

腰椎椎间盘退行性变大动物模型的建立方法

唐家国^{1,2}, 于滨生^{2,3*}

1. 广州医科大学研究生院, 广东 511436

2. 深圳市脊柱外科重点实验室, 北京大学深圳医院脊柱外科, 广东 518036

3. 深圳市骨科疾病再生技术工程实验室, 北京大学深圳医院骨科研究中心, 广东 518036

【关键词】腰椎; 椎间盘退行性变; 模型, 动物; 综述文献

【中图分类号】R 681.533 【文献标志码】A 【文章编号】1672-2957(2017)05-0314-05

【DOI】10.3969/j.issn.1672-2957.2017.05.012

Methods for establishing lumbar intervertebral disc degeneration model in large animals

TANG Jia-guo^{1,2}, YU Bin-sheng^{2,3*}

1. Graduate School, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, Guangdong, China

2. Shenzhen Key Laboratory of Spine Surgery, Department of Spinal Surgery, Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen 518036, Guangdong, China

3. Shenzhen Engineering Laboratory of Orthopaedic Regenerative Technologies, Orthopaedic Research Center, Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen 518036, Guangdong, China

【Key Words】Lumbar vertebrae; Intervertebral disc degeneration; Models, animal; Review literature

J Spinal Surg, 2017, 15(5): 314-318

椎间盘退行性变(IDD)是脊柱外科的常见病和多发病,随着人口老龄化进程的加速,其发生率大幅上升^[1-2]。IDD是引起腰背痛的主要原因^[3-4],为了寻求治疗腰背痛的有效手段,IDD与椎间盘再生的基础研究近年来受到了广泛关注。由于穿刺或者椎间盘造影会破坏椎间盘完整性,加速退行性变,在人体上进行的椎间盘研究只能进行观察而不能开展直接干预的有创研究,而动物模型在许多方面可以模拟人体IDD的发生过程,从而可以开展直接干预研究。IDD模型种类繁多,但均有一定的局限性,大动物的椎间盘在解剖结构、生化及组织学上与人椎间盘具有相似性,是较为理想的用于IDD与再生治疗相关的研究模型^[5-8]。本文就牛、羊、猪、犬和猴等大动物IDD的建模方法作一综述。

1 大动物IDD模型的造模方法

1.1 纤维环损伤法

1.1.1 纤维环切割

椎间盘结构的破坏在IDD中起着决定性的作用,手术破坏椎间盘纤维环可以导致IDD。而纤维环切割模型是模仿纤维环周围裂隙,激发髓核及终板改变^[9],导致椎间盘出现退行性变表现。康然等^[10]的实验研究中,将猪全麻后(腹腔注射3%戊巴比妥 1.0 mL/kg),取侧卧位,切口从末节肋骨与脊柱交点前下方2.0 cm处开始,沿着腹膜后间隙暴露椎间盘前外侧,借助C形臂X线机透视定位,选择23号刀片平行于椎间隙切割纤维环(长度为17.0 mm)。术后2周出现明显的IDD表现。Melrose等^[11]通过类似的方法对美利奴羊的纤维环外层切开进行IDD的造模,术后3~6个月出现IDD的影像学和组织学表现。因此该造模方法能够建立较理想的IDD动物模型。同时猪动物模型的主要优势是椎间盘大小与人相似^[8],而且该方法手术操作相对简单,易于复制,模型个体间差异小,造模成功率高。

基金项目: 深圳市科创委资助项目(JCYJ20130402113615042, JCYJ20150403091443318)

