

# 间断直立位下兔椎间盘退变模型的影像及病理表现\*★

张超, 李宁宁, 胡朝晖

## Pathology and imaging performance of a rabbit intervertebral disc degeneration model induced by the intermittent upright position

Zhang Chao, Li Ning-ning, Hu Zhao-hui

### Abstract

**BACKGROUND:** A great number of animal models were used to study intervertebral disc degeneration, but there is still lack of a consistent with human intervertebral disc degeneration in animal models.

**OBJECTIVE:** To investigate the feasibility of establishing a intervertebral disc degeneration model with upright position and a model construction with convenience and simple.

**METHODS:** Totally 42 New Zealand white rabbits were randomly divided into experimental group and control group. The rabbits were fixed in polyvinyl chloride (PVC) pipes. The PVC pipes were upright in the experimental group and the PVC pipes were flat in the control group.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 4 weeks after modeling, there was no significant difference of the disc height index (DHI), magnetic resonance imaging and annulus change between the experimental group and the control group ( $P > 0.05$ ). PAS staining of nucleus, the gray value was increased significantly ( $P < 0.05$ ). At 8, 12 weeks after modeling, there was significant difference of the DHI in the two groups, which has a significant decreased in degenerative disc T2-weighted signal. Hematoxylin-eosin staining of annulus was disordered arrangement. PAS staining of degenerative disc intervertebral nucleus showed that gray value was significantly larger ( $P < 0.05$ ). It is indicated that the method of upright position can successfully establishment of disc degeneration model by their own gravity load on the intervertebral disc.

Zhang C, Li NN, Hu ZH. Pathology and imaging performance of a rabbit intervertebral disc degeneration model induced by the intermittent upright position. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(4): 679-682.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 已有大量的动物模型用于研究椎间盘退变, 但是尚缺乏一种符合人类椎间盘退变规律的动物模型。

**目的:** 探讨直立位下构建椎间盘退变模型的可行性及造模的简便、易行性。

**方法:** 新西兰大白兔 42 只, 随机数字表法均分为实验组和对照组。将兔子固定在 PVC 管中, 实验组将 PVC 管直立, 对照组将 PVC 管平放。

**结果与结论:** 4 周时实验组和对照组间椎间盘高度指数、MRI 及纤维环改变差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 髓核 PAS 染色后灰度值明显增加 ( $P < 0.05$ )。8, 12 周实验组和对照组椎间盘高度指数相比差异有显著性意义, 退变椎间盘 T2 加权像信号明显降低, 苏木精-伊红染色显示纤维环排列紊乱, PAS 染色显示退变椎间盘髓核的灰度值明显变大 ( $P < 0.05$ )。说明通过强迫直立位下因自身身体重力负荷对椎间盘产生影响可以成功建立椎间盘退变模型。

**关键词:** 直立位; 椎间盘退变; 动物模型; 影像学表现; 病理表现

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.04.025

张超, 李宁宁, 胡朝晖. 间断直立位下兔椎间盘退变模型的影像及病理表现[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(4):679-682.  
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of Orthopaedic Spine Surgery, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Zhang Chao★, Studying for master's degree, Physician, Department of Orthopaedic Spine Surgery, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
zc-315@163.com

Correspondence to: Li Ning-ning, Chief physician, Department of Orthopaedic Spine Surgery, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
glnn@tom.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 2011 GXNSFA018281\*

Received: 2011-09-08  
Accepted: 2011-10-22

## 0 引言

有报道称75%~80%的人在其一生中会有腰背痛, 而椎间盘退变是引发背部疼痛主要的原因<sup>[1]</sup>。其中可以加速椎间盘退变的包括年龄、职业体力负荷、背部受伤及吸烟等诸多危险因素<sup>[2]</sup>。但是确切的病因、发病机制及病理生理学还不清楚。因此为了研究椎间盘退变而建立动物模型是有必要的<sup>[3]</sup>。本实验拟通过间断直立位下对新西兰大白兔椎间盘产生异常负荷导致兔椎间盘退变, 以证实直立位下建立椎间盘退变模型的可行性和有效性, 并且该实验模型是一种符合生理规律, 且简便易行的椎间盘退变模

型。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验, 影像及病理组织学表现。

**时间地点:** 实验于2011-03/10在桂林医学院实验中心进行。

**材料:** 健康普通级新西兰大白兔42只(影像学排除椎体先天性畸形和椎间盘病变), 雌雄不限, 6月龄, 体质量(2.5±0.5) kg, 购于广西医科大学实验动物中心, 实验过程中对动物处置符合科技部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

