

脊柱侧凸动物模型的研究进展

郑 欣, 邱 勇

(南京大学医学院附属鼓楼医院骨科 210008 江苏省南京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.01.19

中图分类号: R682.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-01-075-04

脊柱侧凸动物模型的建立是研究脊柱侧凸疾病发病机制及诊疗方法的重要手段。目前已成功建立了鸡、鼠、兔、羊等多种动物的脊柱侧凸模型。其建模方式,经历了从复杂的松果体切除术,到简单的利用脊柱内、外拴系方法的演变。动物的物种也由最初的鸡、鼠等较小的动物,发展到牛、猪等与人类接近的大动物。为便于根据实验目的所需进行动物种类选择,笔者就近年来脊柱侧凸动物模型的建模方式及其有效性按动物物种作一综述。

1 古比鱼

脊柱侧凸的多基因遗传机制一直被认为是人类青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)发病的重要机制之一,但缺乏相应的动物模型。Gorman 等^[1]将有脊柱侧凸的雄性古比鱼与正常雌性古比鱼进行杂交,构建同系杂交遗传谱系,发现该模型中脊柱侧凸出现的年龄、侧凸进展和最终侧凸的角度是一个逐渐变异的过程。同系交配对于脊柱侧凸具有较强的遗传影响,该研究还显示出其构建的谱系为多基因遗传疾病,大角度的侧凸在雌性古比鱼中的发生率较雄性高。另外, Gorman 等^[2]对 246 只侧凸和 75 只无侧凸的雌性古比鱼进行体长的测量,发现侧凸的雌性古比鱼存在与人类 AIS 的体长发育形态学异常相似。

该模型由于可以构建同系杂交的遗传谱系,因而对于人类脊柱侧凸的基因学遗传机制及生长相关基因方面的研究具有重要的意义。

2 鸡

鸡为双足直立动物,是研究褪黑素与特发性脊柱侧凸关系内分泌机制病因学的经典模型动物。鸡脊柱侧凸模型的建立主要通过外科技术切除松果体或强光照射的方法建立。

早在 1959 年, Thillard 首次报道切除幼鸡松果体可导致其出现与人类脊柱侧凸类似的畸形,此后许多国内外学者对该实验加以验证^[3-5],所报道的诱导率存在较大差异。近年来有学者对该侧凸模型的机制及其临床价值的有效性产生了质疑, Fagan 等^[6]的实验中发现 19% 的未手术的幼鸡也出现了脊柱侧凸,在松果体切除组中,近 50% 的

鸡出现角状后凸畸形,与人类较为平滑的特发性脊柱侧凸外形有较大差异,而在褪黑素水平较高的鸡中,也有部分出现了脊柱侧凸。Fagan 认为,鸡的脊柱侧凸模型研究结果未必适用于人类,因为鸡的椎间关节更类似于滑膜关节,与拥有椎间盘的人类脊柱不同。

强光持续照射,可以达到抑制褪黑素分泌,从而造成生理性松果体切除的效果。Nette 等^[4]对正常组和松果体切除组的幼鸡均进行 24h 持续强光照射,22d 后两组鸡血清褪黑素水平均明显降低,15% 的正常鸡在光照下发生侧凸,而松果体切除组中侧凸发生率从 50% 上升至 80%,认为血清褪黑素水平降低对侧凸发生有作用。但王亭等^[5]的研究发现,两组间褪黑素水平降低无差异,而持续强光照射组观察 3 个月仍未出现脊柱侧凸,认为松果体切除后的鸡,其脊柱侧凸的发生不仅仅是褪黑素分泌减少所致。

在鸡的建模方式中,切除松果体对手术操作要求高,且颅内手术对于动物的内环境干扰较大,成活率不高;强光照射进行生理性切除松果体的方式,其有效性存在较大的争议;物种关系上,与人类相距较远,对于该模型研究得出的褪黑素假说,并不能完全解释人类 AIS 的发病机理。