作者简介: 唐家国(1989—), 硕士在读, 医师;
tangjiaguo3211@163.com

*通信作者: 于滨生 hpyubinsheng@hotmail.com

但是这种建模方法存在对动物伤害大、不易控制损伤程度、费用高等缺点,而且此方法单纯使用戊巴比妥腹腔注射或静脉注射,麻醉深度较难控制,效果不佳,对实验条件要求较高。

1.1.2 纤维环穿刺

彭俊等^[12]使用比格犬经2%戊巴比妥(1.0 mL/kg)静脉麻醉,取俯卧位,用穿刺针(16G)在C形臂X线机引导下经皮穿刺椎间盘,穿过对侧纤维环,维持穿刺针在纤维环内60 s,术后3个月出现IDD的影像学和组织学表现。谢林等^[13]使用肌内注射陆眠宁Ⅱ(0.2 mL/kg)将山羊进行全身麻醉,取侧卧位,通过C形臂X线机定位确定椎间隙,于椎体前外侧切开约0.6 cm的切口,分离组织,然后垂直于椎间盘插入套筒,再将2.5 mm克氏针插入椎间盘内1.0 cm处,拔出克氏针及套筒,彻底止血后关闭切口。术后2个月出现IDD影像学和组织学表现。以上两种造模方法分别借鉴了脊柱外科中经皮穿刺及通道下手术的微创技术,克服了纤维环切开法和普通针头穿刺纤维环的缺点,具有模型制作过程简单、时间短、损伤小、并发症少、成功率高、重复性强等优点。近期Lim等^[14]利用钻头通过侧前方腹膜外入路对绵羊椎间盘的损伤,成功对绵羊的椎间盘进行造模。该造模方法采用了脊柱外科常用的侧前入路经腹膜外的微创手术方式,以最小的创伤达到造模的目的。

纤维环损伤的造模方法见表1。虽然该方法有许多优点,但毕竟是通过损伤椎间盘结构来诱发IDD,该退行性变过程与椎间盘自然退行性变过程不尽相同,不能完全再现IDD的客观规律;另外建模时间相对较短,仅能初步了解此模型的早期指标改变,与人类IDD之间的相关性和可比性不明确。

表1 纤维环损伤的IDD造模方法

动物	造模方法	造模成功时间
猪 ^[10]	手术刀片切割纤维环	术后2周
美利奴羊 ^[11]	纤维环切开	术后3~6个月
比格犬 ^[12]	16G普通针头经皮穿刺纤维环	术后3个月
山羊 ^[13]	2.5 mm克氏针经通道下穿刺纤维环	术后2个月
绵羊 ^[14]	3.5 mm钻头经腹膜外入路损伤纤维环	术后2个月
山羊 ^[15]	4.5 mm钻头穿刺纤维环	术后2个月

1.2 髓核损伤法

1.2.1 机械损伤

IDD的组织学和分子生物学基础为椎间盘内活

性细胞减少和细胞外基质(ECM)成分的变性、丢失。髓核内的主要ECM成分为Ⅱ型胶原和蛋白多糖,后者主要为硫酸化糖胺多糖(s-GAG)。Ⅱ型胶原能承受较高的压应力,而s-GAG可以结合水分,对维持椎间盘黏弹性有重要作用^[16]。ECM成分丢失、变性会导致椎间盘内水分含量下降,生物力学性能改变,黏弹性下降,进而在反复的应力作用下碎裂、塌陷及变扁^[17]。有研究用氯胺酮(11.0~33.0 mg/kg)和咪达唑仑(0.5 mg/kg)静脉注射,将去势的雄羊麻醉,然后经侧腹膜后入路暴露相应节段椎间盘,采用十字切口切开纤维环,使用2.0 mm髓核咬骨钳将大部分髓核组织摘除,逐层缝合创口,术后给予止痛、抗感染。术后4周开始出现明显的椎间隙降低、终板下骨质硬化等IDD表现^[18]。Woiciechowsky等^[19]借助脊柱外科的经椎间孔入路内窥镜技术对美利奴羊进行髓核摘除,术后6个月出现纤维环塌陷及IDD影像学表现。髓核摘除的方法操作相对简单,易于复制,造模成功率高,这种造模方法随着手术技术及器械的进步,对动物的伤害越来越小,但存在费用高、易导致椎体失稳等缺点。

1.2.2 化学损伤

正常椎间盘的胶状髓核主要由蛋白多糖(蛋白聚糖为主)、胶原(Ⅱ型胶原为主)和水构成。纤维环主要由15~25层同心圆排列的胶原纤维构成,主要为Ⅰ型胶原(80%左右)^[8,20]。研究发现利用硫酸软骨素酶ABC注射到山羊^[21-22]、犬^[23]的椎间盘髓核可造成髓核内蛋白聚糖的损失从而诱导IDD。这种造模术后12周,出现椎间盘纤维环破坏及骨赘形成的IDD表现。同时也发现,建立缓慢进展的IDD模型的软骨素酶ABC的浓度是0.25 U/mL^[21]。羊(绵羊和山羊)的椎间盘髓核蛋白多糖含量和椎间盘生物力学均相似于人类^[6,8],而且羊是一种强壮的动物,具有很强的耐受手术干预的能力^[8],因此,羊动物模型是一个很有吸引力的模型,适用于IDD和椎间盘再生研究。更早有文献报道,把木瓜凝乳蛋白酶注射到比格犬的椎间盘内,术后1个月在X线下见椎间隙变窄,MRI(T2加权像)髓核信号强度降低,显示IDD的影像学表现^[24]。木瓜凝乳蛋白酶是一种蛋白分解酶,相对分子质量为27 000~45 000,主要作用于髓核中长链黏多糖的非胶原蛋白,使蛋白质发生聚合作用,释放硫酸软骨素,致使髓核中蛋白质的黏稠度降低,而对纤维环不发生作用^[25]。

