

# 体内椎间盘退变动物模型的研究进展

王文轩<sup>1</sup> 朱立国<sup>2</sup> 董博<sup>3△</sup> 陈延武<sup>1</sup> 袁普卫<sup>3</sup> 康武林<sup>3</sup> 刘德玉<sup>3</sup>

[关键词] 椎间盘退变;模型;体内;综述

[中图分类号] R681.5 [文献标志码] A [文章编号] 1005-0205(2020)11-0085-04

椎间盘退变(IDD)是一种随年龄增长、多种因素损伤后形成的复杂的退行性改变,IDD 过程中可发生多种病理变化,是引起腰痛和各种退行性脊柱疾病的主要原因之一。伴随着当代人生活习惯和工作方式的变化,其患者数量和发病率均呈现升高趋势<sup>[1]</sup>,发病人群也趋于年轻化,尤其是长时间处于坐位的人群。研究表明不少于 40% 的患者出现腰痛与 IDD 密不可分<sup>[2]</sup>,这也是腰部疼痛复发的基础病理所在<sup>[3]</sup>。

通过构造动物模型,并在此基础上研究退变机制及有效治疗手段,已经成为研究本病的主要方法,以往的研究者所选择的动物种类以鼠和兔居多。鼠模型多选择鼠尾椎间盘作为研究主体,但是鼠尾椎间盘体积太小、不易进行取材操作,并且在骨性结构和椎旁肌肉韧带方面与人体差异过大,限制了鼠在 IDD 模型中的应用。相比之下兔的椎体骨性结构、椎旁肌肉、椎间盘体积更接近人类,所以被更多人选择。目前体内 IDD 模型的构建方法主要包括异常应力型、椎间盘损伤型、自发退变型、缺血型等。

## 1 异常应力型

正常状态下的椎间盘具有联合椎骨共同承受压力负荷、缓冲震荡冲击、保护脊髓等作用<sup>[4]</sup>,并且有利于维持正常的脊柱生理曲度。压力载荷对于椎间盘的生理特性具有明显的调控与影响作用,已有文献通过流行病学研究得出结论,正常范围内的机械压力是维持椎间盘细胞的正常状态所必需<sup>[5-8]</sup>,异常应力可导致慢性累积性损伤,与 IDD 有明显关联,其所受机械负荷压力过大或者受力不均都是导致 IDD 的重要因素,异常应力型更接近大多数患者的 IDD 过程。

## 1.1 轴向加压型

对椎间盘进行轴向加压主要模拟人类的直立行走姿势下负重对椎间盘的轴向载荷,按此构思进行造模时,通常选择牵引针联合加压装置对动物相邻椎体施加压力,或使四肢行走的实验动物固定于特制容器内保持直立位,使椎间盘受压缩应力增加,从而诱导实验动物发生应力型 IDD。穿刺椎体进行加压时可能刺破腹后壁血管或伤及椎间盘、相邻椎体上的牵引针可能不完全平行导致目标椎间盘受压力不均甚至椎体出现骨折线,以及术后出现的伤口感染和伤及脊髓引起的大小便失禁、后肢瘫痪等,通过多次 X 线透视引导后在椎体中央定位并穿刺可减少这些情况的发生率。

熊鑫茗等<sup>[9]</sup>采用克氏针横穿白兔腰 4、腰 5 椎体后安装自制的在体加压装置,持续施加目标数值的压力后与纤维环损伤的动物模型组进行对比,发现轴向加压构造的退变模型标本中椎间盘各区域退变程度相比于纤维环损伤组更加均匀,且在退变过程中椎间盘各组成成分变化的趋势与正常人体的退变大致符合,证明轴向压力装置可以将白兔成功造模,尤其在轻中度 IDD 模型方面更有优势。郭江波等<sup>[10]</sup>使用自制的外固定装置固定大鼠尾椎后,各分组进行不同周期的持续加压以及加压后牵引,表明此方法可诱导大鼠尾椎发生 IDD,并且得出已发生加压后退变的椎间盘在低张力牵引后可以表现出很大的重建能力的结论。其他研究者<sup>[11-13]</sup>也通过外部牵引装置成功构造 IDD 模型。

## 1.2 脊柱失稳

维持脊柱正常的生理曲度主要依靠体内的动力平衡系统和静力平衡系统,动、静力平衡失调是发生脊柱生理曲度变化的主要因素,并进一步导致 IDD 的发生。通过切断椎旁肌肉群破坏目标节段各椎体的稳定性以加速椎间盘的退变,从而成功构造脊柱失稳型 IDD 模型。