3 鼠

与鸡类似,鼠的脊柱侧凸模型也主要通过褪黑素缺乏的内分泌机制建立。Machida 等^[7]制造出直立的二足鼠模型并对其进行松果体切除,二足鼠产生脊柱侧凸,而切除松果体的四足鼠和未摘除松果体的二足鼠并未发生脊柱侧凸。同样的, Dubousset 等^[3]指出褪黑素缺乏与直立姿势是脊柱侧凸发生发展的两个重要条件,二者同时存在时,则可能导致侧凸。鼠的松果体切除术,仍然存在外科技术要求较高,容易造成颅脑组织的损伤、颅内出血,死亡率较高^[7]的风险。因此,无需手术切除松果体的褪黑素缺陷 C57BL/6J 鼠成为近年来鼠脊柱侧凸模型的研究热点。Oyama 等^[8]发现, C57BL/6J 二足鼠的脊柱侧凸发生率为 70%,与切除松果体的 C3H/HeJ 二足鼠相近(64.3%),验证了 C57BL/6J 二足鼠模型的有效性。

大鼠的脊柱侧凸模型,还可以通过拴系的方式进行。Sarwark 等^[9]将幼年大鼠的肩胛下角与躯体同侧骨盆拴系,制造出了脊柱侧凸模型,具有与人类 AIS 相似的顶椎旋转等特征。国内肖军等^[10]以肋骨拴系二足鼠的方法诱导成功侧凸形态与人类特发性脊柱侧凸相似的模型,其进展规律

呈现多样化特点,包括稳定性单胸弯、进展性胸腰段单弯、进展性双弯等。

褪黑素缺乏的内分泌机制造模方式,对动物的物种有限制,目前仅在鸡与鼠中成功建立了该机制的模型,但由于其物种与人类相距较远,相关实验结论是否适用于人类存在争议。直立二足鼠拴系模型主要用来研究直立姿势对脊柱侧凸的发病机理影响,由于形体较小,无法进行进一步的外科治疗的研究,存在一定缺陷。

4 兔

兔的脊柱侧凸模型常采用下列几种方法:(1)切除肋骨;(2)切除肌肉或肌肉失神经化;(3)拴系固定椎骨和/或肋骨的方法;(4)电刺激一侧椎旁肌。Sevastik 等 1984 年提出肋骨的不对称性生长可能为胸椎脊柱侧凸的始动因素,他们对不同年龄的成年家兔施行肋骨截骨后,用固定器将右侧一根肋骨延长 1cm 造成胸椎在冠状面和矢状面上出现左侧凸,而颈椎前凸和胸椎后凸减小。CT 平扫显示椎体发生旋转,棘突偏向凸侧。Agadir 等^[11]切除生长期新西兰兔的右侧第 3、4、5 肋间神经,6 个月后手术组动物全部出现进展性左侧凸。Tsuang 等^[12]将生长期家兔肩胛骨与对侧骨盆进行后侧机械拴系造成结构性侧凸,但不连续的作用力或肩胛骨与躯体同侧骨盆绑扎不会导致侧凸。为验证拴系时间对脊柱侧凸造模的影响,Kallemeier 等^[13]也采用肩胛骨与对侧骨盆拴系的方法制造兔脊柱侧凸,一组采用约在 1 个月内自身降解的材料进行拴系,另一组采用不可降解材料维持 2 个月后移除拴系,降解材料拴系组侧凸角度逐渐变小,而在拴系 2 个月组,侧凸角小于 45°的兔更易于发生侧凸角的减小,这与 Tsuang 等^[12]先前的研究中,侧凸角大于 45°的兔会维持或者平均进展 15°的结果类似。基于此,Kallemeier 等认为该侧凸模型拴系需要 2 个月的时期,相当于家兔生长期的三分之一。

Willers 等^[14]电刺激 16 只兔右侧的椎旁肌,导致所有兔均出现了左侧凸畸形,伴有椎体的旋转,冠状面上侧凸角度及椎体的旋转程度随着电刺激时间的增加而增加,对其脊柱的三维结构显示其外形类似于人类的特发性脊柱侧凸。Bomba 等^[15]对进行电刺激产生脊柱侧凸的兔睾丸进行组织病理学研究发现兔的睾丸产生退行性变,超微结构镜下表现出小管上皮细胞溶解、线粒体破坏等改变,可以影响兔的内分泌腺体,电刺激是否间接通过内分泌机制而造成脊柱侧凸尚需进一步研究。

