

•基础研究•

去卵巢致肾虚的腰椎间盘退变模型的实验研究

姚长风^{1,3}, 赵永见^{1,2}, 牛凯⁴, 孙悦礼¹, 李晨光^{1,2}, 唐德志^{1,2}, 舒冰^{1,2}, 卢盛^{1,2}, 周重建^{1,2}, 梁倩倩^{1,2}, 施杞^{1,2}, 王拥军^{1,2}

(1.上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 2.上海中医药大学脊柱病研究所, 上海 200032; 3.安徽中医学院针灸骨伤临床学院, 安徽 合肥 230038; 4.安徽理工大学医学院, 安徽 淮南 232001)

【摘要】 目的:观察去前肢卵巢对大鼠腰椎间盘和椎体骨密度的影响,建立大鼠肾虚型腰椎间盘退变模型,探讨椎间盘退变的内在机制、椎间盘退变和骨质疏松之间的关系。**方法:**选择1月龄雌性SD大鼠30只,随机分为正常对照组、腰椎间盘退变组、肾虚型腰椎间盘退变组(复合模型组),每组10只。腰椎间盘退变组大鼠去除双前肢,肾虚型腰椎间盘退变组大鼠在去除双前肢3个月后,再去卵巢。8个月后,通过Micro-CT扫描观察椎体骨密度,藏红O-快绿染色法观测椎间盘组织形态学改变,免疫组织化学法观察II、X胶原在椎间盘中的蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测细胞外基质相关基因的表达,以评价去除双前肢和双卵巢对椎间盘退变和椎体骨密度的影响。**结果:**Micro-CT扫描发现,肾虚型腰椎间盘退变组动物椎体骨质疏松明显;藏红O-快绿染色法显示椎间隙变窄,肾虚型腰椎间盘退变组椎间盘组织退变明显,软骨板发育不全;免疫组织化学染色显示肾虚型腰椎间盘退变组相对于正常对照组,椎间盘内X型胶原表达增加,II型胶原表达降低;RT-PCR分析发现,腰椎间盘退变组和肾虚型腰椎间盘退变组II型胶原(type II collagen, Col2a1)基因的表达较正常对照组低,3组比较差异有统计学意义($P=0.000, P=0.000$);腰椎间盘退变组和肾虚型腰椎间盘退变组聚集蛋白聚糖(aggrecan-1, Agc1)基因的表达较正常对照组低,差异有统计学意义($P=0.000, P=0.000$);腰椎间盘退变组和肾虚型腰椎间盘退变组X型胶原(type X collagen, Col10a1)基因的表达较正常对照组高,差异无统计学意义;肾虚型腰椎间盘退变组基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase 13, MMP-13)基因的表达较正常对照组和腰椎间盘退变组高,3组比较差异有统计学意义($P=0.000, P=0.000$);腰椎间盘退变组和肾虚型腰椎间盘退变组聚集蛋白聚糖降解酶2(aggrecanase-2, ADAMTS-5)基因的表达较正常对照组高,差异有统计学意义($P=0.006, P=0.008$)。**结论:**采用去双前肢和去卵巢的方式建立的大鼠腰椎间盘退变模型,出现了肾虚“骨象”——骨质疏松,并在组织形态学、分子细胞生物学等方面的表现与临床肾虚型腰椎间盘退变更加相似。

【关键词】 腰椎; 椎间盘; 卵巢; 大鼠; Sprague-Dawley

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.12.011

Experimental study on lumbar intervertebral disc degeneration model with kidney deficiency by ovariectomizing
YAO Chang-feng, ZHAO Yong-jian, NIU Kai, SUN Yue-li, LI Chen-guang, TANG De-zhi, SHU Bing, LU Sheng, ZHOU Chong-jian, LIANG Qian-qian, SHI Qi, and WANG Yong-jun*. *Institute of Spine, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

ABSTRACT Objective: To observe effects of removing arms and ovarian on lumbar intervertebral disc and vertebral bone mineral density (BMD) by establishing rat model of lumbar intervertebral disc degeneration (IDD) with kidney deficiency, and to explore internal mechanism of disc degeneration, relationship between disc degeneration and osteoporosis. **Methods:** Thirty Sprague-Dawley female rats aged one month were randomly divided into control group, lumbar IDD group and lumbar IDD with kidney deficiency group (combined group), 10 rats in each group. Lumbar IDD group removed double arms, lumbar IDD with kidney deficiency group removed double arms after 3 months, both ovaries were removed. Vertebral bone mineral density were observed by Micro-CT scan; morphological changes were tested by safranin O-fast green staining; II, X collagen protein expression in the intervertebral disc were observed by immunohistochemistry; extracellular matrix gene expression were observed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), in order to evaluate the effects of removed of forelimbs and double ovarian on degeneration and vertebral bone mineral density of intervertebral disc. **Results:** Micro-CT scan showed osteoporosis

