

## · 基础研究 ·

# 大鼠破裂型椎间盘突出模型的建立及突出物重吸收机制的研究

刘锦涛<sup>1</sup>, 姜宏<sup>1</sup>, 王拥军<sup>2</sup>, 徐坤林<sup>1</sup>, 张志刚<sup>1</sup>, 李红卫<sup>1</sup>

(1. 苏州市中医医院骨科, 江苏 苏州 215003; 2. 上海中医药大学脊柱病研究所)

**【摘要】 目的:**设计一种新的腰椎间盘突出重吸收模型。**方法:**取 20 只体重(300±20) g 的 3 月龄远交群(SD)雄性大鼠, 依据随机数字表随机分成实验组和对照组。实验组经手术切除尾椎椎间盘, 埋植在硬膜外; 动物 30 d 后处死, 取埋植髓核组织, 进行 HE 染色, 流式细胞仪以及免疫组化检测。对照组, 将线团埋植在背部肌肉内, 30 d 后处死作实验对照。**结果:**实验组 30 d 后的 TNF- $\alpha$ 、VEGF 免疫组化染色呈阳性。实验组的 Th、B 细胞数量与对照组比较差异有统计学意义。**结论:**大鼠破裂型椎间盘突出模型能够很好的揭示破裂型椎间盘突出后的重吸收过程, 为进一步研究椎间盘突出后的重吸收提供一种新的动物模型。

**【关键词】** 椎间盘移位; 吸收; 模型, 动物; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2010.05.017

**A study of a rat lumbar disc herniation model and the mechanism spontaneous of resorption** LIU Jin-tao, JIANG Hong\*, WANG Yong-jun, XU Kun-lin, ZHANG Zhi-gang, LI Hong-we. \*Department of Orthopaedics, Suzhou Hospital of TCM, Suzhou 215003, Jiangsu, China

**ABSTRACT Objective:** To establish a new animal model of resorption of lumbar disc herniation. **Methods:** Twenty 3-month-old Sprague Dawley (SD) male rats were randomly divided into experimental group and control group. The caudal discs of the experimental rats were surgically removed and were implanted in the epidural. The animals were killed at 30 days, and the implanted nucleus pulposus were taken out for HE staining, flow cytometry and immunohistochemistry. In the control group, coils were implanted in the back muscles, and the animals were killed at 30 days after the operation for the above test. **Results:** In the experimental group, immunohistochemical staining of TNF- $\alpha$ , VEGF were positive at 30 days. The Th cells and B cells in the experimental group were more than that in the control group with statistically significant differences. **Conclusion:** The model can well reveal the re-absorption process of the ruptured disc, and provide a new re-absorption disc animal model for the further study.

**Key words** Intervertebral disc displacement; Absorption; Models, animal; Rats

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(5): 370-372 www.zggszz.com

部分腰椎间盘突出可以被自然重吸收, 而椎间盘突出后自然重吸收过程涉及一系列复杂的形态、生化指标的改变。本实验旨在建立一种利用大鼠模拟人的椎间盘突出后自然重吸收过程的动物模型, 并研究其相关的机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 选取 3 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 20 只, 体重(300±20) g。依照随机数字表随机分为对照组和实验组, 每组 10 只。实验动物由中科院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(沪)2007-0005。动物实验环境: 清洁级。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 实验组** 采用氯胺酮(0.10 g/kg)腹腔注射,

麻醉成功后, 剃去背部体毛, 橡皮筋扎住尾部。常规消毒, 无菌条件下, 每只切取尾椎椎间盘 2 个, 包含上下软骨终板。用针刺破上下终板, 使髓核暴露, 造成游离或破裂状态。用 7 号手术线“米”形包绕椎间盘, 放入生理盐水器皿备用。然后无菌条件下后正中中线后路切开背部皮肤、肌肉, 暴露脊椎, 去掉椎板。将取出尾椎间盘放入, 逐层缝合。

**1.2.2 对照组** 成功实施麻醉后, 后正中中线后路切开皮肤、肌肉, 暴露脊椎, 去掉椎板, 放入线团, 逐层缝合。

## 1.3 观测指标与方法

**1.3.1 组织学观察及免疫组化分析** 动物 30 d 后处死, 实验组每只大鼠埋植 2 个椎间盘。取其一用多聚甲醛浸泡 24 h, 10% EDTA 脱钙 1 周、梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋固定、切片。HE 染色法观

察形态改变及免疫组化分析,观察 TNF- $\alpha$ , VEGF。对照组切取正常尾椎椎间盘 1 个,检测相同指标。

**1.3.2 流式细胞仪检测** 动物 30 d 后处死。实验组取埋植的另一椎间盘,用眼科剪剪碎,放入研钵轻度研磨,用 10 ml PBS 反复冲洗组织,经匀浆机反复震荡混匀,细胞滤网滤去组织将液体导入离心管,取 3 ml 组织冲洗液,放入离心机导管以 2 000 r/5 s,离心 15 min,弃上清。经过一系列处理后,加入抗体 FITC Anti-rat CD4, FICT Mouse IgG1, k Isotype control (美国 BioLegend 公司提供)。分别检测 Th(T 辅助细胞)、B 细胞。计算机数据处理软件 Lysis(美国 B.D. 公司提供)分析得出 Th、B 细胞的含量比例。对照组取出背部埋线肌肉周围组织,作相同检测对照(旨在排除由线团引起的免疫反应)。

