

纤维环穿刺法与纤维环切开法建立兔椎间盘退变模型*

罗平, 刘玉林, 陈仲, 林荔军, 许勇, 黄小军, 周初松

Comparison of rabbit degenerative intervertebral disc models constructed by anulus puncture and annulus incision

Luo Ping, Liu Yu-li, Chen Zhong, Lin Li-jun, Xu Yong, Huang Xiao-jun, Zhou Chu-song

Abstract

BACKGROUND: Constructing animal model of intervertebral disc degeneration which more faithfully mimics the pathologic hallmarks of human intervertebral disc degeneration can be a beneficial assistance for further intervertebral disc degeneration therapy. However, there is not an accepted optimal model for intervertebral disc degeneration study.

OBJECTIVE: To compare the rabbit model of degenerative intervertebral disc constructed by anulus puncture and annulus incision.

METHODS: Totally 32 New Zealand white rabbits were randomly divided into the anulus puncture group and annulus incision group. Intervertebral disc of L₃₋₆ was exposed by extro-peritoneal approach, and the discs were injured by puncturing the anulus or cutting the anulus. The deep and direction were controlled. Pathological change of intervertebral disc was checked with MRI and histopathological examination at weeks 2, 4, 12, and 20 after operation.

RESULTS AND CONCLUSION: At week 4 after operation, the area of nucleus gelatinosus was deflated with enlarged annulus fibrosus, T₂-weighted image (T₂WI) declined, blurred, and the height of intervertebral space was also decreased, the grade of T₂ value in the anulus puncture group was lower than that of the annulus incision group ($P < 0.05$); with time prolonged, T₂ scores increased, and the intervertebral space narrowed, which reached a peak at week 20 after operation. The differences had no significance. The histological sections demonstrated that the cell content in nucleus pulposus was increased gradually. The rabbit model of intervertebral disc degeneration can be successfully constructed by the methods of anulus puncture and annulus incision. The degeneration of incision model is more severe than that of puncture model. Anulus puncture method can faithfully mimic intervertebral disc degeneration after damage in human being.

Department of Orthopaedics, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China

Luo Ping★, Studying for master's degree, Department of Orthopaedics, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China
Luoping_lc@yahoo.com.cn

Luo P, Liu YL, Chen Z, Lin LJ, Xu Y, Huang XJ, Zhou CS. Comparison of rabbit degenerative intervertebral disc models constructed by anulus puncture and annulus incision. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(11):1955-1958. [<http://www.crter.cn> <http://en.zgckf.com>]

Correspondence to: Zhou Chu-song, Chief physician, Associate professor, Department of Orthopaedics, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China
zcsmd@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-17
Accepted: 2009-11-24

摘要

背景: 椎间盘退行性变模型的建立, 是研究椎间盘退行性变病理过程和尝试基因治疗等的基础, 建立的动物模型要求与人类椎间盘退行性变具有相似性和可比性, 但目前尚缺乏公认的最佳实验动物模型。

目的: 比较纤维环穿刺法和纤维环切开法建立兔椎间盘退变动物模型的差异。

方法: 将 32 只新西兰大白兔以数字表法随机分为纤维环穿刺组和纤维环切开组。经腹膜外入路暴露 L_{3/4}、L_{4/5}、L_{5/6} 椎间隙, 纤维环穿刺组采取针刺纤维环, 纤维环切开组采取尖刀切开纤维环, 控制穿刺或切开的深度及方向。术后 2, 4, 12, 20 周通过 MRI 和组织病理学检查观察腰椎间盘髓核变性及其组织病理情况。

结果与结论: 术后 4 周, 兔椎间盘髓核面积缩小, 纤维环面积增大, 髓核内 T₂ 加权像信号降低、变暗, 椎间隙高度也开始下降, 纤维环穿刺组 T₂ 信号强度评分较纤维环切开组低 ($P < 0.05$); 随着时间的进展, 兔椎间盘 T₂ 信号强度评分逐步增高, 椎间隙逐渐变窄, 术后 20 周椎间盘 T₂ 信号强度评分达最高, 两组比较差异无显著性意义。随着时间的进展, 两组髓核内细胞含量逐渐减少, 纤维软骨形成。提示纤维环穿刺法和纤维环切开法均可成功建立椎间盘退变模型, 但纤维环切开法椎间盘的退变程度较纤维环穿刺法剧烈, 建立的模型过程可能不是人体椎间盘自然退变的模拟过程, 纤维环穿刺法比较真实地模拟了人类椎间盘损伤后的退变过程。

关键词: 纤维环穿刺法; 纤维环切开法; 椎间盘退变; 动物模型; 骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.11.014

