

轴向负载诱导肾虚小鼠椎间盘退变的实验研究

劳杨骏¹ 裘一丹² 徐彬¹ 盛红枫¹ 张树良¹ 刘亦杨¹ 沈立锋¹ 吴承亮²

[摘要] 目的:探究采用自制的热板鼠笼诱导的间断轴向力学负载环境对肾虚小鼠腰椎间盘退变的影响。方法:选择 16 个月龄老年小鼠 36 只,随机分为对照组、模型组及肾虚模型组,每组 12 只。每日于固定时间段将肾虚模型组及模型组小鼠放入自制的热板鼠笼,开始跳跃后计时 10 min,对照组小鼠不予处理。分别在造模 1 个月和 3 个月后,通过 HE、ABH 染色分别比较三组小鼠腰椎间盘组织学差异,通过免疫组化测定Ⅱ型胶原来说明三组小鼠椎间盘退变的不同情况。结果:染色结果表明模型组和肾虚模型组小鼠椎间盘高度明显小于对照组,模型组与肾虚模型组样本软骨终板都存在更严重的骨化,模型组较对照组明显。模型组与肾虚模型组椎间盘内软骨老化较对照组明显升高,且肾虚模型组髓核的软骨细胞退变作用更为严重,其阳性染色较模型组有明显的升高。结论:间断的轴向力学负载能够促进小鼠椎间盘内软骨细胞退变和基质分解酶的表达,从而诱导小鼠腰椎间盘退变的发生和发展,且其对肾虚小鼠腰椎间盘能造成更为严重的椎间盘退变。

[关键词] 肾虚;椎间盘退变;热板鼠笼;轴向力学负载

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)01-0013-05

Experimental Study on the Intervertebral Disc Degeneration Induced by Spinal Axial Loading in Mice with Kidney Deficiency

LAO Yangjun¹ QIU Yidan² XU Bin¹ SHENG Hongfeng¹

ZHANG Shuliang¹ LIU Yiyang¹ SHEN Lifeng¹ WU Chengliang²

¹Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China;

²Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.

Abstract Objective: To investigate the efficacy of intermittent spinal axial mechanical loading induced by self-made hot plate cage on lumbar intervertebral disc degeneration in mice with kidney deficiency. **Methods:** Thirty-six 16 months-old mice were randomly divided into kidney deficiency model group, model group and control group with 12 mice in each group. The mice of kidney deficiency model group and model group were put into the self-made hot-plate cage at the same time every day, the control group was not treated. Histological differences of lumbar intervertebral disc in three groups were compared by HE and ABH staining, and the type Ⅱ Collagen was detected by immunohistochemistry to explain the different conditions of intervertebral disc degeneration in the three groups of mice after modeling for 1 month and 3 months respectively. **Results:** The results of staining showed that the height of intervertebral disc in model group and kidney deficiency model group was significantly lower than that in control group. The cartilage endplates in the model group and the kidney deficiency model group were more ossified than those in the control group. The aging of intervertebral disc cartilage in model group and kidney-deficiency model group was higher than that in control group, and the degeneration of

nucleus pulposus in kidney-deficiency model group was more serious, and the positive staining was higher than that in model group. **Conclusion:** Intermittent spinal axial mechanical loading can promote the degeneration of chondrocyte and increase expression of decomposing enzyme in intervertebral disc of mice, which induce the initiation and development of lumbar disc degeneration in mice. And it can cause more serious intervertebral

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81573994)

国家自然科学基金资助项目(81804113)

浙江省中医药科技计划项目(2017ZA017)

浙江省基础公益研究计划项目(LGF19H60007)

¹ 浙江省立同德医院(杭州, 310012)

² 浙江中医药大学

disc degeneration in kidney deficiency mice.