柳州市人民医院  
骨科脊柱外科, 广  
西壮族自治区柳  
州市 545006

张超★, 男, 1983  
年生, 汉族, 甘  
肃省张掖市人, 桂  
林医学院在读硕  
士, 医师, 主要  
从事脊柱骨科学  
方面的研究。  
ZC-315@  
163.com

通讯作者: 李宁  
宁, 主任医师, 柳  
州市人民医院骨  
科脊柱外科, 广  
西壮族自治区柳  
州市 545006  
gllnn@tom.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225  
(2012)04-00679-04

收稿日期: 2011-09-08  
修回日期: 2011-10-22  
(20110908007/D·G)

## 方法:

**动物分组及造模:** 将动物随机数字表法均分为实验组和对照组。选直径110 mm, 长70 cm的PVC管(购于广东佛山市日丰企业有限公司)。将实验动物固定在PVC管中。实验组将PVC管直立, 对照组将PVC管平放, 见图1, 每天连续在管中固定5 h。



Figure 1 Spinal morphology in polyvinyl chloride pipe with diameter of 110 mm under X-ray  
图1 兔子在直径110 mm的PVC管中的X射线下脊柱形态

**实验配对:** 两组兔造模后分别于4, 8, 12周各取7只分别对脊柱(以L<sub>4/5</sub>中心)行X射线、MRI拍片检查及苏木精-伊红染色、PAS染色对比观察椎间盘退变情况。

**X射线检查:** 将实验组和对照组分别在造模前及造模后按分组实验时间点(4, 8, 12周)用德国西门子公司X光机, 以L<sub>4/5</sub>为中心拍摄脊柱侧位片计算椎间盘高度指数(disc height index, DHI), 见图2。DHI = 实验前的椎间盘高度指数/试验后的椎间盘高度指数×100<sup>[4-5]</sup>。并观察动物模型的脊柱稳定性、骨赘、椎间隙等了解椎间盘退变情况。

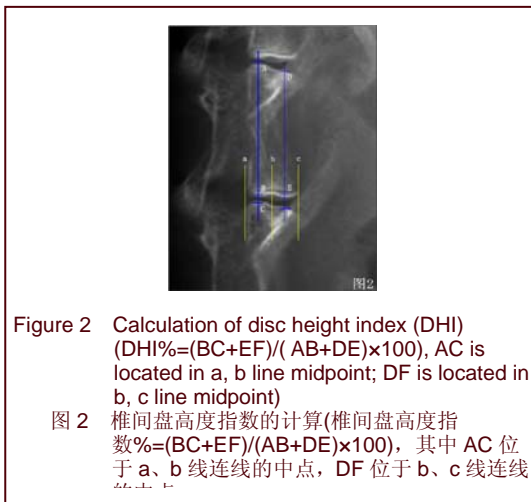


Figure 2 Calculation of disc height index (DHI) (DHI%=(BC+EF)/(AB+DE)×100), AC is located in a, b line midpoint; DF is located in b, c line midpoint)  
图2 椎间盘高度指数的计算(椎间盘高度指数%=(BC+EF)/(AB+DE)×100), 其中AC位于a、b线连线的中点, DF位于b、c线连线的中点。

**MRI检查:** 采用美国GE公司1.5T Signa HD型医用超导磁共振扫描仪, 选用膝关节线圈行T2矢状位扫描。扫描参数: TR 3 000 ms, TE 135 ms, 层厚3 mm, 层距1 mm。所有MRI影

像资料由2位放射科资深医师盲法阅片。根据改良Thompson分级法作为评估标准<sup>[6]</sup>, 共分4级: 1正常; 2信号轻度减弱伴有高信号区范围的缩小; 3信号中度减弱; 4信号重度减弱。随机抽取造模前5只兔的MRI片, 将其与造模后4, 8, 12周实验组及对照组MRI片(每组各7张)进行比较分析, 按改良后的Thompson分级法对每张片L<sub>4/5</sub>的T2WI进行分级并统计分析。

**组织学观察:** 造模完毕后, 处死实验动物后取实验动物L<sub>4/5</sub>椎间盘组织, 用体积分数4%的甲醛溶液固定24 h, 经脱钙、脱水处理后, 行矢状位取材石蜡包埋后切片(每组各7张)。常规苏木精-伊红染色后观察纤维环形态变化, 由病理科资深医师盲法阅片。按照Nerlich等<sup>[7]</sup>的分级方法将纤维环的退变程度分级。