肖志锋等<sup>[14]</sup>采用雌性小鼠进行操作,从棘突和椎

<sup>1</sup> 陕西中医药大学第一临床医学院(陕西 咸阳,712046)

<sup>2</sup> 中国中医科学院望京医院脊柱二科

<sup>3</sup> 陕西中医药大学附属医院骨科

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:297065203@qq.com

板向内侧横突剥离椎旁肌,显露背侧结构成分,用剪刀切除腰1至腰6节段各椎体棘突、棘上韧带、棘间韧带、双侧小关节等脊髓背侧成分后缝合,后期分析表明手术引起的脊柱不稳定可以引发小鼠发生IDD。其他研究者<sup>[15-17]</sup>也通过破坏脊柱稳定性成功构造IDD动物模型。

## 2 椎间盘损伤型

椎间盘作为椎体间的一种无血供组织,自身的能量供应来源与代谢废物排出均依靠邻近椎体上的骨性终板内的毛细血管进行转输,自身修复能力较差,通过直接损伤椎间盘可以有效的达到IDD的目的,包括纤维环穿刺法和髓核抽吸法。目前构建IDD动物模型最常被使用的是纤维环穿刺法,通过急性机械损伤诱导短期内发生IDD;穿刺后抽吸髓核也可使实验动物短期内发生IDD,但是人体IDD大多是一个慢性的、进行性发展的过程,与急性机械损伤并无太大关联,因此与人体仍存在较大差距,且穿刺后不适宜进行病变早期治疗干预。

### 2.1 纤维环穿刺

采用细针穿刺纤维环诱发IDD,乃是目前构建体内IDD模型的最常见造模方法,主要是由于该方法操作简单,创伤小,易于完成且可进行多次、多节段穿刺造模。Ashinsky等<sup>[18]</sup>使用骨骼成熟的新西兰兔,麻醉后在背部正中中线旁切开皮肤并向下滑离,暴露腰2至腰7节段的椎体和椎间盘,随后将克氏针插入已暴露节段各椎间盘前缘的纤维环内5 mm,并旋转针身360°后拔出,为确保对椎间盘造成足够的损伤,每次穿刺后必须在针尖上观察到附着的髓核组织。分别于术后第2,4,8,12周处死家兔并进行分析,证明采用新西兰兔进行纤维环穿刺可以成功诱导IDD模型。苏凌浩等<sup>[19]</sup>选择健康的杂交犬进行实验,造模前对每只实验犬的腰3至腰7节段各椎间盘进行MRI检测,确保造模前椎间盘均为未退变的健康椎间盘,麻醉后行腹部正中切口,翻出肠管并分离椎体前肌肉群,使用穿刺针刺入腰1至腰7节段各椎间盘纤维环5 mm后出针,穿刺后4周MRI测定证明纤维环穿刺法对杂交犬椎间盘可造模成功。另有其他研究者也使用纤维环穿刺法进行IDD动物造模<sup>[20-24]</sup>,分析证明纤维环穿刺后IDD模型构造成功。

### 2.2 髓核抽吸

在椎间盘发生退变的过程中髓核细胞的增殖能力降低而凋亡增加,致使组织修复能力不足,髓核细胞的数量明显减少,故可用髓核抽吸法构建IDD模型。

白亦光等<sup>[25]</sup>选择白兔进行实验,麻醉后行腹部正中切口,逐层分离至椎体前缘暴露腰1至腰7节段各椎间盘,注射器连接穿刺针头刺入纤维环5 mm,回抽

针筒持续15 s,抽出少量髓核组织后出针,MRI检查显示自术后4周起出现明显退变,造模成功。Wayne等<sup>[26]</sup>选择14周龄的大鼠麻醉后切开前腹壁,分离腹腔脏器组织后暴露腰椎节段的两个相邻椎间盘,针刺并抽吸椎间盘中相同体积的髓核,后经影像学测定其发生退变,造模成功。其他研究者<sup>[19,27-28]</sup>也使用抽吸髓核的方法成功诱导实验动物发生IDD。

## 3 自发退变型

自发型IDD又称增龄性退变,主要采用可随月龄增长而自发发生IDD的动物进行造模,该方法操作简单、无创伤、最接近正常椎间盘的退变过程,但由于实验周期长而可能受到饮食和饲养条件的影响。

