

综述

椎间盘退变模型及其评估指标

张 勇¹, 徐永清¹, 王 非², 陆华拓¹, 唐 辉¹, 游永刚¹

(1 成都军区昆明总医院全军骨科中心 650032 昆明市; 2 广州军区广州总医院骨科 510010 广州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.06.19

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2009)-06-0476-04

腰痛发病率高,严重影响人类健康,椎间盘退变是引起腰痛的重要原因之一。目前椎间盘退变的病因及发病机制尚不清楚,也无有效的治疗方法。因此,建立椎间盘退变模型对于研究其退变机制及治疗方法具有重要意义。笔者对椎间盘退变模型的制备方法及其评估指标进行综述。

1 体外人工培养椎间盘退变模型

椎间盘体内环境复杂,互相影响因素非常多,研究其退变机制比较困难。但将椎间盘细胞或组织分离出来通过置于人工环境中培养制备模型,能够排除干扰因素而针对单因素研究,容易控制人为干预,是研究椎间盘退变机制及其治疗的好方法。

单层培养椎间盘细胞技术被广泛采用。Helen 等^[1]分别在低浓度血清、50ng/ml 胰岛素样生长因子-1 (IGF1)及胰岛素条件下单层培养人纤维环细胞,应用多因素回归模型分析体外单层培养细胞的增殖能力与细胞供者的年龄、性别、椎间盘退变程度之间的关系。研究结果显示女性、高龄及退变后期椎间盘均不利于细胞增殖;同时,源于健康供者的细胞只有在 IGF1 条件下增殖力才高于源自退变椎间盘的细胞,因此,IGF1 能够激活椎间盘细胞有丝分裂的各种信息转导途径。Chou 等^[2]分别单层培养羊内、外层纤维环细胞并传代,结果显示在细胞传至第 2 代时,内、外层纤维环细胞表型同原代细胞无明显变化,内、外层细胞之间存在明显表型差异,外层细胞的 I 型胶原表达水平高,而内层细胞 II 型胶原表达水平高。但当细胞传至第 6 代时内、外层纤维环细胞的形态无明显差异,均为长梭形,且 I 型胶原基因及蛋白表达水平相同,这种变化同体内椎间盘退变过程相似。

椎间盘细胞在长期单层培养过程中增殖率低、表型易缺失及难以维持活力,而三维培养能够很好地维持细胞表型及促进基质分泌^[3]。目前用于椎间盘细胞三维培养的工程材料有琼脂糖凝胶、藻酸盐珠、透明质酸凝胶、生物活性玻璃等。然而三维培养不能维持各种类型细胞之间的相互作用。椎间盘组织培养系统能够保持椎间盘的完整性,从而保持细胞间及组织间的相互作用。Risbud 等^[4]用显微解剖技术将鼠腰椎间盘切取行组织培养,由于椎间盘内渗

透压高于外周培养基,为了避免椎间盘与培养基间形成明显的渗透梯度,作者应用高渗性培养基防止椎间盘发生肿胀并为椎间盘提供压力。同时为了保持髓核细胞的生物活性,在培养液中添加转化生长因子- β 1(TGF- β 1)。组织学结果显示 1 周内髓核能够保持完整结构,随后出现退变。作者认为短期培养的椎间盘组织可用作研究环境因素对椎间盘退变或再生的影响。Haschtmann 等^[5]认为由于软骨终板是椎间盘的营养通道,体外建立的椎间盘培养模型必须包含软骨终板,研究证明包含软骨终板的椎间盘模型培养时间较长,是体外研究椎间盘退变机制及其治疗的优质模型;但组织和器官培养体系的实验重复性较细胞培养体系差。

2 椎间盘退变的体内模型(动物模型)