### 纤维环退变分级:

分级	纤维环
1 (normal 正常)	纤维环由伸长的细胞组成呈鱼骨形层状、均称排列
2 (light 轻度)	纤维环局部细胞增殖、黏液样变性和细胞凋亡增加
3 (moderate 中等)	纤维环撕裂
4 (strong 严重)	纤维环形成瘢痕/囊肿

用高碘酸-希夫(PAS)染色观察髓核蛋白多糖(PG)的变化, 在PAS染色中, 细胞外基质中的髓核蛋白多糖呈紫红色<sup>[8]</sup>, 随机从每组7张组织切片中选取一张, 再在×100视野下随机对髓核选取5个不重复视野。应用Image-Pro Plus6.0软件(美国Media Cybernetics 公司, 柳州市人民医院病理科提供)对组织切片中髓核部分进行处理, 将灰度值阈值调为 0-255, 0为黑色, 255为白色。灰度值越高表明蛋白多糖的含量越低。灰度值间接反映了蛋白多糖的相对含量。计算其灰度值, 结果用均数±标准差表示。

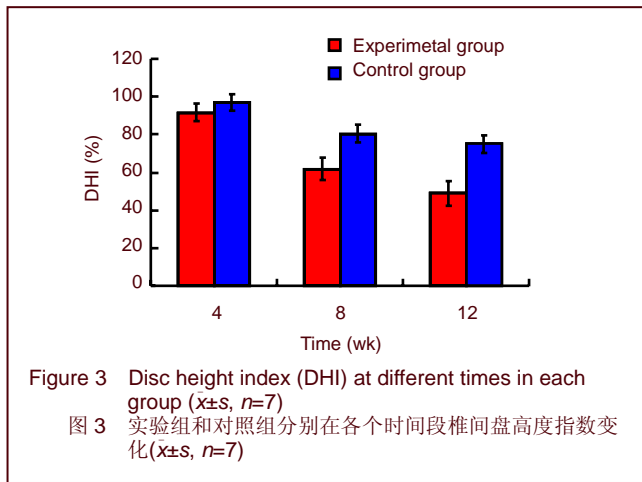
**主要观察指标:** 造模后观察椎间隙高度、MRI及病理组织学表现。

**统计学分析:** 实验数据由第一、三作者应用SPSS 15.0统计软件进行处理。组间计量资料比较采用方差分析(ANOVA), 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。MRI及苏木精-伊红染色组织切片数据资料采用非参数检验中的Mann-Whitney U检验, P < 0.05为差异有显著性意义。

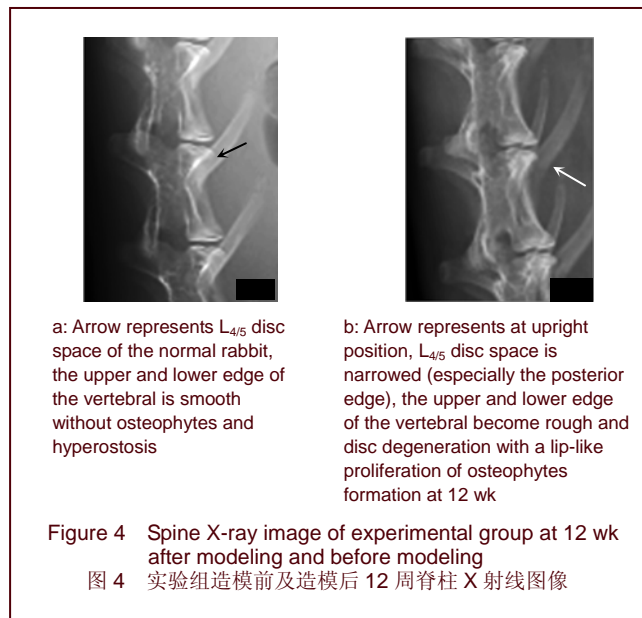
## 2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入42只兔子, 造模过程中无脱落, 均进入结果分析。

**2.2 X射线检查结果** 造模后4周开始实验组和对照组L<sub>4/5</sub>椎间隙逐渐变窄, 椎间盘高度逐渐变小。且在各实验时间点(4, 8, 12周)实验组较对照组的椎间盘高度指数均有变化, 但4周时两组间变化无显著性意义( $P > 0.05$ )。8, 12周时实验组和对照组间椎间盘高度指数比较, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。对照组8周和12周时椎间盘高度指数变化差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 而实验组随造模时间的延长椎间盘高度指数差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见图3。



对照组在8周以后椎间盘高度指数变化差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。退变椎体可见唇样增生等骨质增生的表现, 见图4a, b。

