

直立体位下无创轴向加载建立兔椎间盘退变动物模型

白雪东,王德利,侯黎升,葛 丰,徐 成,李 威,何 勃,阮狄克

(海军总医院骨科 100048 北京市)

【摘要】目的:通过直立体位下无创性轴向加载的方式,建立一种新型兔腰椎间盘早期退变的动物模型。**方法:**24 只 4 月龄雄性新西兰大白兔随机分为实验组及对照组。将实验组动物置于特制筒内使之保持直立体位,并自颈部施以 600g 轴向载荷,每日 6h;对照组动物不接受任何处理而常规饲养。在实验开始前及实验开始后 4 周、8 周、12 周时对全部动物行 X 线及 MRI 检查,观察实验组动物在筒内时腰椎的骨性结构,通过椎间盘高度指数(disc height index, DHI)测量,比较两组动物侧卧位时 L2/3、L4/5 和 L6/7 节段椎间隙高度改变;通过髓核相对灰度值测量比较两组动物髓核含水量变化。14 周后全部动物处死,取 L5/6 节段胶冻状髓核组织,应用 rt-PCR 检测 I 型胶原、II 型胶原及蛋白多糖表达水平;取 L6/7 节段椎间盘连同上、下各 1mm 软骨下骨,应用 HE 及天狼星红染色观察各组动物椎间盘组织结构改变。**结果:**2 只实验组动物在实验过程中死亡,其对应的实验数据从结果中剔除。腰椎 X 线片显示,在直立体位负重条件下,实验组兔腰椎形成明显后凸,较侧卧位下腰椎间隙明显变窄,在 L2/3 节段,直立体位下椎间隙高度为侧卧位时的 75.1% ($P<0.05$);在 L4/5 节段为 54.8% ($P<0.05$);在 L6/7 节段为 47.9% ($P<0.05$)。DHI 测量显示两组动物腰椎各节段 DHI 在任何时间点均无显著差异 ($P>0.05$)。MRI 结果显示,在 L2/3 节段,实验组与对照组髓核灰度值在任何时间点均无统计学差异 ($P>0.05$),在 L4/5 节段,实验组与对照组髓核相对灰度值在 12 周时开始具有显著差异 ($P<0.05$);在 L6/7 节段,两组间在 8 周时即开始有显著性差异 ($P<0.05$)。rt-PCR 结果显示,实验组 I 型胶原 mRNA 表达明显高于对照组 (3.57 倍, $P<0.05$);而 II 型胶原及蛋白多糖表达明显低于对照组 (分别为 0.35 倍和 0.43 倍, $P<0.05$)。病理学检查显示对照组与实验组椎间盘组织结构存在显著差异,对照组髓核组织与纤维环间边界清晰,髓核内富含均匀分布的髓核细胞;实验组内层纤维环明显增生,而髓核区域相应减小。**结论:**直立体位下无创性轴向加载方式可显著加速兔腰椎间盘的退变进程,其在发病机理上与人类椎间盘退变更加相似,该腰椎间盘退变动物模型操作简单、可重复性强。

【关键词】椎间盘退变;动物模型;轴向载荷;无创性;兔

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2017.06.12

中图分类号:R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2017)-06-0545-08

Upright posture combined with noninvasive axial loading-induced rabbit intervertebral disc degeneration/BAI Xuedong, WANG Deli, HOU Lisheng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2017, 27(6): 545-552

【Abstract】 Objectives: To establish a novel in vivo rabbit model of early intervertebral disc degeneration (IDD) that can better simulate the IDD process in humans. **Methods:** 24 four-month-old male New Zealand white rabbits were randomly assigned into two groups (experimental group and control group). Each rabbit in the experimental group ($n=12$) was placed into a plastic tube specially designed to maintain the animal in an upright posture. A collar weighed 600g was placed onto the neck of each experimental rabbit, 6 hours for one day. Rabbits in the control group ($n=12$) were regularly fed in their cages throughout the experiment. Before the experiment and at 4, 8 and 12 weeks after the experiment, lumbar lateral radiographs and MRI were taken in the lateral decubitus position for both the experimental group and the control group to monitor the

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81301579)