髓核损伤的造模方法见表2。该造模方法可操作性好,重复性好,不需要复杂的仪器,实验周期

短。化学损伤造模注射药物的剂量易控制,但髓核内注射的物质可能会影响IDD后生化检测的准确性,另外化学物质的作用机制所限,其退行性变与人类IDD过程存在差异,因此模型可靠性较差。

表 2 髓核损伤的造模方法

动物	造模方法	造模成功时间
山羊 ^[18]	髓核摘除	术后4周
美利奴羊 ^[19]	椎间孔镜下髓核摘除	术后6个月
山羊 ^[21-22]	硫酸软骨素酶ABC椎间盘内注射(0.25 U/mL)	术后12周
犬 ^[23]	硫酸软骨素酶ABC髓核内注射(12.5 U)	术后28 d
比格犬 ^[24]	木瓜凝乳蛋白酶髓核内注射,每个椎间盘 3.78×10^{-3} U)	术后1个月

1.3 终板损伤法

正常的椎间盘是无血管及神经支配的^[8],椎间盘的营养供应大部分(80%)依赖终板渗透作用^[8],还有20%由外层的纤维环供给。终板在结构上与关节软骨类似,厚约0.6 mm,是营养物质从椎体运输到椎间盘的主要通道^[20]。椎体终板损伤会破坏椎间盘的完整性,影响椎间盘营养通道,导致椎间盘发生退行性变^[26]。Cinotti等^[26]用克氏针(直径1.5 mm)穿刺经左腹膜后暴露猪L₄/L₅/L₆/S₁椎间盘的上下终板,造成终板急性损伤,术后7个月在MRI(T₂加权像)可见髓核信号降低。Holm等^[27]经左腹膜后暴露L₃/L₄椎间盘,再利用钻头(直径3.5 mm)与L₄椎体上缘成45°角插入L₃/L₄椎间隙的下终板,然后通过液压泵给L₂/L₃/L₄椎间盘加压,同时监测椎间盘内压力,模拟人脊柱生物力学,术后3个月MRI(T₂加权像)可见L₃/L₄椎间盘髓核信号明显下降。也有文献报道在猕猴^[28]和恒河猴^[29]软骨下骨中注射争光霉素,可阻断邻近椎间盘的营养供应,导致IDD的发生。术中先用10.0 mg/kg氯胺酮和0.5 mg/kg咪达唑仑肌内注射麻醉猕猴,再将争光霉素2.0 mL注射到椎体软骨下骨,术后3个月椎间盘高度缓慢下降,术后6个月椎间盘高度下降明显^[28]。这种非人灵长类动物模型有着椎间盘大小、解剖结构及机械应力暴露(直立)更接近人类的优点,但也受伦理、经费、实验环境等因素制约^[8]。也有报道通过把骨水泥注入到不成熟的猪椎体内,利用骨水泥阻断椎间盘终板的营养通路,术后3个月出现明显IDD表现^[30]。

终板损伤的造模方法归纳如表3所示。不管是

机械损伤方式还是化学损伤方式,均能通过终板损伤成功建立IDD模型。终板机械损伤建模时,破坏终板的程度不易掌握,退行性变发生过程较缓慢,退行性变匀速、渐进,是一种缓慢IDD模型,便于更清楚全程观察动物IDD的病理、生理及形态学改变。

表 3 终板损伤的造模方法

动物	造模方法	造模成功时间
猪 ^[26]	克氏针穿刺终板(直径1.5 mm)	术后7个月
猪 ^[27]	钻头穿刺终板(直径3.5 mm)	术后3个月
猕猴 ^[28]	4.0 mL争光霉素软骨终板下注射(1.5 mg/mL)	术后3~6个月
恒河猴 ^[29]	4.0 mL平阳霉素软骨终板下注射(1.5 mg/mL)	术后3~6个月
猪 ^[30]	椎体内注射骨水泥阻断	术后3个月

