

基于析因设计探讨腰椎活动范围增大对大鼠黄韧带肥厚的影响

王宝剑¹ 张平² 高春雨³ 张静茹² 朱宏伟² 李秋月² 马玉峰^{1△} 高景华^{3△}

[摘要] 目的:基于析因设计评价三种腰椎活动范围增大的造模方法,建立一种新的大鼠黄韧带肥厚模型,同时探讨腰椎活动范围的增大所诱发黄韧带肥厚的机制。方法:将 72 只大鼠随机分为假手术组、肌肉切除组、骨关节切除组和肌肉+骨关节切除组,分别对其 L_{5/6} 节段进行造模。于造模后的第 4,8,12 周共 3 个时间点取材。通过 X 线片观察屈曲和背伸位时 L_{5/6} 节段的活动范围和椎间隙高度,通过苏木精-伊红(HE)染色观察 L_{5/6} 节段黄韧带总体和背侧层的厚度,通过免疫组化法和实时聚合酶链式反应法(Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)检测黄韧带中白细胞介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、转化生长因子 β 1(Transforming Growth Factor- β 1, TGF- β 1)、I 型胶原(Type I Collagen, Col1)和 III 型胶原(Type III Collagen, Col3)等因子的表达。结果:肌肉+骨关节切除法可以最大程度增大 L_{5/6} 节段的屈曲活动范围和黄韧带的厚度,并导致黄韧带中 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1、P-Smad2/3(或 Smad2 和 Smad3)、Col1 和 Col3 的蛋白及 mRNA 呈高表达,其次为骨关节切除法,最后为肌肉切除法。结论:同时切除棘突、棘间韧带、椎旁肌等结构可以最大程度引起大鼠腰椎屈曲范围的增大和黄韧带的增厚,其机制可能是机械应力导致黄韧带中炎性因子 TNF- α 和 IL-1 β 的高表达,并诱导 TGF- β 1/Smads 通路致使细胞外基质沉积,进而发生了黄韧带肥厚。

[关键词] 黄韧带肥厚;大鼠模型;析因设计

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)06-0015-09

DOI: 10. 20085/j. cnki. issn1005-0205. 230603

The Influence of Increased Range of Motion of Lumbar on Rat Model of Ligamentum Flavum Hypertrophy with Factorial Design

WANG Baojian¹ ZHANG Ping² GAO Chunyu³ ZHANG Jingru²
ZHU Hongwei² LI Qiuyue² MA Yufeng^{1△} GAO Jinghua^{3△}

¹ Orthopedics Department, The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

² Pathology Department, Wangjing Hospital of Chinese Academy of Chinese Medicine Science, Beijing 100029, China;

³ Spine Department 2, Wangjing Hospital of Chinese Academy of Chinese Medicine Science, Beijing 100029, China.

Abstract Objective: To establish a new rat model of ligamentum flavum hypertrophy (LFH) by evaluating three modeling methods of increasing lumbar range of motion, and to explore the mechanism of LFH induced by increasing lumbar range of motion. **Methods:** The 72 rats were randomly divided into sham group (group A), muscle resection group (group B), bone resection group (group C), and the mixture group of B and C (group D), and the L_{5/6} segments were modeled respectively. The specimens were collected at three time points: 4th week, 8th week, and 12th week after modeling. The motion range of the lumbar and the height of the intervertebral space were observed by X-ray examination. The thickness of LF

and its dorsal layer were observed by HE staining. The expression of IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1/Smads pathway, and Col1 and Col3 were detected by immunohistochemistry and real-time-PCR. **Results:** The model of muscle and bone resection can maximize the flexion range of the L_{5/6} segment and the thickness of LF, and lead to the high expression of mRNA and protein of IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, P-Smad2/3 (or Smad2 and Smad3), Col1 and Col3 in ligamentum flavum

基金项目:北京中医药大学 2022 年度基本科研业务费项目
(2022-JYB-XJSJJ095)

¹ 北京中医药大学第三附属医院骨科(北京, 100102)

² 中国中医科学院望京医院病理科

³ 中国中医科学院望京医院脊柱二科

[△]通信作者 E-mail: 1226671495@qq. com(高景华)
c806@bucm. edu. cn(马玉峰)

followed by the model of bone resection, and finally the model of muscle resection. **Conclusion:** The simultaneous resection of the spinous process, interspinous ligament, and paravertebral muscle can increase the range of lumbar flexion and thicken the LF in rats. The mechanism may be that mechanical stress leads to inflammatory factors $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ which induced $TGF-\beta 1/Smads$ pathway, leading to the deposition of extracellular matrix and LFH.

Keywords: ligamentum flavum hypertrophy; rat model; factorial design

黄韧带肥厚 (Ligamentum Flavum Hypertrophy, LFH) 是退行性腰椎管狭窄症 (Degenerative Lumbar Spinal Stenosis, DLSS) 的主要病理表现之一^[1]。既往研究表明, 导致黄韧带肥厚的因素包括增龄、炎症、机械应力和纤维化等^[2]。黄韧带肥厚动物模型的建立是研究退行性脊柱疾病的基础, 也是探索黄韧带增厚机制、发现药物潜在治疗靶点的前提。但目前对于腰椎黄韧带肥厚的动物模型仍存在争议。既往研究制备的退行性腰椎管狭窄症模型大多局限于碎骨粒、球囊、螺钉以及可膨胀材料等回填压迫造成^[3], 极少研究涉及腰椎黄韧带肥厚动物模型的制作^[4]。因此, 本研究的主要目的是通过评价三种腰椎活动范围增大的造模方法, 建立一种新的大鼠黄韧带肥厚模型, 同时探讨腰椎活动范围的增大所诱发黄韧带肥厚的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用 8 周龄雄性清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 72 只, 每只体重约 250 g, 购自北京金牧阳动物实验技术有限公司, 许可证编号为 SCXK(京)2019-0006。所有大鼠均被饲养于温、湿度可控的环境中(温度为 20~25 ℃, 湿度为 40%~50%, 光照 12 h 与黑暗 12 h 交替循环), 自由进食水。

1.2 伦理审查

本实验通过中国中医科学院中医基础理论研究所动物伦理委员会批准, 批准号为 2020605。

1.3 主要试剂与仪器

苏木精-伊红(HE)染液(北京索莱宝科技有限公司, 批号为 G1120), 马森三色染色试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司, 批号为 BA4079A), 转化生长因子 $\beta 1$ (Transforming Growth Factor- $\beta 1$, $TGF-\beta 1$) 兔多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司, 批号为 BA0290), 肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor- α , $TNF-\alpha$) 兔多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司, 批号为 bs-10802R), 白细胞介素 1β (Interleukin- 1β , $IL-1\beta$) 兔多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司, 批号为 bs-0812R), I 型胶原 (Type I Collagen, Col1) 兔多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司, 批号为 BA-0325), III 型胶原 (Type III Collagen, Col3) 兔多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司, 批号为