第一作者简介:男(1981-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱外科

电话:(010)66951376 E-mail:baixuedongngh@163.com

通讯作者:阮狄克 E-mail:ruandikengh@163.com

signs of disc degeneration by measuring disc height index(DHI) and grayscale values of nucleus pulposus(NP). At 14 weeks, all animals in both groups were sacrificed. The NPs of L5/6 were obtained for quantitative real time-PCR(rt-PCR) analysis. Disc segment L6/7 was obtained for histologic analysis. The specimens were cut midsagittally and stained with hematoxylin and eosin(H&E) and picrosirius red. **Results:** Two rabbits in the experimental group died during the study, and their data were not included in the final results. The lateral radiograph of rabbits in the experimental group which had been placed into the tube and maintained in an upright position showed that there was an obvious kyphotic curvature on the lower lumbar spine, and the disc height of L2/3, L4/5 and L6/7 was much smaller than the height in the image of the same rabbit in lateral decubitus position, 75.1%, 54.8% and 47.9% respectively for each segment (all $P<0.05$). DHI measurement showed no significant difference between two groups at any time point. Serial MRI scans showed that animals in the experimental group presented a progressive decrease in the signal intensity of their lumbar discs over the 14-week period. In contrast, NP signal intensities in the control group decreased more slowly during the same period. Significant differences between two groups were observed since 12 weeks in L4/5($P<0.05$) and 8 weeks in L6/7($P<0.05$). The result of rt-PCR showed that the collagen type I mRNA expressions were significantly greater(3.06-fold), whereas collagen type II and aggrecan mRNA expressions were significantly less (0.35-fold and 0.37-fold respectively) in the experimental group than those in the control group (all $P<0.05$). Histologic examination showed significant difference between the control and experimental group. In the experimental group, there was a large increase in fibrocartilage lamellas in the inner border of posterior AF, resulting in a significantly decreased gelatinous NP area. **Conclusions:** The upright posture combined with noninvasive external loading method can induce accelerated degenerative changes in rabbit lumbar discs. These mild degenerative changes closely resemble those which occur in the early phase of disc degeneration in humans, which suggest its use in future studies.

[Key words] Intervertebral disc degeneration; Animal model; Axial load; Noninvasive; Rabbit

[Author's address] Department of Orthopedics, Navy General Hospital, Beijing, 100048, China

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是椎间盘突出症的主要病理基础,也是许多脊柱退行性疾病的始动原因^[1,2]。目前对其发病机制以及病理生理方面的认识仍较为缺乏。椎间盘退变动物模型在阐明其发病机制以及评估新的治疗方法方面发挥了重要作用。尽管椎间盘退变动物模型多种多样,但当前尚没有理想的动物模型能够较好地模拟人类椎间盘退变过程,因此,探索能够更好地模拟人类椎间盘退变的新型造模方法具有重要意义^[3]。本研究拟通过无创性脊柱轴向加压方法建立一种新型兔椎间盘退变体内模型,为该领域的研究提供更为合理的动物模型。

1 材料与方法

1.1 分组及处理

24 只 4 月龄雄性新西兰大白兔,体重 2.4~2.8kg,随机分为两组,实验组 12 只,对照组 12 只。将实验组动物置于特制的圆柱形筒内,使之保持直立体位。筒壁为光滑透明塑料制成,高度 50cm,直径 14cm,筒底为不锈钢丝网,以方便清

理。实验动物在筒内无法跳出,经过数天适应期后逐渐温顺,1 周后,将由聚苯乙烯泡沫及铅坠制成的重 600g 的围领佩戴于实验组动物颈部(图 1),以进一步增加实验动物脊柱的轴向应力,至此正



图 1 增加实验组兔腰椎间盘轴向载荷的方法:将实验组兔置于特制筒内,强迫其保持直立体位,并在其颈部施加其 1/4 体重围领以增加其轴向载荷

Figure 1 Rabbit sitting in the tube maintaining an upright posture and loaded with a heavy collar to increase the axial load on the lumbar discs

式实验开始计时。实验组动物在筒内每日放置时间为 6h, 上午 3h, 下午 3h。除在筒里的“工作时间”以外, 实验组动物均在笼中自由饲养。对照组 12 只动物在整个实验过程中均在笼中自由饲养。每 4 周测量所有动物体重以评估各组动物的一般情况。

1.2 X 线检查

实验开始前, 在清醒状态下, 实验组动物在筒内直立体位下行腰椎侧位 X 线检查以观察其在该体位下的脊椎形态。而后, 实验组以及对照组所有动物以速眠新 II (3mg/kg)+氯胺酮(40mg/kg)麻醉, 侧卧位下行腰椎 X 线检查。在 X 线片上以 SilverPACS-ADViewer 软件测量比较实验组动物在不同体位下椎间隙高度变化。椎间隙高度为椎间盘前、中、后间隙的平均值, $h=(A+M+P)/3$ (图 2a)。

在实验开始后 4 周、8 周以及 12 周时, 所有实验组及对照组动物在麻醉状态下侧卧位行腰椎侧位 X 线检查。在腰椎 X 线片上行椎间盘高度指数 (disc height index, DHI) 测量 (图 2b), $DHI=2 \times (A+M+P)/(A1+M1+P1+A2+M2+P2)$ 。DHI 在各个时间点的改变与实验开始前所测 DHI 相比较, 结果表达为 DHI%。为分析不同节段腰椎间盘 DHI 变化差异, 对分别代表上、中、下腰椎的 L2/3、L4/5 及 L6/7 三个节段的椎间盘高度进行测量分析。所有测量均由两名独立的观察者完成, 其平均值为最终测量结果。

