

综述

脊柱融合动物模型的研究进展

董智勇, 邝冠明, 郑召民

(中山大学附属第一医院骨科 510080 广州市)

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2006)-02-0158-03

随着对脊柱融合机理及其并发症的进一步认识以及研究逐渐深入, 动物模型在脊柱外科领域的应用越来越广泛。尤其是近年, 骨组织工程和基因治疗受到了极大的关注, 脊柱融合实验动物模型在评价这些新兴技术方面的作用日益显著, 为相关的基础与临床前期研究做出了巨大贡献。现就有关内容做一综述。

1 实验动物模型的优势

融合手术已成为脊柱外科领域的一种常规治疗手段, 但是其存在的大量问题尚未解决, 如自体骨来源有限、取骨区并发症、假关节形成等。为了解决这些问题, 人们进行了大量的研究。这些研究按研究对象不同可以分为临床研究和动物实验研究。临床研究存在很大的局限性, 通常在实验中存在很多非控制性因素, 干扰实验因素对研究结果的作用, 产生偏倚^[1]。动物模型可以很好地克服上述缺点, 有效地控制非实验因素, 保留实验因素, 进行随机可控的对照研究。实验动物一般采用相同的动物种类, 取自同一饲养环境, 并对年龄、性别、体重等影响研究结果的因素进行控制, 个体间的差异较小。研究者可以有效地控制外科技术, 保持局部环境的一致性, 能够准确评价疗效的改变。

另外, 动物实验还可以通过组织学方法对实验中取得的生物学结果进行定性和定量评价, 并且可以通过破坏性的生物力学实验评估其机械完整性, 而上述评价方法均无法在人体实施。目前基因治疗还处在起始阶段, 人们对其安全性尚无法进行有效的评估, 因而不适合直接应用于人体, 需要进行动物实验评价并改进其生物安全性^[2]。

2 实验动物模型的分类

实验动物广泛应用于脊柱融合各个领域。研究者用其评价新型的骨移植材料; 选择不同的骨移植部位, 评价内固定器械和外科技术的改进对临床疗效的影响; 比较不同的生长因子和基因治疗的优缺点以及临床应用前景。因此, 选择合适的动物模型是实验设计中最重要和确保实验成功的主要因素之一。

根据研究的目的不同, 实验动物模型主要分为两类: 生物力学模型和生物学模型。生物力学模型是研究脊柱的生物力学情况或脊柱器械的应用情况, 宜选择较大的实验动物, 因为大动物脊柱的骨性解剖结构与人类相近, 获得的数据更

加可靠、实用。生物学模型主要用来研究脊柱融合的生物愈合过程和愈合机制, 利用较多数量的较小动物模型可以获得大量的数据, 比用较少数量的大动物所获得的少量实验数据更有价值。

3 常用的实验动物模型

研究者采用了多种不同的实验动物模型来进行脊柱融合的研究。不同融合部位所采用的实验动物模型也各不相同。下面分述目前常用的实验动物模型及其在脊柱融合发展中的作用。

3.1 前路融合动物模型

3.1.1 颈、胸椎前路融合动物模型 山羊是颈椎前路椎间融合研究中最理想的实验动物。山羊具有头部直立、颈椎垂直负重等特点, 脊柱融合的生物力学环境与人体相似, 而且山羊的椎间盘和椎体的大小也与人类相似, 能够有效地比较植入物在人体的情况。人们利用山羊进行了多方面的研究, 如检测各种生长因子对融合的作用、比较不同的骨移植材料以及不同的椎间融合器械在促进脊柱融合方面的作用。Zdeblick 等^[3]比较了 rhBMP-2 与自体骨在山羊颈椎前路减压融合中的作用效果, 结果显示 rhBMP-2 组的融合率要明显优于自体骨组及羟基磷灰石组, 为生长因子在颈椎前路融合的应用提供了实验基础。Kandziora 等^[4]应用这一模型评价联合应用 IGF-1、IGF-β1 促进融合的生物效应。Takahashi 等^[5]及 Sachs 等的研究小组也分别采用该动物模型进行了 rhBMP-2 及 rhBMP-7 促进颈椎前路融合的实验研究, 得出了积极的结论。上述研究促进了颈椎前路融合的发展, 并且有效地验证了山羊动物模型在颈椎前路融合研究中的作用, 对后继研究者具有指导意义。

胸椎前路融合中常用的实验动物为绵羊。Cunningham 等^[6]将 12 只绵羊分别在 T5/6、T7/8、T9/10 应用胸腔镜技术进行融合, 移植材料分别采用 BAK、自体骨、BAK 加自体骨、以及 BAK 加 rhOP-1。术后 4 个月观察结果, BAK 加 rhOP-1 组的融合率最高。作者认为在椎间融合中 rhOP-1 可以取代自体骨移植, 有效避免了供骨区并发症。