A00788-3), P-Smad2/3 兔多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司, 批号为 bs-8853R), Smad7 兔多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司, 批号为 bs-0566R), 羊抗兔 IgG-HRP(北京博奥森生物技术有限公司, 批号为 bs-0295G), 逆转录试剂盒(天根生化科技有限公司, 批号为 RR037A), SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)(天根生化科技有限公司, 批号为 FP205), 引物设计由武汉赛维尔生物科技有限公司完成。打磨机(韩国世新精密工业社), 小动物 X 光影像系统(美国代尔医疗集团), ABI Q6 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司), 光学显微镜(日本尼康仪器有限公司), 分光光度计(德国艾本德有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 设计方案 实验方案一析因设计: 采用 2 因素(a 为肌肉切除、 b 为骨关节切除) 2 水平(不用、用)析因设计, 将 2 个因素 2 个水平交叉组合, 实验总组合数为 $2 \times 2 = 4$, 见表 1。

表 1 2×2 析因设计及实验方案

因素 a	因素 b	
	b_1	b_2
a_1	$a_1 b_1$	$a_1 b_2$
a_2	$a_2 b_1$	$a_2 b_2$

1.4.2 分组 将 72 只大鼠依次编号, 采用随机数字表法将其分为 4 组: A 为假手术组($a_1 b_1$)、B 为肌肉切除组($a_2 b_1$)、C 为骨关节切除组($a_1 b_2$)、D 为肌肉+骨关节切除组($a_2 b_2$), 每组大鼠 18 只。大鼠术后常规饲养 12 周, 分别于术后第 4、8、12 周每组各处死 6 只, 对其 $L_{5/6}$ 脊柱节段取材。

1.5 造模

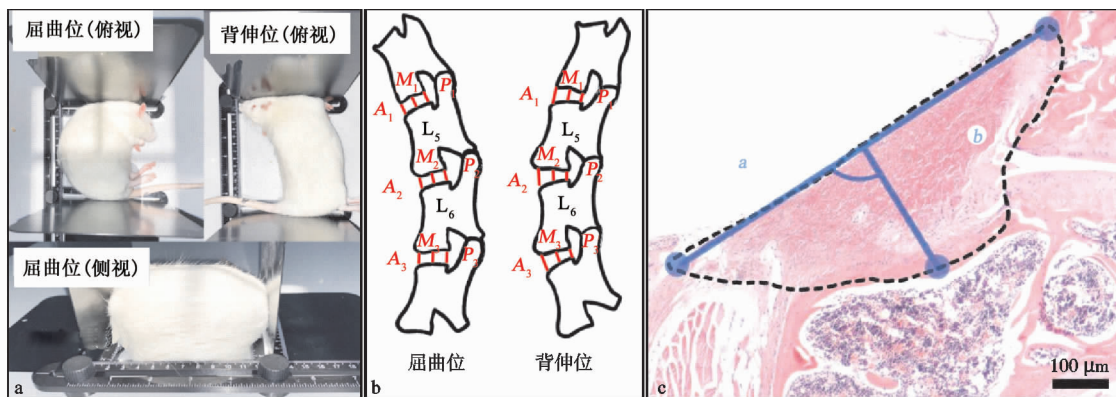
术前一夜禁食水, 标记, 称重。5%戊巴比妥钠溶液(30~40 mg/kg)腹腔注射麻醉。1)假手术组: 腰背部备皮, 俯卧位固定四肢, 碘伏消毒, 铺巾。以 L_6 为中心在后背部正中作一个 2~3 cm 的纵行切口, 切开皮下组织及腰背筋膜, 充分止血后逐层缝合切口。2)肌肉切除组^[5]: 切开皮下组织及腰部筋膜后, 依次切除 $L_{5/6}$ 的浅层腰部筋膜(外缘范围切至附着于髂骨的 1/2 处)、中层竖脊肌, 用镊子将深层多裂肌从椎板上逐渐剔净直至椎板完全暴露, 其余操作同前。3)骨关节切除组^[6]: 切开皮下组织及腰部筋膜, 沿棘突两侧剥离椎

旁肌并向两侧分开,显露 L₅、L₆ 的棘突和 L_{5/6} 关节突关节,咬骨钳咬除 L₅、L₆ 棘突、棘上韧带和棘间韧带,用电动磨钻将 L_{5/6} 关节突关节打磨至与椎板相平。过程中注意不要造成椎板的缺损,其余操作同前。4)肌肉+骨关节切除组:根据上述造模方法,同时予肌肉切除造模加骨关节切除造模。

1.6 观察项目

1.6.1 影像学测量 在造模术后第 12 周时,所有大鼠在经麻醉下拍摄腰椎动力位(过伸位和过屈位)X 线片。为了确保所有大鼠的伸展和屈曲程度相同,特自制

了一个简单的可伸缩支架,将大鼠放于两侧钢板之间,以确保所有大鼠头端到尾端的距离一致(见图 1a)。使用 Image J 1.50 软件测量以下数据(见图 1b):1)屈曲位、背伸位的间盘高度比值(Disc Height Ratios,DHR): $DHR_{前}=2 \times A_2 / (A_1 + A_3)$, $DHR_{中}=2 \times M_2 / (M_1 + M_3)$, $DHR_{后}=2 \times P_2 / (P_1 + P_3)$,该数值反映了屈曲或背伸状态下的椎间盘的高度。2)屈曲范围比值(Flexion Ratios,FR)和背伸范围比值(Extension Ratios,ER): $FR=A_2 / P_2$ (屈曲位), $ER=A_2 / P_2$ (背伸位),该数值反映了屈曲或背伸状态下的腰椎活动范围^[6-7]。



(a) 大鼠屈曲位和背伸位X线拍摄方法 (b) L₅和L₆节段参数的测量(A-前, M-中, P-后) (c) 大鼠黄韧带厚度等数值的测量方法

图 1 影像学测量

1.6.2 HE 染色与黄韧带厚度的评估 HE 染色:收集脊柱 L_{5/6} 节段后置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,后置于 10% 乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA)脱钙液中脱钙 8 周。脱钙完成后将 L_{5/6} 节段沿着横突前缘纵向劈开,得到脊柱前柱与后柱结构。将后柱沿黄韧带矢状面的中点横向切开,将切开的横断面朝下放入脱水盒中,梯度脱水、透明、浸蜡及石蜡包埋。石蜡块以 5 μm 厚度连续切片后进行 HE 染色。