5 羊

前述的各种动物模型,由于动物形体较小,主要用于脊柱侧凸的病因学研究,如褪黑素缺乏的内分泌学说,肋骨生长不平衡学说等。而羊、牛、猪等大动物模型,形体较大,椎体形态与人类较为接近,可进行椎弓根钩、螺钉固定等外科操作,因而常用作外科治疗新技术研究的动物模型。羊的脊柱侧凸建模,主要以拴系的方法进行。如 Braun 等^[16]运用后路拴系、凸侧 T8~T13 肋骨切除、凹侧相应肋骨

绑扎的方法成功建立了羊的侧凸模型,所有动物发生了进展性结构性右侧凸,外形类似于人类的特发性脊柱侧凸,包括顶椎明显偏离中线、椎体和椎间盘的楔形变、椎体旋转等特征。郑国权等^[17]应用单侧椎弓根螺钉内固定方式建立羊的脊柱侧凸模型,CT 证实该模型为三维脊柱畸形模型,主弯内存在典型的椎体旋转和椎体楔形变,其结构特点与人类的 AIS 相似;Zhang 等^[18]对该模型去除拴系后的侧凸变化进行研究,在造模 8 周后移除拴系,脊柱侧凸仍然进行性发展,与 Braun 等的结果一致。后路坚强固定拴系制造脊柱侧凸模型的缺点是其建立的侧凸外形不像人类 AIS 具有平滑的弧形。后来,Braun 等改进该模型^[19],以软质弹性材料进行拴系,拴系术后侧凸角平均为 55.4°,8 周后进展为 74.4°。该研究证实,使用弹性拴系可以在较短的时期内建立脊柱侧凸的模型,从而可以使羊在生长期内得到外科治疗的干预。

羊的脊柱侧凸模型尽管类似于人类的特发性脊柱侧凸模型,但其与后路不对称拴系有关的缺点也显而易见,此外,山羊的胸廓形状较小而成尖形,与人类呈桶状的胸廓形状不同,制造出的脊柱侧凸外形与人类 AIS 的外形不同。Braun 等^[20]指出,羊的脊柱侧凸模型造模成功后生长潜能较小,不利于非融合治疗技术的研究。

6 牛

与羊的脊柱侧凸造模方式类似,牛的脊柱侧凸建模,主要以前路拴系的方式进行。Newton 等^[21]采用 8 只 3~4 周大小的牛进行单侧前路拴系,并以未拴系的对照组动物进行对照。12 周后,获得了 11.6°的侧凸角度,与对照组相比具有统计学差异,并且造成了 5.1°的后凸角。然而,其侧凸角度的 60%来自于椎间盘的楔形变,未能造成椎体的显著变化。由于牛的生长速度过快,为更好获得较大的侧凸角,Newton 等^[22]采用了双侧拴系的方法,单侧拴系组在拴系 6 个月后冠状面侧凸角为 11°,双侧拴系组为 37°,与单侧拴系进行对比,双侧拴系可获得更大的侧凸和后凸角。

尽管该模型获得了冠状面和矢状面的进展性侧凸,但并没有椎体的旋转,仍然没有很好地模拟出 AIS 患者的弯型。牛在生长期中体重增加 270%,脊柱长度增加 60%,椎体高度增加速度为 18mm/年,生长速度显著快于人类。牛生长速度过快,形体较大,难于实验饲养,对实验要求较高。

7 猪

与羊和牛相比,猪的椎体形状、解剖、椎间盘和胸廓形状,更加接近人类^[23-25],猪的脊椎高度、宽度、椎弓根直径也与人类接近^[23],较适宜应用椎弓根螺钉固定。且猪的生长速度与人类类似。猪的生长高峰约在其 6 个月大时^[26],在生长期中,猪的体重增加 104%,脊柱长度增加 30%,椎体高度增加速度约为 4mm/年。相比之下,青少年在其生长高峰中,体重增加 70%,坐高增加 30%,椎体高度增加速度约为 1mm/年。因此,在其生长高峰期前,可以进行侧凸的造

