文章编号:1000-5404(2013)15-1579-04

论著

经皮微创纤维环穿刺法制作兔椎间盘退变模型

王 珏[1],张 雷[1],刘杨青[1],卓瑞立[2],孟 飞[1] (450052 郑州,郑州大学第一附属医院骨科[1];457001 河南 濮阳,濮阳市油田总医院骨科[2])

[摘要] **目的** 应用经皮微创穿刺方法制造兔腰椎间盘退变模型。**方法** 在C型臂X光机监控下,定位18只兔子的L3/4、L4/5、L5/6椎间盘,应用经皮穿刺方法穿刺纤维环,每组行MRI检查后予以处死,取L3/4、L4/5、L5/6椎间盘髓核组织行HE染色观察髓核细胞,用免疫组化染色法观察Ⅱ型胶原蛋白染色情况,取L2/3及L6/7正常间盘组织作为对照。**结果** 造模前后椎间盘髓核的MRI信号强度有随造模手术后的时间延长而逐渐降低的趋势(L3/4、L4/5及L5/6,$P<0.05$)。病理HE染色观察发现,对照组正常的髓核组织中有大量的髓核细胞,随着通过微创法制作兔腰椎间盘退变动物模型后时间的延长纤维环细胞、髓核细胞数量逐渐减少,到第12周时,髓核组织中只有很少量的髓核细胞,却有很多纤维软骨组织。对照组及术后4、8、12周组Ⅱ型胶原免疫组化染色的灰度值单因素方差分析结果 $F=41.82$,$P<0.05$,组间比较LSD-t检验结果显示除术后4周与8周组比较差异无统计学意义外,其余组间比较均有显著差异($P<0.05$)。**结论** 成功建立了新的微创兔腰椎间盘退变动物模型。

[关键词] 微创;椎间盘退变;动物模型;兔
[中图法分类号] R-332; R681.53 [文献标志码] A

Rabbit model of degenerative intervertebral disc made by percutaneous minimally invasive annulus needle puncture

Wang Jue[1], Zhang Lei[1], Liu Yangqing[1], Zhuo Ruili[2], Meng Fei[1] ([1]Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052; [2]Department of Orthopedics, The Oilfield General Hospital of Puyang City, Puyang, Henan Province, 457001, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a rabbit model of degenerative lumbar intervertebral disc by minimally invasive percutaneous annulus needle puncture. **Methods** Under the guidance of C-arm X-ray machine, 18 rabbits were operated on the L3/4, L4/5 and L5/6 intervertebral discs, and were randomly divided into group A (4 weeks), group B (8 weeks) and group C (12 weeks). Rabbits were sacrificed after MRI detection, and the L3/4, L4/5 and L5/6 intervertebral disc nucleus pulposus were isolated. HE staining was used to observe nucleus pulposus cells, and immunohistochemical staining was carried out to observe type Ⅱ collagen. The L2/3 and L6/7 normal intervertebral discs were used as controls. **Results** The lumbar MRI results after operation indicated a decreasing tendency of the signal intensity before and after puncture of nucleus pulposus (L3/4, L4/5 and L5/6) ($P<0.05$). HE staining showed the nucleus pulposus of the control group had a large number of nucleus pulposus cells, which declined at 4 and 8 weeks after modeling. There were mainly fibrocartilage tissues in the nucleus pulposus after 12 weeks, accompanied by very few amount of marrow nucleated cells. The gray values of type Ⅱ collagen were analyzed in the control group and the operation groups after 4, 8 and 12 weeks by one-way ANOVA, and the result was $F=41.82$ ($P<0.05$). The results of comparison among groups by LSD t-test showed significant differences among all the groups except for that between group A and group B ($P<0.05$). **Conclusion** The rabbit model of minimally invasive lumbar intervertebral disc degeneration is successfully established.