椎间盘退变的动物模型必须能够模拟人椎间盘退变的病理过程。并且退变的严重程度应该可以控制、制备的模型具有可重复性,以利于不同研究者相互之间进行对比研究。为了减少实验组间的差异,试验方法细节及实验环境应该标准化。基于椎间盘退变的病因研究,目前用于制备椎间盘退变模型的方法包括人为改变椎体间生物力学、融合邻近椎间关节、机械损伤椎间盘及酶化学消化椎间盘等方法^[6-15],各种方法各有利弊。为了较真实模拟人椎间盘退变过程,学者们大多选择应用非损伤椎间盘的方法。

非损伤诱导椎间盘退变模型具有非侵入性特点,比较符合人椎间盘退变过程。吸烟可能是导致腰痛的危险因素之一,腰痛的发生与吸烟的频率、数量及持续时间有关。学者们推测吸烟可能减少椎间盘周围的血循环,从而降低营养物质与代谢产物的交换^[16]。Uei 等^[17]使鼠每天被动吸 20 支烟,通过检测血液中尼古丁的含量确定被动吸烟的效果。持续吸烟 2 周后鼠椎间盘出现纤维化、髓核破裂及结构紊乱等退行性病理变化。作者同时研究椎间盘基因表达,结果显示吸烟 4 周后金属蛋白酶-1 抑制剂表达增强,同时聚集蛋白聚糖表达也开始上调并持续增高,持续吸烟 7 周后胶原基因表达明显下降。

灭活基因也是制备椎间盘退变模型的重要技术。IX 型胶原是椎间盘基质的主要成分之一,Bovd 等^[18]饲养缺失 IX 型胶原基因的鼠 9 个月后,切取椎间盘进行研究,结果显示鼠椎间盘病理改变类似人椎间盘退变。作者认为此方法制备的模型能够很好地模拟椎间盘自发、早发性退变,

第一作者简介:男,(1981-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(0871)4774655 E-mail:songdenghe@126.com

通讯作者:徐永清

并且此椎间盘退变模型不需要手术、改变力学或化学损伤,因此是用于研究人椎间盘退变机制及治疗方法的优质模型。

3 椎间盘退变的有限元模型

有限元模型是用于研究正常与退变椎间盘力学分布的主要工具^[19],此模型将椎间盘描述为二相性物质,即由固相基质及渗透其中的水构成。设计这种模型需要准确的构成法则与物质特征。椎间盘的力学特性由生物化学成分和纤维固性组织结构共同调节,纤维环主要由胶原和蛋白多糖构成,其中胶原提供弹力强度,蛋白多糖因其强大的溶胀能力则使组织具有水合性。因此,在设计模型的构成法则中必须详细考虑椎间盘的物质特性。该模型主要由以下三种组织结构组成:(1)弹性非胶原性固相基质;(2)粘弹性胶原纤维结构;(3)高渗透、可渗透的流质。Schroeder 等^[20]完善了有关表述纤维环粘弹性的数据,同时将有关描述髓核及纤维环压力特性的现存数据与新测得的数据结合,为人椎间盘制定流质弹性物质构成法则。结果显示该法则及实验数据能够很好地描述人椎间盘的纤维和非纤维结构特性。研究者认为对于众多用于研究退变与再生椎间盘力学的模型,流质弹性物质构成法则特别重要。在从事手工业的人们中,腰背痛患病率很高,在体内、外研究腰椎反复负重与椎间盘退变的关系很困难,三维有限元模型可解决这一难题。Williams 等^[21]在设计模拟腰椎活动节段的三维有限元模型时,认为由于纤维环分内层和外层,两者之间存在生物学特征差异,因此存在内外环差异的模型较纤维环同质的模型能够更真实表现体内椎间盘的生物学特性及状态,前者能够用于研究反复负重与椎间盘退变之间的关系。Cheung 等^[22]应用三维有限元模型研究椎间关节对静态压力与震动性压力的反应,研究结果显示纤维环及关节面承受的压力随着静态压力持续时间增加,流质的流量及椎间盘的形变与动态压应力的频率有关。学者们推测震动性压力通过流质泵出机制促进椎间盘流质交换。有限元模型能够帮助人们深入了解椎间盘生物学特征及退变后发生的病理变化,同时还能用于治疗方法研究,但必须和体内、外研究方法结合使用。