3.1.2 腰椎前路融合动物模型 人们利用多种动物进行了腰椎前路融合的实验研究。Muschik 等^[7]将 24 只兔随机分为 3 组, 椎间分别注入不同剂量的牛 BMP, 研究 BMP-2 在前路椎间融合中的作用, 取得了极好的实验结果。作者认为该动物模型可以有效地应用于相关的实验研究。但兔的椎间隙较小, 椎间植入困难, 限制了其进一步应用。Sandhu 等^[8]认为绵羊是一种能够有效控制的动物模型, 他们利用绵羊进行的研

第一作者简介: 男(1975-), 在读硕士, 研究方向: 脊柱外科、骨组织工程

电话: (020)87332200 E-mail: zhiyongzsy@163.com

究证实了重组人 BMP-2 因子在脊柱融合中的作用,为绵羊在腰椎前路融合研究中的应用奠定了实验基础。Boden 等^[9]应用灵长类动物进行了相似的实验,探讨 rhBMP-2 在椎间融合中的有效剂量,椎间融合器中填充胶原,胶原分别在不同剂量的 rhBMP-2 液中浸泡。各实验组均获得了融合,而空白组未获得坚固融合。组织学检查证实填充 BMP-2 的 cage 周围,有正常的成熟骨小梁环绕生长。他认为包含 rhBMP-2 因子的钛 cage 可以作为骨移植替代物。

3.2 后路融合动物模型

腰椎后外侧融合模型是后路融合中研究最多的一种,其应用的实验动物也最多,从裸鼠直至灵长类动物均可见到大量报告,但在此类研究中,羊的应用非常少见,仅见到个别报告。目前人们主要是采用背部正中或双侧切口,沿最长肌与多裂肌间进入,暴露横突,去除皮质后完成植骨床准备,植入骨移植材料,观察其促进融合的作用。随着微创技术的发展,很多微创技术也开始应用于此模型。Boden 等^[10]首先尝试在兔和猴的动物模型中应用电视内窥镜技术进行植骨,实验动物术中创伤小、恢复快,取得了良好的实验效果。研究者认为微创融合技术与骨诱导性移植材料联合应用,可以最大限度地减少或避免传统手术的三大主要缺陷:肌肉去血供和去神经支配、供区并发症以及假关节形成。

3.2.1 小鼠模型 小鼠模型过去常用来评价药物对脊柱融合的整体作用。近年来随着组织工程和基因治疗的发展,此模型更多用在概念验证策略方面,评价新兴的治疗方法。由于裸鼠无免疫原性,在组织工程骨的研究中更为常用。Borden 等^[11]应用这一模型介绍了局部基因治疗的概念,并验证了一种新的骨诱导蛋白基因 LMP-1 在脊柱融合中的作用和可行性。研究者采用 LMP-1 基因转染骨髓细胞,复合无骨诱导性的脱钙骨基质(DBM),行腰椎单节段后外侧融合,4 周后实验组融合率为 100%,对照组为 0。该实验充分验证了基因治疗在脊柱融合中的作用和有效性,成骨性外源基因转入细胞后可以在局部高效表达,促进融合,为今后基因治疗应用于免疫原性动物及其在临床前期中的应用指明了研究方向。Peterson 等^[12]应用这一模型验证了 3 种不同类型的 DBM 在脊柱融合中的作用,为人们选择更佳的骨诱导性移植材料提供了实验基础。

3.2.2 兔 兔是腰椎解剖与人类相似的最小动物之一,其骨性解剖部位可以提供足够的空间进行移植骨植入,同时能够提供足够的骨骼进行自体骨移植对照;而且兔的融合率与人相似,可以有效地比较不同诱导材料的成骨活性。因兔是腰椎后外侧融合实验研究中最常用的动物模型。这一模型目前广泛应用于评价不同形式的 DBM、各种重组生长因子以及组织工程高分子聚合材料在脊柱融合中的作用。Riew 等^[13]用腺病毒载体携带 BMP-2 基因转染新西兰兔骨髓间充质干细胞,复合明胶海绵,植入兔 L5/6 横突间。术后 7 周,实验组横突间可见明显的成熟骨小梁,而对照组无新生骨形成。Cheng 等^[14]利用该模型首次证实了 rhBMP-4 因子在促进脊柱融合中的作用,其研究表明脊柱融合的几率和 rhBMP-4 的剂量呈正相关,为 BMP-4 因子在脊柱融合中的广泛应用奠定了实验基