[**Key words**] minimally invasive; intervertebral disc degeneration; animal model; rabbit

Corresponding author: Wang Jue, E-mail: 13526842169@126.com

腰腿痛是影响人类健康的很常见的疾病,而椎间盘退行性改变(intervertebral disc degeneration, IVDD)是引起腰腿痛的一个很重要的原因[1],其发生的病理生理学机制至今尚未明了。IVDD包含复杂的生物力学、形态学、生物化学和生物学行为等方面的改变。随着分子生物学、组织工程学的发展,实验研究中对IVDD的治疗有了新的手段,包括基因疗法、生长因子

[通信作者] 王 珏,E-mail: 13526842169@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1518.008.html(2013-06-19)

疗法、细胞疗法以及组织工程等，但应用到临床，还需要对IVDD的病理生理学发病机制进行更深入地研究。制作一种可靠的IVDD动物模型对研究IVDD的发病机制很有意义。纤维环损伤模型自1948年Key等[2]成功应用于狗后，被广泛采用和改进。文献[3-5]报道用家兔作为IVDD模型动物，但需要外科切口手术，肉眼直视下制作损伤IVDD模型。2009年王鹏等[6]进行了微创制作兔腰椎间盘退变模型的解剖学分析，认为解剖上可以达到经皮穿刺兔腰椎间盘纤维环而不损伤重要血管、神经及内脏，但却未真正建立此模型。本研究首先仔细分析了家兔腰椎的解剖结构，然后在C形臂透视引导及体表定位下微创经皮穿刺兔腰椎间盘的外侧纤维环，建立一个小创伤的兔腰椎间盘退变模型，并通过MRI及病理组织学分析，证实其可行性。

1 资料与方法

1.1 制作模型动物

大耳白兔18只，购自郑州市河南康达试验动物有限公司[许可证号：SCXK(豫)2011-0001，由河南省动物实验中心喂养，饲料许可证号：SCXK(豫)2010-0002]，4月龄，体质量2.3～3.0 kg，雌雄不拘，每笼1只标准兔饲料喂养。经逐一检测，无急慢性传染病及免疫性疾病，肢体活动良好，通过C型臂X线机及MRI检查无脊柱畸形及椎间盘病变。

1.2 主要试剂及仪器

兔Ⅱ型胶原多克隆抗体、SP9001试剂盒、DAB试剂盒(北京中杉生物工程公司)，显微镜(日本OLYMPUS)，磁共振扫描设备(德国西门子Trio Tim 3.0T)，移动式C型臂X射线机(德国Ziehm 8000)。

1.3 微创穿刺兔腰椎纤维环的解剖学试验

解剖6月龄家兔10只，体质量2.5～3.0 kg，雌雄不拘，每笼1只标准兔饲料喂养，无急慢性传染病及免疫性疾病，肢体活动良好，无脊柱畸形及椎间盘疾病。取下其除颈椎以外的脊柱全长，观察脊柱旁组织结构，解剖胸、腰椎组织，使胸、腰椎完全暴露，重点记录并分析腰椎及椎旁的解剖特点，切开椎间盘，观察椎间盘成肾形，并记录椎间盘及髓核大小、纤维环厚度[6]。兔腰椎共有7块，从腰椎大体上观察，椎间盘位于其下位椎体棘突及关节突平面。解剖发现，从棘突外侧一个半横指处进针，取于棘突呈15°～25°的角度向内下穿刺至椎间盘中心部，完全可以避开硬脊膜、神经根，距腹腔脏器较远，腹膜及腹腔内重要组织几乎无损伤的可能(图1、2)。

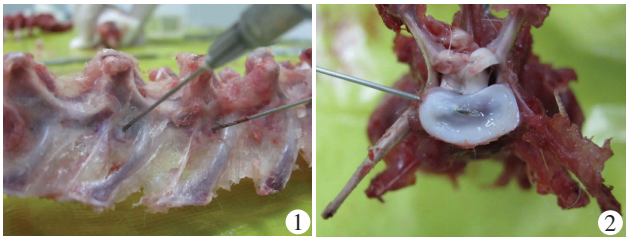
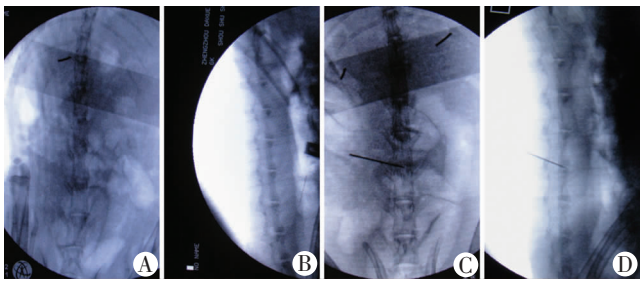


