

建立剪切应力导致椎间盘退变模型

夏冬冬¹, 林胜磊¹, 赵浩增¹, 沈中海¹, 李耀¹, 王向阳², 徐华梓², 池永龙²

(1. 温州医学院 第二临床医学院, 浙江 温州 325000; 2. 温州医学院附属第二医院 骨科, 浙江 温州 325100)

摘要: **目的** 建立剪切应力导致椎间盘退变的在体动物模型,探索剪切应力与椎间盘退变之间的关系。**方法** 20只成年日本大耳白兔随机平均分成2组。加载组通过手术在动物L4/5节段植入自行研制的剪切应力加载装置,并加载50 N的剪切力4周;对照组只植入加载装置但不加载剪切力。4周后处死所有动物并对所有相关节段的椎间盘做病理检查。**结果** 术后的影像学检查显示加载装置位于动物腰椎,手术过程和植入的加载装置对实验动物的日常活动与饮食均无影响。病理学检查发现加载组椎间盘的纤维环组织排列紊乱,正常髓核细胞明显减少。**结论** 新型装置的设计减少了对动物椎体的创伤,并且可以提供可靠的剪切应力;在体动物模型的建立揭示一定的剪切应力可导致动物椎间盘退变,对进一步研究载荷与椎间盘退变间的关系具有较大的意义。

关键词: 剪切应力; 加载; 椎间盘退变; 影像学; 病理学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Development of shear force-induced intervertebral disc degeneration model

XIA Dong-dong¹, LIN Sheng-lei¹, ZHAO Hao-zeng¹, SHEN Zhong-hai¹, LI Yao¹, WANG Xiang-yang², XU Hua-zi², CHI Yong-long² (1. *The Second Clinical Medical College, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China*; 2. *Department of Orthopaedic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325100, Zhejiang, China*)

Abstract: **Objective** To develop a shear force-induced intervertebral disc degeneration (IDD) *in vivo* animal model, and investigate the relationship between shear stress and IDD. **Methods** A total of 20 Japanese white rabbits were randomly divided into two groups. In loading group ($n=10$), shear force of 50 N was applied on the disc of L4/5 for 4 weeks by a custom-made external shear force loading device. In control group ($n=10$), the animals underwent a sham operation with the external loading device situated, but their discs remained unloaded. After 4 weeks, all the intervertebral discs of L4/5 were executed for the pathologic examination. **Results** The postoperative radiographic examination showed a perfect position of the loading device, and the operation process and implanted loading device had no effect on daily activities and diet of the experiment animals. The pathological examination showed an irregular arrangement of annulus fibrosus and a significant decrease of normal nucleus pulposus cells in loading group. **Conclusions** The new custom-made device greatly reduced the wounds on animal vertebra and provided a reliable shear force. The development of *in vivo* animal model indicates that IDD can be induced by shear force, which is of significance to further study the relationship between loading and IDD.

Key words: Shear force; Loading; Intervertebral disc degeneration (IDD); Radiology; Pathology

椎间盘是人类脊柱的一个重要组成部分,它的主要功能是吸收、缓冲和传递人体所受的载荷,使得脊柱可以在一定范围内活动^[1]。椎间盘的退变往往会造成功能紊乱甚至功能丧失,一部分椎间盘的退变还会引起腰椎间盘突出症、椎间盘源性腰痛和颈椎病等脊柱退行性疾病,严重影响患者的生活质量,给家庭和社会造成巨大的经济负担。有研究发现超出生理范围的轴向压缩可以明确引起椎间盘的退变^[2],由此提出以机械载荷因素为始动因素而致使椎间盘退变的概念,即椎间盘的非生理性负荷诱导椎间盘结构损害和一系列细胞介导的不可逆性反应,而这些变化可进一步通过营养代谢通路的薄弱、年龄的变化、修复机制的不完善以及遗传因素等加深椎间盘的退变,由此明确载荷与椎间盘退变存在着密切的关系。