模而用于非融合技术的治疗研究。

目前对于猪的脊柱侧凸造模方法,主要有前路骨骺阻滞和后路拴系两种方法。1980 年,Beguiristain 等^[27]在两个月大的猪中,进行单侧椎弓根螺钉固定,导致结构性弯,伴随椎体的旋转。后来多位学者^[28,29]并未能很好地重复出该实验结果,主要原因为:(1)螺钉对中央软骨骺骨干造成的损伤不足以造成生长不平衡而引起脊柱侧凸;(2)动物的生长高峰已过,所引起的生长不平衡不足以引起侧凸。Zhang 等^[30]将 9 只 2 个月大的雄性家猪分成三组,分别进行假手术、右侧单枚椎弓根螺钉固定及两枚椎弓根螺钉固定,结果表明单侧椎弓根螺钉穿越中央软骨骺骨干可以在生长期的猪中造成轴向生长的不平衡,产生侧凸;双枚椎弓根螺钉可以显著影响中央软骨骺骨干的生长,可制造出角度更大的侧凸。

骨骺阻滞的方法通过影响脊椎本身结构制造出脊柱侧凸的外形,而前路或后路拴系的方法,由于不破坏脊柱本身结构,适宜于侧凸造模及模型完成后外科治疗干预的研究。Newton 等^[31]应用 12 只 7 个月大的小型猪在 T8 和 T11 钻入 U 型钉,结合具有弹性的材料前路拴系椎体制造脊柱侧凸模型,术后 6 个月,冠状面 Cobb 角为 14°,术后 12 个月,进展为 30°。冠状面上,固定的 4 个节段椎体均出现了进展性的楔形变,然而,椎间盘的楔形变方向与拴系侧相反,即拴系侧高于未拴系侧。小型猪的缺点在于其生长较慢,造模时间较长。Schwab 等^[32]对 18 只 11 周大的约克夏猪通过后路椎弓根螺钉固定,以弹性韧带进行后路单侧拴系,结合同侧的 5 根肋骨拴系,建立猪的脊柱侧凸模型。手术结束,即可获得冠状面 Cobb 角为 25°的脊柱侧凸,术后 11 周,进展为 55°;矢状面后凸角从术后的 4°进展到 11 周时的 24°,并出现顶椎的轴向旋转。Patel 等^[33]利用 CT 对该侧凸模型进行分析,顶椎的椎体和椎间盘高度,凸侧较凹侧高,拴系术后即刻获得的侧凸角与椎体和椎间盘的楔形变程度及侧凸的进展存在显著相关性。他们认为该模型为一个三维脊柱侧凸的动物模型,更加接近人类特发性脊柱侧凸的外形。

综上所述,在研究脊柱侧凸发病机制及治疗方法的过程中,学者们利用多种方法在大小动物中建立了脊柱侧凸的动物模型,从早期采用鸡、兔等小动物探究 AIS 病因到近年来探究外科治疗新技术的羊、猪等的大动物模型。但至今仍未有一种理想的动物模型能较好地模拟出人类的 AIS。理想的建模方法,应具备简单易行,可重复性强,与人类脊柱侧凸相似的特点。随着研究的深入,相信会有更为理想的模型,从而进一步推动脊柱侧凸的实验研究。

