-0006; 硫酸钡 (上海万疆生物技术有限公司; 规格: 99%, 1 μ m); Perkin Elmer Quantum FX 小动物 Micro-CT 系统; 超声波破碎仪 (美国 Sonics)。

1.2 实验方法

1.2.1 造影剂准备 将 48g 硫酸钡溶解于 80ml 等比例混合的生理盐水与纯水溶液中, 混匀后置于功率为 25W 的超声波破碎仪中约 5min, 再放入约 50℃ 水浴箱中待用。

1.2.2 注射造影剂 兔耳缘静脉注射 10% 水合

氯醛 (1.5ml/kg) 进行麻醉, 待麻醉起效 (血管钳钳夹四肢无肌肉收缩反应, 无角膜反射) 后, 将其放在小动物手术台上, 仰卧位, 固定四肢, 备皮后暴露手术区域, 碘伏消毒 3 遍后铺巾, 腹正中线切开腹腔, 暴露肾动脉以下腹主动脉、下腔静脉及双侧髂总动脉。丝线结扎双侧髂总动脉, 随后对腹主动脉进行插管并灌注肝素生理盐水 (500u/100ml), 下腔静脉插管放血, 肝素生理盐水冲洗血管直至流出液清亮。之后向腹主动脉内注射造影剂 (约 20ml/min) 直至下腔静脉内流出乳白色液体 (约 60ml, 图 1)。注射完毕, 血管钳钳夹关闭腹主动脉、下腔静脉。

1.2.3 Micro-CT 扫描 夹闭腹主动脉及下腔静脉 1h 后取材: 每只取完整 L4、L5 椎体及其椎间盘并将该标本置于 Micro-CT 旋转台内的标本支架内, 同时采用美国 Perkin Elmer 公司 Quantum FX 小动物 Micro-CT 系统进行标本扫描。扫描参数: 电压 90kV, 电流 160 μ A。扫描层数: 512 层。同一标本以 L5 上终板中心区域为中心先进行 10mm 范围大小扫描, 再进行 5mm 范围大小扫描。将扫描得到的 Micro-CT 图像数据根据扫描范围的大小分为 10mm 组和 5mm 组。

1.2.4 三维重建 将得到的扫描图像转化为 DICOM 格式文件导入 Mimics 软件 (15.0)。根据骨质与硫酸钡造影剂的不同阈值大小分别建立终板及去掉终板骨质后的血管三维模型图。最后将两个模型图进行合并, 并将终板模型进行 80% 的透明度处理。这样可以很好地观察终板内的血管三维结构。然后分别从 10mm 组与 5mm 组的血管三维模型图中随机选取 5 个血管末端, 测量其直径大小, 取平均值分别代表各组末端血管直径。

1.3 统计分析

用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计学分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 10mm 组与 5mm 组血管末端直径比较采用两独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 Micro-CT 扫描结果

Micro-CT 扫描后将结果导入 Mimics 软件得到 L5 椎体上终板及部分椎体骨质和椎间盘组织的轴状位、冠状位和矢状位图像,这些图像可以清晰呈现出终板结构。发现终板内部存在大量的孔道结构,各孔道结构并非独立存在,邻近孔道之间存在着相互联系。注射硫酸钡进行血管造影后,可以清晰观察到终板孔道结构内有造影剂显影,从矢状位及轴状位图像中可以发现终板内部的血管贯穿孔道结构,血管形态结构复杂,主要集中分布于终板内接触髓核部分的中心区域(图 2)。

2.2 Mimics 三维重建结果

将椎体终板内的血管造影结果进行三维重建后得到其三维图像(图 3),可以清晰观察到椎体终板内的血管三维形态结构。10mm 组终板血管俯视图可见血管在终板内接触髓核部分的中心区域分布密集,管径较粗,并向四周的接触纤维环部分的终板呈放射状辐射(图 3);矢状面上可见终