黄韧带厚度的测量:将同等放大倍数的显微镜镜下图像导出,采用 Image J 1.50 软件测量黄韧带厚度(见图 1c)。1)黄韧带厚度:将黄韧带腹侧缘的两端附着点连线(a 线),于 a 线向背侧缘做垂线,最长的垂线即为黄韧带的厚度(b 线)。2)黄韧带背侧层的厚度:靠近椎板侧主要由胶原纤维构成的蓝色区域为背侧层(c 线)。

1.6.3 免疫组化法检测各组黄韧带 IL-1β、TNF-α、TGF-β1/Smads (TGF-β1、P-Smad2/3、Smad7)、Col1、Col3 蛋白的定位、半定量表达 样本组织常规固定、脱水、包埋、石蜡切片,65 °C 烤片 1 h,脱蜡、水化,酶修复法进行抗原修复,细胞样本 95%乙醇充分固定,3%过氧化氢孵育 10 min,PBS 洗 2 次,一抗孵育 30 min(一抗稀释比例:IL-1β[1:250],TNF-α[1:50],TGF-β1[1:200],P-Smad2/3[1:50],Smad7[1:200],Col1

[1:250],Col3[1:500]),PBS 洗 2 次,二抗孵育 20 min,PBS 洗 2 次,DAB 染色,自来水充分冲洗,复染,脱水,透明,封片。采用 Image J 1.50 对免疫组化切片进行分析,以平均光密度值(MOD,MOD=IOD/面积)作为 IL-1β、TNF-α、TGF-β1、P-Smad2/3、Smad7、Col1、Col3 表达强度的评价参数。在 200 倍视野下,每张切片随机拍摄 3 个视野,取平均值作为每张切片的观察结果。

1.6.4 实时 PCR 检测 IL-1β、TNF-α、TGF-β1/Smads (TGF-β1、Smad2、Smad3、Smad7)、Col1、Col3 的 mRNA 表达 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,测定浓度后使用逆转录试剂盒进行逆转录,配置好 qPCR 反应体系(20 μL):SuperReal PreMix Plus 10 μL,正向和反向引物各 0.6 μL,cDNA 模板 2 μL,无酶无菌水补充至 20 μL。预变性 95 °C 15 min;变性 95 °C 10 s;退火 60 °C 20 s;延伸 72 °C 30 s。变性、退火、延伸循环 40 次。计算使用 2^{-ΔΔCt} 方法执行。引物序列见表 2。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。黄韧带的厚度取左、右两侧黄韧带的平均值,为定量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示(需符合正态分布)。多组间(≥ 3)数据比较,若满足正态分布且方差齐的采用单因素方差分析(one-way ANOVA),否则用秩和检验,事后检验用 LSD-t 法进行组间两两比较,手术方法的主效应及其

表 2 所用引物序列

基因		引物序列(5'-3')
IL-1 β	正向	CGATCACTGAAC TGCACGCTC
	反向	ACAAAGGACATGGAGAACACCACTT
TNF- α	正向	TCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAG
	反向	GGAAGACCCCTCCCAGATAGA
TGF- β 1	正向	ACCTCGGCTGGAAGTGGAT
	反向	AGGACCTTGCTGTACTGCGTGT
Smad2	正向	CGTCCATCTTGCCATTCAAG
	反向	CTCAAGCTCATCTAATCGTCCTG
Smad3	正向	GCGTGCGGCTCTACTACATC
	反向	GCACATTGCGGTCAACTGGTA
Smad7	正向	CAGGCATTCTCGGAAGTCA
	反向	TCTAGTTGCGAGAGTCGGCTAA
Col1	正向	TGGCAAAGATGGACTCAACG
	反向	TCACGGTCACGAACCACATT
Col3	正向	TCGCTCTGCTTCATCCCACTAT
	反向	CTTCCAGACATCTCTATCCGCAT
GAPDH	正向	GGAAGCTTGTCAATGGAATC
	反向	TGATGACCCTTTTGGCTCCC

之间的交互作用采用析因设计方差分析。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 影像学测量结果

造模术后 12 周 X 线图像结果提示,肌肉+骨关节切除组大鼠可见在屈曲位和背伸位的 L_{5/6} 椎间隙的中、后方高度增加,L_{5/6} 活动范围增大,L₅ 和 L₆ 椎体前缘出现骨赘。骨关节切除组大鼠在屈曲位的 L_{5/6} 椎间隙后方高度增大,L_{5/6} 活动范围增大。骨关节切除组和肌肉+骨关节切除组大鼠的 L₅ 和 L₆ 棘突仍然未完全长出,但 L_{5/6} 关节突关节与其他组一样完整,已基本恢复正常。所有组大鼠在 L_{5/6} 水平均未见明显的椎体滑移和旋转(见图 2)。另外,三种造模方法均可以造成 L_{5/6} 节段屈曲位椎间隙后方高度与活动范围的增大,其中以肌肉+骨关节切除法最明显,骨关节切除法次之,最后是肌肉切除法,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