**1.4 统计分析** 采用 SPSS 13.0 统计软件包分析数据,对 Th 和 B 细胞含量两组之间的差异进行单因素方差分析检验。数据以( $\bar{x} \pm s$ )形式表示, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 组织学观察及免疫组化分析**

**2.1.1 组织学观察结果** 对照组椎间盘(即正常状态下椎间盘),HE 染色片在光镜 $\times 100$  倍下,可见中心为髓核区,胶原纤维排列呈网状,髓核细胞较小,呈圆形,散在其中;外周环绕的是纤维环区,大量胶原纤维散在排列,纤维环细胞为长梭形,核呈长柱状,染色深。实验组:纤维环板层结构变化不大,排列轻度不规则,髓核组织变化较大,胶原纤维组织皱缩甚至消失。髓核细胞更小,细胞核聚集,细胞间质部分消失,形状极不规则。

**2.1.2 免疫组化检测结果** 10 例实验组标本,做 VEGF, TNF- $\alpha$  免疫组化检测均成阳性,只是强弱不同(见图 1-2)。

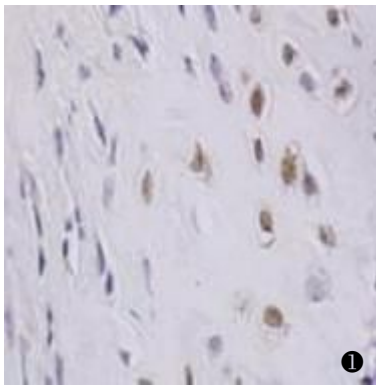


图 1 实验组髓核组织 VEGF 免疫染色,其中黄色颗粒为染色阳性颗粒(光镜 $\times 400$ )

Fig.1 VEGF immunostaining in the experimental group nucleus pulposus, in which particles were stained yellow granules under light microscope  $\times 400$



图 2 实验组 TNF- $\alpha$  免疫染色,黄色颗粒为染色阳性颗粒(光镜 $\times 400$ )

Fig.2 TNF- $\alpha$  immunostaining in the experimental group, in which particles were stained the yellow granules under light microscope  $\times 400$

**2.2 流式细胞仪检测** 对照组与实验组 Th、B 细胞的含量有明显差异(见表 1)。在对照组周围组织的检测中细胞数量比例明显小于实验组。

表 1 对照组与实验组 Th、B 细胞的含量( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab.1 The Th, B cells in control group and experimental group( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	鼠数(只)	Th 细胞含量	B 细胞含量
对照组	10	9.879 $\pm$ 2.18	13.79 $\pm$ 5.87
实验组	10	40.55 $\pm$ 8.61**	31.93 $\pm$ 14.37*

注:与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\* $P < 0.05$

Note: Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$

**3 讨论**

近年来,随着影像学技术的不断发展,关于椎间盘突出后的自然重吸收现象在临床上不断得到证实。腰椎间盘突出组织的不断缩小和消失被认为是椎间盘突出保守治疗的原因之一。椎间盘突出后自然重吸收的机制目前尚无明确定论。仅仅从临床观察尚不足以阐明其吸收机制,为进一步研究必须建立一种与临床有关的动物模型以供观察评定。

**3.1 椎间盘突出后发生重吸收的关键因素与机制**

经过多年的临床研究证实,椎间盘突出后自然重吸收的现象主要发生在后纵韧带破裂型或游离型,是否接触血运是椎间盘突出后能否自然重吸收的关键因素之一<sup>[1]</sup>。目前比较公认的几种椎间盘突出后自然重吸收机制是炎性细胞吞噬作用、突出组织血管化以及突出椎间盘组织诱发自身免疫作用。

本动物模型切取大鼠尾椎椎间盘,用针刺破上下软骨终板,埋植在硬膜外,使髓核完全有机会接触自体血运,符合自体椎间盘突出后,后纵韧带破裂型或游离型吸收条件。用 HE 染色法对椎间盘突出重吸收后组织形态与正常组织的结构做比较,发现模型组椎间盘形态结构发生明显改变。通过免疫组化检测发现实验组的 TNF- $\alpha$ 、VEGF 免疫组化染色呈阳

性,初步证实了椎间盘突出后重吸收过程中炎症反应的存在与突出组织中新生血管的产生;利用流式细胞仪检测 Th、B 细胞数量,发现实验组 Th、B 细胞含量明显高于对照组,证实突出髓核组织确实能够引发自身的免疫反应,这些变化均是自然重吸收的关键因素。

