

综述

椎间盘退变模型的研究进展

牛朋彦, 熊 伟, 李 锋

(华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科 430030 武汉市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.02.15

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-02-0160-04

椎间盘退变过程是对因遗传因素、老化、椎间盘营养受损及负荷异常等引起的不断进展的局部稳定结构失效所导致的一种异常的、细胞介导的反应^[1]。其共同病理特征表现包括细胞减少、蛋白多糖耗竭、纤维环结构紊乱和破裂等, 这些病理变化程度与临床表现及对治疗的反应并不一致。深入认识椎间盘退变的病理生理变化、临床表现及其对治疗反应的关系一直是研究重点。由于人体椎间盘组织受伦理、法规等因素的限制较难获得, 动物的组织、器官和活体模型常用于研究椎间盘退变的病理生理机制和探索相关的治疗方法。笔者就椎间盘退变模型研究进展作一回顾, 重点阐述各种椎间盘退变模型的局限性及其与人椎间盘退变病理变化的相关性。

1 椎间盘退变的体外模型研究

1.1 细胞培养模型

将动物椎间盘髓核细胞、内外层纤维环细胞和终板软骨细胞从活体中取出后进行体外培养可以观察正常和退变椎间盘细胞的形态学和结构特征, 以及细胞生长、增殖和分化等过程, 并且可以观察椎间盘细胞对不同培养环境和各种体外干预的反应。单层细胞培养和利用各种支架的三维立体细胞培养是目前常用的椎间盘细胞体外培养模式。三维立体细胞培养比单层细胞培养更易维持椎间盘细胞的表型和基质的表达。有研究发现椎间盘细胞在藻酸钙微球三维环境中比单层细胞培养可以更好地维持蛋白多糖和胶原的基因表达^[2]。通常使用的三维立体细胞培养体系包括凝胶类、琼脂糖类和胶原类, 如藻酸钙微球培养体系。在进行三维立体细胞培养时, 支架的选择应考虑到细胞的种类、细胞是否易于从支架上分离下来等问题。不同的椎间盘细胞需要不同的培养体系去维持它们的表型, 如藻酸盐或琼脂糖类培养体系适合髓核细胞, 而单层培养或胶原凝胶则用于纤维环细胞较好^[3]。胶原凝胶可以比藻酸钙微球更好地维持内层纤维环纤维软骨细胞的形态和基质的产生。

细胞培养常用于研究椎间盘细胞对各种营养成分的

需求及各种细胞因子在维持椎间盘细胞表型和基质表达等方面的作用。Homer 等^[4]在琼脂糖凝胶扩散盒中培养牛椎间盘细胞, 发现髓核细胞的活力与营养的供应、营养成分的浓度密切相关。细胞培养也可用于检测椎间盘细胞对各种力学、化学等刺激的反应。Miyamoto 等^[5]使用周期性机械应力刺激培养髓核细胞和纤维环细胞, 发现炎症因子前列腺素 E2 的合成明显增加, 这可能与椎间盘退变诱发疼痛的病理机制相关。此外, 还有研究表明周期性机械张应力^[6]、压缩性负荷^[7]、流体静力压^[8]等力学刺激以及烟酰胺^[9]、过氧亚硝酸盐^[10]等化学刺激均可以调节体外培养的椎间盘细胞的生长及基质的合成能力。

1.2 椎间盘器官培养模型

体外椎间盘器官培养模型是将动物椎间盘(保留或去除邻近椎体终板)完整取材后, 利用椎间盘自身的三维结构和可调控的培养条件进行体外整体培养。同普通的细胞培养相比, 椎间盘器官培养模型更接近生理条件, 可以作为活体动物模型的一种重要的替代模型。目前已成功建立了兔、鼠类、羊和牛等动物的体外椎间盘器官培养模型。尤其是牛尾部椎间盘的大小非常接近人腰椎间盘, 其水合作用、胶原和蛋白多糖的分布、蛋白多糖的合成率也跟人腰椎间盘具有可比性, 非常适用于人腰椎间盘生物力学的研究。

