

## · 基础研究 ·

# 大鼠尾椎椎间盘退变静态压力模型的构建

徐海栋, 刘晓伟, 史新瑞, 杨斐, 许斌\*

南京军区南京总医院骨科, 江苏 210002

**【摘要】目的** 采用静态压力构建稳定的大鼠尾椎椎间盘退变模型。**方法** 将40只12周龄大鼠随机分为静态压力组和针刺组, 每组20只。静态压力组: 在尾椎C<sub>4-7</sub>椎体上安装静态压力环形外固定支架, 压缩的4根弹簧施加的压强均为10 kPa, 维持8周。针刺组: 采用16 G针头刺入尾椎C<sub>4/C<sub>5/C<sub>6/C<sub>7</sub></sub></sub></sub>椎间盘, 限制损伤深度5 mm、朝向椎间盘中心, 损伤后留置10 s。分别于术后8周进行组织病理学切片观察, 采用秩和检验比较2组Thompson椎间盘退变病理分级。**结果** 对2组大鼠尾椎共120个椎间盘髓核组织标本进行病理分级, 统计结果显示静态压力组退变级别明显高于针刺组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 采用静态压力构建的椎间盘退变模型稳定可靠, 较传统针刺模型具有优势, 可为临床椎间盘退变研究提供可靠的动物模型。

**【关键词】** 尾骨; 椎间盘退行性变; 运动试验; 大鼠

**【中图分类号】** R-332    **【文献标志码】** A    **【文章编号】** 1672-2957(2017)06-0348-03

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-2957.2017.06.007

## Construction of caudate degenerative intervertebral disc model by static pressure in rats

XU Hai-dong, LIU Xiao-wei, SHI Xin-rui, YANG Fei, XU Bin\*

Department of Orthopaedics, Nanjing General Hospital, Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China

**【Abstract】 Objective** To establish a stable rat caudate degenerative intervertebral disc model using static pressure.

**Methods** Forty 12-week-old rats were randomly divided into static pressure group and acupuncture group, with 20 rats in each group. In the static pressure group, the caudal vertebrae C<sub>4-7</sub> were intervened by 10 kPa static pressure for 8 weeks. In the acupuncture group, the caudal intervertebral discs C<sub>4/C<sub>5/C<sub>6/C<sub>7</sub></sub></sub></sub> were acupunctured by a 16 G needle for 10 s. Histopathological sections were observed at 8 weeks after operation, and the Thompson disc degeneration pathological grading of the 2 groups was compared by rank-sum test. **Results** According to Thompson disc degeneration pathological grading, 120 rat caudal vertebrae in the 2 groups were graded, and the rank-sum test results showed that the static pressure group was superior to the acupuncture group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The static pressure model is stable, reliable, and superior to the traditional acupuncture model, thus providing a reliable animal model for clinical research on disc degeneration.

**【Key Words】** Coccyx; Intervertebral disc degeneration; Exercise test; Rats

J Spinal Surg, 2017, 15(6): 348-350

椎间盘退行性疾病严重影响着现代人类生活, 尤其是随着生产、生活方式的改变, 颈腰痛已经成为骨科门诊中的主要病种<sup>[1-3]</sup>。其中有不少患者不能通过非手术治疗获得改善, 而需要进行手术干预, 包括微创手术、非融合手术或传统融合手术等<sup>[4-5]</sup>。建立可以模拟人椎间盘退行性变的动物模型有助于椎间盘退行性疾病的发生机制、病理过程以及治疗

方法的深入研究<sup>[6-7]</sup>。目前椎间盘退行性变模型主要包括动物体外椎间盘模型和动物体内椎间盘模型2种。动物体外模型包括椎间盘细胞培养模型、椎间盘组织培养模型, 这些模型主要以获得相关的椎间盘退行性变组织或细胞为目的; 动物体内椎间盘模型包括自发性椎间盘退行性变模型和诱发性椎间盘退行性变模型, 临床研究中常用的是诱发性椎间盘退行性变模型, 如针刺模型、应力改变模型、脊柱失稳模型、化学法构建的模型等<sup>[8-9]</sup>, 其中应力改变模型被认为最接近实际的椎间盘退行性变的病理机制, 但是存在应力作用不能标准化的问题, 致使诱发的动物椎间盘退行性变程度无法标准化, 故在

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81501925);

中国博士后面上基金项目(2016M593038)

作者简介: 徐海栋(1980—), 博士, 副主任医师;

xuhaidong1980@163.com

\*通信作者: 许斌 xuzongbin@hotmail.com

应用中受到了限制。

本研究采用自行研制的环形外固定大鼠尾椎退行性变模型构建支架, 采取静态压力构建稳定的大鼠尾椎椎间盘退行性变模型, 对其进行相关的对比研究, 现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