罗平, 刘玉林, 陈仲, 林荔军, 许勇, 黄小军, 周初松. 纤维环穿刺法与纤维环切开法建立兔椎间盘退变模型 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(11):1955-1958. [<http://www.crter.org> <http://cn.zgckf.com>]

0 引言

腰椎间盘退变是引起下腰痛的主要原因, 建立一个经济、可靠、重复性好的动物模型有助于人们对椎间盘退变的诱因、病理生理变化及某些治疗方法的研究。为研究椎间盘退变发病机制提供有利条件, 同时为修复治疗退变

椎间盘的各种研究提供良好的实验载体^[1], 采用兔建立椎间盘退变动物模型相对于其他动物模型有许多优势, 较大型哺乳动物经济易得, 不涉及伦理问题; 而相对大鼠, 兔椎间盘组织体积量大, 方便进行操作和取材。本实验分别使用纤维环穿刺法和纤维环切开法建立兔椎间盘退变模型^[2-3], 对这两种方法的结果进行研究比较。

南方医科大学珠江医院骨科, 广东省广州市 510280

罗平★, 男, 1984年生, 湖南省长沙县人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 主要从事脊柱骨科学的研究。
Luoping_lc@yahoo.com.cn

通讯作者: 周初松, 主任医师, 副教授, 南方医科大学珠江医院骨科, 广东省广州市 510280
zcsmid@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)11-01955-04

收稿日期: 2009-10-17
修回日期: 2009-11-24 (20091017009/GW-Z)

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验, 病理组织学观察。

时间及地点: 于2009-03/09在南方医科大学珠江医院中心实验室完成。

材料: 健康成年新西兰白兔32只, 由南方医科大学实验动物中心提供, 动物许可证号SCXK粤2006-0015, 雄性, 3月龄, 体质量(2.5±0.5) kg, 标准条件下适应性饲养1周。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。Philips 3.0 T医用超导型磁共振扫描仪购自荷兰飞利浦公司。

实验方法: 术晨禁食、水。30%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉后, 所有兔子左侧卧位, 由第12肋末到髂棘作纵切口长10 cm, 腹外斜肌与背肌之间剪开, 腹膜外入路进入, 从根部剪除L_{3/4}、L_{4/5}、L_{5/6}横突, 到达椎体侧前方, 根据髂嵴定位(平腰6椎体), 暴露L_{3/4}、L_{4/5}、L_{5/6}椎间隙。

以数字表法将32只新西兰大白兔随机分为两组: 纤维环穿刺组和纤维环切开组。

纤维环穿刺: 以16号针头在椎间盘侧前方平行终板方向, 刺入椎间隙5 mm, 维持5 s, 拔出针头。

纤维环切开: 用弯钳夹持手术尖刀, 控制深度1.5 mm, 在椎间盘侧前方做斜行切口(刀片方向与上下终板成60°角, 深度1.4~1.6 mm)。分别于术中及术后2 d肌注青霉素80万U。术后置于笼中自由喂养。分别于术后2, 4, 12, 20周每组随机选取4只动物麻醉后腰椎MRI检查及髓核组织病理切片。

检测指标:

MRI检查: 所有动物均在30%戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉下、俯卧位进行MRI腰椎矢状位扫描, MRI采用Philips 3.0 T医用超导型磁共振扫描仪, 颈椎线圈通过椎间盘矢状正中切面, 采用自旋回波序列, TR: 3 000 ms, TE: 120 ms, 无间距扫描。采用兔椎间盘MRI评价标准进行退变程度的评分并分度^[4], 所有MRI影像资料由两位资深MRI医师盲法阅片并提出诊断意见: 每个椎间盘的退变评分为前、中、后三部分评分总和(各部分评分标准如表1), 总分的变化范围在0~9之间, 1~3分为轻度退变, 4~6分为中度退变, 7~9分为重度退变, 具体评分标准见表1。

表1 椎间盘退变程度的MRI轴位T2加权像评分标准
Table 1 Score standards of MRI T2 weighted images for intervertebral disc degeneration

Situation	Signal intensity	Color	Boundary	Points
No degeneration	Hight signal	Bright	Clear	0
Mild degeneration	Low signal+	Gray	Rather vague	1
Moderate degeneration	Low signal++	Dark gray	Vague	2
Sever degeneration	Low signal+++	Black	No clear boundary	3

病理组织学观察: 处死兔后, 迅速用尖刀切取髓核组织, 无菌生理盐水冲洗血迹后, 以体积分数10%甲醛溶液固定24 h, 石蜡包埋, 行常规切片苏木精-伊红染色, 观察髓核组织形态学变化及细胞数量的变化。