4 椎间盘退变模型的评估指标

4.1 组织形态学

HE 染色是研究椎间盘组织形态的重要技术,能够显示各层组织结构。正常椎间盘髓核是由脊索细胞与软骨样细胞构成。纤维环由层状胶原结构组成,内层主要为软骨样细胞,外层为纤维样细胞。髓核细胞周围的阿辛蓝染色阳性及纤维环层状结构的存在是椎间盘完整的标志^[23]。在退变早期,脊索细胞数量减少,软骨样细胞增加,随着退变发展,脊索细胞和软骨样细胞均减少,纤维环内死亡细胞数量增加。软骨内形成骨赘,髓核由胶冻样组织变成纤维软骨组织,体积缩小,纤维环的层状结构紊乱,髓核和纤维

环界限不清,椎间盘出现裂隙^[24]。椎间盘退变晚期,脊索细胞完全消失,骨赘广泛形成,髓核膨出纤维环^[25]。因此,骨赘形成、纤维环裂伤、软骨终板钙化、施莫尔结节形成及椎间隙狭窄是椎间盘退变的标志。

4.2 分子生物学

免疫组化与定量多聚酶链反应(PCR)是研究生物化学与基因学的常规技术。免疫组化能够定性、定量反映组织的生物化学改变,而 PCR 能够检测基因表达变化。生物化学是椎间盘的物质基础,椎间盘细胞外基质主要包括蛋白多糖、胶原。当椎间盘发生病变时,细胞外基质、合成酶和分解酶等蛋白及其基因发生变化。Cs-Szabo 等^[26]研究发现,人椎间盘发生轻度退变时,蛋白多糖基因表达在纤维环内增加,而在髓核内降低,随着退变进展,其表达在整个椎间盘内均降低;当发生严重退变后 I 型胶原表达在髓核与纤维环内均明显增加,II 型胶原在发生轻度退变后增加,当严重退变后表达下调。金属蛋白酶(MMPs)是椎间盘基质的主要降解酶,目前发现的 MMPs 包括胶原酶(MMP-1,8,13)、明胶酶(MMP-2,9)和间充质溶解素(MMP-3)。当椎间盘发生退变后,基质金属蛋白酶(MMP-13)表达明显增加^[27]。

4.3 影像学

磁共振(MRI)能够提供清晰的椎间盘图像,T2 加权像中椎间盘的密度与椎间盘的水分及蛋白多糖含量密切相关,MRI 是评估椎间盘退变非常有价值、客观的工具^[28]。磁共振弛豫时间及表现弥散系数能够在形态学出现变化前检测出椎间盘退变信号^[29]。X 线片能够提供椎间盘高度降低、骨赘形成及椎间盘钙化等病变信息,其中椎间盘高度是定量分析椎间盘退变程度的重要指标,椎间盘高度指数^[30]是椎间盘前部、中部、后部三者高度的均数除以相邻椎体高度均数的结果。Benneker 等^[30]结合椎间盘退变的形态学研究 MRI 和 X 线片与椎间盘退变形态学变化的联系。结果显示,X 线片参数能够区分椎间盘退变的不同分期的变化,而 MRI 只能分辨出椎间盘退变早期阶段的变化。作者认为 X 线片是早期诊断椎间盘退变及进行体内分期的低成本、高效及非损伤方法。除上述技术之外,Kawchuk 等^[30]认为超声差异技术评估椎间盘退变具有敏感性、特异性及诊断准确率高等优点。

5 结论及展望

椎间盘退变的模型必须具备以下条件:(1)能够最真实模拟人椎间盘退变过程;(2)具备较高重复性和可靠性。体外模型的可控性及针对性强,容易排除干扰因素,因此常用于实验研究,但椎间盘退变因素繁多、复杂,因此体内模型能够更真实反映椎间盘退变过程。目前制备椎间盘退变动物模型的技术较多,尚无统一标准,但不同方法诱导椎间盘退变后发生的病理变化基本相似。由于人椎间盘退变原因很多,与基因、生活习惯、体质及职业等有关,因此,选择制备方法时应与研究目的相对应、具有针对性。因为