Keywords: kidney deficiency; intervertebral disc degeneration; hot plate cage; spinal axial loading

随着人类老龄化和不健康的作息方式,越来越多的人正遭受着椎间盘退变所带来的痛苦,造成生活质量的下降。传统医学认为,腰痛,有风、有湿、有寒、有热、有挫闪、有瘀血、有滞气、有痰积,皆标也,肾虚,其本也。因此,肾虚是传统医学治疗腰痛的突破点。

肾虚椎间盘退变模型是探究人类椎间盘退变机制和药物治疗的关键^[1],小鼠是一种理想的实验动物^[2-4]。因此我们采用自制的热板鼠笼使肾虚小鼠自发跳跃,并观察肾虚小鼠腰椎间盘的退变情况。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

16个月龄 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠 36 只,体质量(30.00 ± 0.73)g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,实验动物合格证号 SCXK(沪)2003-0016。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

1.2 实验试剂和仪器

II 型胶原兔抗鼠抗体(美国 abcam 公司),自制的热板鼠笼,EC350-1 型石蜡包埋机(美国 Thermo 公司),Tissue-Tek VIP5Jr 型组织脱水机(日本 Sakura 公司),HM325 型组织切片机(美国 Thermo 公司)、Scope A1 光学显微镜(德国 ZEISS 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与造模

将 36 只 16 月龄老年健康 SPF 级小鼠随机分为对照组、模型组与肾虚模型组,每组 12 只。肾虚模型组小鼠行双侧卵巢切除术,待 2 周恢复后,每日 10:00,15:00,19:00 将模型组与肾虚模型组小鼠放入自制热板鼠笼中,打开热板并设定温度为 50°C ,若干分钟后,小鼠不堪笼底高温开始跳跃,从第 1 只小鼠跃起开始计时,10 min 左右后小鼠力竭不再跳跃时,将小鼠放回普通饲养鼠笼中(图 1)。对照组小鼠不做任何处理。