础。

3.2.3 犬 人们应用犬来研究生长因子在促进腰椎后外侧融合中的有效作用剂量及其生物安全性。也有人应用犬观察生长因子在融合中的剂量应答关系。Sandhu 等^[15]进行了两个实验,分别应用不同剂量的 rhBMP-2 因子复合聚乳酸(OPLA)支架,植入 L4/5 双侧横突间,观察其促进脊柱融合的作用。在应用 58 μ g 以上剂量 BMP 的各组中,动物均在术后 3 个月出现成功的横突间融合,而在自体骨移植组和单纯移植 OPLA 组中却不能融合。L4/5 间融合物的横截面积和机械稳定性并非呈剂量依赖关系,组织学的变化也和 rhBMP-2 的剂量无关。这一研究首次揭示了 BMP-2 剂量与作用强度的关系,为后继的研究者提供了研究思路及方向。Meyer 等^[16]应用犬对 BMP-2 因子的安全性进行了有益的探讨。20 只成熟猎犬均行 L5 双侧椎板切除术,并刺破硬膜,使脑脊液外漏;实验动物随机分为两组,分别植入自体骨及复合 rhBMP-2 的骨移植材料;研究者发现 BMP-2 组可以促进椎板切除外骨愈合,并且在鞘膜囊及脊髓处无异常矿化。研究者认为 rhBMP-2 可以促进骨生长,对动物无毒副作用。

3.2.4 猴 灵长类动物在进化上最接近人,具有与人相似的很多特点,其基因和人类有 98% 的同源性;脊柱的解剖结构、形态、毗邻关系以及承受的负荷也与人类类似。由于物种进化的复杂性和多样性,在低等动物身上证实有效的骨移植骨并非都能成功应用于较高级的动物。因而,在某一新的骨移植材料及器械应用于人体之前,应使用灵长类动物来检验其功效。

Boden 等于 1995 年提出了标准的猴横突间融合模型,以后的研究均以此为基础开展。随着微创技术的发展,Boden 等^[10]于 1996 年将微创的概念和技术引入此动物模型,取得了极好的实验效果。Martin 等^[17]分别采用不同剂量的 rhBMP-2 与不同载体复合,植入恒河猴 L4/5 横突间融合模型中。发现在灵长类动物脊柱中,如果填充的时间足够长、对组织压缩采取相应的机械保护,即使较低剂量的 rhBMP-2 亦可以有效地促进骨诱导。

Boden 等^[18]在灵长类动物实验的基础上,探讨了生长因子应用于人体的可能性及安全性。他采用 Ne-Osteo 骨生长因子,应用于恒河猴双侧横突间融合模型,按剂量不同分组,在 25mg 组实验动物均获得坚固融合。在此基础上,对 22 名患者分别进行了 3 期临床实验。实验设计为患者自身对照,一侧采用自体骨,另一侧使用 Ne-Osteo 骨生长因子;12 个月,除一名吸烟患者外,双侧均取得融合。他认为每侧采用 25mg 以上的 Ne-Osteo 所取得的融合率和自体骨移植相同。这项研究为自体骨移植找到了一种良好的替代材料。极大地促进了骨组织工程的发展及临床应用。但是目前在灵长类模型中所进行的研究还刚刚起步,尚未见到基因水平上成功融合的报告。基于基因治疗的组织工程骨完全取代自体骨尚有一段很长的路,需要研究者不断地进行探索。

总之,为了有效地促进脊柱融合,提高临床疗效,人们进行了很多尝试,组织工程和基因治疗的兴起为人们提供了一种全新的思路。为了使组织工程骨早日进入临床,人们采用

了多种不同的动物融合模型来检验其效果。由于动物实验可以有效地控制非实验因素,取得准确的实验结果,并可以验证不同的骨移植材料以及不同生长因子的有效性与可靠性,为人们寻找一种最佳的移植材料提供了可能。目前在这一领域已经取得了可喜的进展,如在大量动物实验的基础上,rhBMP-2 应用于人体的临床实验已经见到报告,其极好的实验结果预示着临床大规模应用的时代即将来临。

一种新的骨移植材料成功应用于人体之前必须进行四个方面的实验:概念验证研究、可行性研究、安全性及毒性研究以及功效研究。在上述每个研究阶段,人们都离不开实验动物^[9]。但是目前实验动物模型还存在着很多不足之处,不同的研究者采用的动物模型以及动物实验方法不甚相同,所取得的实验结果缺乏有效对比。如何建立一套标准的动物实验模型以及标准的动物实验流程,逐次验证上述四个阶段,仍是一个尚待解决的问题。另外,动物选择涉及的问题亦较多,除实验性质要求外,动物饲养条件、死亡率、经济与否等,尚无统一的评价标准,需要综合考虑。

基因治疗在脊柱融合中的作用日益受到重视,但其研究目前仍停留在较低的水平上,缺乏高等动物的相关研究。能够上调生长类因子表达的逆转录因子也已经进入了研究者的视线,在裸鼠腰椎融合模型中,此因子可以高效影响其它生长因子及细胞成骨,但其安全性尚待进一步验证。此外,人们对于生长因子尚存很多争议,如在其安全性、有效剂量、费效比等相关问题上仍存在分歧,限制了其进一步应用^[20]。上述问题的提出和解决都将极大地扩大脊柱融合的研究范围,并且需要在大量动物实验的基础上取得成果,这也必将对动物融合模型的改进和发展产生积极的影响。