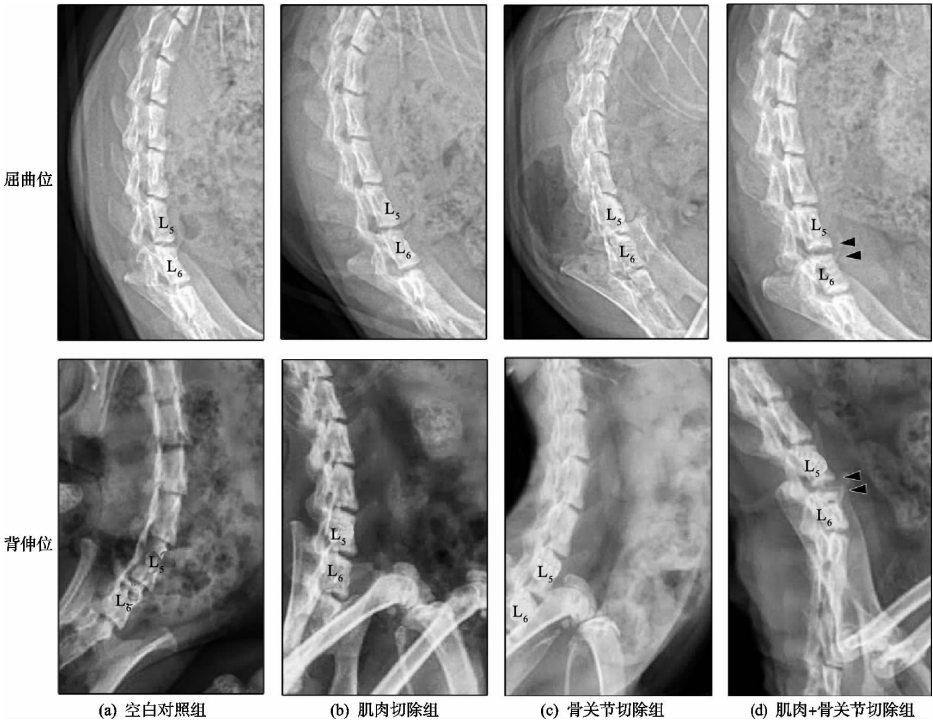


图 2 造模术后第 12 周各组大鼠屈曲和背伸位 X 线片(▲—椎体前缘骨赘)

表 3 大鼠椎间盘高度的组间比较($\bar{x}\pm s, n=6$, 比值)

参数		假手术组	肌肉切除组	骨关节切除组	肌肉+骨关节切除组
屈曲位间盘高度比值	前	0.92 \pm 0.04	1.11 \pm 0.12	1.14 \pm 0.03	1.07 \pm 0.11
	中	0.89 \pm 0.12	0.95 \pm 0.08	1.33 \pm 0.06 ¹⁾²⁾	1.61 \pm 0.17 ¹⁾²⁾³⁾
	后	1.02 \pm 0.06	1.34 \pm 0.16 ¹⁾	1.57 \pm 0.13 ¹⁾²⁾	2.13 \pm 0.10 ¹⁾²⁾³⁾
背伸位间盘高度比值	前	1.06 \pm 0.07	1.08 \pm 0.02	0.95 \pm 0.07	1.76 \pm 0.14 ¹⁾²⁾³⁾
	中	0.95 \pm 0.13	1.02 \pm 0.09	1.08 \pm 0.18	1.71 \pm 0.24 ¹⁾²⁾³⁾
	后	0.97 \pm 0.15	1.04 \pm 0.10	1.06 \pm 0.12	2.15 \pm 0.20 ¹⁾²⁾³⁾
屈曲范围比值		1.15 \pm 0.12	0.77 \pm 0.09 ¹⁾	0.63 \pm 0.04 ¹⁾	0.54 \pm 0.25 ¹⁾²⁾³⁾
背伸范围比值		3.17 \pm 0.19	3.20 \pm 0.16	3.26 \pm 0.30	3.32 \pm 0.27

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与肌肉切除组比较, $P<0.05$;3)与骨关节切除组比较, $P<0.05$ 。

主效应及交互作用分析:1)屈曲位椎间盘高度:肌肉切除法和骨关节切除法均不能增大间盘前侧高度比值($DHR_{前}$),两种方法无交互作用,差异无统计学意义($P>0.05$);肌肉切除法不能增大间盘中侧高度比值($DHR_{中}$),骨关节切除法能增大 $DHR_{中}$,两种方法有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$);肌肉切除法和骨关节切除法均能增大间盘后侧高度比值($DHR_{后}$),两种方法有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$)。2)背伸位椎间盘高度:肌肉切除法和骨关节切除法均不能增大 $DHR_{前}$,两种方法无交互作用,差异无统计学意义($P>0.05$);肌肉切除法和骨关节切除法均不能增大 $DHR_{中}$,两种方法有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$);肌肉切除法和骨关节切除法均不能增大 $DHR_{后}$,两种方法有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$)。3)屈曲位腰椎活动范围:肌肉切除法和骨关节切除法均能增大椎间盘活动范围(FR),两种方法有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$)。4)背伸位腰椎活动范围:肌肉切除法和骨关节切除法均不能增大椎间盘活动范围(FR),两种方法无交互作用,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 4 主效应及交互作用分析结果(P 值)

因素	屈曲位间盘高度比值			背伸位间盘高度比值			屈曲范	背伸范
	前	中	后	前	中	后	围比值	围比值
肌肉切除组(A)	0.341	0.070	0.022 ¹⁾	0.573	0.097	0.279	0.001 ¹⁾	0.878
骨关节切除组(B)	0.290	0.002 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.064	0.108	0.083	0.001 ¹⁾	0.647
肌肉×骨关节切除组(A×B)	0.018 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.291

注:1)主效应、交互作用分析, $P<0.05$ 。

2.2 组织学观察与黄韧带厚度

如图 3 造模术后第 12 周各组的黄韧带 HE 染色结果所示,假手术组、肌肉切除组、骨关节切除组和肌肉+骨关节切除组中黄韧带厚度有逐渐增大的趋势,中间层弹性纤维密度有逐渐降低的趋势,且背侧层胶原纤维的排列逐渐趋于紊乱,细胞数量也趋于增多。另外,通过分析造模术后第 4,8,12 周各组大鼠 L_5 和

L_6 黄韧带厚度得出:三种造模方法均可以引起黄韧带的厚度增大,其中以肌肉+骨关节切除法最为明显,其次为骨关节切除法,最后为肌肉切除法。主效应及切除方法间交互作用分析:肌肉切除法与骨关节切除法均能增大黄韧带厚度,两种方法有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

另外,三种造模方法中只有骨关节切除法和肌

表 5 大鼠黄韧带整体厚度的组间比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	第 4 周	第 8 周	第 12 周
假手术组(A)	412.45±21.38	477.38±18.29	493.97±27.21
肌肉切除组(B)	387.41±23.16	493.21±25.17	523.22±30.32 ¹⁾
骨关节切除组(C)	408.38±16.45	514.92±23.36 ¹⁾	562.10±35.14 ¹⁾²⁾
肌肉+骨关节切除组(D)	431.89±13.34	605.23±34.82 ¹⁾²⁾	670.04±25.38 ¹⁾²⁾³⁾
肌肉×骨关节切除组(A×B)		$P<0.001$	

注:1)与同时时间的假手术组比较, $P<0.05$;2)与同时时间的肌肉切除组比较, $P<0.05$;3)与同时时间的骨关节切除组比较, $P<0.05$ 。肌肉+骨关节切除法可以引起黄韧带背侧层厚度的增大,其中以肌肉+骨关节切除法最为明显,其次为骨关节切除法,而肌肉切除组与假手术组相当。主效应及切除方法间交互作用分析:肌肉切除法不能增大黄韧带背侧层厚度,骨关节切除法可以增大黄韧带背侧层厚度,两种方法有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 6。