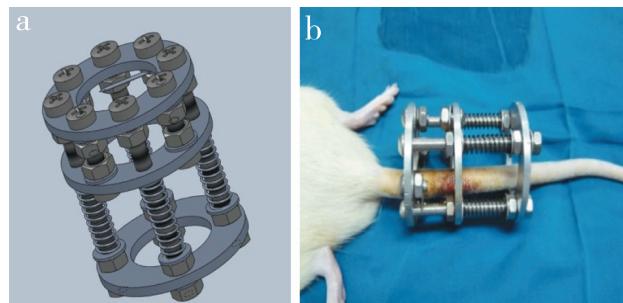
选择12周龄的健康、性成熟、普通级别的健康SD大鼠40只(本院实验动物中心提供, 实验动物质量合格证编号1613017), 雌雄各半, 体质量为( $300 \pm 50$ )g, 经影像学检查无尾椎病变。按照实验的需要将大鼠随机分为静态压力组和针刺组, 每组20只。按照标准饲养条件在本院实验动物中心单笼饲养, 室温18~25℃, 相对湿度55%~65%, 中央空调集中通风8~15次/h, 正常日夜规律。喂食全价营养颗粒及消毒饮用水(由本院实验动物中心提供), 所有动物在实验前适应环境7 d。

### 1.2 实验方法

静态压力组: 将20只SD大鼠隔夜禁食后, 采用3.6%的水合氯醛10 mL/kg标准腹腔注射, 麻醉成功后将大鼠俯卧位置于操作台上, 固定四肢, 手术操作区域进行无毛化处理, 用动物X线机透视确定大鼠尾椎C<sub>4~7</sub>椎体并予以标记, 然后消毒铺巾。在C<sub>4~7</sub>椎体上安装静态压力环形外固定支架(图1)。压缩的4根弹簧施加的压强均为10 kPa, 旨在模拟大鼠直立时腰椎所承载的压力负荷。在处理的过程中, 注意将克氏针固定在大鼠尾椎的椎骨上, 同一椎体的2枚交叉克氏针之间为垂直放置且固定在环形外固定支架上, 以保持平衡; 注意均匀加压, 避免局部皮肤的破溃、感染及坏死。旋转外固定支架上的螺母以压缩弹簧, 短缩后固定长度, 获得持续的静态压力, 维持8周内稳定静态压力的施加。在8周观察期内每天定期观察和调整大鼠外固定支架, 以避免大鼠因活动、装置松动引起的压力减小或失效。

针刺组: 大鼠尾椎干预前的处理方式同静态压力组。之后对20只大鼠的尾椎C<sub>4/C<sub>5</sub>/C<sub>6</sub>/C<sub>7</sub></sub>椎间隙在体表精确定位后, 采用16 G针头刺入椎间隙, 限制损伤深度5 mm、朝向椎间盘中心, 损伤后留置10 s, 针刺处予以创口贴保护。

2组大鼠术后均给予青霉素 $2.0 \times 10^5$  U/d连续肌内注射3 d, 预防感染。麻醉清醒后放回饲养笼中观察, 常规饲养, 如有感染及时替换。



a: 静态压力环形外固定支架 b: 静态压力模型  
a: Static pressure ring external fixator b: Static pressure model

图1 静态压力模型构建

Fig. 1 Establishment of static pressure model

### 1.3 标本处理

术后常规饲养8周后, 经耳缘静脉注射空气处死大鼠, 获取观察节段椎间盘标本共120份, 采用石蜡包埋处理后切片, 予以常规苏木精-伊红(HE)染色, 观察标本的病理学变化, 请专业病理医师根据Thompson椎间盘退行性变病理分级<sup>[10]</sup>进行模型分级。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计学分析, 所得结果为等级资料, 采用秩和检验进行组间比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

进入研究的40只SD大鼠全部完成以上实验步骤, 无脱落, 获得椎间盘标本120份。经专业病理医师进行等级评估, 采用静态压力构建的椎间盘标本的病理分級级别均较高(图2), 而针刺模型的病理级别较低, 经统计学分析显示组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表1)。说明静态压力模型较针刺模型更为稳定。

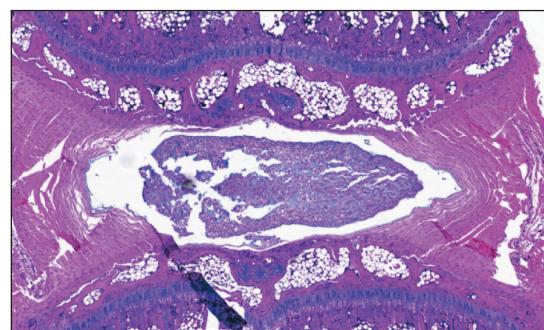


图2 静态压力模型的椎间盘病理标本(HE染色,  $\times 100$ )