研究发现脊柱不同节段椎间盘的生化成分和代谢状态具有非常显著的差异。Sarver 等^[11]发现同一只鼠的尾部和腰部椎间盘具有明显不同的机械力学性能, 所以从尾部椎间盘研究中得出的结论不能延伸到腰椎或颈椎。椎间盘器官培养模型存在椎间盘膨胀、蛋白多糖丢失和组织的不均一性等缺陷。目前研究发现可以通过多种方法减轻或消除椎间盘膨胀, 如保留软骨终板、包埋在藻酸钙微球中、培养基中添加高渗性溶液和或应用外部负荷等。各种力学负荷除了可以防止椎间盘膨胀, 还可以模拟椎间盘在体内所处的力学环境对其的作用。Lee 等^[12]在对保留和去除软骨终板的牛椎间盘进行体外培养时发现, 去除软骨终板的椎间盘在给予静态压力后可以在体外维持细胞活性和生物合成的反应性达 1 周; 对剥离软骨终板的牛椎间盘施加静态和循环负荷的对比研究结果显示静态负荷更适合于维持细胞活性^[13]。进一步的研究发现体外施加循环负荷可以改

第一作者简介: 男(1981-), 硕士研究生, 研究方向: 脊柱外科

电话: (027)83663412 E-mail: jack291@yahoo.com.cn

通讯作者: 李锋 E-mail: fengli@tjh.tjmu.edu.cn

善软骨终板的渗透性。但 Ariga 等^[14]在研究中发现静态压力可以促使体外培养的小鼠椎间盘器官模型的软骨细胞发生凋亡。这种体外器官培养模型的不断成熟将有助于减少实验动物的使用,较大椎间盘的整体体外器官培养的发展将会对将来椎间盘退变和修复的研究产生较大的影响。

在体外进行细胞培养和椎间盘器官培养适合研究各种因素对椎间盘退变的短期影响或效应,进一步长期的影响或效应研究则需要在椎间盘退变体内模型中进行。

2 椎间盘退变的体内模型研究

2.1 力学模型

维持椎间盘正常的结构、成分和机械力学特性需要一定基础量的机械力学负荷。椎体间的固定会使椎间盘由于缺少相应的机械力学刺激而导致蛋白合成减少,而高强度和/或高频率的动态和静态的压缩负荷会引起细胞凋亡、参与分解代谢的基因表达和酶活性增加,最终导致椎间盘结构性质的改变。说明力学微环境与椎间盘退变密切相关。

2.1.1 尾部椎间盘模型 由于动物尾部椎间盘便于施加干预,而且操作对周围结构的破坏和对正常生理功能的影响最小,大、小鼠和牛尾部椎间盘模型已经在研究中广泛应用。这些模型包括早期 Lindblom^[15]建立的一种强迫性弯曲鼠尾部的模型和后来使用外部装置对尾部椎间盘施加轴向压缩或不对称性压缩的模型^[16]。研究表明持续的轴向压缩会导致椎间盘高度的损失、韧性的改变和水含量的丢失,髓核胶原纤维的含量和细胞凋亡有所增加;不对称性压缩也可以引起细胞的死亡,编码蛋白多糖和Ⅱ型胶原的基因表达降低。

许多动物尤其是啮齿类动物的尾部椎间盘无论是生物力学特性还是结构成分都明显区别于人类腰部椎间盘,尤其是脊索细胞在大、小鼠髓核中会终身存在,而人在成年期就已经消失,因此不适合研究正常髓核细胞对机械力学负荷的反应。但是牛尾椎间盘的膨胀压力类似于人腰椎间盘,尤其是其结构成分和基质合成同青年人腰椎间盘具有可比性,可以作为研究青年人腰椎间盘的模型。

2.1.2 双足大、小鼠模型 双足大、小鼠是通过截除大、小鼠的前肢后诱导形成的一种可模拟人类直立姿势的动物模型,是早期为研究过度负重对人椎间盘病变的影响而创建的一种方法。Bailey 等^[17]在对双足大鼠和正常大鼠(四足鼠)进行的 24h 对比研究中发现双足大鼠站立的时间并不多于正常大鼠,双足鼠不是真正意义上的“直立”模型。不过长期的、反复的直立姿势却可以加速大鼠椎间盘的退变。该模型缺陷在于啮齿类动物髓核中有脊索细胞的存在,对各种力学干预的反应可能会不同正常人髓核细胞的反应,而且在伦理上亦不被支持。

2.2 损伤模型

通常椎间盘损伤动物模型是采用手术方式改变脊柱的机械力学结构造成脊柱不稳或通过损伤纤维环、终板而

引起椎间盘退行性改变的发生。

椎体间融合术、椎间关节或棘突切除术等对脊柱正常力学结构的手术破坏可使脊柱因过度运动引起纤维环分层退化和破裂、细胞凋亡和骨赘形成等椎间盘退行性改变。椎体间融合术可使邻近节段的椎间盘因过度运动发生退变或使融合椎体远端的椎间盘发生严重的退变^[18]。但椎间关节切除术和棘突切除术后能否发生椎间盘退变、什么时间发生退变还不是非常明确,而且术后破坏区周围的纤维化可能会使脊柱重新稳定起来。