表 6 大鼠黄韧带背侧层厚度的组间比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	第 4 周	第 8 周	第 12 周
假手术组(A)	97.87±3.57	112.80±8.13	124.68±10.13
肌肉切除组(B)	101.07±2.52	110.59±4.87	119.20±14.34
骨关节切除组(C)	106.90±4.29 ¹⁾	125.90±9.18 ¹⁾²⁾	157.39±11.58 ¹⁾²⁾
肌肉+骨关节切除组(D)	123.55±5.71 ¹⁾	205.83±6.73 ¹⁾²⁾³⁾	261.32±12.26 ¹⁾²⁾³⁾
肌肉×骨关节切除组(A×B)		$P<0.001$	

注:1)与同时时间的假手术组比较, $P<0.05$;2)与同时时间的肌肉切除组比较, $P<0.05$;3)与同时时间的骨关节切除组比较, $P<0.05$ 。

2.3 免疫组化结果

如图 4 所示,造模术后第 12 周的 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1 等蛋白在大鼠黄韧带中的表达表现为棕黄色,主要表达在成纤维细胞中。其中,IL-1 β 、TGF- β 1、TNF- α 主要定位在细胞质中,P-Smad2/3 主要定位在细胞核中,Smad7 主要定位在细胞质和细胞核中,Col1

和 Col3 主要定位在细胞质和细胞外基质中。通过对免疫组化中蛋白表达的半定量分析得出:肌肉+骨关节切除组所产生的 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1、P-Smad2/3、Col1 和 Col3 的蛋白表达量最多,Smad7 的表达量最少,其次为骨关节切除法,最后为肌肉切除法,见表 7、图 4 和图 5。