1.3 MRI 观察

实验开始前以及开始后 4、8、12、14 周, 各组动物均在麻醉状态下行 MRI 检查。在 12~14 周期间, 实验组动物不再接受任何处理, 与对照组动物一样常规饲养, 以消除压迫本身对于椎间盘含水量改变的影响。

椎间盘内髓核组织的水合状态通过我们此前建立的改良 Schneiderman's 法进行分析^[4]。应用 SilverPACS-ADViewer 软件, 在椎间盘正中矢状位片上测量髓核正中央 1mm² 区域的平均灰度值, 与同层面脑脊液的灰度值进行对比, 所得比值即为该节段髓核组织的相对灰度值。为衡量腰椎不同节段椎间盘内信号的变化差异, 对分别代表上、中、下腰椎的 L2/3、L4/5 以及 L6/7 三个节段的髓核相对灰度值进行分析。所有测量均由两名独立的观察者完成, 其平均值为最终测量结果。

1.4 髓核组织基质基因表达的 rt-PCR 检测

实验开始 14 周后, 实验组与对照组所有动物均通过静注苯巴比妥处死。获取 L5/6 节段胶冻状髓核组织, 迅速冻存于液氮。在获取足量 cDNA 后, 通过定量 PCR 检查分析髓核基质成分 I 型胶原、II 型胶原以及蛋白聚糖基因表达情况。选择管家基因 GAPDH 作为内参, 使用 Premier 5.0 软件对上述基因设计引物, 具体序列见表 1。参照常规定量 PCR 步骤实行检测^[9]。每个样品设三个复孔, 得出每个样品的 Ct 平均值, 再根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出相对于对照组、实验组各基因的相对表达量。

1.5 组织学观察

在所有动物处死后, 将在 MRI 检测中退变最明显的节段 L6/7, 连同椎间盘上、下各 1mm 软骨下骨, 以微型电锯取下。标本立即以 10% 的中性福尔马林固定 1 周, 再以 Perenyi 氏脱钙液 (4% 硝酸, 0.15% 铬酸和 30% 乙醇混合溶液) 脱钙 1 周。所有标本经自来水冲洗 12h 除酸后, 以刀片自椎

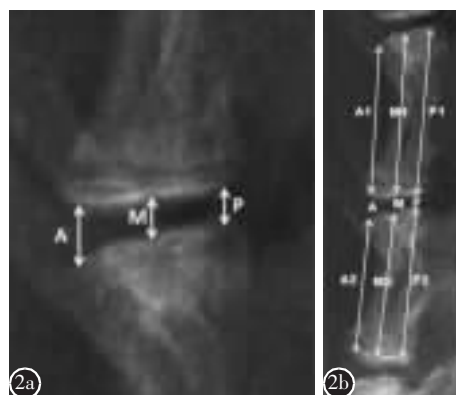


图 2 椎间隙高度测量方法与 DHI 测量方法示意图 a 椎间隙高度测量方法, $h=(A+M+P)/3$, 其中 A、M、P 分别代表前、中、后间隙高度 b DHI 测量方法, $DHI=2 \times (A+M+P)/(A1+M1+P1+A2+M2+P2)$, 其中 A、M、P 分别代表前、中、后椎间隙高度, A1、M1、P1 分别代表上位椎体前、中、后缘高度, A2、M2、P2 分别代表下位椎体前、中、后缘高度

Figure 2 The method used in disc height measurement and DHI measurement a Disc height measurement, $h=(A+M+P)/3$, where A, M, P represent the height of anterior, medial and posterior portion of the disc respectively b DHI was calculated by averaging the height measurements obtained from the anterior, middle, and posterior portions of the IVD (A, M, P respectively) and dividing that by the average of the adjacent vertebral body heights (A1, M1, P1 for the upper vertebrae, and A2, M2, P2 for the lower vertebrae), $DHI=2 \times (A+M+P)/(A1+M1+P1+A2+M2+P2)$

表 1 qRT-PCR 检测相关基因的引物序列
Table 1 Nucleotide sequences of the primers for qRT-PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequences	基因库编号 GeneBank accession no
GAPDH	GGAGAAAGCTGCTAA ACGACCTGGTCCTCGGTGTA	L23961
Collagen Ia	ATGGATGAGGAAACTGGCAACT GCCATCGACAAGAACAGTGTAAAGT	D49399
Collagen IIa	CCTGTGCGACGACATAATCTGT GGTCCTTTAGGTCCTACGATATCCT	AF027122
Aggrecan	GCTACGGAGACAAGGATGAGTTT CGTAAAAGACCTCACCTCCAT	L38480