1.4 天然退行性变的动物模型

天然退行性变模型,多应用于研究遗传、生活习性等对IDD的影响,天然退行性变大动物模型见表4。犬的自发性IDD模型分软骨营养不良(CD)和非软骨营养不良(NCD)^[31]。主要是通过大体观、组织病理学、糖胺聚糖的含量、金属蛋白酶-2的活性,观察犬退行性变的椎间盘,并与人IDD的数据对比,CD犬自发IDD模型的椎间盘内的脊索细胞变化、大体病理标本、组织病理特点及多糖含量均类似于人类IDD^[31]。除了上述犬的自发模型,还有灵长类动物,如狒狒和猕猴都被作为自发的IDD模型^[32-33]。作为非人类的灵长类动物,它们处于直立或半直立状态,生物力学更接近人类,被认为是一种具有巨大潜能的动物模型。这种动物模型最大的优点是在较少人为干预的情况下引发自然退行性变,其改变与人类IDD最为接近,但是因建模周期长、效率低、动物物种和数量有限及伦理要求高等因素,限制了其使用。

表 4 天然退行性变模型

动物	造模方法	造模成功时间
犬 ^[31]	衰老	CD模型≤1岁,NCD模型5~7岁
狒狒 ^[32]	衰老	≥14岁
猕猴 ^[33]	衰老	21~23岁

2 总结与讨论

建立IDD动物模型的目的是阐明IDD发生机制和研究治疗手段,以获得IDD预防和治疗的方法。

除上述大动物IDD的造模方法外, 还有学者通过基因敲除、被动吸烟、直立行走、无水乙醇注射^[34-37]等造模方法使用小动物成功制备IDD模型。任何动物模型都不可能完全复制人类IDD过程, 但希望能尽可能地模拟人类IDD的临床情况。大动物模型的椎间盘高度、宽度及髓核大小等方面均与人类有相似性, 能模拟人类IDD后组织结构和细胞等方面变化的特性, 从而研究出一种IDD的生物治疗方法, 缓解病痛。进行IDD的生物力学研究时, 大动物模型的优势更加凸显, 大动物在解剖学、生理学、病理生理学方面更接近人类, 并能模拟人体的脊柱外科手术, 如斜外侧腰椎椎间融合术、经椎间孔入路内窥镜技术、通道下手术等微创手术方式。避免大动物模型建立的诸多缺点, 建立一个科学、合理、操作简单而且重复性高的IDD模型是今后努力的方向。总之, IDD模型的建立应根据不同的实验目的, 选择合适的动物及造模方法。

致谢: 文章在构思和撰写过程中得到北京大学深圳医院骨科研究中心黄永灿博士的指导, 特此致谢。

参考文献

- [1] Hoy D, Bain C, Williams G, et al. A systematic review of the global prevalence of low back pain[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(6): 2028-2037.
- [2] Hoy D, March L, Brooks P, et al. The global burden of low back pain: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6): 968-974.
- [3] Molinos M, Almeida CR, Caldeira J, et al. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration[J]. *J R Soc Interface*, 2015, 12(108): 20150429.
- [4] Oehme D, Goldschlager T, Ghosh P, et al. Cell-based therapies used to treat lumbar degenerative disc disease: a systematic review of animal studies and human clinical trials[J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 946031.
- [5] Alini M, Eisenstein SM, Ito K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? [J]. *Eur Spine J*, 2008, 17(1): 2-19.
- [6] Gullbrand SE, Malhotra NR, Schaer TP, et al. A large animal model that recapitulates the spectrum of human intervertebral disc degeneration[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(1): 146-156.
- [7] Oehme D, Goldschlager T, Rosenfeld J, et al. Lateral surgical approach to lumbar intervertebral discs in an ovine model[J]. *Scientific World J*, 2012, 2012: 873726.
- [8] Daly C, Ghosh P, Jenkin G, et al. A review of animal models of intervertebral disc degeneration: pathophysiology, regeneration, and translation to the clinic[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 5952165.
- [9] 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.
- [10] 康然, 黄桂成, 李海声, 等. 纤维环切开法建立猪腰椎间盘退变动物模型[J]. *实用老年医学*, 2012, 2(2): 141-145.
- [11] Melrose J, Roberts S, Smith S, et al. Increased nerve and blood vessel ingrowth associated with proteoglycan depletion in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27(12): 1278-1285.
- [12] 彭俊, 徐建广. 犬椎间盘经皮针刺退变模型的建立[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(24): 4463-4466.
- [13] 谢林, 顾军, 唐田, 等. 山羊腰椎间盘退变微创动物模型研究[J]. *实用骨科杂志*, 2015, (8): 709-713.
- [14] Lim KZ, Daly CD, Ghosh P, et al. Ovine lumbar intervertebral disc degeneration model utilizing a lateral retroperitoneal drill bit injury[J]. *J Vis Exp*, 2017, 25(123).
- [15] Zhang Y, Drapeau S, An HS, et al. Histological features of the degenerating intervertebral disc in a goat disc-injury model[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(19): 1519-1527.
- [16] 张闻力, 李涛, 龚全, 等. 三种方法建立兔椎间盘退变模型的比较研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(1): 41-45.
- [17] Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, et al. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration[J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(Pt 4): 652-655.
- [18] Acosta FL Jr, Metz L, Adkisson HD, et al. Porcine intervertebral disc repair using allogeneic juvenile articular chondrocytes or mesenchymal stem cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(23-24): 3045-3055.
- [19] Woiciechowsky C, Abbushi A, Zenclussen ML, et al. Regeneration of nucleus pulposus tissue in an ovine intervertebral disc degeneration model by cell-free resorbable polymer scaffolds[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2014, 8(10): 811-820.
- [20] 黄永灿, 吕维加, 陆昶曩. 干细胞与椎间盘再生: 从基础到临床[J]. *中国矫形外科杂志*, 2012, 20(14): 1299-1301.
- [21] Hoogendoorn RJ, Wuisman PI, Smit TH, et al.