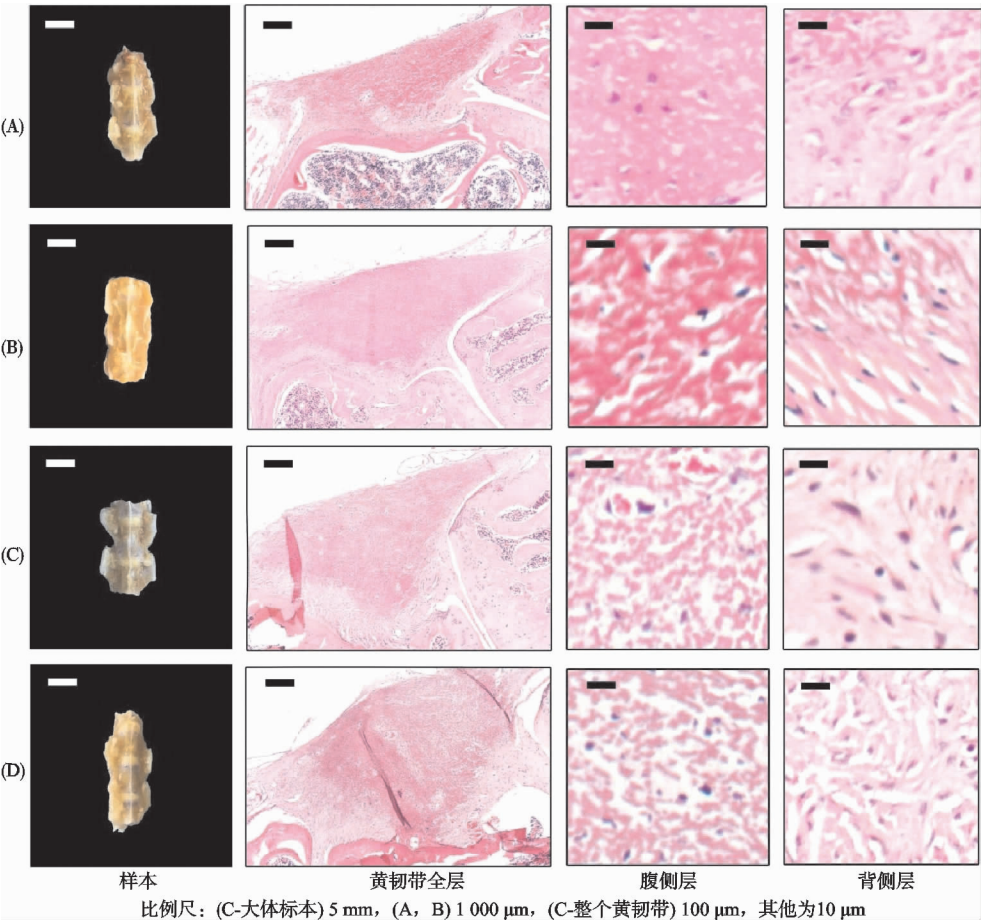


图 3 造模术后第 12 周各组的黄韧带 HE 染色

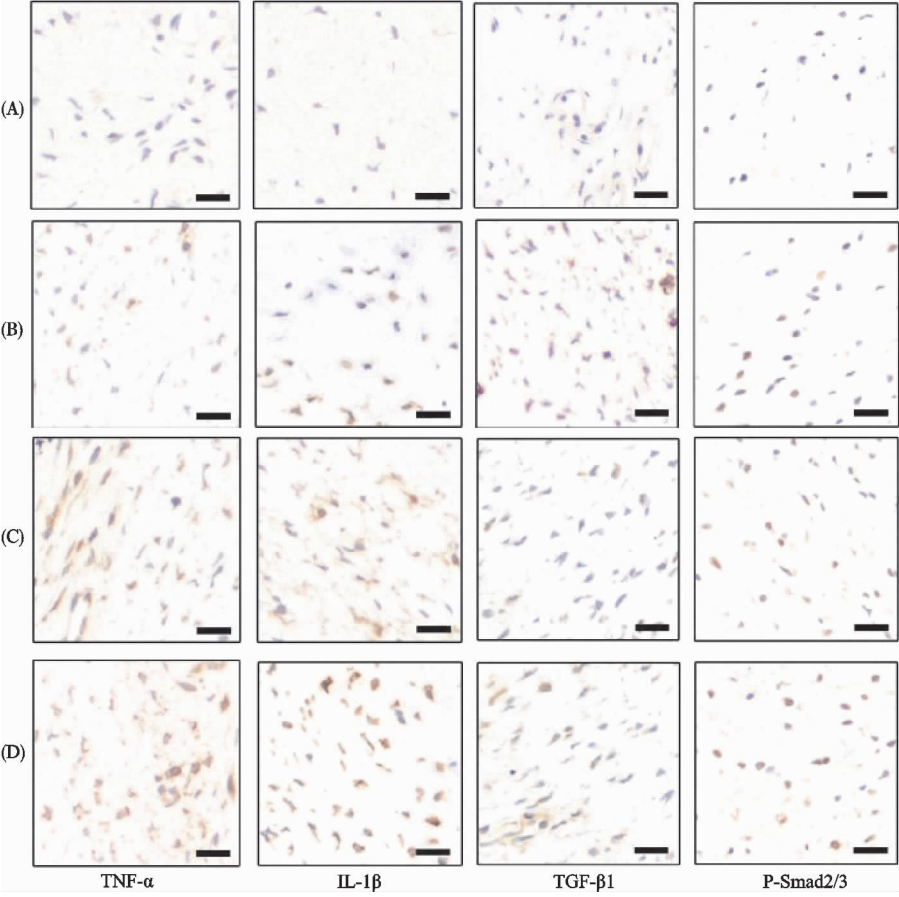


图 4 各组 IL-1β、TNF-α、TGF-β1 和 P-Smad2/3 蛋白表达的组间比较(比例尺为 10 μm)

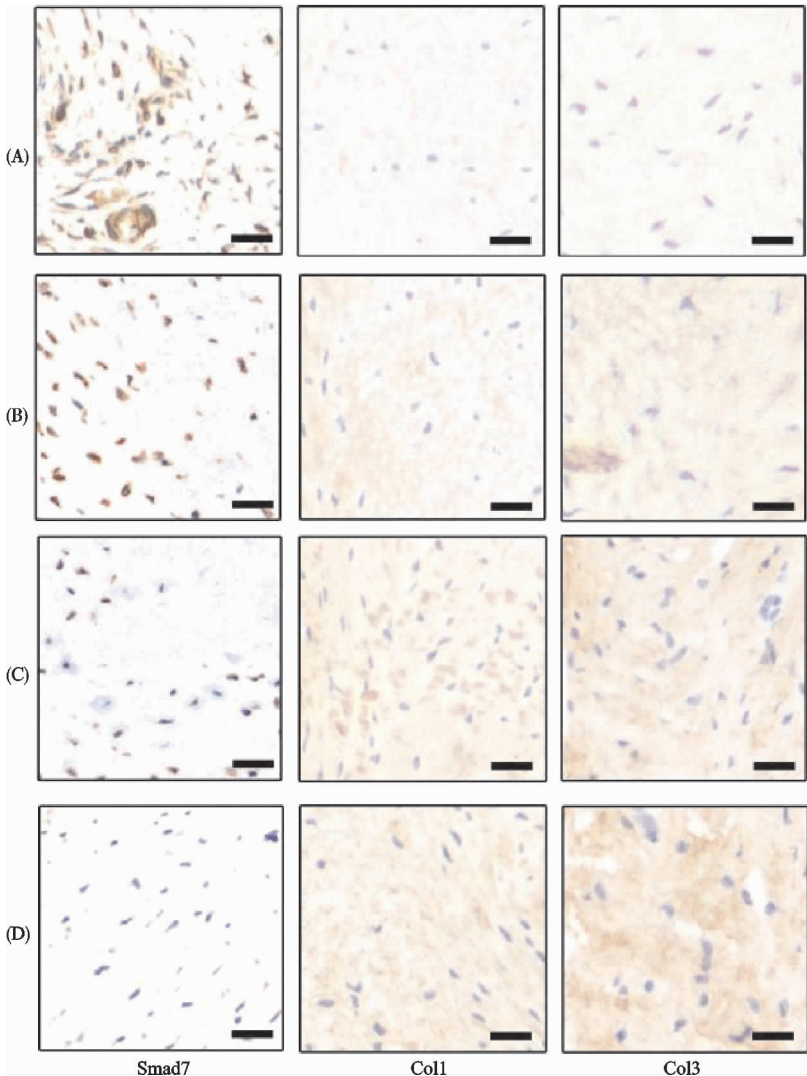


图 5 各组 Smad7、Col1、Col3 和 P-Smad2/3 蛋白表达的组间比较(比例尺为 10 μm)

表 7 免疫组化法测得各组不同基因的蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	IL-1β	TNF-α	TGF-β1	P-Smad2/3	Smad7	Col1
假手术组(A)	0.72±0.09	0.66±0.16	0.78±0.11	0.55±0.10	1.16±0.15	0.94±0.12
肌肉切除组(B)	0.73±0.05 ¹⁾	0.95±0.20 ¹⁾	0.83±0.13 ¹⁾	0.52±0.07	1.37±0.13	1.02±0.10 ¹⁾
骨关节切除组(C)	0.80±0.14 ¹⁾²⁾	1.27±0.18 ¹⁾²⁾	1.08±0.22 ¹⁾²⁾	0.54±0.05 ¹⁾²⁾	0.90±0.16 ¹⁾²⁾	1.46±0.18 ¹⁾²⁾
肌肉+骨关节切除组(D)	1.21±0.25 ¹⁾²⁾³⁾	1.30±0.22 ¹⁾²⁾³⁾	1.34±0.20 ¹⁾²⁾³⁾	0.91±0.11 ¹⁾²⁾³⁾	0.86±0.12 ¹⁾²⁾³⁾	1.59±0.23 ¹⁾²⁾³⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与肌肉切除组比较, $P<0.05$;3)与骨关节切除组比较, $P<0.05$ 。

主效应及交互作用分析:肌肉切除法和骨关节切除法均增加大鼠黄韧带中的 IL-1β、TNF-α、Col1 和 Col3 的蛋白表达,两种方法均有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$);肌肉切除法不增加 P-Smad2/3 的蛋白表达,骨关节切除法增加 P-Smad2/3 的蛋白表

达,两种方法有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$);肌肉切除法不降低 Smad7 的蛋白表达,骨关节切除法降低 Smad7 的蛋白表达,两种方法有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 8。

2.4 实时 PCR 结果

表 8 主效应及交互作用分析结果(P 值)