8 参考文献

- Gorman KF, Tredwell SJ, Breden F. The mutant guppy syndrome curveback as a model for human heritable spinal curvature[J]. *Spine*, 2007, 32(7): 735-741.
- Gorman KF, Breden F. Disproportionate body lengths correlate with idiopathic-type curvature in the curveback guppy[J]. *Spine*, 2010, 35(5): 511-516.
- Dubousset J, Machida M. Possible role of the pineal gland in the pathogenesis of idiopathic scoliosis: experimental and clinical studies[J]. *Bull Acad Natl Med*, 2001, 185(3): 593-602.
- Nette F, Dolynchuk K, Wang X, et al. The effects of exposure to intense, 24h light on the development of scoliosis in young chickens[J]. *Stud Health Technol Inform*, 2002, 91: 1-6.
- 王亨, 胡有谷, 郑英刚, 等. 褪黑素在鸡脊柱侧凸模型中的作用[J]. *中华骨科杂志*, 2002, 22(10): 623-626.
- Fagan AB, Kennaway DJ, Oakley AP. Pinelectomy in the chicken: a good model of scoliosis [J]? *Eur Spine J*, 2009, 18(8): 1154-1159.
- Machida M, Murai I, Miyashita Y, et al. Pathogenesis of idiopathic scoliosis: experimental study in rats [J]. *Spine*, 1999, 24(19): 1985-1989.
- Oyama J, Murai I, Kanazawa K, et al. Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels [J]. *J Pineal Res*, 2006, 40(3): 219-224.
- Sarwark JF, Dabney KW, Salzman SK, et al. Experimental scoliosis in the rat. I. Methodology, anatomic features and neurologic characterization[J]. *Spine*, 1988, 13(5): 466-471.
- 肖军, 吴志宏, 邱贵兴, 等. 直立姿势对脊柱侧凸易感性及侧凸曲线进展规律的影响[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(1): 48-52.
- Agadir M, Sevastik B, Reinhold FP, et al. Vascular changes in the chest wall after unilateral resection of the intercostal nerves in the growing rabbit [J]. *J Orthop Res*, 1990, 8(2): 283-290.
- Tsuang YH, Yang RS, Chen PQ, et al. Experimental structural scoliosis in rabbits [J]. *J Formos Med Assoc*, 1992, 91(9): 886-890.
- Kallemeier PM, Buttermann GR, Beaubien BP, et al. Validation, reliability and complications of a tethering scoliosis model in the rabbit[J]. *Eur Spine J*, 2006, 15(4): 449-456.
- Willers UW, Sevastik B, Hedlund R, et al. Electrical muscle stimulation on the spine: three-dimensional effects in rabbits [J]. *Acta Orthop Scand*, 1995, 66(5): 411-414.
- Bomba G, Kowalski IM, Szarek J, et al. The effect of spinal electrostimulation on the testicular structure in rabbit[J]. *Med Sci Monit*, 2001, 7(3): 363-368.
- Braun JT, Ogilvie JW, Akyuz E, et al. Experimental scoliosis in an immature goat model: a method that creates idiopathic-type deformity with minimal violation of the spinal elements along the curve[J]. *Spine*, 2003, 28(19): 2198-2203.
- 郑国权, 张永刚, 王岩, 等. 单侧椎弓根螺钉内固定建立脊柱侧凸动物模型的影像学观察 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2008, 18(6): 460-463.
- Zhang YG, Zheng GQ, Zhang XS, et al. Scoliosis model created by pedicle screw tethering in immature goats: the feasibility, reliability and complications [J]. *Spine*, 2009, 34(21): 2305-2310.

综述

维生素 D 受体基因多态性和椎间盘退变的相关性研究进展

邢文华¹, 霍洪军¹, 杨学军¹, 贾连顺²

(1 内蒙古医学院第二附属医院脊柱外科 010030 呼和浩特市; 2 第二军医大学附属长征医院骨科 200003 上海市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.01.20

中图分类号: R681.5, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-01-0078-03

文献报道生理性退变、重体力劳动、椎间盘外伤、过度劳累、吸烟等均与椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)的相关因素^[1-2]。而近年来随着研究逐渐深入到分子水平,多数学者认为遗传因素在 IDD 发生、发展中可能扮演着重要的角色^[3-4],IDD 是由多个微效基因和环境因素共同作用、积累到一定程度导致的一种复杂性疾病,研究环境因素在 IDD 中作用的同时,还须考虑其遗传易感性,将遗传和环境的作用结合起来^[5]。其中维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)基因与骨、软骨代谢关系密切,其多态性与椎间盘退变的关系备受关注。