板将椎体部分与椎间盘内纤维环及髓核部分明显分隔,其内血管从椎体后方发出,并沿终板后方向前方辐射长入,而椎间盘内髓核及纤维环部分未见血管存在(图 4)。5mm 组图像中见终板内接触髓核部分的中心区域的血管与接触纤维环部分的外周区域的血管结构不同,接触髓核部分的中心区域内的血管形状并非单一攀样结构,而是一种复杂的完全缠绕在一起的血管攀结构(图 5)。

2.3 末端血管直径分析

10mm 组与 5mm 组的血管末端直径分别为 $70.47 \pm 8.08 \mu\text{m}$ 和 $35.45 \pm 3.21 \mu\text{m}$ 。5mm 组血管末端直径明显小于 10mm 组血管末端直径 ($P < 0.001$)。

3 讨论

在本研究中,我们描述了一种新的实验方法,即对兔椎体终板内血管注射硫酸钡造影剂后行

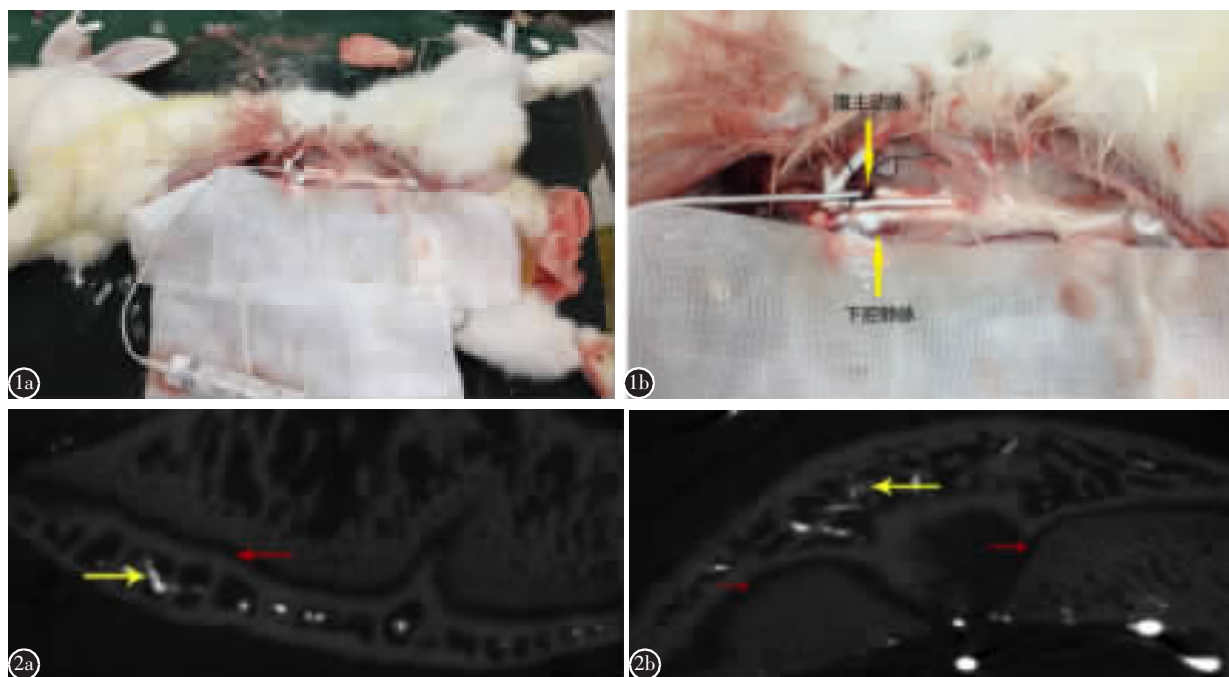


图 1 注射造影剂过程图 a 对腹主动脉进行插管后向腹主动脉内注射硫酸钡,注射约 60ml 可见下腔静脉充满乳白色液体即硫酸钡 b 插管部位放大图清晰见下腔静脉流出乳白色液体即硫酸钡 图 2 Mimics 软件显示终板图 a、b 分别为矢状位及轴状位终板图像,终板与椎体存在明显分界(红色箭头),终板内部大量孔道结构,大量硫酸钡血管造影显影于孔道结构内,血管造影剂主要集中于中央区域(黄色箭头)