Key 等^[19]最早应用手术刀损伤纤维环来诱发动物椎间盘退变模型,此后该法被广泛采用和改进。纤维环损伤后引起急性椎间盘突出和髓核内压力降低,引发椎间盘退变的级联反应。纤维环刀刺伤模型可以分为两类:纤维环全层刀刺伤模型和表层刀刺伤模型。前者由于伤及髓核,椎间盘退变发生发展相对比较迅速,可用于研究退变椎间盘的再生和评估相关治疗方法的疗效;而纤维环表层刀刺伤后发生退变则相对较慢,可能适于研究椎间盘退变的病理生理学过程。但这两种模型的可重复性都相对较差。手术暴露椎间盘前表面后用针穿刺纤维环则可以使椎间盘退变过程相对缓慢,具有渐进性和可重复性,便于研究椎间盘退变的病理过程和进行治疗性干预。深入的研究发现穿刺针的直径要达到椎间盘高度的 40% 才能引起明显椎间盘退变^[20]。所以利用针穿刺纤维环法诱发不同动物椎间盘退变时要考虑穿刺针的直径问题。通过在椎体终板手术钻孔形成终板损伤而诱发的椎间盘退变模型,髓核损失和纤维环的退行性变化与人椎间盘的退行性改变也非常相似^[21]。

2.3 生物学模型

生物学模型是从化学、营养和基因途径,通过降解基质、改变营养供应和基因修饰或敲除对椎间盘细胞直接产生影响。

2.3.1 注射降解酶 向动物椎间盘内注射木瓜凝乳蛋白酶、软骨素酶 ABC 等酶类物质可以模拟椎间盘的退变性改变,如髓核细胞丢失、蛋白多糖含量下降和生物力学功能障碍等。研究发现将软骨素酶 ABC 注入羊椎间盘可以形成缓慢、渐进的椎间盘退变^[22]。但是经过一段较长的时间后,髓核的蛋白多糖会逐渐恢复,并逐步接近正常的含量和组成。纤维连接蛋白及其片段在人椎间盘中会随着退变的发展不断增多,将纤维连接蛋白片段注入兔腰椎间盘可诱导髓核细胞和基质发生渐进的退行性改变,而且这种退变不会随着时间而自然修复^[23],适合于生理性退变模型的研究。

2.3.2 改变营养供应 椎间盘的营养主要依靠软骨终板通路和纤维环外周通路供应,任何影响椎间盘血液供应的因素都可能导致椎间盘因营养供应减少而发生退变。Iwahashi 等^[24]发现尼古丁可以使椎体软骨终板附近血管芽的密度降低、管腔变窄,最终导致蛋白多糖和胶原的合成降低。而 Hutton 等^[25]利用骨水泥阻断一侧或双侧软骨终板

的血供 70 周后,没有发现椎间盘膨胀、明显的髓核破裂或椎间隙变窄等肉眼可见的椎间盘退行性改变。最新的研究结果表明椎间盘器官培养模型营养供应受限后可使椎间盘细胞活力在短期内明显下降,但营养供应受限对相关基因的表达和硫酸软骨素的合成没有明显影响^[26]。

2.3.3 基因修饰或基因敲除 近几年基因修饰或敲除技术在椎间盘退变模型研究中的应用不断发展。研究发现蛋白多糖基因缺失可使软骨间质缺陷型小鼠的颈椎间盘发生退变。Kimura 等^[27]报道Ⅸ型胶原基因突变的转基因小鼠的椎间盘退变加速。近来基因敲除小鼠的应用也逐渐增多,如应用肿瘤坏死因子(TNF)基因敲除小鼠研究 TNF- α 与髓核源性神经根性疼痛相关性^[28]。Sahlman 等^[29]发现 Col2a1(编码Ⅱ型胶原)杂合子基因敲除小鼠可过早地发生椎体终板钙化和椎间盘退变。富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC)、生长分化因子-5(GDF-5)或筒箭毒碱(GDF-8)等基因表达缺失小鼠也用于基因与椎间盘退变关系的研究。