为了进一步明确载荷和椎间盘退变之间的关系,研究者们陆续建立了各种在体动物模型。早在20世纪90年代,就有研究者在实验动物鼠的尾椎上安装加载装置从而实现对椎间盘的加载实验研究^[3-5]。在随后的研究中,Kroeber等^[6]发明了应用于实验动物兔的轴向压力加载装置,在对兔腰L4/5椎间盘进行长达28 d、2.4 MPa的载荷压缩后发现实验节段的椎间盘出现明显的退变表现。虽然Kroeber发明了应用于更大实验动物的加载装置,但是此装置仅能提供轴向的载荷加载,所建立的动物模型也只能用于研究轴向压力对椎间盘的影响。为弥补以往在体动物实验研究中过分单一研究轴向压缩载荷的不足,本课题组通过设计制作可以产生剪切应力并能应用于活体实验动物的加载装置,建立在体动物模型,探索剪切应力对椎间盘的影响,从而实现多层次、多角度研究载荷与椎间盘退变之间的关系。

1 加载装置的系统结构

设计本加载装置的根本目的是为加载实验提供可控的剪切应力。加载装置包括支架和两个夹持装置(见图1)。支架的一个侧面上开有一个U形缺口,两个夹持装置相互平行设置,其中一个夹持装置的顶面固定在支架的底面上,另一个夹持装置的顶面上固定有一个竖直设置的连接柱,连接柱自下而上贯穿U形缺口并从支架的顶面穿出,连接柱的中

部具有螺纹部,且螺纹部上螺装有一个调节螺母,调节螺母位于U形缺口内,调节螺母的上方设置一个弹簧,弹簧套装在连接柱上且与U形缺口的上壁相抵。支架的底面上具有两个平行设置的承台,两个夹持装置分别设置在两个承台上。通过旋转调节螺母就可以使其中的一个夹持装置升降,与另一个夹持装置产生纵向的相对位移,使两个夹持装置所夹持的腰椎间盘产生剪切应力,从而应用于研究剪切应力与椎间盘退变之间的关系。

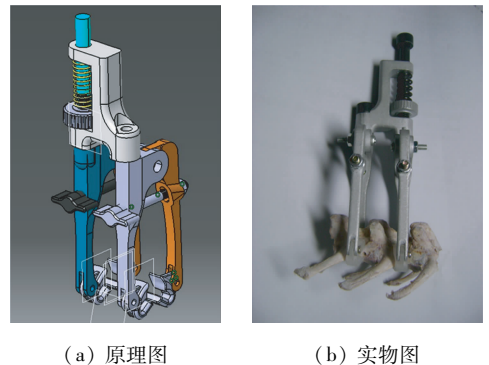


图1 剪切应力加载装置

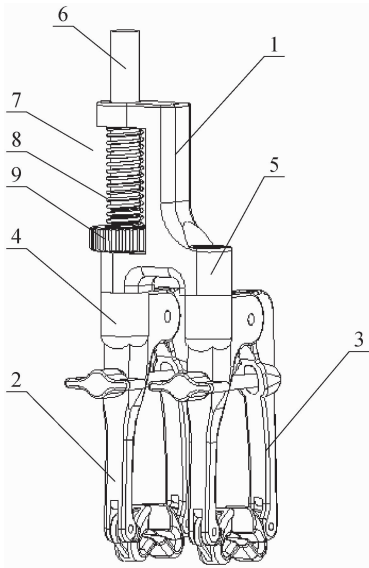
Fig. 1 Shear force loading device (a) Schematic diagram, (b) Picture

2 具体设计

如图2所示,本加载装置包括支架1和两个夹持装置。两个夹持装置结构相同,且相互平行设置。为了便于描述,以图1所示的状态为例,位于左方的夹持装置定义为左夹持装置2,位于右方的夹持装置定义为右夹持装置3。

支架1的下端具有两个左、右平行设置的承台,分别定义为左承台4和右承台5,右夹持装置3的上端固定在右承台5的底面上,左承台4的上方设有一个U形缺口7,连接柱6的下端自上而下穿过U形缺口并从左承台的底面穿出后与左夹持装置2的上端固定,连接柱6的上端向上穿出支架的顶面,连接柱的中部具有螺纹,且连接柱上装有一个调节螺母9,调节螺母9位于U形缺口内,调节螺母的上方设置一个弹簧8,弹簧套装在连接柱上且与U形缺口的上壁相抵,弹簧用于产生剪切力的动力,调节螺母可以调节弹簧弹力的大小。