间盘正中矢状面切开。将各标本以石蜡包埋,制作 5μm 厚组织切片。切片行 HE 染色及天狼星红染色,分别通过光镜及偏振光显微镜观察。

1.6 统计学分析

所有数据均使用 PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois)统计软件进行统计学分析,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。实验组动物直立体位与侧卧位腰椎间隙高度对比应用配对 *t* 检验分析;用析因设计的方差分析研究分组与时间的主效应和交互效应,多样本均数比较采用单因素方差分析,多重数据间的两两比较采用 LSD 法(方差齐性)或 Tamhane's 法(方差不齐),*P*<0.05 表示有统计学差异。

2 结果

2 只实验组动物在实验过程中死亡,其对应的实验数据从结果中剔除。实验组剩余的 10 只动物对实验处理耐受良好。在 12 周的实验处理过程中,实验组动物平均体重从 2.56±0.14kg 升高至 3.63±0.36kg,对照组平均体重从 2.62±0.17kg 上升至 3.81±0.27kg。实验组与对照组动物体重在任何时间点均无显著差异(*P*>0.05)。

2.1 X 线检查结果

实验组动物在筒内直立体位时 X 线片如图 3a 所示。在该体位下,下腰椎形成明显的后凸(图 3b),各椎间隙较麻醉状态下侧卧位影像(图 3c)明显变窄。椎间隙高度测量结果显示,在 L2/3 节段,直立体位下椎间隙高度为侧卧位时的 75.1%;在 L4/5 节段为 54.8%;在 L6/7 节段为 47.9%。直立体位下实验组动物各节段椎间隙高度测量值较侧卧位时均显著减少(*P*<0.05,表 2)。

实验组和对照组动物实验前以及实验开始后

4、8、12 周后侧卧位 X 线片如图 4a、b 所示。DHI% 测量结果显示,实验组及对照组 DHI 均随时间而逐渐下降。然而,无论在任何时间点以及任何节段,实验组与对照组间 DHI 变化均无统计学差异(*P*>0.05,表 3)。

2.2 MRI 检查结果

实验组与对照组动物 T2 加权、正中矢状位 MRI 影像如图 5 所示。实验组动物髓核组织信号强度在 14 周的实验观察期内呈进行性下降(图 5a),而对照组髓核组织信号强度下降则相对较小(图 5b)。灰度值测量结果显示,实验组与对照组髓核相对灰度值均随时间进行性下降(*P*<0.05),

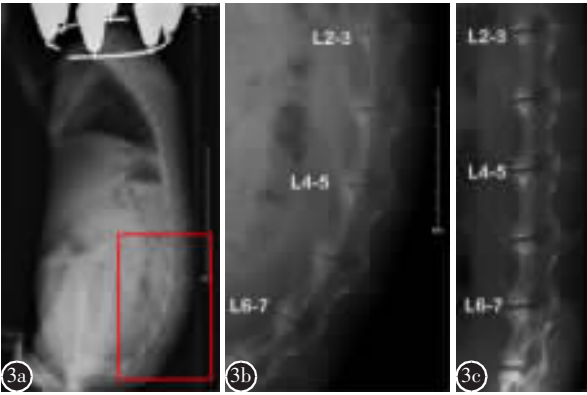


图 3 实验组动物在筒内直立体位时的骨性结构 a 侧位 X 线片示腰椎形成明显后凸 b 为图 a 腰椎局部放大图像示椎间隙明显变窄 c 同一动物麻醉后侧卧位腰椎 X 线片示不负重时椎间隙明显增大

Figure 3 Lateral radiograph of an experimental group rabbit sitting in the tube maintaining an upright posture a Lateral X-ray of the lumbar vertebra was significantly convex b A locally enlarged lumbar image of (a), showed the narrowing of lumbar disc space c Lateral radiograph of the same rabbit in the lateral decubitus position showing larger disc space without loading

表 2 直立体位与侧卧位椎间隙高度测量值比较
(mm, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 Difference in disc height measurement between the upright and decubitus positions

	直立位 Upright posture	侧卧位 Decubitus position
L2/3	1.125±0.123 ^①	1.530±0.253
L4/5	1.126±0.271 ^①	2.079±0.357
L6/7	1.221±0.322 ^①	2.643±0.373