第一作者简介:男(1977-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱外科

电话:(0471)6351230 E-mail:xwhspine@sohu.com

1 椎间盘退变的遗传易感性

椎间盘退变的候选基因研究策略主要有以下三种:(1)与椎间盘结构组成相关基因,如 IX 型胶原等位基因^[6,7];(2)与椎间盘基质降解酶有关的基因,如基质金属蛋白酶 3 启动子区域基因^[8,9];(3)与骨结构有关基因,包括骨质疏松相关基因、维生素 D 受体基因和雌激素受体基因等^[10]。其中 VDR 基因与骨、软骨代谢关系密切。

Leonid 等认为 IDD 的家族遗传率高达 34%~61%。而 Grobler 等^[11]报道年龄在 7~29 岁的青少年椎间盘突出患者中均有阳性家族史,Varlotta 等^[12]对 63 例年龄小于 21 岁的行腰椎椎间盘突出手术患者与年龄、性别相似的正常人对比研究发现,42%患者有阳性家族史。Battie 等^[13]报道对 20 对同卵双生男性志愿者(年龄在 36~60 岁)进行研究后发

19. Braun JT, Ogilvie JW, Akyuz E, et al. Creation of an experimental idiopathic-type scoliosis in an immature goat model using a flexible posterior asymmetric tether[J]. Spine, 2006, 31(13): 1410-1414.
20. Braun JT, Akyuz E, Ogilvie JW, et al. The use of animal models in fusionless scoliosis investigations [J]. Spine, 2005, 30(Suppl 17): S35-45.
21. Newton PO, Fricka KB, Lee SS, et al. Asymmetrical flexible tethering of spine growth in an immature bovine model[J]. Spine, 2002, 27(7): 689-693.
22. Newton PO, Faro FD, Farnsworth CL, et al. Multilevel spinal growth modulation with an anterolateral flexible tether in an immature bovine model[J]. Spine, 2005, 30(23): 2608-2613.
23. Bozkus H, Crawford NR, Chamberlain RH, et al. Comparative anatomy of the porcine and human thoracic spines with reference to thoracoscopic surgical techniques [J]. Surg Endosc, 2005, 19(12): 1652-1665.
24. Dath R, Ebinesan AD, Porter KM, et al. Anatomical measurements of porcine lumbar vertebrae [J]. Clin Biomech, 2007, 22(5): 607-613.
25. Sheng SR, Wang XY, Xu HZ, et al. Anatomy of large animal spines and its comparison to the human spine: a systematic review[J]. Eur Spine J, 2010, 19(1): 46-56.
26. Strathe AB, Sorensen H, Danfaer A. A new mathematical model for combining growth and energy intake in animals: the case of the growing pig [J]. J Theor Biol, 2009, 261(2): 165-175.
27. Beguiristain JL, Salis DJ, Oriaifo A, et al. Experimental scoliosis by epiphyseodesis in pigs[J]. Int Orthop, 1980, 3(4): 317-321.
28. Coillard C, Rhalimi S, Rivard CH. Experimental scoliosis in the minipig: study of vertebral deformations [J]. Ann Chir, 1999, 53(8): 773-780.
29. Cil A, Yazici M, Daglioglu K, et al. The effect of pedicle screw placement with or without application of compression across the neurocentral cartilage on the morphology of the spinal canal and pedicle in immature pigs[J]. Spine, 2005, 30(11): 1287-1293.
30. Zhang H, Sucato DJ. Unilateral pedicle screw epiphyseodesis of the neurocentral synchondrosis: production of idiopathic-like scoliosis in an immature animal model [J]. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(11): 2460-2469.
31. Newton PO, Upasani VV, Farnsworth CL, et al. Spinal growth modulation with use of a tether in an immature porcine model[J]. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(12): 2695-2706.
32. Schwab F, Patel A, Lafage V, et al. A porcine model for progressive thoracic scoliosis[J]. Spine, 2009, 34(11): E397-404.
33. Patel A, Schwab F, Lafage V, et al. Computed tomographic validation of the porcine model for thoracic scoliosis [J]. Spine, 2010, 35(1): 18-25.

(收稿日期: 2010-05-14 修回日期: 2010-06-30)

(本文编辑 刘彦)