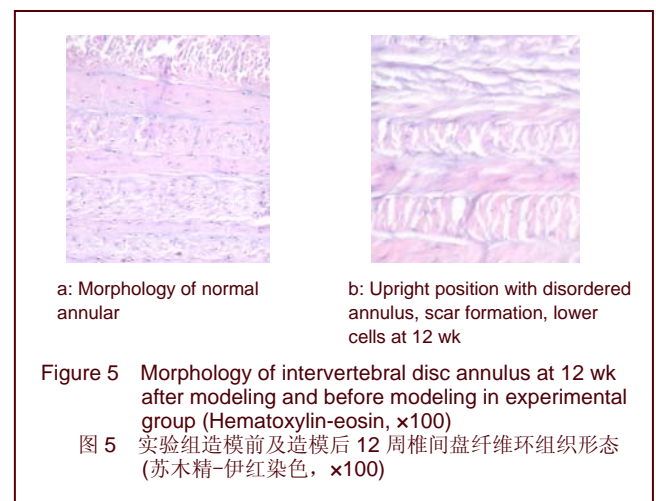


**2.3 MRI检查结果** MRI改良Thompson分级显示随着4, 8, 12周时间的逐渐的增加, 实验组和对照组退变程度加重, 见表1。4周时实验组和对照组间MRI分级差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。8, 12周时两组间椎间盘退变差异有显著性意义(8周时 $P < 0.05$ ; 12周时 $P < 0.01$ )。

表1 不同时间段椎间盘退变程度 Thompson 分级  
Table 1 Thompson scale of disc degeneration at different time

Scale	Experimental group			Control group		
	4 wk	8 wk	12 wk	4 wk	8 wk	12 wk
1	2	0	0	5	3	0
2	4	2	0	2	3	5
3	1	2	1	0	1	1
4	0	3	6	0	0	1

**2.4 苏木精-伊红染色结果** 通过组织切片观察发现实验组和对照组椎间盘组织均表现有退行性改变, 纤维环原有的正常结构变成无序的层状结构, 排列紊乱, 见图5。



病理组织观察分级随4, 8, 12周时间的逐渐增加, 见表2, 纤维环的退变程度不断加重。实验组和对照组在4周时两组间差异无明显性意义( $P > 0.05$ )。8周和12周时两组间的病理组织分级比较, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

表2 不同时间段椎间盘退变的病理组织学分级  
Table 2 Histopathological scale of disc degeneration at different times

Scale	Experimental group			Control group		
	4 wk	8 wk	12 wk	4 wk	8 wk	12 wk
1	3	0	0	6	4	0
2	3	1	0	1	1	4
3	1	3	0	0	1	2
4	0	3	7	0	0	1

**2.5 高碘酸-希夫染色结果** 通过组织切片观察发现实验组和对照组椎间盘组织均表现有退行性改变, 且随着造模时间的延长, 髓核细胞逐渐减少, 髓核细胞分布不均匀。染色呈紫红色的物质减少。经4, 8, 12周实验组和对照组相比较髓核的灰度值变化差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 且实验组、对照组内各造模时间段(4, 8, 12周)髓核的灰度值变化差异也有显著性意义( $P <$

0.05), 见图6。

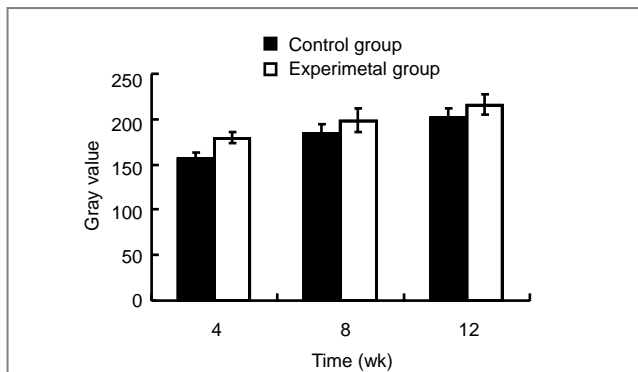


Figure 6 Gray value after PAS staining of the nucleus in each group (n=5)  
图6 各组髓核 PAS 染色后灰度值的变化(n=5)

### 3 讨论

相关实验表明, 高频率静态和动态的压力可以产生细胞凋亡、增加代谢基因的表达、增加酶活性、改变结构性质<sup>[9]</sup>。其中, 椎间盘退变作为脊柱超负荷的一种反应, 从而导致了组织性质的改变及结构的改变, 并且这也造成椎间盘大体和形态学上的改变。相关机械研究在组织水平和运动水平同样指出椎间盘破裂及其过程在退行性的一系列改变中只能发生在当过量负荷也参与其中时。然而在人类脊柱机械负荷和椎间盘退变之间的确切因果关系还不是很清楚。