朱立国等<sup>[29]</sup>选择2个月和7个月龄长爪沙鼠在相同条件下分别喂养至7个月和12个月龄,观察发现所有沙鼠椎间盘均发生退变,证明长爪沙鼠的椎间盘的增龄性变化可以用来构造IDD模型。Johann等<sup>[30]</sup>在研究中将新西兰兔按照1,6,30个月龄进行组织学比较,证明与兔月龄相关的自发性IDD模型具有可靠性。姜晓华等<sup>[31]</sup>选择3个月龄豚鼠进行喂养,分别于3,6,9,12个月龄时处死并观察分析,证明与豚鼠相关的增龄性IDD模型可自发进行。其他研究者<sup>[32]</sup>也选择随年龄增长而自发退变的动物进行研究并验证其成功退变。

## 4 缺血模型

椎间盘是一个无血管组织,椎间盘本身并没有血管充当其营养输送通道,当椎间盘发生退变的过程中,骨性终板下的毛细血管数量逐渐变少,血管直径逐渐变细,说明阻断终板营养通路构建缺血型IDD模型具有理论可能性。缺血型模型的构造过程对操作者要求较高,并且会发生侵入性创伤相关情况,故应用受限。

尹思等<sup>[33]</sup>选择雌性关中山羊,麻醉后在腰2至腰4节段的椎间盘终板下2 mm处破坏椎体骨质形成骨缺损,缺损处使用骨水泥进行填补,实验结束后与同一个体的邻近椎间盘进行比较,证实阻断终板营养通路能够成功构造山羊缺血型IDD模型。康然等<sup>[34]</sup>选择未成熟的丹麦猪幼猪,在椎体的顶部和底部通过钻孔并刮除骨质形成了一个片状缺损,缺损区域平行且靠近终板,然后用骨水泥填充缺损区。3个月后MRI和组织学研究证明了骨水泥可严重干扰终板营养途径并导致缺血型IDD。袁伟等<sup>[35]</sup>选择骨骼发育成熟的大鼠,在X线透视引导下于第七与第八尾椎椎间盘后方3 mm处用穿刺针及注射器将30  $\mu$ L无水乙醇注入椎体骨髓,使酒精充分扩散1 min后出针。数月后检测证明此方法可成功构造大鼠尾椎IDD模型。

## 5 其他模型

孟祥超等<sup>[36]</sup>将敲除髓核细胞缺氧诱导因子1 $\alpha$ 基

因的小鼠与对照组比较,发现基因敲除的小鼠更早发生 IDD。部分研究者<sup>[37-38]</sup>选择雌性小鼠或大鼠麻醉后切除双侧卵巢,数月后检测表明椎体出现明显的骨质疏松以及 IDD。酶化学损伤法虽然能够模拟退变过程中一些蛋白成分的变化,但注射制剂之前的针刺纤维环步骤本身就是一种造模方法,所选择的药物或者制剂也可能会对后期检测产生干扰。部分研究者<sup>[39-41]</sup>分析了剪切应力和轴向旋转力对离体模型 IDD 过程的影响,但与此构思相关的体内模型研究较少,其可行性仍需进一步探讨。有研究者分析了腰椎间盘突出症患者的中医证型与椎间盘 MRI Pfirrmann 分级的对应关系,但相关文献较少,需进一步验证。

在研究 IDD 退变机制及治疗方法的过程中,已有的鼠和兔为主的体内 IDD 动物模型成为研究者主要的选择,模型构造方法各有其优劣势,目前没有能够完美模拟人体 IDD 过程的造模方法,但可以根据不同的研究目标选择不同的造模方法。无论选择何种模型,都应按照影像学及组织学评价标准进行评价以确保造模成功,为椎间盘的相关研究和治疗提供便利。由于 IDD 过程不可逆,故早期诊断及治疗干预尤为重要,异常应力型、自发退变型可研究早期治疗干预手段;椎间盘损伤型、缺血型可研究剧烈创伤后的 IDD;按照患者椎间盘影像学分级与中医证型进行对照评价,需要进一步探索不同证型的 IDD 的中医特色干预手段。