主要观察指标: 术后2, 4, 12, 20周进行两组兔手术部位椎间盘的MRI及病理学检查。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一作者, 实施为第一、二、五、六作者, 评估为第三、四、七作者, 采用盲法评估。

统计学分析: 实验数据应用SPSS 13.0统计学软件处理。MRI资料采用非参数检验中的Mann-Whitney U 检验。统计学处理由第一作者完成。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 32只大白兔全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 兔椎间盘MRI影像变化特征 造模后4周, 椎间盘髓核面积缩小, 纤维环面积增大, 髓核内(L_{3/4}~L_{5/6})MRI的T2加权像信号降低、变暗, 椎间隙高度也开始下降, 而纤维环穿刺组早期T2信号强度改变较为缓和, 见图1, 2。

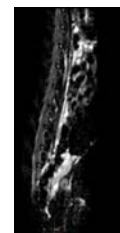


Figure 1 At 4 weeks after operation, both intervertebral height and disc bright degree were declined in anulus puncture group
图1 造模后4周, 纤维环穿刺组椎间隙降低, 亮度略下降

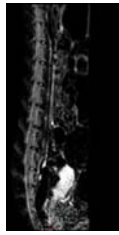
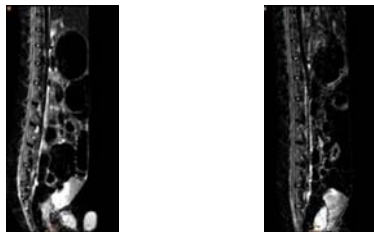


Figure 2 At 4 weeks after operation, compared with annulus puncture group, the declining of intervertebral height and disc bright degree were serious in annulus incision group
图2 造模后4周, 纤维环切开组椎间隙高度及亮度变化较纤维环穿刺组明显

术后4, 12, 20周髓核内MRI的T2加权像信号逐步降低趋势, 髓核面积逐渐缩小直至完全消失, 椎间隙高度也逐步下降; 20周时椎间盘信号变黑, 高度明显降低, 见图3, 椎间盘前缘某些不规则形状提示骨赘形成。



a: Annulus puncture group b: Annulus incision group

Figure 3 At 20 weeks after operation, intervertebral height was obviously declined, the disc blurred completely, there were no noticeable difference between the two groups
图3 术后20周, 椎间隙明显变窄, 椎间盘亮度变黑, 两组变化差异不明显

术后20周, 椎间隙明显变窄, 椎间盘亮度变黑, 两组变化差异不明显。

MRI评分2, 4, 12, 20周逐渐增加, 退变程度加重, 见表2。4周时两组差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 术后2, 12, 20周时两组间MRI评分比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

表2 椎间盘退变程度 MRI 评分
Table 2 Degree of intervertebral disc degeneration MRI grading

Degree	Annulus puncture group				Annulus incision group			
	2 wk	4 wk	12 wk	20 wk	2 wk	4 wk	12 wk	20 wk
Mild	12	3			12	1		
Moderate		9	7			11	3	
Severe			5	12			9	12

2.3 兔椎间盘组织病理学表现 大体可见正常的髓核组织(L_{2/3})呈透明胶质样, 镜下见细胞均匀分布, 形态正常, 见图4; 随着时间的推移, 髓核组织逐渐混浊, 髓核细胞数量不断减少, 少数可见有血管翳的生长。造模后4周髓核组织中有少量髓核细胞, 形态不规则, 分布不均匀, 纤维软骨组织增生, 排列紊乱, 且纤维环切

开组较纤维环穿刺组更为显著; 第20周时髓核中主要为纤维软骨组织, 伴有极少量髓核细胞, 见图5。

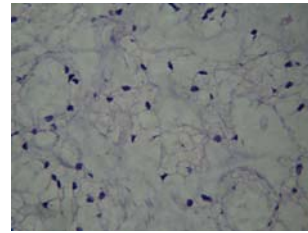


Figure 4 The pathological section in normal rabbit discs showed that there were plenty of cells with regular shapes and uniformity distribution (Haematoxylin-eosin staining, x40)
图4 正常兔椎间盘髓核病理切片可见大量髓核细胞, 形态良好, 分布均匀(苏木精-伊红染色, x40)

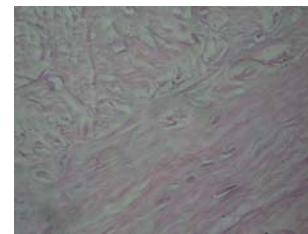


Figure 5 The pathological section of degenerative discs showed that the nucleus pulposus were substituted by fibrous tissue at 20 weeks after operation (Haematoxylin-eosin staining, x40)
图5 退行性兔椎间盘切片示, 造模后20周髓核基本为纤维组织所替代(苏木精-伊红染色, x40)