- Experimental intervertebral disc degeneration induced by chondroitinase ABC in the goat [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(17): 1816-1825.
- [22] Gullbrand SE, Malhotra NR, Schaer TP, et al. A large animal model that recapitulates the spectrum of human intervertebral disc degeneration [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2017, 25(1): 146-156.
- [23] Yamada K, Tanabe S, Ueno H, et al. Investigation of the short-term effect of chemonucleolysis with chondroitinase ABC [J]. J Vet Med Sci, 2001, 63(5): 521-525.
- [24] Melrose J, Taylor TK, Ghosh P, et al. Intervertebral disc reconstitution after chemonucleolysis with chymopapain is dependent on dosage [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1996, 21(1): 9-17.
- [25] 任大江, 李放. 建立椎间盘退变动物模型的方法学回顾 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(8): 138-140.
- [26] Cinotti G, Della Rocca C, Romeo S, et al. Degenerative changes of porcine intervertebral disc induced by vertebral endplate injuries [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(2): 174-180.
- [27] Holm S, Holm AK, Ekström L, et al. Experimental disc degeneration due to endplate injury [J]. J Spinal Disord Tech, 2004, 17(1): 64-71.
- [28] Wei F, Zhong R, Zhou Z, et al. *In vivo* experimental intervertebral disc degeneration induced by bleomycin in the rhesus monkey [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2014, 15: 340.
- [29] Wei F, Zhong R, Wang L, et al. Pingyangmycin-induced *in vivo* lumbar disc degeneration model of rhesus monkeys [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2015, 40(4): E199-210.
- [30] 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.
- [31] Bergknut N, Rutges JP, Kranenburg HJ, et al. The dog as an animal model for intervertebral disc degeneration? [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2012, 37(5): 351-358.
- [32] Platenberg RC, Hubbard GB, Ehler WJ, et al. Spontaneous disc degeneration in the baboon model: magnetic resonance imaging and histopathologic correlation [J]. J Med Primatol, 2001, 30(5): 268-272.
- [33] Nuckley DJ, Kramer PA, Del Rosario A, et al. Intervertebral disc degeneration in a naturally occurring primate model: radiographic and biomechanical evidence [J]. J Orthop Res, 2008, 26(9): 1283-1288.
- [34] Yuan W, Che W, Jiang YQ, et al. Establishment of intervertebral disc degeneration model induced by ischemic sub-endplate in rat tail [J]. Spine J, 2015, 15(5): 1050-1059.
- [35] Liang QQ, Zhou Q, Zhang M, et al. Prolonged upright posture induces degenerative changes in intervertebral discs in rat lumbar spine [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33(19): 2052-2058.
- [36] Nasto LA, Ngo K, Leme AS, et al. Investigating the role of DNA damage in tobacco smoking-induced spine degeneration [J]. Spine J, 2014, 14(3): 416-423.
- [37] Oda H, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model [J]. J Orthop Sci, 2004, 9(2): 135-141.

(收稿日期: 2016-12-25)

(本文编辑: 张建芬)