注:①与直立位比较 *P*<0.05

Note: ①Compared with decubitus position, *P*<0.05

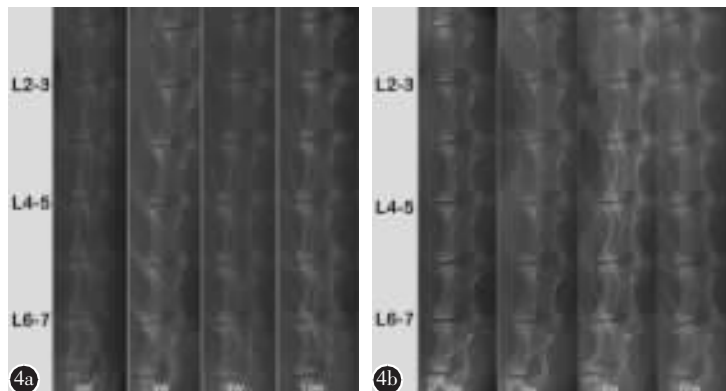


图4 实验组与对照组动物在实验开始前及开始后4周、8周、12周腰椎侧卧位X线片
a 实验组腰椎侧卧位片 b 对照组腰椎侧卧位片

Figure 4 Representative serial lateral radiographs of the experimental group a and control group b rabbits obtained before treatment and at 4, 8, and 12 weeks after treatment

表3 实验组与对照组 DHI% 比较

($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of DHI% between experimental and control groups

时间 Time	L2/3		L4/5		L6/7	
	实验组 (EG)	对照组 (CG)	实验组 (EG)	对照组 (CG)	实验组 (EG)	对照组 (CG)
4周 (4 weeks)	93.4±12.3	86.4±14.8	84.2±15.3	87±18.5	83.3±11.7	81.6±17.0
8周 (8 weeks)	80.6±4.8	80.5±14.8	80.7±11.3	80.3±15.1	73.3±16.6	77.0±15.0
12周 (12 weeks)	78.0±7.8	77±13.7	71.4±7.3	74.9±14.9	70.4±16.1	71.5±13.1

注:各时间点以及各节段,实验组与对照组间 DHI%变化均无统计学差异, $P>0.05$

Note: No significant difference ($P>0.05$) was observed between the two groups at any level and at any time points

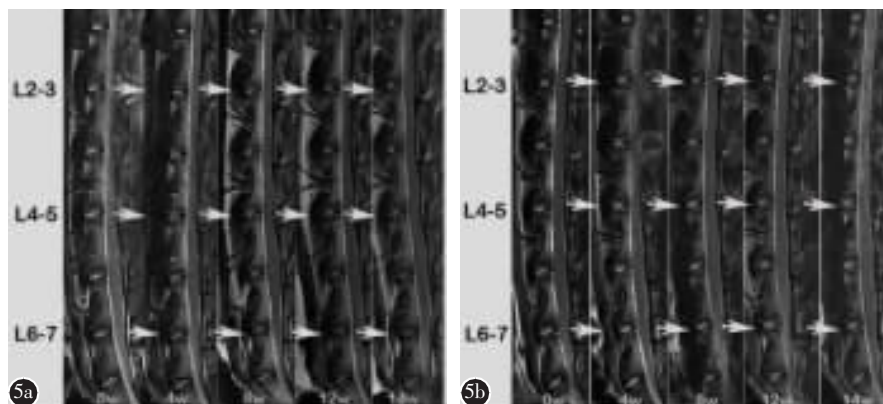


图5 实验组与对照组腰椎 MRI 系列检查结果 a 实验组同一只动物在 0、4、8、12、14 周时的腰椎 MRI T2 加权影像,示髓核组织信号强度在 14 周的实验观察期内呈进行性显著下降 b 对照组同一只动物各时间点腰椎 MRI T2 加权影像示髓核组织信号强度改变相对较小

Figure 5 Serial MRI scans of the lumbar spine in the control and experimental groups a Images of the experimental group, showed a progressive decrease in the signal intensities of lumbar disc b Images of the control group showed signal intensities decreased more slowly during the same period. The images were obtained before treatment and at 4, 8, 12, and 14 weeks after treatment

尤其在前 8 周时间内明显 ($P<0.05$)。在 L2/3 节段,实验组与对照组髓核灰度值在任何时间点均无统计学差异 ($P>0.05$);在 L4/5 节段,2 组间髓核灰度值在 12 周时开始有统计学差异 ($P<0.05$),在 2 周的恢复期后,2 组间仍然具有显著性差异 ($P<$

0.05);在 L6/7 节段,2 组间髓核灰度值在 8 周时即开始有显著性差异 ($P<0.05$),并持续至实验结束(表 4)。

2.3 Real-time PCR 检测结果

实验组与对照组 I 型胶原 mRNA 表达量分

表 4 实验组与对照组髓核相对灰度值比较 (x±s)

Table 4 Normalized grayscale values of the NP in the control and experimental groups