**3.2 大鼠破裂型椎间盘突出动物模型的特点** 当前在研究椎间盘突出后自然重吸收的动物实验中,国内外现有研究主要使用猪、兔子<sup>[2-3]</sup>等大型动物或细胞体外培养<sup>[4]</sup>,而在模型建立方面尚无明确动物模型。大鼠是研究椎间盘突出的常用动物,本模型选取大鼠为实验动物,其与兔子、猪等大型动物比较有其自身优点:①大鼠尾椎本身就有椎间盘,易于摘取;②大鼠与兔子、猪等大型动物比较来源广,经济,易于大规模造模;③大鼠术后抗感染能力强<sup>[5]</sup>。本研究除麻醉意外,其他都正常成活,术后恢复良好。

国外近期研究椎间盘突出后重吸收机制的动物是摘取猪的髓核放置在钛笼中埋植在自体臀部<sup>[1]</sup>。本模型切取大鼠尾椎椎间盘保留上下软骨终板,通过打孔使髓核与外界接触,起到了钛笼的作用,将异物引起的排异反应降到最低,同时避免了取材时髓核与周围组织粘连难于分离的问题。

本实验结果,还可从动物实验角度解释某些临床现象,如部分症状典型的椎间盘突出患者,突出物穿破纤维环和后纵韧带,撕裂椎管内血管引起出血形成血肿并诱发炎症反应,以致在 MRI 上看到的占位物比较明显,经一段时间保守治疗后,症状可得到

明显缓解,并且有的症状越典型,缓解越彻底,个别患者可痊愈,再行第 2 次 MRI 检查时可见突出物缩小,甚至完全吸收<sup>[6-7]</sup>。从试验角度来讲,也可以避免伦理、经济等方面的弊端,并为进一步临床研究提供初期探索。由于本实验重在探讨模型的可行性,对各项指标的研究报道将另文报道,本动物模型为椎间盘突出后自然重吸收机制研究方面提供了一种新的实验平台;为今后中医药及非手术治疗椎间盘突出症的机制研究提供了一种新的动物模型。

**参考文献**

- [1] Geiss A, Larsson K, Rydevik B, et al. Autoimmune properties of nucleus pulposus an experimental study in pigs. *Spine*, 2007, 32: 168-173.
- [2] 陈其昕,刘耀升,李方财,等. 游离型腰椎间盘突出组织的组织学观察. *中华骨科杂志*, 2006, 26(8): 539-543.
- [3] 李晶,周江南,李康华,等. 突出腰椎间盘组织再吸收现象的机制研究. *中华骨科杂志*, 2002, 22(6): 343-345.
- [4] Yoshida M, Nakamura T, Sei A, et al. Intervertebral disc cells produce tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and monocyte chemoattractant protein-1 immediately after herniation: an experimental study using a new hernia model. *Spine*, 2005, 30(1): 55-61.
- [5] 姜宏,刘锦涛,惠 ■ 华,等. 黄芩对破裂型椎间盘突出重吸收动物模型的影响. *中国骨伤*, 2009, 22(3): 205-207.
- [6] Sang HA, Myun WA, Woo MB. Effect of the transligamentous extension of lumbar disc herniations on their regression and the clinical outcome of sciatica. *Spine*, 2000, 25(4): 475-480.
- [7] 姜宏,施杞,郑清波. 腰椎间盘突出后的自然吸收及其临床意义. *中华骨科杂志*, 1998, 18(12): 755-757.

(收稿日期:2009-12-24 本文编辑:王宏)

**本刊关于中英文摘要撰写的要求**

为了便于国际间的交流,本刊要求述评、骨伤论坛、临床研究、基础研究及综述类栏目的稿件必须附中英文摘要。

临床研究和基础研究等论著类稿件的中英文摘要按结构式的形式撰写,即包括目的(说明研究的背景和要解决的问题)、方法(说明主要工作过程,包括所用原理、条件、材料、对象和方法,有无对照、病例或实验次数等)、结果(客观举出最后得出的主要数据资料)、结论(对结果的分析、研究、比较、评价,提出主要贡献和创新、独到之处,或提出问题及展望)4 部分,文字一般不超过 400 字,英文摘要应较中文摘要详细。述评、骨伤论坛和综述类稿件可采用报道性摘要的形式,文字在 200 字左右。

中英文摘要均采用第三人称撰写,不使用第一人称“I”“We”“本文”主语,应着重反映文章的新内容和新观点。不要对论文的内容作诠释和评论。不要使用非公知公用的符号和术语,英文缩写第一次出现时要注明英文全称,其后括号内注明缩写。

英文摘要的内容应包括文题(为短语形式,可为疑问句)、作者姓名(汉语拼音,姓的全部字母均大写,复姓应连写;名字的首字母大写,双字名中间加连字符)、作者单位名称、所在城市、邮政编码、省和国名。作者应列出全部作者的姓名,如作者工作单位不同,只列出通讯作者的工作单位,在通讯作者姓名的右上角加“\*”,同时在单位名称首字母左上角加“\*”,例如:MA Yong-gang\*, LIU Shi-qing, LIU Min, PENG Hao. \*Department of Orthopaedics, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

另外,有关中医药英译要求:中药材译名用英文;中成药、方剂的名称用汉语拼音,剂型用英文,并在英文后用括号加注中文,例如:Xuefu Zhuyu decoction(血府逐瘀汤);中医证型的英译文后以括号注明中文,例如:Deficiency both of Yin and Yang(阴阳两虚)。