夹持装置中卡爪的设计的根本目的是为了代替借用钢针贯穿动物腰椎椎体从而固定的加载装置的



1-支架, 2-左夹持装置, 3-右夹持装置, 4-左承台, 5-右承台, 6-螺柱, 7-U形缺口, 8-弹簧, 9-调节螺母

图2 剪切应力加载装置设计图

Fig.2 Schematic design of the shear force loading device

传统思路,因为一般实验动物椎体较小,钢针横穿会有较大创伤。基于实验动物腰椎形态的3D研究而设计出的卡爪不仅可以完美贴近椎体,具有牢固夹持力,并且对椎体本身没有创伤(见图3)。

3 动物实验

3.1 实验动物

20只成年雌性日本大耳白兔(均质量3kg),随

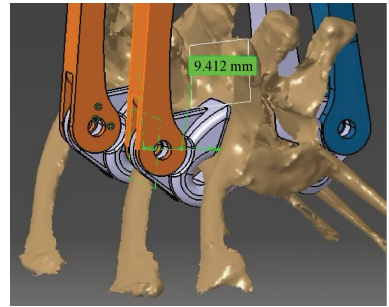


图3 夹持装置示意图

Fig.3 Schematic diagram of the clamping device

机分成两组。A组为加载组,即手术置入剪切应力加载装置(装置总质量110g),并实施50N的剪切力加载4周;B组为对照组,即手术置入剪切应力加载装置,但不加载载荷。

3.2 手术过程

使用静脉注射(10%水合氯醛溶液1.5 mL/kg)的方法在术前常规给予兔子实施全身麻醉。在确定麻醉达到一定深度后(用止血钳夹其四肢无肌肉收缩反应,无角膜反射)摆好实验动物的手术体位(即俯卧位),并减去手术区域毛发(见图4(a))。常规消毒铺巾后在兔背侧腰L4/5节段的棘突一侧皮肤作一长约3cm的纵形切口(见图4(b))。切开皮肤层后,拉开皮肤后再纵形切开覆盖于腰大肌的薄的阔肌(见图4(c))。切开阔肌后,可以明显看到一个腰大肌间隙,用小拉钩钝性分离此间隙(见图4(d))。稍作分离后可明显感觉到小拉钩触碰到腰

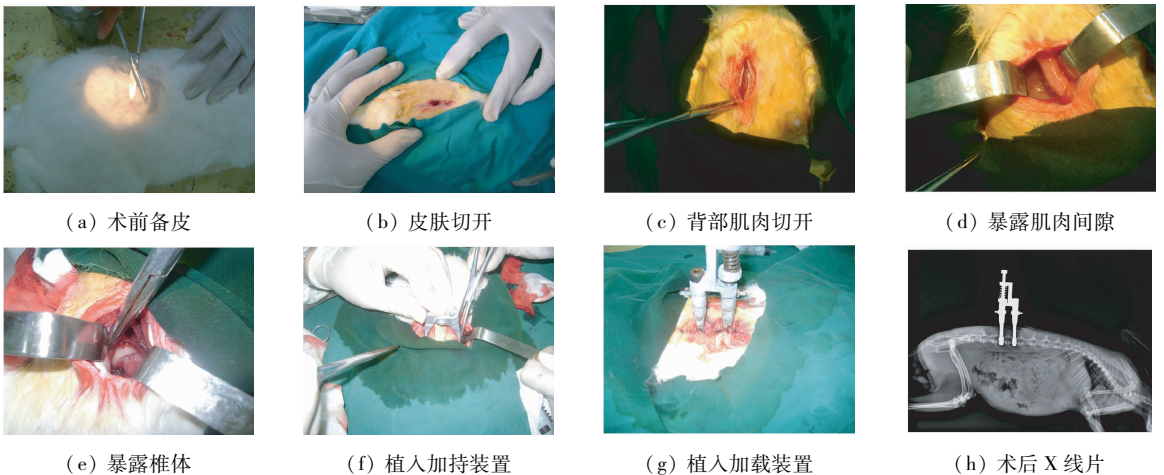


图4 手术过程

Fig.4 Operation procedure (a) Preoperative hair removal, (b) Incision of skin, (c) Incision of muscles, (d) Exposing muscle clearance, (e) Exposing vertebral body, (f) Implanting clamping device, (g) Implanting loading device, (h) Postoperative X-ray

椎的横突,此时用止血钳稍作钝性分离,便可清楚看清加载装置卡口置入的部位即腰椎横突与椎体结合处(见图4(e))。在另一侧作相同操作后便可将经高温消毒过的夹持装置置入动物体内,并拧紧螺栓使其固定在动物腰椎上(见图4(f))。最后缝合创口,并肌注抗生素预防感染(见图4(g))。术后X线检测显示装置准确在位(见图4(h))。