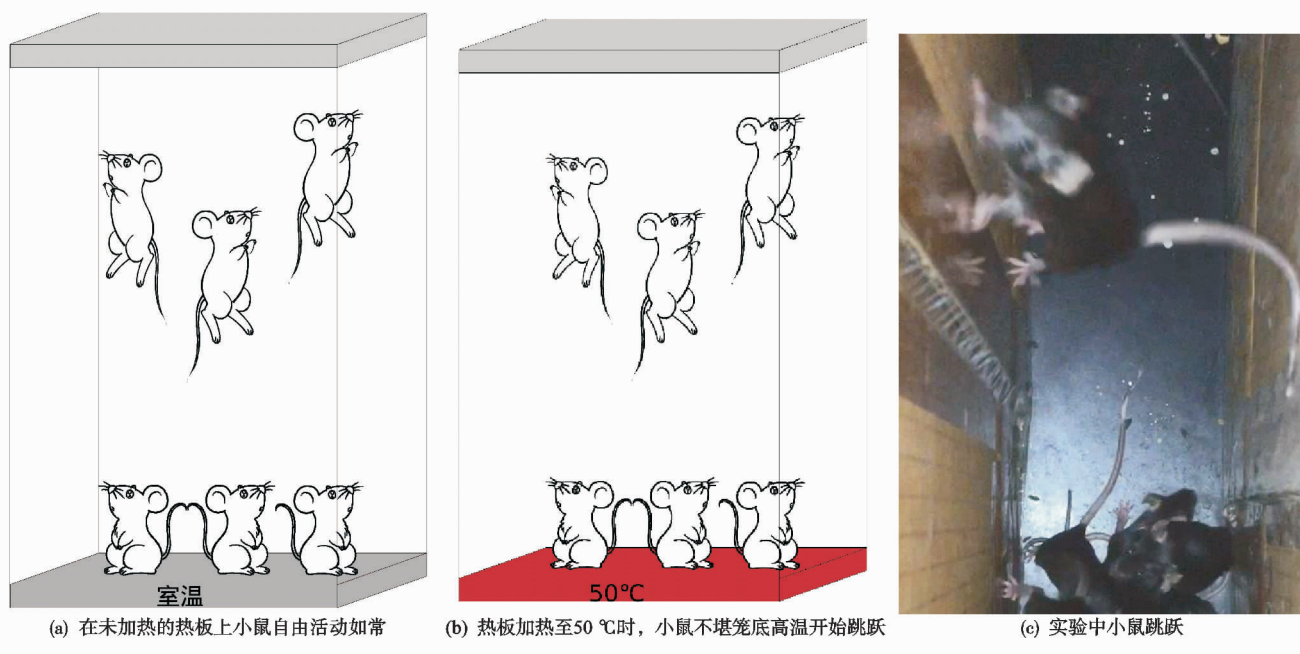


图 1 自制热板鼠笼诱导小鼠跳跃示意图

2.2 动物取材

分别于造模 1 个月及 3 个月后,从对照组、模型组与肾虚模型组分别随机取 6 只小鼠进行脱颈椎处死,取出其 $L_3 \sim L_4$ 脊柱节段,用 4% 多聚甲醛固定 72 h。清水冲洗后,用 20% 的乙二胺四乙酸脱钙 4 周,每周换液 3 次。脱水、透明、包埋后连续冠状位切片,厚度为 $3\ \mu\text{m}$ 。

2.3 腰椎间盘组织形态学观察

对标本分别进行苏木精-伊红(HE)染色、阿尔新

蓝苏木素橘红(ABH)染色。HE 染色: 60°C 烘片过夜,常规脱蜡至水,苏木精染色 1 min 后,用蒸馏水洗至不再褪色, PBS 浸泡 1 min,用蒸馏水洗 3 遍,伊红染色 1 min 后常规脱水透明封片。ABH 染色: 60°C 烘片过夜后,常规脱蜡至水,盐酸乙醇分化 30 s 后,用阿尔新蓝染色 10 min,蒸馏水洗至不再褪色,盐酸乙醇分化 3 s,快速漂洗后氨水蓝化 15 s,蒸馏水漂洗后用 95% 乙醇浸泡 1 min,苏木素橘红染色 1 min 后,常规脱水透明封片。光学显微镜下进行组织形态学观察

并摄片。

2.4 腰椎间盘组织免疫组化染色

同样 60℃ 烘片过夜后,常规脱蜡至水,3% 过氧化氢(H_2O_2)中浸泡 20 min 后 PBS 清洗 4 遍,在含有 0.2 g 胃蛋白酶的 0.01 mol/L 的盐酸 HCl 溶液中修复抗原 50 min 后 PBS 洗 4 遍,羊血清(1:20)封闭非特异性抗原 20 min 后加入 II 型胶原抗体(1:100)4℃ 过夜,室温放置 30 min,PBS 洗 10 min,在生物素标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000)中室温孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,DAB 显色剂显色,苏木素复染,常规脱水透明,中性树胶封片。在 200 倍光学显微镜下观察各个标本,棕黄色为阳性染色。

2.5 椎间盘形态学测量

在光学显微镜下拍摄模型组与对照组每个椎间盘正中冠状面标本的照片(100×),将获得的图片导入制图软件中,用制图软件测量冠状位髓核中点高度和软骨终板中点厚度。

2.6 统计学方法

采用 SPSS13.3 软件进行统计分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用非配对 t 检验分析。

3 结果

从造模开始至实验结束,各组小鼠均未出现死亡。造模 1 个月后,对照组小鼠体质量为(30.30 ± 1.11)g,模型组小鼠体质量为(29.97 ± 0.62)g,肾虚模型组小鼠体质量为(30.72 ± 1.23)g,三组小鼠体质量相近,差异无统计学意义($F=0.83, P=0.45$);造模 3 个月后,对照组小鼠体质量为(31.68 ± 1.39)g,模型组小鼠体质量为(30.60 ± 0.58)g,肾虚模型组小鼠体质量为(30.38 ± 1.15)g,三组小鼠体质量相近,差异无统计学意义($F=2.43, P=0.12$)。

3.1 腰椎间盘组织病理学结果

HE 染色显示,对照组标本腰椎间盘基本正常,其椎间盘由规则排列于外的纤维环、中央的髓核和上下软骨终板构成。外层纤维环排列规则,基本呈同心圆逐层分布,内层纤维环逐渐向髓核过渡,髓核均匀地被纤维环所包裹,软骨终板内可见软骨细胞密集,终板钙化层较薄。模型组和肾虚模型组腰椎间盘已可见退行性改变,3 个月组较 1 个月组更为明显,而肾虚模型组与模型组之间的差异较小,但与对照组相比都出现了较为明显的椎间盘退变现象:椎间盘纤维环裂隙,板层结构稍紊乱,排列较不规则,髓核破坏或皱缩,终板内出现多个骨化中心,严重的终板已被骨组织所替代,见图 2。