时间 Time	L2/3		L4/5		L6/7	
	实验组(EG)	对照组(CG)	实验组(EG)	对照组(CG)	实验组(EG)	对照组(CG)
0w	0.721±0.025	0.729±0.022	0.684±0.027	0.694±0.019	0.670±0.021	0.682±0.020
4w	0.732±0.020	0.713±0.024	0.624±0.021	0.651±0.028	0.597±0.023	0.636±0.015
8w	0.664±0.026	0.650±0.031	0.597±0.021	0.633±0.015	0.498±0.020 ^①	0.558±0.016
12w	0.622±0.028	0.637±0.027	0.516±0.023 ^①	0.587±0.020	0.465±0.015 ^①	0.522±0.017
14w	0.592±0.016	0.613±0.025	0.506±0.024 ^①	0.570±0.023	0.459±0.018 ^①	0.514±0.021

注:①与对照组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control group, $P<0.05$

别为 3.57 ± 0.23 和 1.00 ± 0.17 , 实验组 I 型胶原 mRNA 表达水平明显高于对照组 ($P<0.05$); 实验组与对照组 II 型胶原 mRNA 表达量分别为 0.35 ± 0.06 和 1.00 ± 0.14 , 实验组 II 型胶原 mRNA 表达水平明显低于对照组 ($P<0.05$); 实验组与对照组蛋白多糖 mRNA 表达量分别为 0.43 ± 0.11 和 1.00 ± 0.16 , 实验组蛋白多糖 mRNA 表达水平明显低于对照组 ($P<0.05$)。

2.4 组织学观察结果

在对照组中, HE 染色显示髓核组织与纤维环间边界清晰, 髓核内富含均匀分布的髓核细胞(图 6a); 天狼星红染色显示纤维环结构完整无损坏, 纤维环与髓核间界限清晰, 在髓核区域无明显胶原纤维长入(图 6b)。在实验组, HE 染色显示内层纤维环明显增生, 而髓核组织区域相应减小(图 6c); 天狼星红染色显示增厚的后纤维环发自软骨终板, 其中含有大量新生的胶原纤维(图 6d)。

3 讨论

本研究探索了通过无创性轴向加压的方式建立兔椎间盘早期退变体内动物模型的可行性。实验组动物总体死亡率为 16.7%, 与既往椎间盘造模动物死亡率相当^[6], 分析原因可能是人为将实验动物长时间限制于直立位对动物的健康造成了较大的影响, 因此, 最佳的造模条件尚需进一步摸索。本实验采用的慢性轴向应力加载方式模拟了人类腰椎累积性应力导致的间盘慢性退行性改变。研究表明, 这种慢性累积性应力导致的椎间盘退变与腰椎间盘突出及脊椎关节强硬间呈剂量依赖性相关^[7,8]。与以往常见的椎间盘退变动物模型相比, 本模型避免了手术对椎间盘造成人为的机

械创伤, 在造模机制方面更加合理。

为增加兔椎间盘内压力, 我们将实验组动物置于特制的筒内, 使其维持直立位; 进而通过颈部项圈负重, 进一步增加腰椎的轴向应力。预实验显示实验动物经过短时间的适应后可耐受这一实验处理, 但负重的重量不宜超过其体重的 1/4, 且每日加载时间不宜超过 6h, 否则实验动物容易出现易怒、食欲减退和腹泻等不良反应。

X 线检查中, 直立位下兔腰椎间隙较平卧位明显变窄, 且节段越低狭窄越明显, 说明直立位下实验组动物腰椎间盘内压力明显升高。造成这一结果的原因主要有: (1) 侧卧位拍片时实验动物为麻醉状态, 而直立位下实验动物为清醒状态, 此时肌肉的紧张状态可能导致椎间盘压力升高, 从而表现为椎间隙狭窄。(2) 研究表明, 人类腰椎间盘压力由外力和内力两部分组成, 外力主要为腰椎节段以上的体重形成的轴向压力, 而内力则由稳定脊柱于不同姿势的肌肉力量产生。在坐位状态下, 人类腰椎间盘需承受 2.5 倍于自身体重的应力, 其中多数应力由肌肉力量产生^[9]。本模型中实验动物原本为四足动物, 在筒内要维持相对直立的坐位可能需要更多的来自肌肉的内力来维持这一体位, 从而将大大增加椎间盘内压力。(3) 直立位下实验动物下腰椎形成明显的后凸, 从而可形成应力集中, 该区域椎间盘承受的应力也将显著升高, 从而也可解释下腰椎椎间隙狭窄程度远高于上腰椎。

在经典的纤维环穿刺退变模型中, 实验组 DHI 减少早在术后 2 周即可出现^[10]。然而, 在本研究 12 周的实验观察期中, 实验组与对照组 DHI 在任何时间点均无统计学差异。众所周知, 当椎间