4 参考文献

1. Sandhu HS, Boden SD. Biologic enhancement of spinal fusion [J]. *Orthop Clin North Am*, 1998, 29: 621-631.
2. Khan SN, Lane JM. Spinal fusion surgery: animal models for tissue-engineered bone constructs [J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (9): 1475-1485.
3. Zdeblick TA, Ghanayem AJ, Rapoff AJ, et al. Cervical interbody fusion cages: an animal model with and without bone morphogenetic protein [J]. *Spine*, 1998, 23 (7): 758-765.
4. Kandziora F, Schmidmaier G, Schollmeier G, et al. IGF-I and TGF-beta1 application by a poly-(d,l-lactide)-coated cage promotes intervertebral bone matrix formation in the sheep cervical spine [J]. *Spine*, 2002, 27 (16): 1710-1723.
5. Takahashi T, Tomioka T, Watanabe N, et al. Use of porous hydroxyapatite graft containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 for cervical fusion in a caprine model [J]. *J Neurosurg*, 1999, 90 (Suppl 2): 224-230.
6. Cunningham BW, Kanayama M, Parker LM, et al. Osteogenic protein versus autologous interbody arthrodesis in the sheep thoracic spine: a comparative endoscopic study using the Bagby and Kuslich interbody fusion device [J]. *Spine*, 1999, 24 (6): 509-518.
7. Muschik M, Schlenszka D, Ritsch V, et al. Experimental anterior spine fusion using bovine bone morphogenetic protein: a study in rabbits [J]. *J Orthop Sci*, 2000, 5 (2): 165-170.
8. Sandhu HS, Toth JM, Diwan AD, et al. Histologic evaluation of the efficacy of rhBMP-2 compared with autograft bone in sheep spinal anterior interbody fusion [J]. *Spine*, 2002, 27 (6): 567-575.
9. Boden SD, Martin Jr GJ, Horton WC, et al. Laparoscopic anterior spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a titanium interbody threaded cage [J]. *J Spinal Disord*, 1998, 11 (2): 95-101.
10. Boden SD, Moskovitz PA, Morone MA, et al. Video-Assisted lateral intertransverse process arthrodesis: validation of a new minimally invasive lumbar spinal fusion technique in the rabbit and nonhuman primate (rhesus) models [J]. *Spine*, 1996, 21 (22): 2689-2697.
11. Boden SD, Titus L, Hair G, et al. Lumbar spine fusion by local gene therapy with a cDNA encoding a novel osteoinductive protein (LMP-1) [J]. *Spine*, 1998, 23 (23): 2486-2492.
12. Peterson B, Whang PG, Iglesias R, et al. Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparations in a spine fusion model [J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 2004, 86 (10): 2243-2250.
13. Riew KD, Wright NM, Cheng S, et al. Induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene in rabbit spinal fusion model [J]. *Calcif Tissue Int*, 1998, 63 (4): 357-360.
14. Cheng JCY, Guo X, Law LP, et al. How dose recombinant bone morphogenetic protein-4 enhance posterior spinal fusion [J]. *Spine*, 2002, 27 (5): 467-474.
15. Sandhu HS, Kanim LE, Kabo JM, et al. Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion [J]. *Spine*, 1996, 21 (18): 2115-2122.
16. Meyer RA Jr, Gruber HE, Howard BA, et al. Safety of recombinant human bone morphogenetic protein-2 after spinal laminectomy in the dog [J]. *Spine*, 1999, 24 (8): 747-754.
17. Martin GJ Jr, Boden SD, Marone MA, et al. Posterolateral intertransverse process spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a nonhuman primate: important lessons learned regarding dose, carrier, and safety [J]. *J Spinal Disord*, 1999, 12 (3): 179-186.
18. Boden SD, Grob D, Damien C. Ne-Osteo bone growth factor for posterolateral lumbar spine fusion: results from a nonhuman primate study and a prospective human clinical pilot study [J]. *Spine*, 2004, 29 (5): 504-514.
19. Sandhu HS, Khan S. Animal models for preclinical assessment of bone morphogenetic proteins in the spine [J]. *Spine*, 2002, 27 (16s): S32-S38.
20. Sandhu HS, Khan S, Suh D, et al. Demineralized bone matrix, bone morphogenetic proteins, and animal models of spine fusion: an overview [J]. *Eur Spine J*, 2001, 10 (Suppl): S122-S131.

(收稿日期: 2005-04-18 修回日期: 2005-12-3)

(本文编辑 卢庆霞)