人椎间盘退变主要是非损伤性、缓慢病变过程,所以最佳方法应该是自然诱导法,目前常用的自然退变模型动物主要有沙鼠和恒河猴。沙鼠随着年龄增长椎间盘发生自发性退变,并且沙鼠比较经济^[31];而恒河猴在种系、行为及解剖结构等方面与人类更加相似,也随着增龄发生自发性椎间盘退变,因此是理想的椎间盘退变模型,但价格比较贵^[32]。截至目前,关于造模的物种选择仍存在较大争议。很多人认为爬行动物椎体呈水平位,而人椎体呈垂直位,因此四肢动物不合适制作退变模型。Elliott 等^[33]研究发现四肢动物在椎间盘特性与体重间的联系与人类相似,椎体同样沿长轴受力,因此四肢动物可以用于制备椎间盘退变模型。O'Connell 等^[34]研究发现小鼠腰椎、尾部和大鼠腰椎的椎间盘在几何形状方面跟人类最接近。Reid 等^[35]发现羊腰椎体的生化成分及解剖结构等方面与人类相似,作者认为羊能够为研究人椎间盘提供合理模型。

总之,设计及制备椎间盘退变模型时应考虑临床实用意义。虽然椎间盘退变模型制备方法取得了重大进展,但实验所得数据距离临床应用仍有不少差距,我们需继续探索制备退变模型的高效方法,为研究人类椎间盘退变提供可靠实验依据。

6 参考文献

- Helen HE, Gruber HJ, Leslie K, et al. Clinical and demographic prognostic indicators for human disc cell proliferation in vitro: pilot study[J]. *Spine*, 2001, 26(21): 2323-2327.
- Chou AI, Bansal A, Miller GJ, et al. The effect of serial monolayer passaging on the collagen expression profile of outer and inner annulus fibrosus cells[J]. *Spine*, 2006, 31(17): 1875-1881.
- Gruber HE, Hanley EN. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2000, 1: 1.
- Risbud MV, Izzo MW, Adams CS, et al. An organ culture system for the study of the nucleus pulposus: description of the system and evaluation of the cells [J]. *Spine*, 2003, 28(24): 2652-2659.
- Haschtmann D, Stovanov JV, Ettinger L, et al. Establishment of a novel intervertebral disc/endplate culture model: analysis of an ex vivo in vitro whole-organ rabbit culture system [J]. *Spine*, 2006, 31(25): 2918-2925.
- Wang YJ, Shi Q, Lu WW, et al. Cervical intervertebral disc degeneration induced by unbalanced dynamic and static forces: a novel in vivo rat model [J]. *Spine*, 2006, 31(14): 1532-1538.
- Ching CT, Chow DH, Yao FY, et al. The effect of cyclic compression on the mechanical properties of the inter-vertebral disc: an in vivo study in a rat tail model [J]. *Clinical biomechanics*, 2003, 18(3): 182-189.
- Lopez-Espina CG, Amirouche F, Havalad V. Multilevel cervical fusion and its effect on disc degeneration and osteophyte formation [J]. *Spine*, 2006, 31(9): 972-978.
- Hoogendoorn RJ, Wuisman PI, Smit TH, et al. Experimental intervertebral disc degeneration induced by chondroitinase ABC in the goat [J]. *Spine*, 2007, 32(17): 1816-1825.
- Cinotti G, Della Rocca C, Romeo S, et al. Degenerative changes of porcine intervertebral disc induced by vertebral endplate injuries [J]. *Spine*, 2005, 30(2): 174-180.
- Holm S, Holm SK, Ekstrom L, et al. Experimental disc degeneration due to endplate injury [J]. *J Spinal Disord Tech*, 2004, 17(1): 64-71.
- Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration [J]. *Spine*, 2004, 29(1): 5-14.
- Han B, Zhu K, Li FC, et al. A simple disc degeneration model induced by percutaneous needle puncture in the rat tail [J]. *Spine*, 2008, 33(18): 1925-1934.
- Hoogendoorn R, Doulabi BZ, Huang CL, et al. Molecular changes in the degenerated goat intervertebral disc [J]. *Spine*, 2008, 33(16): 1714-1721.
- Zhou H, Hou S, Shang W, et al. A new in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration characterized by MRI, radiography, CT/discogram, biochemistry, and histology [J]. *Spine*, 2007, 32(8): 864-872.
- Holm S, Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: acute effects of cigarette smoking: an experimental animal study [J]. *Ups J Med Sci*, 1988, 93(1): 91-99.
- Uei H, Matsuzaki H, Oda H, et al. Gene expression changes in an early stage of intervertebral disc degeneration induced by passive cigarette smoking [J]. *Spine*, 2006, 31(5): 510-514.
- Bovd LM, Richardson WJ, Allen KD, et al. Early-onset degeneration of the intervertebral disc and vertebral end plate in mice deficient in type IX collagen [J]. *Arthritis rheumatism*, 2008, 58(1): 164-171.
- Natarajan RN, Williams JR, Andersson GB. Recent advances in analytical modeling of lumbar disc degeneration [J]. *Spine*, 2004, 29(23): 2733-2741.
- Schroeder Y, Elliott DM, Wilson W, et al. Experimental and model determination of human intervertebral disc viscoelasticity [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(8): 1141-1146.
- Williams JR, Natarajan RN, Andersson GB. Inclusion of regional poroelastic material properties better predicts biomechanical behavior of lumbar discs subjected to dynamic loading [J]. *J Biomechanics*, 2007, 40(9): 1981-1987.
- Cheung JT, Zhang M, Chow DH. Biomechanical responses of the intervertebral joints to static and vibrational loading: a finite element study [J]. *Clinical Biomechanics*, 2003, 18(9): 790-799.
- Gruber HE, Ingram J, Hanley EN Jr. An improved staining method for intervertebral disc tissue [J]. *Biotech Histochem*, 2002, 77(2): 81-83.
- Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, et al. Preliminary evaluation of scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc [J]. *Spine*, 1990, 15(5): 411-415.
- Sobajima S, Kompel JF, Wallach CJ, et al. A slowly progres-