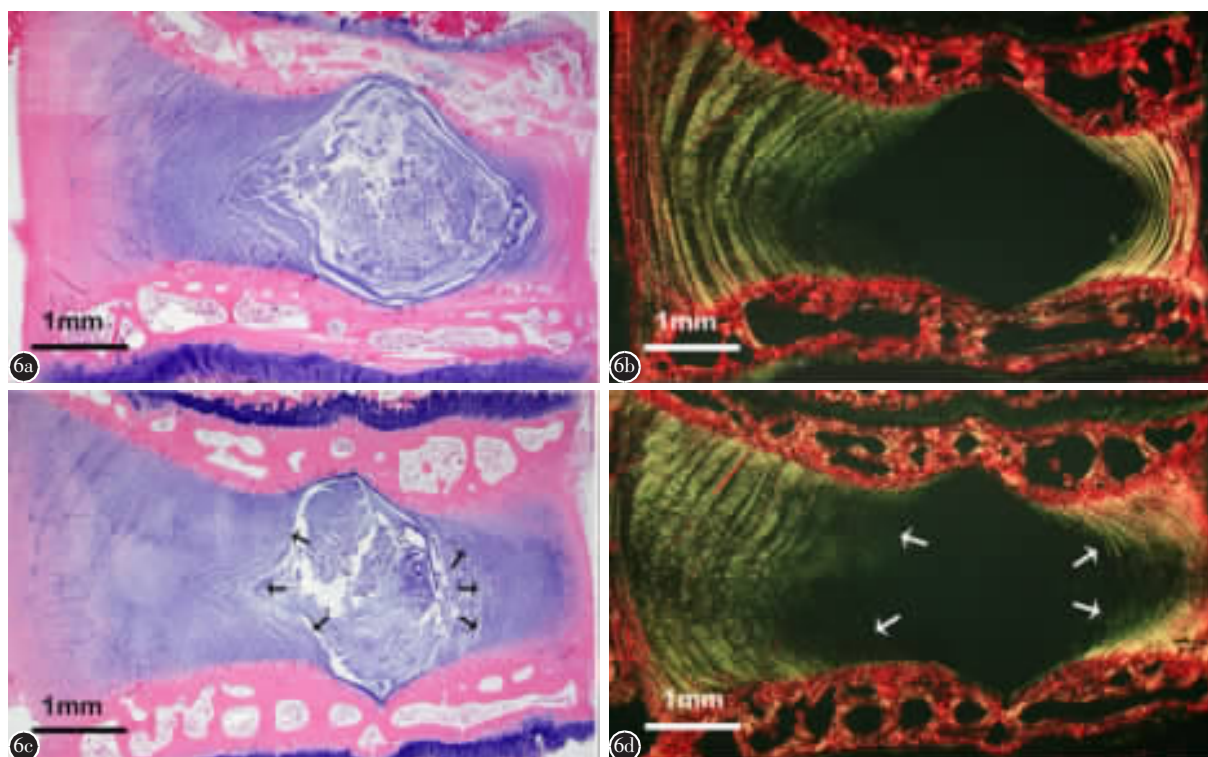


图 6 对照组与实验组 L6/7 椎间盘正中矢状面病理切片染色 a 对照组 HE 染色显示髓核与纤维环间界限清晰,髓核细胞均匀分布于细胞基质中 b 对照组天狼星红染色显示纤维环结构正常,纤维环与髓核间边界清晰 c 实验组 HE 染色显示纤维环内层纤维软骨样组织增生,髓核与纤维环间界限不清(箭头) d 实验组天狼星红染色显示新生的双折光性胶原纤维自软骨终板边缘长入髓核组织(箭头)

Figure 6 Histological sections of disc L6/7 in the midsagittal plane a The control group with H&E staining, exhibiting a clear demarcation between the NP and AF b The control group with picrosirius red staining, revealing a normal pattern of fibrocartilage lamellae and a well-defined border between the AF and NP c The experimental group with H&E staining, showing a large increase in fibrocartilage lamellae at the inner border of the posterior AF. Arrows indicate the distinction between the functional NP and AF d The experimental group with picrosirius red staining, showing newly formed birefringent collagen fibers infiltrating the NP from the margins of the cartilage endplates(arrows)

盘退变表现为明显的椎间隙狭窄时,表明该椎间盘发生了严重的退变。然而,对于当前研究所关注的椎间盘退变早期生物治疗来讲,这种严重的退变却不是理想的动物模型^[11]。相反,本研究建立的早期轻度退变模型可能为研究新的生物治疗方法提供更为理想的工具。在本研究中,实验组与对照组 DHI 均随时间发生了明显的下降,我们认为主要原因在于实验组和对照组动物均为 4 月龄未成年兔,其骨骼发育尚未成熟,椎间盘的生长速度远不及其相邻椎体的生长速度,因此,按照经典的 DHI 计算方法,DHI 随时间会发生显著的降低。然而 8 周以后,当实验动物骨骼发育成熟,DHI 下降幅度则明显减缓。