3 讨论

椎间盘退变的显著变化是椎间盘内蛋白多糖及水分的丢失和胶原蛋白构成的改变。蛋白多糖的丢失直接导致椎间盘髓核内水分的丢失, 椎间盘高度下降; I型胶原的增加及II型胶原的减少使椎间盘抗压缩和拉伸性能减弱, 导致椎间盘生物学性能发生改变。这些变化表现在MRI上, 可看到代表含水量的T2信号强度减弱并有椎间隙狭窄^[5]。

在椎间盘退变的研究中, 动物模型常用于研究椎间盘退变的发生机制和各种介入治疗手段的有效性, 建立的椎间盘退变的动物模型要求与人类的椎间盘退变具有相似性和可比拟性, 应包括以下几个方面: ①能再现椎间盘退行性变的客观规律。②模型重复性好。③所选动物解剖和生理特点尽可能与人类相似。动物椎间盘退变模型可分为自发性和诱导性两种。纤维环损伤法^[6-10]、软骨终板损伤法^[11-12]、髓核损伤法^[13-14]、间接椎间盘损伤法都属于诱导性方法建立椎间盘退变模型^[15-16]。目前研究中, 以鼠或兔制作的诱发性椎间盘退变模型应用最为广泛^[17]。纤维环损伤法包括纤维环穿刺法和纤维环切

开法。有学者首次采用纤维环损伤制作椎间盘退变动物模型, 此后这种方法被广泛的采用并不断改进。郭常安等^[18]运用特制的刀片损伤恒河猴的纤维环, 成功地建立了腰椎间盘退变动物模型。但恒河猴价格昂贵, 不易获取, 使其应用受到了一定的限制。近年来研究发现, 髓核的退变率与纤维环受损程度密切相关, 采用16G或21G的皮肤穿刺针穿刺大白兔纤维环可以诱导其髓核的缓慢退变^[2]; 通过纤维环切开也可成功建立兔椎间盘退变模型^[3]。

人类椎间盘退变早期改变主要表现为蛋白多糖、蛋白多糖聚集体数量的减少以及髓核的脱水^[19]。纤维环损伤后水分丢失诱发了一个复杂的病理过程的开始, 水分的丢失导致椎间盘内压力及微环境的改变, 并破坏了纤维环的血液循环, 髓核内营养代谢系统紊乱, 因而产生一系列病理生理反应, 最终引起退变^[20]。退变的程度及速度与损伤的程度及方式有关。本实验中纤维环穿刺组和纤维环切开组术后4周MRI检查, 椎间隙狭窄, T2信号强度降低, 髓核面积减小; 术后20周, 椎间隙明显狭窄, T2信号强度显著降低, 椎体边缘骨赘形成。表明采用纤维环穿刺法和髓核抽吸法均可建立椎间盘退变模型。纤维环穿刺导致纤维环及髓核的损伤, 穿刺深度控制在5 mm, 这种方法损伤纤维环但不会造成髓核组织的丢失, 椎间盘损伤后随着时间的进展而缓慢退变; 纤维环切开模型直接使纤维环破裂, 对纤维环破坏较大, 由于纤维环外层有起自脊椎动脉的小血管供应, 而内层纤维环、髓核通过软骨终板的渗透而获取营养, 故愈合能力差, 所以, 纤维环切开组引起的髓核水分及蛋白多糖术后的急剧丢失, 表现为MRI早期T2信号强度明显降低, 髓核面积缩小; 而纤维环穿刺组早期T2信号强度改变较为缓和。随着时间的进展, 退变程度逐渐加重; 术后20周时, 髓核T2信号强度、髓核面积两组无显著性差异。

综上所述, 纤维环穿刺法和纤维环切开法都能成功建立椎间盘退变模型。纤维环穿刺法损伤了纤维环并直接降低椎间盘内静水压, 引起髓核内蛋白多糖及胶原成分的改变, 导致椎间盘的载负能力下降, 从而发生退变, 比较真实地模拟了人类椎间盘损伤后退变的过程; 纤维环切开法直接使纤维环破裂, 蛋白髓核内蛋白多糖水分大量丢失, 建立椎间盘退变的效果显著, 但建立的模型过程可能不是人体椎间盘自然退变的模拟过程。因此, 在造模前应根据实验的需要选择不同的方法: 如果研究的是椎间盘退变的机制, 可采用纤维环穿刺法; 如果要