## 参考文献

- [1] FUJITA N, ISHIHARA S, MICHIKAWA T, et al. Potential association of metabolic and musculoskeletal disorders with lumbar intervertebral disc degeneration [J]. J Orthop Sci, 2020, 25(3): 384-388.
- [2] COLOMBIER P, CLOUET J, HAMEL O, et al. The lumbar intervertebral disc: from embryonic development to degeneration [J]. Joint Bone Spine, 2014, 81(2): 125-129.
- [3] ZHENG C J, CHEN J. Disc degeneration implies low back pain [J]. Theor Biol Med Model, 2015, 12(1): 687-688.
- [4] SUN F, QU J N, ZHANG Y G. Animal models of disc degeneration and major genetic strategies [J]. Pain Physician, 2013, 16(3): 267-275.
- [5] BIAN Q, MA L, JAIN A, et al. Mechanosignaling activation of TGF- $\beta$  maintains intervertebral disc homeostasis [J]. Bone Res, 2017, 5(1): 27-40.
- [6] 韩聪, 赵耀东, 朱玲, 等. 基于椎间盘退变生物力学探讨腰椎间盘突出症发病机制 [J]. 中医临床研究, 2020, 12(1): 47-50.
- [7] JOHANNESSEN W, VRESILOVIC E J, WRIGHT A C, et al. Intervertebral disc mechanics are restored following cyclic loading and unloaded recovery [J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(1): 70-76.
- [8] 郭团茂, 行艳丽, 朱海云. 早中期腰椎间盘退变机制及独活寄生汤治疗的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(15): 41-43.
- [9] 熊鑫茗, 邵增务, 郭兵, 等. 可控轴向压力致免腰椎间盘退变模型的建立及评价 [J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(19): 1492-1496.
- [10] GUO J B, CHE Y J, HOU J J, et al. Stable mechanical environments created by a low-tension traction device is beneficial for the regeneration and repair of degenerated intervertebral discs [J]. Spine J, 2020, 20(6): 1529-1559.
- [11] CHE Y J, GUO J B, LIANG T, et al. Controlled immobilization-traction based on intervertebral stability is conducive to the regeneration or repair of the degenerative disc: an in vivo study on the rat coccygeal model [J]. Spine J, 2019, 19(5): 920-930.
- [12] 肖良, 徐宏光, 沈祥. 张力载荷诱导下兔椎间盘退变体内模型的建立及意义 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(12): 1877-1882.
- [13] 王宇翔, 徐海栋. 艾拉莫德对功能退变椎间盘细胞炎症因子表达的影响 [J]. 医学研究生学报, 2019, 32(4): 341-345.
- [14] XIAO Z F, SU G Y, HOU Y, et al. Mechanics and biology interact in intervertebral disc degeneration: a novel composite mouse model [J]. Calcif Tissue Int, 2020, 106(4): 401-414.
- [15] LIU Q, YANG Z, LIU Y, et al. Cervical spinal instability causes vertebral microarchitecture change and vertebral endplate lesion in rats [J]. J Orthop Res, 2019, 10(5): 214-231.
- [16] LIU S, CHENG Y, TAN Y, et al. Ligustrazine prevents intervertebral disc degeneration via suppression of aberrant TGF- $\beta$  activation in nucleus pulposus cells [J]. Biomed Res Int, 2019, 15(10): 734-742.
- [17] BIAN Q, MA L, JAIN A, et al. Mechanosignaling activation of TGF- $\beta$  maintains intervertebral disc homeostasis [J]. Bone Res, 2017, 5(1): 27-40.
- [18] ASHINSKY B G, GULLBRAND S E, BONNEVIE E D, et al. Multiscale and multimodal structure-function analysis of intervertebral disc degeneration in a rabbit model [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27(12): 1860-1869.
- [19] 苏凌浩, 裴世深, 应金威, 等. 功能化自主装多肽 RADKPS 水凝胶对犬椎间盘退变的延缓作用 [J]. 山东医药, 2019, 59(34): 34-37.
- [20] SHELDRICK K, CHAMOLI U, MASUDA K, et al. A novel magnetic resonance imaging postprocessing technique for the assessment of intervertebral disc degeneration-correlation with histological grading in a rabbit disc degeneration model [J]. JOR Spine, 2019, 2(3): 1060-1067.
- [21] WATANABE A, MAINIL-VARLET P, DECAMBRON A, et al. Efficacy of HYADD® 4-G single intra-discal in-

jections in a rabbit model of intervertebral disc degeneration[J]. Biomed Mater Eng, 2019, 30(4): 403-417.

[22] URA K, SUDO H, IWASAKI K, et al. Effects of intradiscal injection of local anesthetics on intervertebral disc degeneration in Rabbit Degenerated Intervertebral Disc[J]. J Orthop Res, 2019, 37(9): 1963-1971.