Figure 1 Angiography Procedure a The barium sulfate suspension was injected in the abdominal aorta until the inferior vein cava was filled b Enlarge figure showed clearly that the inferior vein cava was filled with barium sulfate suspension **Figure 2** Mimics software displayed the endplate a, b The sagittal image and axial image, the red arrow showed boundary between the endplate and the vertebral body. There were a large number of the canal structures in the endplate, in which the barium sulfate contrast agent was developed. Angiography agent was mainly concentrated in the central area(yellow arrow)

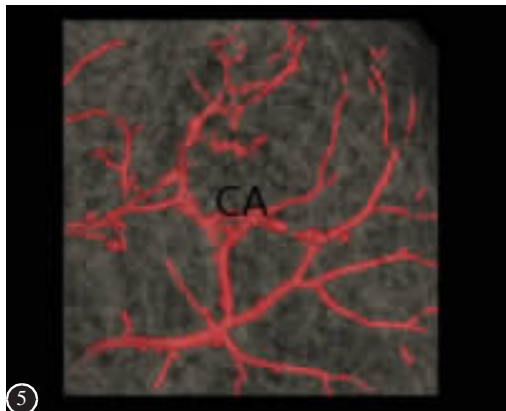
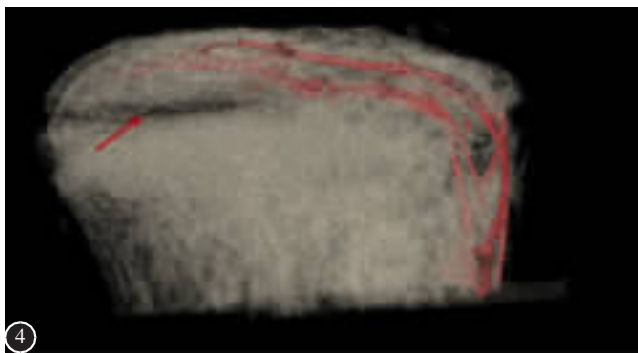
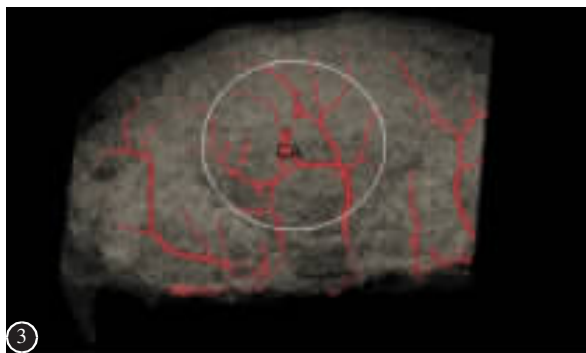


图 3 10mm 组终板血管俯视图 血管在接触髓核部分的终板中心区域内分布密集,管径较粗,并向四周的接触纤维环的终板外周部分呈放射状辐射。外周部分分布稀疏。CA:中心区域 **图 4** 10mm 组终板血管模型矢状位图 矢状面上可清楚见到终板将椎体部分与椎间盘内纤维环及髓核部分分隔,终板与椎体之间存在一明显分界(红色箭头),终板内的血管从椎体后方血管发出,沿后方向前方长入。终板上方的髓核及纤维环内并未见血管存在 **图 5** 5mm 组接触髓核部分的终板中心区域内血管形状并非单一攀样结构,而是一种庞大复杂的完全缠绕在一起的血管攀结构。CA:中心区域

Figure 3 The top view of the 10mm group. The vascular buds were dense distribution in the central portion(nucleus pulposar) with larger diameter, and diverged to the lateral portion (inner anular). CA: central area **Figure 4** The sagittal plane of the 10mm group. The vertebral body and intervertebral disc were clearly separated (red arrow), and the vessels emitted from the rear of the vertebral body and along the endplate divergent ingrowth to the front. There was no vessels in the nucleus pulposar and anular **Figure 5** The 5mm group. The vascular buds in the central portion(nucleus pulposar) exhibited swollen and complex coil-like loops, which was different with the vascular buds in the lateral portion(inner anular) formed simple loops. CA: central area