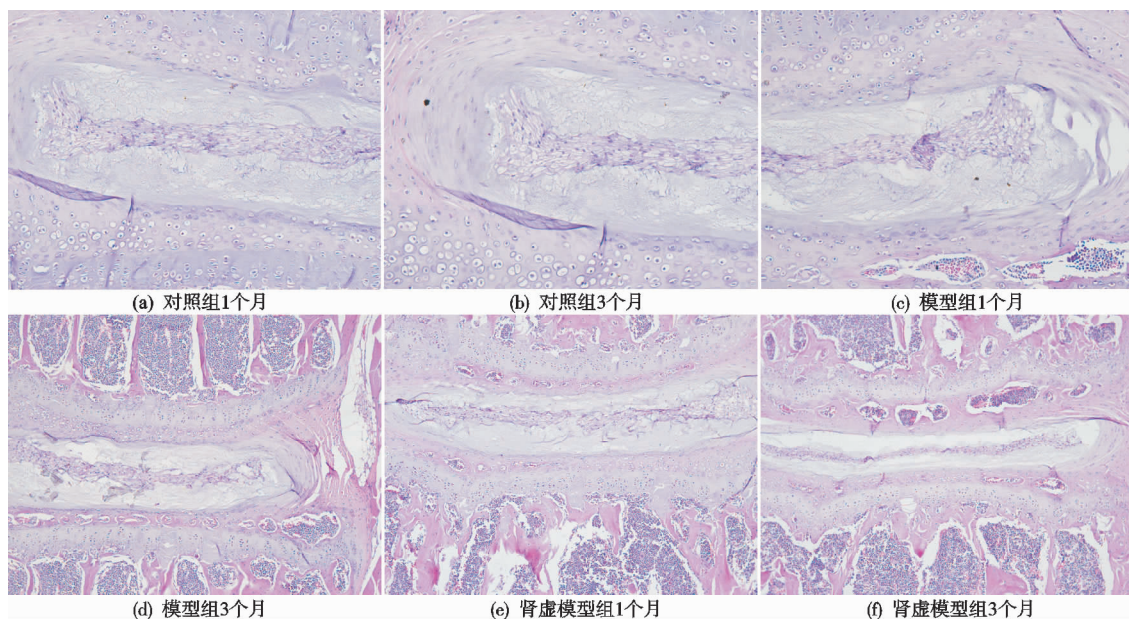


图 2 小鼠椎间盘组织 HE 染色(100×)

ABH 染色结果显示,对照组软骨终板细胞排列基本整齐,软骨终板内蓝染的软骨细胞数目比较多,软骨基质染色较深,部分椎间盘软骨终板内存在较少呈红染的骨化中心,但骨化中心形态较小;模型组与肾虚模型组椎间盘标本均出现软骨终板细胞排列较为混乱,细胞数目明显减少,且软骨基质染色变浅软骨终板出现了多个骨化中心,骨化中心形态较大,严重的甚至出现骨化成片,替代了原本的软骨细胞,而肾虚模型组与

模型组之间椎间盘形态差异不大,见图 3。

3.2 腰椎间盘免疫组织化学结果

II 型胶原染色结果显示,对照组无论 1 个月、3 个月,II 型胶原的阳性表达细胞在样本的髓核、纤维环、及软骨终板中均有分布。而在造模 1 个月后,与对照组相比,模型组椎间盘样本在 II 型胶原的表达上与对照组相比稍有下降但不是非常明显,而肾虚模型组与对照组相比则在 II 型胶原阳性细胞的数量上减少,模

型组与肾虚模型组在Ⅱ型胶原表达上差异较小;在造模3个月之后,此番变化更为明显,与对照组相比,模型组与肾虚模型组样本在Ⅱ型胶原的表达上均有下降,且在肾虚模型组更为显著,见图4。