由于小鼠椎间盘内终身存在脊索细胞,转基因小鼠或基因敲除小鼠用于人椎间盘退变相关研究尚存疑问。而且人椎间盘退变可能是由多基因调控的,单个基因的研究具有局限性。

2.4 自发性椎间盘退变模型

自发性椎间盘退变模型是通过系统方法引起动物遗传性改变,或通过改变喂养食物引起动物行为方式改变而引起椎间盘退变的发生。比如遗传性脊柱后侧凸小鼠模型的颈胸椎结合处的椎间盘会过早地发生蛋白多糖合成率降低等退行性变化^[30]。用一种标准的实验饮食饲养地中海沙鼠,可使沙鼠产生糖尿病和广泛的椎间盘退变——终板硬化、纤维环破裂、细胞变形等^[31]。自发性椎间盘退变的动物模型适于评估自发性退变的病理生理学过程,但不适合于治疗性评估。

椎间盘退变动物模型研究的根本在于模拟人椎间盘退变后在组织水平、细胞水平甚至分子水平等方面的变化,以助于阐明人椎间盘退变的发生机制,以期最终为椎间盘退变的预防和新的治疗策略的发展提供依据。由于不同物种之间的差异,无论是自发的还是诱发的动物椎间盘退行性改变都可能明显不同于人椎间盘退变。在选择动物模型研究人椎间盘退变时,应根据不同的研究目的选择合适的动物及模型。

3 参考文献

1. Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it[J]? Spine, 2006, 31(18): 2151-2161.
2. Wang JY, Baer AE, Kraus VB, et al. Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture[J]. Spine, 2001, 26(16): 1747-1752.
3. Horner HA, Roberts S, Bielby RC, et al. Cells from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system on

matrix expression and cell phenotype [J]. Spine, 2002, 27(10): 1018-1028.

4. Horner HA, Urban JP. 2001 Volvo Award winner in basic science studies: effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc[J]. Spine, 2001, 26(23): 2543-2549.
5. Miyamoto H, Doita M, Nishida K, et al. Effects of cyclic mechanical stress on the production of inflammatory agents by nucleus pulposus and annulus fibrosus derived cells in vitro[J]. Spine, 2006, 31(1): 4-9.
6. Rannou F, Richette P, Benallaoua M, et al. Cyclic tensile stretch modulates proteoglycan production by intervertebral disc annulus fibrosus cells through production of nitrite oxide [J]. J Cell Biochem, 2003, 90(1): 148-157.
7. Miyamoto H, Doita M, Nishida K, et al. Effects of cyclic mechanical stress on the production of inflammatory agents by nucleus pulposus and annulus fibrosus derived cells in vitro[J]. Spine, 2006, 31(1): 4-9.
8. Reza AT, Nicoll SB. Hydrostatic pressure differentially regulates outer and inner annulus fibrosus cell matrix production in 3D scaffolds[J]. Ann Biomed Eng, 2008, 36(2): 204-213.
9. Nie K, Yang SH, Xiong LM, et al. Regulatory effect of nicotinamide on apoptosis and proliferation of rabbit nucleus pulposus cell in vitro[J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2008, 12(37): 7382-7385.
10. Poveda L, Hottiger M, Boos N, et al. Peroxynitrite induces gene expression in intervertebral disc cells[J]. Spine, 2009, 34(11): 1127-1133.
11. Sarver JJ, Elliott DM. Mechanical differences between lumbar and tail discs in the mouse [J]. J Orthop Res, 2005, 23(1): 150-155.
12. Lee CR, Iatridis JC, Poveda L, et al. In vitro organ culture of the bovine intervertebral disc: effects of vertebral endplate and potential for mechanobiology studies [J]. Spine, 2006, 31(5): 515-522.
13. Korecki CL, MacLean JJ, Iatridis JC. Characterization of an in vitro intervertebral disc organ culture system[J]. Eur Spine J, 2007, 16(7): 1029-1037.
14. Ariga K, Yonenobu K, Nakase T, et al. Mechanical stress-induced apoptosis of endplate chondrocytes in organ-cultured mouse intervertebral discs: an ex vivo study[J]. Spine, 2003, 28(14): 1528-1533.
15. Lindblom K. Intervertebral-disc degeneration considered as a pressure atrophy[J]. J Bone Joint Surg Am, 1957, 39(4): 933-945.
16. Lai A, Chow DH, Siu SW, et al. Effects of static compression with different loading magnitudes and durations on the intervertebral disc: an in vivo rat-tail study[J]. Spine, 2008, 33(25): 2721-2727.
17. Bailey AS, Adler F, Min Lai S, et al. A comparison between bipedal and quadrupedal rats: do bipedal rats actually as