Micro-CT 扫描建立终板内血管 3D 结构来观察血管形态。到目前为止,对于椎间盘及终板的研究采用的动物模型包括鼠、兔、犬、牛、羊、猪、猴等 10 余种。在动物模型的物种选择上,虽然灵长类与人类在解剖上最为接近,但由于动物实验伦理和经济因素等限制,难以广泛应用;而牛、羊、猪、犬等大型哺乳动物也因价格昂贵,饲养时间长等条件限制而难以应用。兔作为常规实验动物,具有实验周期短、经济、易于饲养等特点,是用于椎间盘及终板研究较为实用、可行的动物。因此,本课题组将实验动物定为日本大耳兔。

早在 20 世纪 90 年代,Okai 等^[16]通过血管铸型后行电镜扫描来观察兔终板内的血管形态。国内亦有学者^[17,18]使用血管灌注丙烯腈(A)-丁二烯(B)-苯乙烯(S)(acrylonitrile butadiene styrene, ABS)的方法制备兔腰椎软骨终板的血管铸型标本,并通过光学显微镜及扫描电镜观察椎体终板内血管的形态学结构。但该铸型方法具有不少的

缺点:(1)在制备血管铸型标本过程中需使用到一些有机溶剂和浓盐酸等有毒有害物品,这对实验人员具有不小的毒性;(2)标本制备过程耗时久,需几天时间腐蚀组织得到铸型标本;(3)整个标本制备的实验步骤繁琐;(4)得到的铸型标本不易保存,易受外界影响而破坏原本已有的结构。而本研究通过 Micro-CT 扫描注射造影剂后的兔椎体终板,并使用 Mimics 软件对终板内血管结构进行三维重建。其中造影剂为临床常用的硫酸钡,对人体无毒副作用,且造影剂注射完毕后即可立即进行扫描,无需等待,最后得到的实验结果可完整保留并呈现终板内的血管三维结构。该方法有简便、安全并快速等优点。

在 Micro-CT 的扫描过程中我们分别进行了 10mm 与 5mm 大小的范围扫描,发现两者之间对于血管直径存在明显差异,5mm 范围扫描可得到最小血管直径为 20 μ m。5mm 组的平均血管直径为 35 μ m,10mm 组的平均管径为 70 μ m,这与扫描

精度有关,10mm 组与 5mm 组均为连续扫描 512 层,两者之间存在不同的层距,而层距又决定了扫描精度,故两组末端血管直径测量结果显示出明显的差异。在造影剂选择上我们先后尝试了浓度为 150%、100%和 60%(w/v)的硫酸钡,前两者在注射过程中存在较大阻力,常因注射压力过大导致血管破裂,而 60%(w/v)的硫酸钡在注射过程中虽可完成注射,但仍存在一定困难。所以本课题组将 60%(w/v) 浓度硫酸钡进行超声波处理后再进行注射,这样以约 20ml/min 的注射速率可轻松完成注射过程。

本研究建立了一种安全、快速、简便的观察兔终板内血管三维结构的方法,通过该方法我们发现椎体终板内的血管从椎体后方发出,并沿终板后方向前方辐射长入,整体形态结构相互交错呈树枝状。终板内血管在不同区域分布密度不同,在终板内接触髓核部分的中心区域分布密集,在接触纤维环的外周部分分布稀疏,其中中心区域血管的形态结构与外周部分相比更为复杂。本课题组推测该形态结构的不同使得中心区域的血管相比于外周部分的血管具有更大的接触表面积,提高了中心区域终板的渗透性,具体机制有待进一步研究。但本实验方法也具有一定的局限性。首先,三维模型中的血管结构并不是十分完整,其中出现一部分断点情况,这可能是硫酸钡在血管中发生沉淀导致的结果,为了提高图像质量,需要进一步探索造影剂的种类及浓度等情况。其次,虽然本实验采用的设备理论最小分辨率可以达到 9 μ m,但在提高分辨率的同时将会缩小对样本的扫描尺寸,从而导致扫描标本的不完整性。