3.3 标本处理

4周后,在全麻状态下处死所有实验动物,获取保留上下终板的L4/5椎间盘组织,室温下在10%的福马林溶液中固定3d,10%甲酸脱钙1周。常规石蜡包埋后切片,进行HE染色,显微镜下观察组织形态。

4 结果

4.1 实验动物

20只实验动物,2只死于手术前的麻醉,其余18只未出现麻醉意外、后肢瘫痪及术后创口感染等手术并发症,并在术后1d恢复进食与饮水,加载装置的植入并未影响实验动物的正常活动。

4.2 病理结果

对椎间盘髓核及纤维环的HE染色后发现,在放大40倍的视野下加载组椎间盘髓核组织出现明显挛缩,并显得杂乱无章,其周围的纤维环组织也失去了正常的层状排列的形态结构(见图5(a));而对照组髓核饱满,其周围的纤维环组织排列有序(见图5(d))。在放大100倍的视野下可以看到加载组椎间纤维环细胞排列紊乱,软骨细胞脱离终板向髓核内迁移,内层纤维环与终板交界处软骨细胞随内层纤维向皱缩的髓核边缘迁移,髓核组织逐渐皱缩,胶原纤维增多,髓核与终板及内层纤维环的界限逐渐不清(见图5(b));而对照组内层纤维环与终板交界处细胞沿胶原纤维有序排列,与髓核界限清晰(见图5(e))。在200倍视野下加载组的髓核组织内几乎看不到正常的髓核细胞,在红色方框内可以看到髓核组织中的正常的脊索细胞被软骨样细胞取代、胶原纤维增多,髓核组织显得极为稠密并且杂乱(见图5(c));而在对照组则可以清楚地看到正常的髓核细胞(见图5(f))。

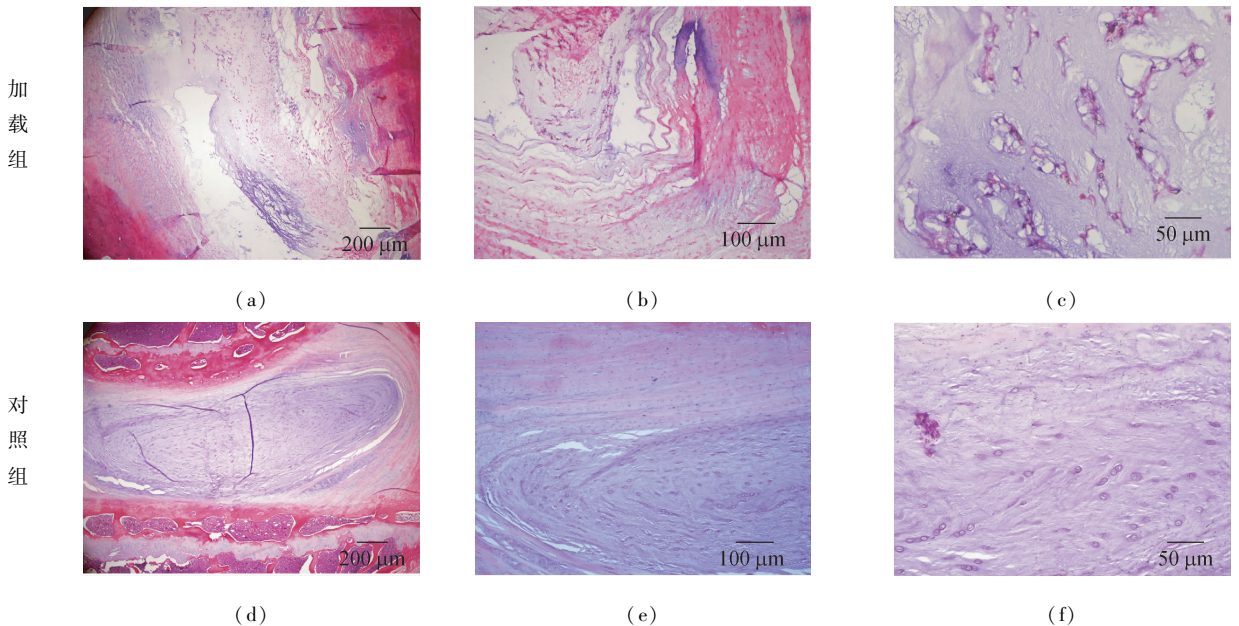


图5 病理检查结果 (a)(b)(c)加载组术后椎间盘组织HE染色,(d)(e)(f)未加载组术后椎间盘组织HE染色

Fig.5 Pathological results (a)(b)(c) Hematoxylin and eosin stained sections of loading disc, (d)(e)(f) Hematoxylin and eosin stained sections of control disc