图1 家兔椎间盘穿刺进针点及方向

图2 家兔椎间盘穿刺剖面观

1.4 兔椎间盘退变动物模型的建立

取18只大耳白兔，术前6 h停止喂饲料，4 h停止喂水。10%水合氯醛3 mL/kg注射入耳缘静脉进行麻醉，确认动物处于麻醉状态后，取其俯卧位，术野备皮，消毒、铺巾。取18G穿刺针，准确定位L5/6椎间盘，向右旁开一个半横指，破皮，向腹侧与棘突呈15°～25°夹角，在C型臂X线机引导下调整角度缓慢进针。当遇到较大阻力时，即到达脊柱骨质，根据C臂影像调整针尖至椎间隙位置。继续穿刺，针尖刺入纤维环，感纤维环质地稍韧有穿骨松质样感，穿透纤维环后有落空感，表明已进入髓核，停止穿刺，C臂影像上见针尖位于椎间盘中心位置(图3)，停留5 s后，拔出穿刺针。据此对每只兔子的L3/4、L4/5、L5/6椎间盘进行穿刺，术后采用抽签法将动物分为3个模型组，每组6只，分别于术后4、8、12周进行后续实验，并将每组的L2/3、L6/7椎间盘作为对照。术后常规应用头孢唑林钠0.5 g，2次/d，3 d，预防感染，将每只动物单笼饲养。



A：兔腰椎C臂下正位片；B：兔腰椎C臂下侧位片；C：穿刺兔L4/5椎间盘时的正位片；D：穿刺兔L4/5椎间盘时的侧位片

图3 大白兔腰椎C臂下图像

1.4.1 造模动物常规情况 观察造模动物的精神状况、肢体活动度、饮食等一般情况。

1.4.2 MRI检查 分别于术后4、8、12周对3组进行MRI检查，应用磁共振扫描设备对兔腰椎行矢状位T_1加权像(T_1WI)、T_2加权像(T_2WI)及T_2脂肪抑制像扫描。MRI影像学资料由放射科医师进行盲法评估，以Pfirrmann分级法[4]作为评估标准，共分5级(表1)。

表1 Pfirrmann椎间盘退变分级标准

分级	髓核结构	髓核纤维环界限	髓核信号强度	椎间盘高度
Ⅰ	均一，亮白	清楚	高	正常
Ⅱ	不均，可有水平带	清楚	高	正常
Ⅲ	不均，灰	不清	中	轻度降低
Ⅳ	不均，灰到黑	丢失	中到低	中度降低
Ⅴ	不均，黑	丢失	低	重度降低

1.4.3 病理学检查 3组大白兔分别行MRI检查后处死，取L3/4、L4/5、L5/6椎间盘髓核组织行HE染色观察髓核细胞与Ⅱ型胶原蛋白染色情况，同时取L2/3及L6/7正常椎间盘组织作为对照。

1.5 统计学分析

数据用$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 17.0统计软件，磁共振信号行χ^2检验，Ⅱ型胶原染色值行方差分析。

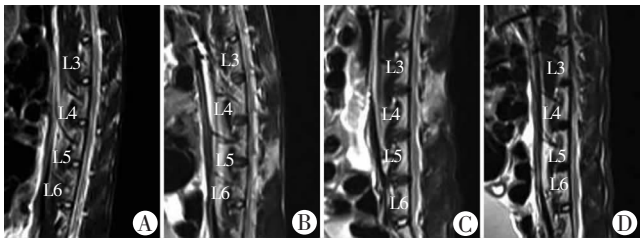
2 结果

2.1 造模动物的常规情况

无 1 例造模动物因感染等因素死亡。麻醉建模操作后，第 1 天精神状态稍差，四肢活动度尚可，食欲差。第 2 天起 3 组动物均食欲好，四肢活动度好，光泽、精神等与实验前无明显变化。