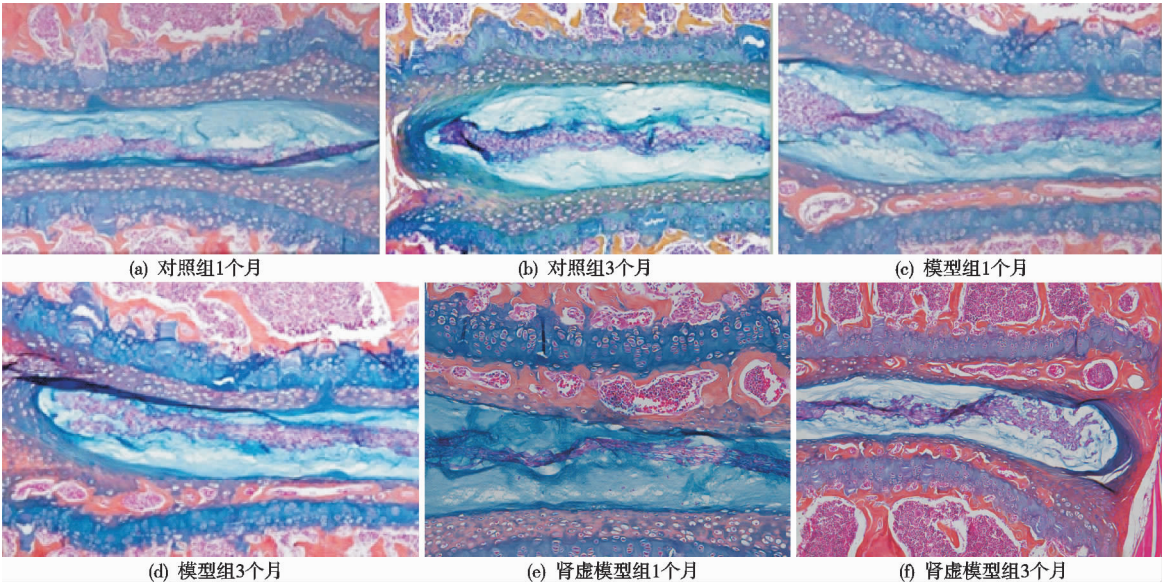


图3 小鼠椎间盘组织 ABH 染色(100×)

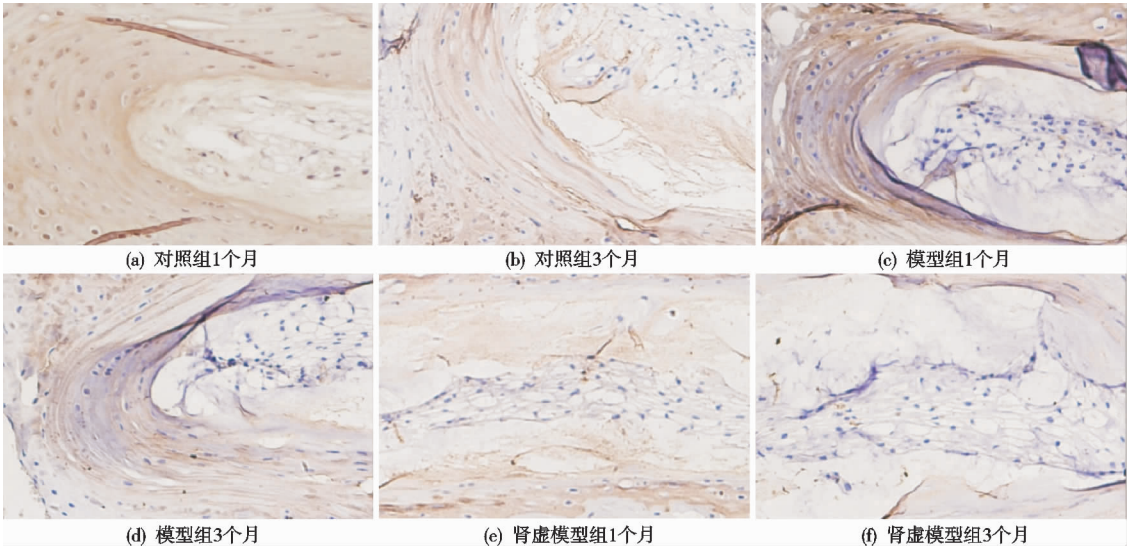


图4 小鼠椎间盘Ⅱ型胶原免疫组织化学染色(400×)