5 讨论

人类多种脊柱疾病(例如颈椎病、腰椎间盘突出症等)的根本病理变化是椎间盘退变,但其确切病因及病理生理机制目前仍不清楚。建立椎间盘退变实验动物模型,对深入研究其病因和发生机制十分重要和必要。到目前为止,用于建立椎间盘退变模型的动物已有包括鼠、兔、犬、牛、羊、猪、猴等10余种。在动物模型的物种选择上,虽然灵长类与人类在解剖上最为接近,但由于动物实验伦理和经济因素等限制,难以广泛应用;而牛、羊、猪、犬等大型哺乳动物也因价格昂贵,生化检测试剂较难购买,饲养时间长,短期内不易见到退变等条件限制而难以大量应用。兔作为构建椎间盘退变模型的常规实验动物,具有实验周期短、实验结果明显、经济、易于饲养等特点,是用于构建椎间盘退变模型较为实用、可行的动物。因此,本课题组将实验动物定为日本大耳白兔,针对其腰椎的特点设计研制一套腰椎剪切应力加载装置,并在活体日本大耳白兔上建立椎间盘退变的模型。

在体动物实验是研究椎间盘退变和载荷之间关系的一个重要手段,可以全面反映出在多种生理因素存在条件下载荷因素对实验动物的作用,通过在体实验得出的数据往往和人类的更为贴近。然而利用在体动物研究载荷与椎间盘退变关系的一大难点是如何制作一个既能产生实验需要的载荷又能植入实验动物体内却对实验动物产生最小伤害的加载装置。很多研究虽然利用不同的实验动物^[6-8],但是它们固定加载装置与动物椎体的方法却极为相似——通过有创的方法将装置固定于动物的椎体上。这种方法虽然可以有效地将实验所用的装置固定于相关的实验节段的动物脊柱,但是也会对椎体产生一定的破坏,尤其是小鼠、大鼠和兔这些小型实验动物其椎体本身就较为细小,若再强行打入钢针等固定物必定会对椎体本身产生较大的破坏,甚至会出现大出血和椎体骨折等情况(在本实验前期准备期间本课题组曾模仿 Kroeber 等^[6]的方法,但发现 1.5 mm 克氏针的打入对动物腰椎的破坏较大,有出血甚至有椎体出现横断)。故本课题组提出了一种对实验动物椎体无创却又可以提供可靠固定的加载方法,即通过设计可以贴附动物腰椎的卡爪夹持来固定加

载装置(见图3)。这种固定方法的设计具有许多优点,首先由于固定不需要通过钢针等打入动物椎体,减小了对实验动物的创伤;其次,减少了相应椎体的创伤,就降低了对实验阶段椎间盘出载荷因素外其他因素的影响;最后,卡爪的设计大大减少了手术植入加载装置的时间,从而进一步降低了手术本身对实验动物的影响。在实验过程中发现,设计的加载装置始终位于动物腰椎,对实验动物的日常活动与饮食均无影响。