- sume an upright posture[J].Spine,2001,26(14):E308-313.
18. 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.
19. Key JA, Ford LT. Experimental intervertebral-disc lesions[J]. J Bone Joint Surg Am,1948,30(3):621-630.
20. Elliott DM, Yerramalli CS, Beckstein JC, et al. The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration[J].Spine,2008,33(6):588-596.
21. Holm S, Holm AK, Ekstrom L, et al. Experimental disc degeneration due to endplate injury[J].J Spinal Disord Tech,2004,17(1):64-71.
22. 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.
23. Oegema TR Jr, Johnson SL, Aguiar DJ, et al. Fibronectin and its fragments increase with degeneration in the human intervertebral disc[J].Spine,2000,25(21):2742-2747.
24. Iwahashi M, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al. Mechanism of intervertebral disc degeneration caused by nicotine in rabbits to explicate intervertebral disc disorders caused by smoking [J].Spine,2002,27(13):1396-1401.
25. Hutton WC, Murakami H, Li J, et al. The effect of blocking a nutritional pathway to the intervertebral disc in the dog model[J].J Spinal Disord Tech,2004,17(1):53-63.
26. Junger S, Gantenbein-Ritter B, Lezuio P, et al. Effect of limited nutrition on in situ intervertebral disc cells under simulated-physiological loading[J].Spine,2009,34(12):1264-1271.
27. Kimura T, Nakata K, Tsumaki N, et al. Progressive degeneration of articular cartilage and intervertebral discs; an experimental study in transgenic mice bearing a type IX collagen mutation[J].Int Orthop,1996,20(3):177-181.
28. Yamashita M, Ohtori S, Koshi T, et al. Tumor necrosis factor- α in the nucleus pulposus mediates radicular pain, but not increase of inflammatory peptide, associated with nerve damage in mice[J].Spine,2008,33(17):1836-1842.
29. Sahlman J, Inkien R, Hirvonen T, et al. Premature vertebral endplate ossification and mild disc degeneration in mice after inactivation of one allele belonging to the Col2a1 gene for type II collagen[J].Spine,2001,26(23):2558-2565.
30. Venn G, Mason RM. Changes in mouse intervertebral-disc proteoglycan synthesis with age. Hereditary kyphoscoliosis is associated with elevated synthesis [J].Biochem J,1986,234(2):475-479.
31. Silberberg R. Histologic and morphometric observations on vertebral bone of aging sand rats[J].Spine,1988,13(2):202-208.
- (收稿日期:2009-05-18 修回日期:2009-06-23)
(本文编辑 卢庆霞)

消息

第一届经口咽寰枢椎前路复位钢板系统(TARP)内固定技术学习班通知

广州军区广州总医院骨科医院、《中国骨科临床与基础研究杂志》编辑部定于2010年4月2~4日在广州联合举办“第一届经口咽寰枢椎前路复位钢板系统(TARP)内固定技术学习班”。本次学习班为全军继续教育项目(8学分),会议主要包括:

一、理论授课:(1)寰枢椎前路的应用解剖;(2)经口咽 TARP 手术的围手术期处理;(3)颅底疾患的诊断与治疗;(4)TARP 手术操作技术;(5)经口咽 TARP 手术的并发症及其预防处理;(6)经口咽 TARP 手术的临床护理;(7)经口咽 TARP 手术的麻醉及相关问题。

二、实践操作:学员6人一组,利用新鲜尸体标本进行经口咽解剖、显露、减压;TARP 钢板寰枢椎螺钉进钉点确定、钉道准备、螺钉置入;枢椎复位螺钉置入;利用寰枢椎复位器模拟脱位复位过程;逆向枢椎椎弓根螺钉进钉点确定、钉道准备及螺钉置入等。届时将由广州军区广州总医院的脊柱外科专家进行现场辅导。

学员要求:为保证学习效果,名额限在30名以内,学员需为高年资主治医师以上,要求有一定的脊柱外科临床经验。

日程安排:2010年4月2日全天报到;4月3日上午进行理论授课;4月3日下午及4日上午进行实践操作;4日下午撤离。欢迎参会代表自带病例资料进行现场讨论。

报到地点:广州市流花路111号 广州军区广州总医院骨科医院。

联系地址:510010 广州市流花路111号 广州军区广州总医院骨科医院,联系人:马向阳(13640254321),麦小红(020-36655321),尹庆水(020-36654194);E-mail:gzzzy_gk@126.com。

报名截止日期:2010年3月15日。欢迎各位骨科同仁踊跃参加。