进行椎间盘退变的生物治疗研究则可采用产生显著退变的髓核抽吸法。

4 参考文献

- [1] Pearle AD.Directions for future research. J Bone Joint Surg Am.2009;91 Suppl 1: 159-160.
- [2] 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. Spine (Phila Pa 1976).2005;30(1): 5-14.
- [3] Lü HR,Liu SL,Ding Y,et al.Zhongguo Linchuang Jiepouxue Zazhi. 2005;23(6):643-647.
吕浩然,刘尚礼,丁悦,等.兔腰椎间盘退变模型的建立及影像学分析[J].中国临床解剖学杂志, 2005,23(6):643-647.
- [4] Kroeber M, Unglaub F, Guehring T,et al.Effects of controlled dynamic disc distraction on degenerated intervertebral discs: an in vivo study on the rabbit lumbar spine model. Spine (Phila Pa 1976).2005;30(2): 181-177.
- [5] Marinelli NL, Haughton VM, Muñoz A, et al. T2 relaxation times of intervertebral disc tissue correlated with water content and proteoglycan content. Spine (Phila Pa 1976).2009;34(5):520-524.
- [6] Xin L, Han GC, Zhao FD, et al. In vivo study of innervation of degenerative intervertebral discs in rabbit anular-injury model. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2009;38(5):485-492.
- [7] Han B, Zhu K, Li FC, et al. A simple disc degeneration model induced by percutaneous needle puncture in the rat tail. Spine (Phila Pa 1976).2008;33(18):1925-1934.
- [8] Yoon SH, Miyazaki M, Hong SW, et al.A porcine model of intervertebral disc degeneration induced by annular injury characterized with magnetic resonance imaging and histopathological findings. Laboratory investigation. J Neurosurg Spine.2008; 8(5):450-457.
- [9] Lin HK,Ye JJ.Jiepouxue Zazhi.2008;31(5):699-702.
林鸿宽,叶君健.纤维环损伤诱导兔椎间盘退变模型[J].解剖学杂志, 2008,31(5):699-702.
- [10] Hu P,Liu Y,Hu YG,et al.Qingdao Daxue Yixueyuan Xuebao.2007; 43(2):167-168.
胡鹏,刘勇,胡有谷,等.一种羊腰椎间盘退变模型的建立[J].青岛大学医学院学报, 2007,43(2):167-168.
- [11] Holm S, Holm AK, Ekström L, et al.Experimental disc degeneration due to endplate injury. J Spinal Disord Tech.2004; 17(1): 64-71.
- [12] Cinotti G, Della Rocca C, Romeo S, et al.Degenerative changes of porcine intervertebral disc induced by vertebral endplate injuries. Spine (Phila Pa 1976).2005;30(2):174-180.
- [13] Greg Anderson D, Li X, Tannoury T, et al.A fibronectin fragment stimulates intervertebral disc degeneration in vivo. Spine (Phila Pa 1976). 2003;28(20):2338-2345.
- [14] Wu J,Tang TS,Wang GL,et al.Suzhou Daxue Xuebao:Yixueban. 2007;27(4):552-554.
吴健,唐天骝,王根林,等.兔腰椎间盘退变模型的建立及影像学分析[J].苏州大学学报:医学版, 2007,27(4):552-554.
- [15] Nakamura T, Iribe T, Asou Y, et al.Effects of compressive loading on biomechanical properties of disc and peripheral tissue in a rat tail model. Eur Spine J.2009; 18(11): 1595-1603.
- [16] Xiong XQ,Shao ZW,Pei H,et al.Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2008;24(10):2077-2080.
熊晓芊,邵增务,裴洪,等.可控轴向压力致兔腰椎间盘退变模型的建立及评价[J].中国病理生理杂志, 2008,24(10):2077-2080.
- [17] Natarajan RN, Williams JR, Andersson GB. Modeling changes in intervertebral disc mechanics with degeneration. J Bone Joint Surg Am.2006; 88 Suppl 2:36-40.
- [18] Guo CA,Hu YG,Wu XY,et al.Zhonghua Waike Zazhi.2000;38(7): 548-551.
郭常安,胡有谷,吴新彦,等.腰椎间盘退变动物模型的建立[J].中华外科杂志, 2000,38(7):548-551.
- [19] Niosi CA,Oxland TR.Degenerative mechanics of the lumbar spine. Spine J.2004;4(6 Suppl): 202S-208S.
- [20] Urban JP,Roberts S.Degeneration of the intervertebral disc. Arthritis Res Ther.2003;5(3): 120-130.