2.2 MRI 检查

术后 4、8、12 周及术前的兔腰椎 MRI 检查见图 4。造模前后椎间盘髓核的信号强度有随造模手术后的时间延长而逐渐降低的趋势（L3/4、L4/5 及 L5/6）。根据软件分析椎间盘髓核中心信号强度值，由磁共振室 2 名教授盲法采用 Pfirrmann 分级法将结果分级（表 2），采用双向有序多分类资料的 χ^2 检验，$\chi^2 = 2.11 \times 10^4$，$P < 0.05$。说明造模动物的椎间盘开始退变，并且随时间的延长，椎间盘的退变有加重趋势。



A：造模手术前的正常大白兔腰椎图像；B、C、D：分别为造模术后 4、8、12 周的图像；L3、L4、L5、L6 为定位的椎间盘

图 4 兔 MRI 检查矢状位 T_2WI 图像

表 2 椎间盘退变 Pfirrmann 分级结果（椎间盘数量）

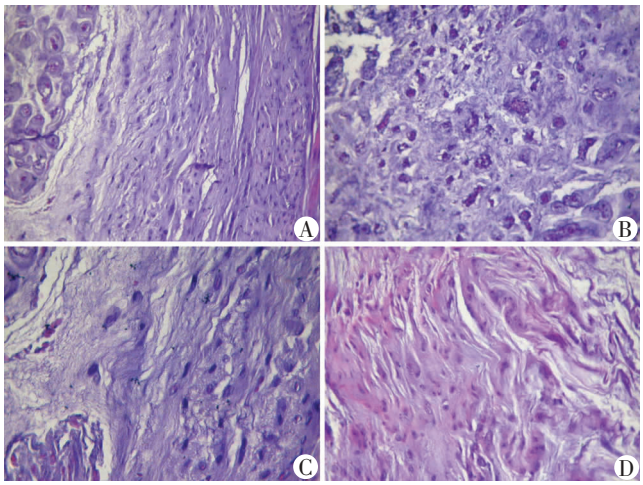
分级	造模前	4 周	8 周	12 周
Ⅰ	54	5	0	0
Ⅱ	0	36	4	0
Ⅲ	0	13	17	1
Ⅳ	0	0	14	7
Ⅴ	0	0	1	10

2.3 HE 染色观察

正常的椎间盘组织（L2/3、L6/7）肉眼观呈略带蓝色透明胶冻状，纤维环包容着髓核组织，造模后随时间的延长，可见间盘组织颜色逐渐变暗、混浊，体积逐渐固缩，纤维环组织和髓核组织分界不清，髓核含水量明显减少。HE 染色观察（图 5）发现，对照组纤维环及髓核结构分界清楚，髓核组织中含有大量髓核细胞，而在造模后随着时间的延长，纤维环及髓核结构分界逐渐不清，纤维环细胞结构逐渐消失，髓核细胞逐渐减少，出现纤维化及软骨样改变。