因素	IL-1β	TNF-α	TGF-β1	P-Smad2/3	Smad7	Col1	Col3
肌肉切除组(A)	0.004 ¹⁾	0.002 ¹⁾	0.049 ¹⁾	0.758	0.042	0.015 ¹⁾	0.038 ¹⁾
骨关节切除组(B)	0.003 ¹⁾	0.014 ¹⁾	0.038 ¹⁾	0.021 ¹⁾	0.155	0.036 ¹⁾	0.001 ¹⁾
肌肉×骨关节切除组(A×B)	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.010 ¹⁾	0.000 ¹⁾	<0.001	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾

注:1)主效应、交互作用分析, $P<0.05$ 。

造模术后第 12 周,通过实时 PCR 测得各组 mRNA 的相对表达量得出:肌肉+骨关节切除组所产

生的 IL-1β、TNF-α、TGF-β1、Smad2、Smad3、Col1 和 Col3 的 mRNA 表达量最多,Smad7 的 mRNA 表达量

最少,其次为骨关节切除法,最后为肌肉切除法,见表 9。

表 9 各组不同基因的 mRNA 相对表达量的组间比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	Smad2
假手术组(A)	1.00 \pm 0.17	1.00 \pm 0.25	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.27
肌肉切除组(B)	1.25 \pm 0.41 ¹⁾	1.83 \pm 0.42 ¹⁾	1.10 \pm 0.16	2.11 \pm 0.36 ¹⁾
骨关节切除组(C)	1.27 \pm 0.35 ¹⁾	1.35 \pm 0.18 ¹⁾	1.17 \pm 0.29 ¹⁾	2.47 \pm 0.13 ¹⁾
肌肉+骨关节切除组(D)	2.32 \pm 0.37 ¹⁾²⁾³⁾	3.34 \pm 0.20 ¹⁾²⁾³⁾	2.26 \pm 0.23 ¹⁾²⁾³⁾	2.93 \pm 0.43 ¹⁾²⁾³⁾
组别	Smad3	Smad7	Col1	Col3
假手术组(A)	1.00 \pm 0.28	1.00 \pm 0.26	1.00 \pm 0.24	1.00 \pm 0.30
肌肉切除组(B)	1.50 \pm 0.35	0.85 \pm 0.31 ¹⁾	1.95 \pm 0.12 ¹⁾	1.70 \pm 0.33 ¹⁾
骨关节切除组(C)	1.68 \pm 0.11 ¹⁾	0.56 \pm 0.41 ¹⁾	2.23 \pm 0.44 ¹⁾	2.48 \pm 0.21 ¹⁾
肌肉+骨关节切除组(D)	1.91 \pm 0.42 ¹⁾²⁾³⁾	0.44 \pm 0.22 ¹⁾²⁾³⁾	2.79 \pm 0.32 ¹⁾²⁾³⁾	2.52 \pm 0.14 ¹⁾²⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与肌肉切除组比较, $P<0.05$;3)与骨关节切除组比较, $P<0.05$ 。

主效应及交互作用分析:肌肉切除法和骨关节切除法均增加大鼠黄韧带中的 IL-1 β 、TNF- α 、Smad2、Col1 和 Col3 的 mRNA 表达,均降低 Smad7 mRNA 的表达,两种方法均有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$);肌肉切除法不增加 TGF- β 1 和 Smad3 的 mRNA 表达,骨关节切除法增加 TGF- β 1 和 Smad3 的 mRNA 表达,两种方法均有交互作用,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 10。

表 10 主效应及交互作用分析结果(P 值)

因素	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	Smad2	Smad3	Smad7	Col1	Col3
肌肉切除组(A)	0.009 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.302	0.021 ¹⁾	0.082	0.006 ¹⁾	0.031 ¹⁾	0.005 ¹⁾
骨关节切除组(B)	0.020 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.019 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.010 ¹⁾	0.026 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.002 ¹⁾
肌肉 \times 骨关节切除组(A \times B)	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.003 ¹⁾	0.000 ¹⁾	0.000 ¹⁾

注:1)主效应、交互作用分析, $P<0.05$ 。

3 讨论

3.1 腰椎屈曲范围的增加诱发黄韧带增厚

关节突关节、棘突、棘上韧带以及椎旁肌切除所诱发的脊柱活动范围增加与机械应力的改变,可以导致脊柱椎间盘、黄韧带等结构的退行性病变^[8-10]。本研究中的三种造模方法均能诱发大鼠黄韧带增厚和或退变,其中以肌肉+骨关节切除法最优(切除椎旁肌、小关节、棘突和棘上韧带),骨关节切除法次之(切除小关节、棘突和棘上韧带),最后是肌肉切除法(切除椎旁肌)。这可能是由于脊柱后方所受到应力大小的差异所导致的^[11]。研究表明^[12]动、静力对维持脊柱各结构的正常位置和功能至关重要,骨和韧带组织所产生的的静力约束作用以及肌肉组织产生的动力约束作用共同维持着脊柱的稳定性。在上述三种造模方法中,肌肉切除法破坏了静力系统的约束作用,骨关节切除法破坏了动力系统的约束作用,肌肉+骨关节切除法对动、静力系统均造成了破坏。本研究通过同时破坏腰椎的椎旁肌、关节突关节、肌肉、棘突和韧带,造成了动静力的失衡,最大程度上导致后柱稳定性丧失,相应节段的活动范围增大,诱发并加速了黄韧带的退变与增厚。

Sairyō 等^[13]研究表明,黄韧带的应力主要来源于纵向的拉力,黄韧带背侧的机械应力大约是腹侧的 5 倍,而屈曲是诱发这种机械应力最重要的活动。因此,在日常活动中,屈曲时较高的机械应力可能主要施加

于背侧而非腹侧,导致背侧的微损伤。在微损伤愈合过程中,产生了纤维化团块,这可能导致黄韧带的肥大。该大鼠模型在屈曲位时椎间盘高度和腰椎活动范围均增加,且黄韧带背侧层厚度增加明显。这可能是由于背侧层在屈曲位受到更大的应力所导致的,说明机械应力是诱发或加速黄韧带增厚的重要因素。

既往研究认为黄韧带肥厚发生的机制是其在机械应力作用下发生炎症反应,这种炎症反应引起组织病理性损伤修复,细胞外基质的沉积,即在各种炎症介质、促纤维化等细胞因子的介导下组织发生纤维化和肥厚^[14]。而在导致退行性脊柱疾病的促炎细胞因子中,IL-1 β 、TNF- α 是最主要的参与者,其在肥厚黄韧带中的高表达已得到初步证实^[13],另外 TGF- β 1/Smads 被认为是引起纤维化的最重要的信号传导通路,其在各种组织与器官的纤维化和瘢痕组织纤维性修复过程中有着核心的推动作用^[15-16]。