3.3 组织形态学检测结果

三组小鼠椎间盘高度比较如表1所示,造模1个月 后模型组与肾虚模型组椎间盘高度较对照组显著下 降,差异有统计学意义($P=0.034,0.009$);造模3个 月后,模型组与肾虚模型组椎间盘高度较对照组下降, 差异有统计学意义($P=0.024,0.011$)。

表1 三组小鼠椎间盘高度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	椎间盘高度/mm	
		造模1个月 后	造模3个月 后
对照组	6	0.924±0.161	0.839±0.135
模型组	6	0.676±0.202	0.626±0.103
肾虚模型组	6	0.613±0.114	0.597±0.151

4 讨论

本实验观察了由热板鼠笼产生的轴向负载对肾虚 小鼠椎间盘退的影响,探究用此方法来建立肾虚腰椎

间盘退变小鼠模型的可行性。选用此方法来造模的初 衷是因为现有的肾虚椎间盘退变在腰椎上的力多为对 称或不对称的静力,小鼠相关脊柱节段没有自主活动 的能力,这与人类在日常生活中发生椎间盘退变的机 制相悖^[5-9]。虽然通过针刺损伤椎间盘诱导退变的造 模方法可以获得许多动物如小鼠^[10,11]、大鼠^[12]、兔^[9] 椎间盘退变模型,但是人类椎间盘退变是一个随年龄 增大而进展的复杂过程,而针刺动物椎间盘是一次性 的急性损伤,其椎间盘在被针刺之前,软骨终板有良 好的血供和细胞微环境,因此此类模型最适用于模拟 有外伤后的椎间盘退变患者,是否真正适用于模拟人 类椎间盘退变还有待研究^[13]。笔者建立了热板诱导 肾虚小鼠跳跃的模型,促使小鼠主动地直立并且不断 跳跃,产生轴向负载来诱导椎间盘退变。

传统医学治疗腰痛基于其自身对腰痛独特的认识

理论。《素问·脉要精微论》曰“腰者，肾之府，转摇不能，肾将惫矣”，揭示了“肾”与腰之间的密切联系，提示腰部出现“转摇不能”的功能障碍时，归因于“肾将惫矣”。中医学强调“邪之所凑，其气必虚”。同样地，中医学对腰痛的认识亦遵循该原则，认为腰痛的发生虽与风、寒、湿、外伤、劳损、瘀血、气滞等多种致病因素相关，但其根本原因为“肾虚”，上述致病因素均在“肾虚”的基础上侵袭人体而致腰痛，即形成了“腰痛以肾虚为本，纵属实邪，应每在肾虚的基础上受邪”的认识理论，正如《证治准绳》所言，腰痛“有风、有湿、有寒、有热、有挫闪、有瘀血、有滞气、有痰积，皆标也；肾虚，其本也”。因此，肾虚是腰痛的根本病机，“肾虚腰痛”是中医药辩证腰痛的理论基础。相关动物实验也证明了肾虚与椎间盘退变呈一定的相关性，去卵巢的实验动物在一段时间后将会出现椎间盘退变、骨质疏松，并在组织病理学、分子细胞生物学等方面的表现与临床肾虚型椎间盘退变相似的情况^[14-16]。通过本实验的探究，从一定程度解释了肾虚腰痛的原因，为传统医学治疗肾虚腰痛研究中模型动物的选择提供了一种可选方案。

参考文献

- [1] 劳杨骏,徐涛涛,杨笑奇,等.小鼠椎间盘退变模型的构建策略[J].中国中医急症,2015,24(10):1783-1786.
- [2] 余城墙,张宇,谢程欣,等.椎间盘退变分子生物学机制及再生治疗的优势与未来[J].中国组织工程研究,2019,23(30):4889-4896.
- [3] SHOWALTER B L,BECKSTEIN J C,MARTIN J T,et al. Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: torsion mechanics and collagen content [J]. Spine (Phila Pa 1976),2012,37(15):900-907.
- [4] 张驰,吕浩源,章晓云,等.长非编码 RNA 在椎间盘退变中的机制[J].中国组织工程研究,2019,23(27):4280-4285.
- [5] SAKAI D,NISHIMURA K,TANAKA M,et al. Migration of bone marrow-derived cells for endogenous repair in a new tail-looping disc degeneration model in the mouse;a