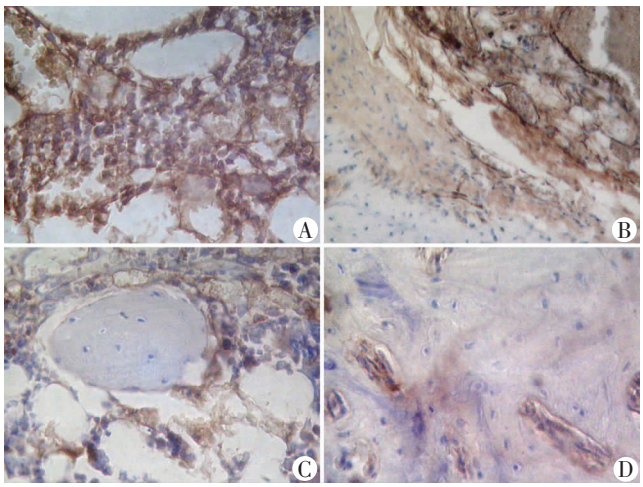
2.4 Ⅱ型胶原蛋白在经皮微创兔椎间盘退变模型中表达

正常组椎间盘组织间质中Ⅱ型胶原蛋白染色呈深棕色，分布较密，较均匀。而各造模组染色呈浅棕色，分布稀疏，不均匀（图 6）。正常组及造模后 4、8、12 周组椎间盘组织间质中Ⅱ型胶原蛋白染色度值分别为[（142.04 ± 1.33）、（146.41 ± 2.10）、（147.27 ± 2.082）和（150.23 ± 2.34），$F = 40.82$，$P < 0.05$]。造模术后组间两两比较（除 4 周与 8 周组间）均有统计学差异（$P < 0.05$）。说明用微创穿刺兔腰椎纤维环方法造模后随时间的延长，Ⅱ型胶原蛋白在兔退变腰椎间盘间质中的免疫组化表达降低。



A：正常椎间盘组　正常的纤维环及髓核结构；B：造模术后 4 周　髓核细胞减少，变性；C：造模术后 8 周　髓核细胞进一步减少，出现纤维化；D：造模术后 12 周　髓核细胞几近消失，出现纤维化及软骨样改变

图 5 正常椎间盘与椎间盘退变造模术后各组大白兔椎间盘细胞 HE 染色观察　（×100）



A：正常椎间盘组；B：造模术后 4 周；C：造模术后 8 周；D：造模术后 12 周

图 6 正常椎间盘与椎间盘退变造模术后各组大白兔椎间盘Ⅱ型胶原免疫组织化学染色观察　（S-P ×100）

3 讨论

腰椎间盘退变的发病机制是一个复杂的过程，是在包括自然因素、环境因素等多种因素共同作用下逐渐形成的，自然因素包括衰老、遗传易感性等，环境因素包括营养供应障碍、机械负荷等[7]。椎间盘退变的确切机制目前尚无定论，其包括生物力学机制、细胞凋亡失衡、基质酶活性改变、椎间盘营养供应减少、相关细胞因子以及自身免疫反应等。对于 IVDD 的程度的评价多从影像学及病理学上进行。磁共振（MRI）是一

种对椎间盘退变非常灵敏的设备,能够提供清晰的椎间盘图像,椎间盘内部的蛋白多糖及水分的含量可反应在T_2WI中椎间盘的信号上[8]。在椎间盘退变形态学出现变化前,其退变信号就可以在磁共振的T_2WI上表现出来[9]。MRI可通过T_2WI的信号减低、测量T_2WI信号强度及MRI指数来评价椎间盘退变的程度[10-12]。病理学HE染色能够清晰完整显示椎间盘各层的组织学形态结构,椎间盘完整的标志是纤维环层状结构的存在及髓核细胞周围的阿辛蓝染色阳性[13]。在退变早期,层状的纤维环结构逐渐消失,代之以混乱的层状结构,髓核组织体积减少,细胞成分减少,纤维组织逐渐取代了含水量高的髓核组织,其内的脊索细胞及软骨样细胞数量减小,软骨内形成骨赘,纤维环和髓核界限不清[14]。在椎间盘退变晚期,细胞间基质成分变性,细胞几近消失,出现纤维化及软骨样改变,软骨内形成大量骨赘[8]。免疫组织化学方法是诊断并评价椎间盘退变程度的可靠方法。Ⅱ型胶原蛋白是髓核组织内的主要成分,在椎间盘退变的过程中,髓核组织内的Ⅱ型胶原蛋白含量逐渐减少。因此,对椎间盘组织进行Ⅱ型胶原蛋白的免疫组织化学分析,根据其含量可以评价椎间盘退变的程度。