之前已有许多有关载荷与椎间盘退变之间关系的研究^[8-10],但是这些研究中的载荷往往都过于单调,仅仅关注轴向的压缩。而人体椎间盘抗压能力较强,抗剪切力较弱;剪切应力易引起椎间盘微损伤,是导致椎间盘退变的主要载荷^[11]。临床实践发现,椎间盘退变最早、最易发生的部位在人体脊柱的腰骶段(L4/5、L5/S1),可能与该节段前倾角大,相对于其他节段承载着更多的剪切应力有关。因此,剪切应力是作用于椎间盘的关键生物力学因素,对椎间盘退变具有十分关键的作用。故而越来越多的学者认为,研究椎间盘时应把剪切应力作为一个重要的因素考虑到实验过程和相关模型制作过程中去^[12-15]。但这些实验均为椎间盘离体实验,仅研究椎间盘在剪切力作用下的形态学变化和生物力学特性,难以阐明其机制。本研究在活体实验动物兔上研究剪切应力与椎间盘退变之间的关系,通过植入剪切应力加载装置4周后在后期的病理检查中发现:纤维环细胞排列紊乱,内层纤维环与终板交界处软骨细胞随内层纤维向皱缩的髓核边缘迁移;髓核组织逐渐皱缩,纤维增多,髓核与终板及内层纤维环的界限逐渐不清;正常的髓核细胞消失不见,髓核组织显得极为稠密并且杂乱。这预示50 N剪切力加载4周后,椎间盘发生明显的退变。Kroeber 等^[6]在兔腰椎给予加载的载荷大小为2.4 MPa,而本研究则是给予50 N(约为1 MPa)加载,因为过大的剪切载荷将会造成动物椎体的侧向滑移破坏脊髓,而1 MPa载荷也符合 Lotz 等^[16]提出的超过0.8 MPa 载荷对椎间盘有破坏作用的理论。病理检查的实验结果进一步证实一定大小的剪切应力将会导致椎间盘的退变,揭示了载荷与椎间盘退变之间的关系。由于加载装置的设计制作和相关动物模型的建立仅是研究剪切应力与椎间盘关系的第一步,关于其更深

人的探索例如影像学和分子生物学的研究还有待于下一步的实验。

参考文献:

- [1] Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006, 31(18): 2151-2161.
- [2] Walsh AJ, Lotz JC. Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading [J]. *J Biomech*, 2004, 37(3): 329-337.
- [3] Wuertz K, Godburn K, MacLean JJ, *et al.* In vivo remodeling of intervertebral discs in response to short- and long-term dynamic compression [J]. *J Orthop Res*, 2009, 27(9): 1235-1242.
- [4] Ching CT, Chow DH, Yao FY, *et al.* Changes in nuclear composition following cyclic compression of the intervertebral disc in an in vivo rat-tail model [J]. *Med Eng Phys*, 2004, 26(7): 587-594.
- [5] Barbir A, Godburn KE, Michalek AJ, *et al.* Effects of torsion on intervertebral disc gene expression and biomechanics, using a rat tail model [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(8): 607-614.
- [6] Kroeber MW, Unglaub F, Wang H, *et al.* New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27(23): 2684-2690.
- [7] Iatridis JC, Mente PL, Stokes IA, *et al.* Compression-induced changes in intervertebral disc properties in a rat tail model [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1999, 24(10): 996-1002.
- [8] Hutton WC, Toribatake Y, Elmer WA, *et al.* The effect of compressive force applied to the intervertebral disc in vivo. A study of proteoglycans and collagen [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1998, 23(23): 2524-2537.
- [9] Lotz JC, Colliou OK, Chin JR, *et al.* Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: An in vivo mouse model and finite-element study [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1998, 23(23): 2493-2506.
- [10] Hee HT, Chuah YJ, Tan BH, *et al.* Vascularization and morphological changes of the endplate after axial compression and distraction of the intervertebral disc [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(7): 505-511.
- [11] 戴力扬, 王向阳. 骨骼系统生物力学 [M]//胡蕴玉, 主编. 现代骨科基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 98-147.
- [12] Hollingsworth NT, Wagner DR. Modeling shear behavior of the annulus fibrosus [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2011, 4(7): 1103-1114.
- [13] Little JP, Pearcy MJ, Tevelen G, *et al.* The mechanical response of the ovine lumbar annulus fibrosus to uniaxial, biaxial and shear loads [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2010, 3(2): 146-157.
- [14] 黄菊英, 李海云, 吴浩, 等. 腰椎间盘突出症力学特征的仿真计算方法[J]. *医用生物力学*, 2012, 27(1): 96-101.
- Huang JY, Li HY, Wu H, *et al.* Simulation calculation on biomechanical properties of lumbar disc herniation [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(1): 96-105.
- [15] 季伟, 王向阳, 徐华梓, 等. 脊柱三维运动测试实验装置的研制[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(5): 454-459.
- Ji W, Wang XY, Xu HZ, *et al.* Development of an experimental device for measuring three-dimensional movement of the spine [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(5): 454-459.
- [16] Lotz JC, Chin JR. Intervertebral disc cell death is dependent on the magnitude and duration of spinal loading [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2000, 25(12): 1477-1483.