腰骶部脊髓脊膜膨出伴脂肪瘤的诊断与治疗体会

罗永春¹, 卢洪流¹, 戴宜武¹, 赵春平¹, 封志纯², 杨志军¹, 徐如祥¹

(1 北京军区总医院神经外科; 2 北京军区总医院附属八一儿童医院 100700)

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2009.06.20

中图分类号: R682.1, R730.262 文献标识码: B 文章编号: 1004-406X(2009)-06-0479-02

脊髓脊膜膨出(myelomeningocele, MMC)是胚胎期的神经管闭合发生障碍导致椎板融合不全, 脊髓和/或神经根自骨裂处膨出的先天发育畸形, 常伴有局部脂肪异常增生, 也称脂肪瘤型脊髓脊膜膨出, 其临床症状有不同程度的双下肢无力和大小便功能障碍, 如不及时治疗或手术方式不当会严重影响患儿的生活质量。2007 年 1 月~2008 年 5 月我们收治 18 例脊髓脊膜膨出患儿, 其中 8 例伴有脂肪瘤, 总结报告如下。

临床资料 本组男 5 例, 女 3 例, 年龄 28d~15 岁, 其中 1 岁以内 5 例, 1 例 3 岁, 1 例 14 岁, 1 例 15 岁, 均由于家属发现患儿出生后腰骶部包块, 逐渐长大而就诊。5 例 1 岁以内小儿无明显临床症状, 余 3 例有不同程度的双下肢无力进行性加重(肌力 3 级 2 例, 4 级 1 例)和小便失禁、大便干燥。查体见患者腰背部肿物, 4 例有明显囊性突起,