[23] BANALA R R, VEMURI S K, DAR G H, et al. Efficiency of dual siRNA-mediated gene therapy for intervertebral disc degeneration (IVDD) [J]. Spine J, 2019, 19(5): 896-904.

[24] LI K, LV C. Intradiscal injection of sesamin protects from lesion-induced degeneration [J]. Connect Tissue Res, 2019, 20: 1-10.

[25] 白亦光, 韩小伟, 张旭乾, 等. 穿刺抽吸法诱导兔椎间盘退变模型[J]. 川北医学院学报, 2013, 28(2): 91-94.

[26] WAYNE M, SANFORD E, ANDERBERG L, et al. Olfactory stem cells can be induced to express chondrogenic phenotype in a rat intervertebral disc injury model[J]. Spine J, 2009, 9(7): 585-594.

[27] 张继业, 舒永辉, 朱权, 等. 兔腰椎小关节退变在退行性腰椎侧凸发病中的作用[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(8): 993-997.

[28] RUDNIK-JANSEN I, TELLEGEN A, BEUKERS M, et al. Safety of intradiscal delivery of triamcinolone acetonide by a poly(esteramide) microsphere platform in a large animal model of intervertebral disc degeneration[J]. Spine J, 2019, 19(5): 905-919.

[29] 朱立国, 张平, 宋庆慧, 等. 补肾活血方对沙鼠增龄过程中腰椎软骨终板钙化干预作用的初步研究[J]. 中国骨伤, 2017, 30(10): 926-932.

[30] JOHANN C, POT-VAUCEL M, GRIMANDI G, et al. Characterization of the age-dependent intervertebral disc changes in rabbit by correlation between MRI, histology and gene expression[J]. BMC Musculoskelet Disor, 2011, 12(1): 147-155.

[31] JIANG X H, TIAN F, WANG W, et al. Effect of calcitonin pretreatment on naturally occurring intervertebral disc degeneration in guinea pig[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(7): 10367-10379.

[32] ZHANG Y G, SUN Z M, LIU J T, et al. Features of intervertebral disc degeneration in rat's aging process [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2009, 10(7): 522-527.

[33] 尹思, 杜恒, 赵为公, 等. 阻断双侧终板营养途径构建山羊椎间盘退变模型[J]. 临床骨科杂志, 2020, 23(1): 145-150.

[34] KANG R, LI H, RINGGAARD S, et al. Interference in the endplate nutritional pathway causes intervertebral disc degeneration in an immature porcine model[J]. Int Orthop, 2014, 38(5): 1011-1017.

[35] YUAN W, CHE W, JIANG Y Q, et al. Establishment of intervertebral disc degeneration model induced by ischemic sub-endplate in rat tail[J]. Spine J, 2015, 15(5): 1050-1059.

[36] 孟祥超, 刘卓超, 王君, 等. MicroRNAs 在缺氧诱导因子 1 $\alpha$  缺失椎间盘组织中的差异性表达[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(7): 940-946.

[37] XIAO Z F, HE J B, SU G Y, et al. Osteoporosis of the vertebra and osteochondral remodeling of the endplate causes intervertebral disc degeneration in ovariectomized mice[J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1): 207-221.

[38] CHEN C H, CHEN W C, LIN C Y, et al. Sintered dicalcium pyrophosphate treatment attenuates estrogen deficiency-associated disc degeneration in ovariectomized rats[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 3033-3041.

[39] VAN RIJSBERGEN M M, BARTHELEMY V M, VRANCKEN A C, et al. Moderately degenerated lumbar motion segments; are they truly unstable? [J]. Biomech Model Mechanobiol, 2017, 16(2): 537-547.

[40] ZHU Q, GAO X, CHEN S, et al. Effect of intervertebral disc degeneration on mechanical and electric signals at the interface between disc and vertebra[J]. J Biomech, 2020, 104(10): 975-976.

[41] CHOU P H, WANG S T, YEN M H, et al. Fluid-induced, shear stress-regulated extracellular matrix and matrix metalloproteinase genes expression on human annulus fibrosus cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7(1): 34-41.

(收稿日期: 2020-05-18)

## 广告目录

1. 广东省医药进出口公司珠海公司	2. 陕西盘龙药业集团股份有限公司
同息通 ..... 封三	盘龙七片 ..... 封四