- pilot study[J]. Spine J,2015,15(6):1356-1365.
- [6] PAPUGA M O,KWOK E,YOU Z,et al. TNF is required for the induction but not the maintenance of compression-induced BME signals in murine tail vertebrae: limitations of anti-TNF therapy for degenerative disc disease[J]. J Orthop Res,2011,29(9):1367-1374.
- [7] HSIEH A H,LOTZ J C. Prolonged spinal loading induces matrix metalloproteinase-2 activation in intervertebral discs [J]. Spine (Phila Pa 1976),2003,28(16):1781-1788.
- [8] LIU L T,HUANG B,LI C Q,et al. Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate[J]. PloS One,2011,6(10):e26285.
- [9] CALVO-ECHENIQUE A,CEGONINO J,CORREA-MARTIN L,et al. Intervertebral disc degeneration;an experimental and numerical study using a rabbit model[J]. Med Biol Eng Comput,2018,56(5):865-877.
- [10] TAM V,CHAN W C W,LEUNG V Y L,et al. Histological and reference system for the analysis of mouse intervertebral disc[J]. J Orthop Res,2018,36(1):233-243.
- [11] 劳杨骏,裴一丹,徐彬,等.轴向负载诱导小鼠椎间盘退变模型的建立[J].中医正骨,2019,31(5):1-6.
- [12] ZHANG J,LI Z,CHEN F,et al. TGF-beta1 suppresses CCL3/4 expression through the ERK signaling pathway and inhibits intervertebral disc degeneration and inflammation-related pain in a rat model [J]. Exp Mol Med,2017,49(9):e379.
- [13] SAKAI D,ANDERSSON G B. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions[J]. Nat Rev Rheumatol,2015,11(4):243-256.
- [14] 冯帅华,吴官保,杨屈,等.去卵巢致大鼠腰椎间盘退变模型初探[J].中国医学创新,2015,12(15):19-22.
- [15] 李震,张柳,穆树林,等.仙灵骨葆预防卵巢切除大鼠的腰椎间盘退变[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(15):2722-2726.
- [16] 姚长风,赵永见,牛凯,等.去卵巢致肾虚的腰椎间盘退变模型的实验研究[J].中国骨伤,2013,26(12):1015-1022.

(收稿日期:2019-07-03)

(上接第 12 页)

- [16] EARLL M,WAYNE J,BRODRICK C,et al. Contribution of the deltoid ligament to ankle joint contact characteristics;a cadaver study [J]. Foot & Ankle International,1996,17(6):317-324.
- [17] YABLON I G,HELLER F G,SHOUSE L. The key role of the lateral malleolus in displaced fractures of the ankle [J]. The Journal of Bone and Joint Surgery: American Volume,1977,59(2):169-173.
- [18] YANG Y,ZHOU X,ZHANG M,et al. Lateral wall osteotomy combined with embedded biodegradable implants for displaced intra-articular calcaneal fractures[J]. Journal

- of Orthopaedic Surgery and Research,2019,14(1):74-79.
- [19] 张宏宁,朱永展,李雪,等.踝关节骨折中外踝移位对距关节接触影响的三维有限元分析[J].中华创伤骨科杂志,2017,19(9):769-774.
- [20] 何勇,顾湘杰,马昕,等.胫腓下联合分离的生物力学研究[J].中华创伤骨科杂志,2005,7(10):943-947.
- [21] 张海波,张培勋,谢根成.合并下胫腓联合分离的踝关节骨折脱位诊治探讨[J].中华创伤杂志,2003,19(2):55-56.
- [22] 张晓猛,祁宝昌,鞠维娜,等.外踝骨折治疗的研究进展[J].中国老年学杂志,2017,37(1):220-222.

(收稿日期:2019-05-13)