大量的椎间盘退变的动物模型在文献中已有所报道。每种模型在研究椎间盘退变的病理生理学及发病机制中和测试新疗法中都有其优、缺点<sup>[10-11]</sup>。传统的损伤或者加载模型的椎间盘退变已经支配了此项研究近半个世纪<sup>[12]</sup>。此类动物模型拟通过单一的超负荷或者重复载荷导致结构的损害(比如加速椎间盘退变或者是髓核疝出)从而导致椎间盘退变。但是此类实验有术后感染的风险, 并且忽略的椎间盘退变的自身因素。

本实验考虑到较小的动物(比如大鼠和小鼠)较难得到清晰可靠的影像资料<sup>[13]</sup>, 而较大动物价格昂贵且不易获取, 所以实验选择新西兰大白兔作为实验动物。通过强迫实验动物直立位以达到因自身身体重力负荷造成椎间盘退变, 实验组和对照组在4周时X射线观察椎间盘高度指数、MRI分级及纤维环组织苏木精-伊红染色分级差异无显著性意义, 但是在4周时髓核PAS染色灰度值已开始发生变化。造模8, 12周后各组间在影像表现和组织学改变上均出现差异。且实验组较对照组的变化差异明显。这与文献中报道的人类椎间盘退变早期改变表现在蛋白多糖聚合体数量的减少以及髓核的脱水<sup>[14]</sup>, 且多种因素导致的椎间盘组织中改变首先影响终板, 其次是髓核, 最后是纤维环<sup>[15]</sup>, 结论相类似。

综上所述, 通过强迫直立位下因自身身体重力负荷对椎间盘产生影响可以成功建立椎间盘退变模型。此过程因应力的改变导致椎间盘内纤维环正常的层状结构变得紊乱、髓核中蛋白多糖的减少最终导致了椎间盘高度的降低, 体现了人类重要的致退变因素-重力的作用, 且在椎间盘退变的过程中, 组织学改变先于影像学改变。此动物模型是一个慢性的积累损伤过程, 与人类椎间盘长期缓慢积累性损伤很相似, 适宜进行动态观察和检测。

### 4 参考文献

- [1] Sudo H, Minami A. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis Rheum.* 2011;63(6):1648-1657.
- [2] Papadakis M, Sappas G, Papadopoulos EC, et al. Pathophysiology and biomechanics of the aging spine. *Open Orthop J.* 2011;5:335-342.
- [3] 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.
- [4] Sudo H, Minami A. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis Rheum.* 2011;63(6):1648-1657.
- [5] Papadakis M, Sappas G, Papadopoulos EC, et al. Pathophysiology and biomechanics of the aging spine. *Open Orthop J.* 2011;5:335-342.
- [6] 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.
- [7] 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. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005;30(1):5-14.
- [8] Unglaub F, Guehring T, Lorenz H, et al. Effects of unisegmental disc compression on adjacent segments: an in vivo animal model. *Eur Spine J.* 2005;14(10):949-955.  
董妙珠, 肖萍, 于于薇, 等. PAS、AB染色法在软骨蛋白多糖检测中的运用[J]. *上海预防医学*, 2004, 16(9):419-420.
- [9] Stokes IA, Iatridis JC. Mechanical conditions that accelerate intervertebral disc degeneration: overload versus immobilization. *Spine (Phila Pa 1976).* 2004;29(23):2724-2732.
- [10] An HS, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005;30(1):25-31; discussion 31-32.
- [11] Kong MH, Do DH, Miyazaki M, et al. Rabbit Model for in vivo Study of Intervertebral Disc Degeneration and Regeneration. *J Korean Neurosurg Soc.* 2008;44(5):327-333.
- [12] Hadler NM, Carey TS, Garrett J. The influence of indemnification by workers' compensation insurance on recovery from acute backache. *North Carolina Back Pain Project. Spine (Phila Pa 1976).* 1995;20(24):2710-2715.
- [13] 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. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005;30(1):5-14.
- [14] Nguyen AM, Johannessen W, Yoder JH, et al. Noninvasive quantification of human nucleus pulposus pressure with use of T1rho-weighted magnetic resonance imaging. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90(4):796-802.
- [15] Leung VY, Tam V, Chan D, et al. Tissue engineering for intervertebral disk degeneration. *Orthop Clin North Am.* 2011; 42(4):575-583.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 广西自然科学基金面上项目 (2011GXNSFA018281)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。