Fig. 2 Pathological specimen of static pressure model of intervertebral disc (HE staining,  $\times 100$ )

表1 病理分级  
Tab. 1 Pathological grade

组别 Group	n=60				
	I 级 Level I	II 级 Level II	III 级 Level III	IV 级 Level IV	V 级 Level V
静态压力 Static pressure	0	4	9	31	16
针刺 Acupuncture	5*	9*	25*	17*	4*

注: \*与静态压力组相比,  $P < 0.05$

Note: \*  $P < 0.05$ , compared with static pressure group

### 3 讨 论

动物体内椎间盘退行性变模型是目前医学研究中的重要材料, 在提供可研究的髓核、纤维环细胞, 以及进行动物体内的干预、负载药物、基因防治等方面都具有非常重要的意义<sup>[11-13]</sup>。应力改变动物模型的主要机制是改变动物局部脊柱的生物力学属性, 模拟人体椎间盘退行性变过程中脊柱的应力载荷。经过长期的发展和研究, 先后出现了弯曲鼠尾部椎间盘退行性变动物模型、去鼠上肢直立椎间盘退行性变模型以及目前开始流行的轴向压力或张力施加模型<sup>[14-15]</sup>。本研究的主要目的是寻找一种稳定的、可控的椎间盘退行性变动物模型构建方案, 为后期的椎间盘退行性变发生机制和干预研究提供可靠的动物模型。

本研究采用的环形外固定支架可以对大鼠的尾椎施加持续的静态压力, 构建的模型属于轴向压力施加模型, 并且具有良好的可控性和稳定性, 可以根据动物的体质量、部位调节模拟人体的相关应力作用导致的退行性变。在早期的预实验中本研究组发现大鼠有尾椎压力不平衡造成的缺血坏死, 经过多次的摸索, 获得比较稳定的加压模式, 在本研究中未发生大鼠尾椎缺血坏死造成实验动物脱落的现象。尾椎的局部缺血对椎间盘退行性变的实验结果从大体病理模型观察上影响不大, 后期需要进一步地深入评估。

力学因素作用和营养障碍是椎间盘退行性变的重要诱因, 在持续的静态压力作用下椎间盘内氧气、营养物质和代谢产物的转运进行性减少, 内环境逐渐紊乱, 细胞外基质的分解和病理性重建, 最终导致髓核细胞凋亡、内部营养障碍、椎间盘退变加速的恶性循环形成<sup>[16-18]</sup>。本研究结果提示静态压力模型的椎间盘退行性变程度均较高, 而且集中在IV级及以上; 针刺模型的椎间盘退行性变程度较

低, 主要在III级左右。说明静态压力模型相对于针刺模型具有成模快、稳定、标准化的优点。

关于椎间盘退行性变动物模型的研究是长期的探索性工作, 其目的在于更好地了解椎间盘退行性变的病理过程、寻找治疗的切入点, 明确动物椎间盘退行性变模型与实际人体椎间盘退行性变之间的相关性和可比性非常关键<sup>[19]</sup>。在选择合适的动物模型模拟人类椎间盘退行性变时, 要充分评估模型的适用性和局限性<sup>[20]</sup>。后期本研究组将针对固定时间、弹簧的强度与病理分级之间的关系进行深入研究, 以建立更为细化的动物模型标准。

### 参 考 文 献

- [1] Leichtle UG, Wünschel M, Socci M, et al. Spine radiography in the evaluation of back and neck pain in an orthopaedic emergency clinic [J]. J Back Musculoskelet Rehabil, 2015, 28(1): 43-48.
- [2] Patton CM, Hung M, Lawrence BD, et al. Psychological distress in a department of veterans affairs spine patient population [J]. Spine J, 2012, 12(9): 798-803.
- [3] Paanalahti K, Holm LW, Nordin M, et al. Three combinations of manual therapy techniques within naprapathy in the treatment of neck and/or back pain: a randomized controlled trial [J]. BMC Musculoskeletal Disord, 2016, 17: 176.
- [4] 徐海栋, 付强, 许斌, 等. 全内镜下椎板间隙入路治疗腰5骶1椎间盘突出症 [J]. 医学研究生学报, 2013, 26(9): 959-962.
- [5] Mobbs RJ, Phan K, Malham G, et al. Lumbar interbody fusion: techniques, indications and comparison of interbody fusion options including PLIF, TLIF, MI-TLIF, OLIF/ATP, LLIF and ALIF [J]. J Spine Surg, 2015, 1(1): 2-18.
- [6] 牛朋彦, 熊伟, 李锋. 椎间盘退变模型的研究进展 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(2): 160-163.
- [7] 王凯, 鲁厚根. 椎间盘退变模型的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(1): 117-119.
- [8] 西永明, 胡有谷. 椎间盘退变模型研究的建立及其历史和现状 [J]. 中华骨科杂志, 2000, 20(6): 378-380.
- [9] Dudli S, Fields AJ, Samartzis D, et al. Pathobiology of Modic changes [J]. Eur Spine J, 2016, 25(11): 3723-3734.
- [10] Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, et al. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1990, 15(5): 411-415.