简单、易行、安全、微创地制造椎间盘退变模型有助于我们对椎间盘退变的病因及治疗进行深一步地研究,并可对很多新治疗方法的有效性进行检验。文献[15]报道,对于兔腰椎间盘退变模型,通过常规手术暴露腰椎间盘穿刺纤维环导致其退变是目前应用的方法,然而都是在切口手术下完成,造模过程中极易损伤腹膜、腹腔脏器及椎旁血管,暴露范围较大,创伤过大,手术时间延长,增加了感染的机会,术后动物致残率、死亡率高,造成浪费和影响实验结果的准确性;手术过程中对腰椎周围组织的破坏及术后瘢痕形成都对试验结果造成影响,违背了自然退变过程的模仿。2009年王鹏等[6]对经皮穿刺制作兔腰椎间盘退变模型进行了解剖学上的分析,证实不切口情况下,可完成经皮直接穿刺至椎间盘,造成损伤,且不损伤腹膜、脊髓及神经根。但其并未应用此法成功制作出兔腰椎间盘退变模型,且其选择的通路与具体操作与本实验有很大的不同,他们选择的通路贴近腹膜,到达椎体前方,在仅靠手感的操作下易损伤腹膜及椎体前方血管或脏器。

本实验改进了以往在传统手术下制作兔腰椎间盘退变模型的方法,使用经皮微创穿刺纤维环法制作兔腰椎间盘退变模型,在大量解剖家兔腰椎及研究椎旁组织结构的基础上,经过反复实践,找到了上述穿刺通道,建立了更合理的方法。本方法穿刺通路远离腹膜、腹腔脏器、重要血管、神经,且在C臂X线机引导下进行,操作准确,一步到位,误伤概率小,有简单、微创、感染率及致残率低、重复性好等优点。本研究中建立的腰椎间盘退变动物模型,为腰椎间盘退变机制与治疗的进一步研究提供了更好的试验对象。

参考文献:

[1] 舒剑臣, 唐小穗, 赵京元. 腰椎间盘退变引起腰腿痛的相关化学因素研究进展[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6(6): 1534-1537.

[2] Key J A, Ford L T. Experimental intervertebral-disc lesions[J]. J Bone Joint Surg Am, 1948, 30A(3): 621-630.

[3] 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.

[4] 罗平, 刘玉林, 陈仲, 等. 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.

[5] 杨效宁, 孙天威, 王启明, 等. 纤维环穿刺法诱导兔椎间盘退变模型的组织学和影像学分析[J]. 徐州医学院学报, 2010, 30(5): 314-317.

[6] 王鹏, 徐海孺, 骆国钢, 等. 经皮穿刺纤维环法诱导兔腰椎间盘退变模型[J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(11): 668-670.

[7] Hadjipavlou A G, Tzermiadianos M N, Bogduk N, *et al*. The pathophysiology of disc degeneration: a critical review[J]. J Bone Joint Surg Br, 2008, 90(10): 1261-1270.

[8] Sobajima S, Kompel J F, Kim J S, *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.

[9] Niinimaki J, Ruohonen J, Silfverhuth M, *et al*. Quantitative magnetic resonance imaging of experimentally injured porcine intervertebral disc[J]. Acta Radiol, 2007, 48(6): 643-649.

[10] Benneker L M, Heini P F, Anderson S E, *et al*. Correlation of radiographic and MRI parameters to morphological and biochemical assessment of intervertebral disc degeneration[J]. Eur Spine J, 2005, 14(1): 27-35.

[11] Hoogendoorn R J, Wuisman P I, Smit T H, *et al*. Experimental intervertebral disc degeneration induced by chondroitinase ABC in the goat[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(17): 1816-1825.

[12] Sowa G, Vadala G, Studer R, *et al*. Characterization of intervertebral disc aging: longitudinal analysis of a rabbit model by magnetic resonance imaging, histology, and gene expression[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33(17): 1821-1828.

[13] Gruber H E, Ingram J, Hanley E N Jr. An improved staining method for intervertebral disc tissue[J]. Biotech Histochem, 2002, 77(2): 81-83.

[14] 徐宝山, 杨强, 夏群. 腰椎间盘退变的分子病理学变化及发病机制[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(2): 335-338.

[15] 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.

(**收稿**:2013-01-14;**修回**:2013-02-28)

(编辑 龙 亮)