由于下腰椎运动节段的自身结构特点以及承

受更多的应力这一特性,人类椎间盘退变往往发生于下腰椎^[12]。从本研究 MRI 结果来看,实验组下腰椎退变程度远高于上腰椎。这一退变方式与人类椎间盘退变特点相一致。在实验干预 12 周后,实验组动物获得 2 周的休息时间以排除压力本身对椎间盘组织水合状态的影响。2 周后复查 MRI 显示实验组椎间盘的水合状态并未得到恢复,说明椎间盘内发生了不可逆性病理改变。

在不同的椎间盘退变动物模型研究中,其髓核组织基质构成基因的表达可能有较大差别。在 Anderson 等建立的兔纤维环穿刺模型中,I、II 型胶原蛋白表达上调 2~8 倍,而蛋白聚糖表达则较对照组下调约 6 倍^[13]。同样是纤维环穿刺,在 Sobajima 等建立的退变模型中,实验组 II 型胶原

和蛋白聚糖表达较对照组明显减少,而 I 型胶原基因表达则显著升高。本研究中实验组髓核基质构成基因表达的改变与既往诸多应力性椎间盘退变模型一致,表现为 I 型胶原表达显著升高,而 II 型胶原和蛋白多糖表达则显著降低^[14,15]。

既往对于人类年龄相关性退变研究发现,退变椎间盘中央富含水区(称为“功能性髓核”)的直径较年轻未退变椎间盘明显减少,而相应的“功能性纤维环”的宽度则明显增加;下腰椎退变程度远高于上腰椎,后纤维环受累程度远重于前纤维环^[12]。与该研究发现一致,本模型中椎间盘病理切片显示实验组后纤维环较对照组显著增厚,而髓核组织体积则相应减少,可能是髓核纤维化的早期表现。

需要指出,本研究尚存在一些局限性。未能准确测量出实验动物在筒内直立状态下的椎间盘内压力;4 月龄实验动物骨骼尚未发育成熟,与成人椎间盘退变过程可能存在一定的生理性差异;实验组和对照组在造模过程中的生活空间差异较大,若将对照组设为筒内横卧体位可能会更加合理。然而,作为探索性研究,本实验为建立无创性积累性应力导致的椎间盘退变提供了一种全新且可行的动物模型。

4 参考文献

1. Kandel R, Roberts S, Urban JP. Tissue engineering and the intervertebral disc: the challenges[J]. *Eur Spine J*, 2008, 17 (Suppl 4): 480-491.
2. Sakai D, Andersson GB. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(4): 243-256.
3. Sakai D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease[J]. *Eur Spine J*, 2008, 17(Suppl 4): 452-458.
4. Ruan D, He Q, Ding Y, et al. Intervertebral disc transplantation in the treatment of degenerative spine disease: a preliminary study[J]. *Lancet*, 2007, 369(9566): 993-999.
5. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
6. Sobajima S, Kompel JF, Kim JS, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(1): 15-24.
7. Seidler A, Bergmann A, Jager M, et al. Cumulative occupational lumbar load and lumbar disc disease: results of a German multi-center case-control study (EPILIFT)[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2009, 10: 48.
8. Seidler A, Bolm-Audorff U, Heiskel H, et al. The role of cumulative physical work load in lumbar spine disease: risk factors for lumbar osteochondrosis and spondylosis associated with chronic complaints[J]. *Occup Environ Med*, 2001, 58(11): 735-746.
9. Beckstein JC, Sen S, Schaer TP, et al. Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: axial compression mechanics and glycosaminoglycan content [J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2008, 33(6): E166-E173.
10. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2005, 30(1): 5-14.
11. Xi Y, Kong J, Liu Y, et al. Minimally invasive induction of an early lumbar disc degeneration model in rhesus monkeys [J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2013, 38(10): E579-E586.
12. Adams MA, McNally DS, Dolan P. Stress distributions inside intervertebral discs: the effects of age and degeneration[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1996, 78(6): 965-972.
13. Anderson DG, Izzo MW, Hall DJ, et al. Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs: analysis of a rabbit annular laceration model[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2002, 27(12): 1291-1296.
14. Liang QQ, Zhou Q, Zhang M, et al. Prolonged upright posture induces degenerative changes in intervertebral discs in rat lumbar spine[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2008, 33(19): 2052-2058.
15. Paul CP, Schoorl T, Zuiderbaan HA, et al. Dynamic and static overloading induce early degenerative processes in caprine lumbar intervertebral discs[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62411.

(收稿日期:2017-03-02 修回日期:2017-05-08)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)