(下转第356页)

- human SIRT1 protects against nutrient deprivation-induced mitochondrial apoptosis through autophagy induction in human intervertebral disc nucleus pulposus cells [J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17: 253.
- [10] Kanno H, Ozawa H, Sekiguchi A, et al. Induction of autophagy and autophagic cell death in damaged neural tissue after acute spinal cord injury in mice [J]. Spine ( Phila Pa 1976 ), 2011, 36( 22 ): E1427-1434.
- [11] Jiang W, Zhang X, Hao J, et al. SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative human disc nucleus pulposus cells [J]. Sci Rep, 2014, 4: 7456.
- [12] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9( 3 ): 231-241.
- [13] Ding F, Shao ZW, Yang SH, et al. Role of mitochondrial pathway in compression-induced apoptosis of nucleus pulposus cells [J]. Apoptosis, 2012, 17( 6 ): 579-590.
- [14] Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, et al. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells [J]. Cancer Res, 2004, 64( 12 ): 4286-4293.
- [15] Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, et al. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy [J]. Cell Death Differ, 2007, 14( 1 ): 146-157.
- [16] Mammucari C, Milan G, Romanello V, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle *in vivo* [J]. Cell Metab, 2007, 6( 6 ): 458-471.
- [17] Mazure NM, Pouysségur J. Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia [J]. Autophagy, 2009, 5( 6 ): 868-869.

(收稿日期: 2017-01-25)

(本文编辑: 于 倩)

(上接第350页)

- [11] James G, Blomster L, Hall L, et al. Mesenchymal stem cell treatment of intervertebral disc lesion prevents fatty infiltration and fibrosis of the multifidus muscle, but not cytokine and muscle fiber changes [J]. Spine ( Phila Pa 1976 ), 2016, 41( 15 ): 1208-1217.
- [12] Paglia DN, Singh H, Karukonda T, et al. PDGF-BB delays degeneration of the intervertebral discs in a rabbit preclinical model [J]. Spine ( Phila Pa 1976 ), 2016, 41( 8 ): E449-458.
- [13] Freeman BJ, Kuliwaba JS, Jones CF, et al. Allogeneic mesenchymal precursor cells promote healing in postero-lateral annular lesions and improve indices of lumbar intervertebral disc degeneration in an ovine model [J]. Spine ( Phila Pa 1976 ), 2016, 41( 17 ): 1331-1339.
- [14] Sakai D, Andersson GB. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions [J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11( 4 ): 243-256.
- [15] Wang Z, Perez-Terzic CM, Smith J, et al. Efficacy of intervertebral disc regeneration with stem cells—a systematic review and meta-analysis of animal controlled trials [J]. Gene, 2015, 564( 1 ): 1-8.
- [16] Gantenbein B, Illien-Jünger S, Chan SC, et al. Organ culture bioreactors—platforms to study human intervertebral disc degeneration and regenerative therapy [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2015, 10( 4 ): 339-352.
- [17] Wang SZ, Rui YF, Lu J, et al. Cell and molecular biology of intervertebral disc degeneration: current understanding and implications for potential therapeutic strategies [J]. Cell Prolif, 2014, 47( 5 ): 381-390.
- [18] Li P, Zhang R, Gan Y, et al. Effects of osteogenic protein-1 on intervertebral disc regeneration: a systematic review of animal studies [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88: 260-266.
- [19] 徐海栋, 赵建宁, 付强. Spotlight通道系统与显微内窥镜椎间盘切除术治疗腰椎椎间盘突出症临床对比[J]. 脊柱外科杂志, 2013, 11( 4 ): 193-197.
- [20] 杨松波, 高春华, 庞晓东, 等. 椎间盘退变模型的研究进展[J]. 脊柱外科杂志, 2012, 10( 5 ): 315-317.

(收稿日期: 2017-02-01)

(本文编辑: 于 倩)