3.2 该模型的优势

Hayashi 等^[10]建立了一种新型的椎间机械应力集 中的大白兔模型,将 L_{3/4} 和 L_{5/6} 进行融合固定致使应力集中于 L_{4/5} 节段,整个成模过程为 16 周。Saito 等^[8]通过机械应力的加载建立了黄韧带肥厚小鼠模型,将麻醉后的小鼠放置于一种可以反复翻折的加载机器上,对其 L_{5/6} 节段每天实施 3 h 持续 12 周的应力加载。但上述模型的成功建立需要较长的时间,且需要特殊的设备或

器械。鉴于切除棘突、韧带^[4]或椎旁肌^[5]也可诱导黄韧带肥厚,因此,笔者尝试用破坏韧带、棘旁肌、小关节的方法将更多的应力集中在某一腰椎节段,以期在 8 周内更快地诱导黄韧带肥厚。人体的黄韧带向外侧一直延伸到关节囊,向内侧附着部则延伸到中线椎板形成棘突处,部分与棘间韧带和关节囊腹侧相连。而大鼠的黄韧带主要分布在双侧关节突关节腹侧,棘突处几乎无黄韧带的分布(见图 1c)。此外,测量黄韧带厚度的方法为通过黄韧带腹侧缘垂线的长度,该位置在关节突关节附近,远离棘突间。因此,切除棘突和棘间韧带对黄韧带的损伤及最终测量结果的影响有限。另外,为了避免造模过程中磨除关节突关节时对黄韧带造成损伤,本研究只对关节突关节进行半磨除,而不是全部磨除甚至全部切除。因此,这种模型相对简便快速、安全稳定。

3.3 该模型的局限性

本研究还存在一些局限性。首先,人黄韧带和大鼠黄韧带在大小、营养供给和应力方面有一定的差异^[17]。最近的离体研究使用来源于黄韧带肥厚患者的黄韧带细胞作为体外三维模型,更好地模拟了黄韧带组织中细胞-细胞和细胞-细胞间质的相互作用^[18]。但是,这种模型同样也不能有效模拟脊柱内部复杂的机械、化学、营养和代谢环境,使其在机制探索和新药研发方面仍有一定的局限性。其次,本研究尚未就 TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 、Col1 等因子进行 Western Blot 分析以进一步验证蛋白表达。

本研究通过切除棘突、棘间韧带、椎旁肌等结构诱导了大鼠脊柱后方失稳模型,结果表明该方法可以最大程度增大 L_{5/6} 节段的屈曲活动范围和黄韧带的厚度,IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1、P-Smad2/3(或 Smad2 和 Smad3)、Col1 和 Col3 的蛋白及 mRNA 也均呈高表达,说明腰椎屈曲范围的增大所引发的机械应力可导致黄韧带中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的高表达,并诱导 TGF- β 1/Smads 通路致使细胞外基质沉积而导致黄韧带肥厚。

参考文献

- [1] JACOBI S, BEYNON A, DOMBROWSKI S U, et al. Effectiveness of conservative nonpharmacologic therapies for pain, disability, physical capacity, and physical activity behavior in patients with degenerative lumbar spinal stenosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2021, 29(21): 324-332.
- [2] NAKAMURA T, OKADA T, ENDO M, et al. Angiopoietin-like protein 2 induced by mechanical stress accelerates degeneration and hypertrophy of the ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis[J]. PLoS One, 2014, 9(1): 11-13.
- [3] 周磊, 李明, 刘培来, 等. 椎板切除碎骨粒回植法制作腰椎管狭窄动物模型[J]. 中国临床解剖学杂志, 2007, 25(6): 660-664.

- [4] SATO N, HIGASHINO K, SAKAI T, et al. Role of epiligament in ligamentum flavum hypertrophy in patients with lumbar spinal canal stenosis: a pilot study[J]. J Med Invest, 2018, 65(1/2): 85-89.
- [5] 张喜善, 蔡国栋, 范锡海, 等. 动力失衡性大鼠颈椎黄韧带早期退变模型的建立[J]. 泰山医学院学报, 2009, 30(2): 81-84.
- [6] FUKUI D, KAWAKAMI M, YOSHIDA M, et al. Gait abnormality due to spinal instability after lumbar facetectomy in the rat[J]. Eur Spine J, 2015, 24(9): 2085-2094.
- [7] OICHI T, TANIGUCHI Y, SOMA K, et al. A mouse intervertebral disc degeneration model by surgically induced instability[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2018, 43(10): E557-E564.
- [8] SAITO T, YOKOTA K, KOBAYAKAWA K, et al. Experimental mouse model of lumbar ligamentum flavum hypertrophy[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169717.
- [9] HAYASHI K, SUZUKI A, ABDULLAH AHMADI S, et al. Mechanical stress induces elastic fibre disruption and cartilage matrix increase in ligamentum flavum[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13092.
- [10] HAYASHI K, SUZUKI A, TERAH H, et al. Fibroblast growth factor 9 is upregulated upon intervertebral mechanical stress-induced ligamentum flavum hypertrophy in a rabbit model[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2019, 44(20): E1172-E1180.
- [11] KOSAKA H, SAIRYO K, BIYANI A, et al. Pathomechanism of loss of elasticity and hypertrophy of lumbar ligamentum flavum in elderly patients with lumbar spinal canal stenosis[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2007, 32(25): 2805-2811.
- [12] WANG Y J, SHI Q, LU W W, et al. Cervical intervertebral disc degeneration induced by unbalanced dynamic and static forces: a novel in vivo rat model[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2006, 31(14): 1532-1538.
- [13] SAIRYO K, BIYANI A, GOEL V, et al. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2005, 30(23): 2649-2656.
- [14] 孙超, 刘新晖. 腰椎黄韧带增生纤维化分子机制的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(2): 183-187.
- [15] LAN H Y. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [16] WU N, GE Y, ZHOU Y, et al. Nanosized titanium dioxide resulted in the activation of TGF- β /Smads/p38MAPK pathway in renal inflammation and fibrosis of mice[J]. J Biomed Mater Res; Part A, 2016, 104(6): 1452.
- [17] LARSON J W, LEVICOFF E A, GILBERTSON L G, et al. Biologic modification of animal models of intervertebral disc degeneration[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(S2): 83-87.
- [18] LIN C L, KUO Y T, TSAO C H, et al. Development of an in vitro 3d model for investigating ligamentum flavum hypertrophy[J]. Biol Proced Online, 2020, 22(1): 20.