本研究结果显示,通过注射硫酸钡造影剂后用 Micro-CT 扫描建立终板内血管三维结构的方法可以清楚地反映兔终板内血管三维结构,为进一步研究终板血管变化提供了新的技术手段。

4 参考文献

1. An HS, Anderson PA, Haughton VM, et al. Introduction: disc degeneration: summary[J]. Spine, 2004, 29(23): 2677-2678.
2. Videman T, Nurminen M, Troup JD. 1990 Volvo Award in clinical sciences: lumbar spinal pathology in cadaveric material in relation to history of back pain, occupation, and physical loading[J]. Spine, 1990, 15(8): 728-740.
3. Battie MC, Videman T, Gill K, et al. 1991 Volvo Award in clinical sciences: smoking and lumbar intervertebral disc degeneration: an MRI study of identical twins[J]. Spine, 1991, 16(9): 1015-1021.
4. Benneker LM, Heini PF, Alini M, et al. 2004 Young Investigator Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration [J]. Spine, 2005, 30(2): 167-173.
5. Miller JA, Schmatz C, Schultz AB. Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex, and spine level in 600 autopsy specimens[J]. Spine, 1988, 13(2): 173-178.
6. Lotz JC, Fields AJ, Liebenberg EC. The role of the vertebral end plate in low back pain[J]. Global Spine J, 2013, 3(3): 153-164.
7. Adams MA, Dolan P. Intervertebral disc degeneration: evidence for two distinct phenotypes[J]. J Anat, 2012, 221(6): 497-506.
8. Nachemson A, Lewin T, Maroudas A, et al. In vitro diffusion of dye through the end-plates and the annulus fibrosus of human lumbar inter-vertebral discs [J]. Acta Orthop Scand, 1970, 41(6): 589-607.
9. Aoki J, Yamamoto I, Kitamura N, et al. End plate of the discovertebral joint: degenerative change in the elderly adult [J]. Radiology, 1987, 164(2): 411-414.
10. Crock HV, Goldwasser M. Anatomic studies of the circulation in the region of the vertebral end-plate in adult Greyhound dogs[J]. Spine, 1984, 9(7): 702-706.
11. McFadden KD, Taylor JR. End-plate lesions of the lumbar spine[J]. Spine, 1989, 14(8): 867-869.
12. Maroudas A, Stockwell RA, Nachemson A, et al. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro[J]. J Anat, 1975, 120(Pt 1): 113-130.
13. Kobayashi S, Baba H, Takeno K, et al. Fine structure of cartilage canal and vascular buds in the rabbit vertebral endplate. Laboratory investigation [J]. J Neurosurg Spine, 2008, 9(1): 96-103.
14. Zhang YG, Sun ZM, Liu JT, et al. Features of intervertebral disc degeneration in rat's aging process[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2009, 10(7): 522-527.
15. Gruber HE, Ashraf N, Kilburn J, et al. Vertebral endplate architecture and vascularization: application of micro-computerized tomography, a vascular tracer, and immunocytochemistry in analyses of disc degeneration in the aging sand rat [J]. Spine, 2005, 30(23): 2593-2600.
16. Oki S, Matsuda Y, Shibata T, et al. Morphologic differences of the vascular buds in the vertebral endplate: scanning electron microscopic study[J]. Spine, 1996, 21(2): 174-177.
17. 吕刚, 芮钢. 椎体软骨终板血管芽的形态学实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1998, 18(12): 722-724.
18. 徐宏光, 陈小虎, 王弘, 等. 兔椎体软骨终板血管芽增龄性变化[J]. 中华骨科杂志, 2011, 31(4): 351-356.

(收稿日期:2015-06-26 末次修回日期:2015-10-04)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)