质软而有波动感, 4 例呈现丘状突起, 按之呈揉面感, 质地较硬。其中 2 例存在局部皮肤色素斑, 2 例局部有毛发, 1 例存在藏毛窦。均行 X 线检查显示有不同程度的腰和/或骶段脊柱裂, 有 3 例合并脊柱侧凸。术前行 MRI 评估, 均有脊髓圆锥低位及椎管内脂肪沉积, 根据脂肪沉积与脊髓的关系分为三型^[1]: 圆锥上型 1 例, 圆锥旁型 4 例, 圆锥下型 3 例(图 1)。

所有患者均采用椎管探查、脂肪瘤切除、粘连松解、硬脊膜修补术。手术在全麻下进行, 俯卧位, 取囊性包块周围梭形纵切口, 切开皮肤, 小心分离皮下、腰背筋膜至囊肿颈部、椎骨缺损的边缘, 推开竖脊肌, 切除椎板至脂肪瘤上下极正常节段, 剪开囊膜及硬脊膜, 切除多余的脂肪组织或脂肪瘤, 分离附着于囊膜及硬脊膜的脊髓或神经, 还纳入硬膜腔, 术中根据张力情况决定切断终丝 3 例, 松解理顺粘连的马尾神经, 切除多余的囊壁, 重叠缝合闭合硬膜腔。硬膜腔外置引流管, 切除多余皮肤缝合切口。

结果 8 例患者术后病理检查证实为脂肪瘤。术后 1 例患儿出现高热, 局部出现脑脊液漏, 经过清创换药 1 个月愈合, 其余患儿均一期愈合。术后 3 个月门诊复查, 1

第一作者简介: 男(1975-), 主治医师, 医学硕士, 研究方向: 脑血管病的手术及介入治疗, 小儿神外

电话: (010)66721629 E-mail: luoyong4581@163.com

通讯作者: 戴宜武

- sive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-Ray, and Histology[J]. Spine, 2005, 30(1): 15-24.
26. Cs-Szabo G, Ragasa-San Juan D, Turumella V, et al. Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the annulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2002, 27(20): 2212-2219.
27. Hoogendoorn RJ, Helder MN, Wuisman PI, et al. Adjacent segment degeneration: observations in a goat spinal fusion study [J]. Spine, 2008, 33(12): 1337-1343.
28. Niinimäki J, Ruohonen J, Silfverhuth M, et al. Quantitative magnetic resonance imaging of experimentally injured porcine intervertebral disc[J]. Acta Radiologica, 2007, 48(6): 643-649.
29. Benneker LM, Heini PF, Anderson SE, et al. Correlation of radiographic and MRI parameters to morphological and biochemical assessment of intervertebral disc degeneration[J]. Eur Spine J, 2005, 14(1): 27-35.
30. Kawchuk GN, Kaique AM, Holm SH, et al. The diagnostic performance of vertebral displacement measurements derived from ultrasonic indentation in an invivo model of degenerative disc disease[J]. Spine, 2001, 26(12): 1348-1355.
31. Gruber HE, Johnson T, Norton HJ, et al. The sand rat model for disc degeneration: radiologic characterization of age-related changes: cross-sectional and prospective analyses[J]. Spine, 2002, 27(3): 230-234.
32. Kramer PA, Newell-Morris LL, Simkin PA, et al. Spinal degenerative disk disease in female macaque monkeys: epidemiology and comparison with women [J]. J Orthop Res, 2002, 20(3): 399-408.
33. Elliott DM, Sarver JJ. Young investigator award winner: volition of the mouse and rat disc as disc as mechanical models of the human lumbar disc[J]. Spine, 2004, 29(7): 713-722.
34. O'Connell GD, Vresilovic EJ, Elliott DM, et al. Comparison of animals used in disc research to human lumbar disc geometry[J]. Spine, 2007, 32(3): 328-333.
35. Reid JE, Meakin JR, Robins SP, et al. Sheep lumbar intervertebral discs as models for human discs [J]. Clinical Biomechanics, 2002, 17(4): 312-314.

(收稿日期: 2009-02-23 修回日期: 2009-04-20)

(本文编辑 彭向峰)