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)基金资助项目(编号:2010CB530400);国家自然科学基金重点项目(编号:30930111);国家自然科学基金项目(编号:81102851, 81102606, 81102605, 30973760, 30901914);上海市高校创新团队计划(沪教委科[2009]6号);上海市教委“曙光”跟踪计划(编号:10GG20)

Fund program: Supported by National Basic Research Program of 973 (No. 2010CB530400)

通讯作者:王拥军 E-mail: yjwang88@hotmail.com

in kidney deficiency group was obviously worse than other two groups; safranin O-fast green staining showed that intervertebral space became narrowed, intervertebral disc tissue degenerated obviously, chondral palte was underdeveloped in kidney deficiency group; immunohistochemistry showed that X collagen expression increased, type II collagen expression decreased in kidney deficiency group; RT-PCR showed that type II collagen expression in lumbar IDD group and kidney deficiency group was lower than control group, and had statistical meaning among three groups ($P=0.000, P=0.000$); Agc 1 in lumbar IDD group and kidney deficiency group was lower than control group, and had statistical meaning among three groups ($P=0.000, P=0.000$); while type X collagen expression was higher than control group, but no significant meaning; MMP-13 in lumbar IDD group and kidney deficiency group was higher than control group, with significant meaning compared among three groups ($P=0.000, P=0.000$); aggrecanase-2 in lumbar IDD group and kidney deficiency group was higher than control group, with significant meaning compared among three groups ($P=0.006, P=0.008$). **Conclusion:** Rats model of lumbar disc degeneration established by removed forelimbs and ovariectomized can occur "bone like"—osteoporosis, which is similar with clinical kidney lumbar disc degeneration in tissue morphology, molecular cell biology expression.

KEYWORDS Lumbar vertebrae; Intervertebral disk; Ovary; Rats; Sprague-Dawley

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(12): 1015-1022 www.zggszz.com

椎间盘退行性疾病临床常见,已严重影响了患者的生活质量,给个人、家庭和社会带来了沉重的经济负担。动物模型是研究疾病的重要平台,建立理想的动物模型将有助于再现各种致病因素触发下的疾病发病过程、发病机制,探索有效干预措施的机制。本研究结合了中医藏象理论、现代医学研究成果和技术,试图建立一种符合临床实际的肾虚型腰椎间盘退变动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 动物 1 月龄 SPF 级 SD 雌性大鼠 30 只,体质量(180 ± 20) g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,许可证号 SCKK(沪)2007-0005。

1.2 主要仪器设备 全自动石蜡包埋机、组织脱水机、轮转式切片机、摊片机和烘片机(德国 Leica 公司提供,型号分别为 EG1 160 型、TP 1020 型、RM 2135 型、HI1 210 型和 HI1 220 型),光学显微镜和图像分析系统(日本 Olympus 公司, BH-20 型),紫外可见光分光光度计(美国 Beckman 公司, DU800/VIS 型), SANYO-MDF-J281AT-80℃超低温冰箱,四通道荧光实时定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(新加坡 Biorad 公司, C1 000 Thermal cycler 型),基因扩增仪(德国 Eppendorf 公司, Mastercycler Personal 型), Eppendorf 5417R 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司),多样品组织研磨机(上海净信科技有限公司, TissueLyser-24 型), Micro-CT(Scanco Medical AG, 瑞士)。

1.3 主要试剂 盐酸氯胺酮注射液(批准文号: H35020148, 福建古田药业有限公司),免疫组化试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司), Trizol(美国 Sigma 公司), Takara 逆转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司),多克隆兔抗 II 型胶原抗体(美国 abcam 公司, ab53047),多克隆兔抗 X 型胶原抗体(美国 abcam 公司, ab58642),多克隆兔抗 MMP-13 抗体(美

国 abcam 公司, ab75606),藏红染液,固绿染液,蛋白酶 K(德国 Merck 公司)。

1.4 动物模型建立及分组干预 30 只大鼠按随机区组法分为正常组、腰椎间盘退变组和肾虚型腰椎间盘退变组(复合模型组),每组 10 只。腰椎间盘退变组采用 1 月龄 SD 大鼠,将其双前肢剪毛和清洁后,用碘伏消毒大鼠上肢皮肤,盐酸氯胺酮(0.1 g/kg)腹腔注射麻醉,取前臂近端 1/3 处横向切开皮肤,剥离筋膜和肌肉,暴露三角肌下血管神经束,用丝线结扎后,剪刀剪断皮肤、肌肉、血管和神经,离断肩关节。用盐酸庆大霉素消毒,将肌肉、筋膜、皮肤逐层缝合,最后于缝合处涂金霉素眼膏防止感染。术后先在普通饲养笼内饲养 14 d,然后改用特制饲养笼饲养。术中及术后过程中无死亡,每周测量大鼠直立高度,按平均值调节食物槽和水瓶高度,迫使大鼠通过身体直立来获取食物和水。共观察 8 个月。

肾虚型腰椎间盘退变组于腰椎间盘退变模型造模后 3 个月,盐酸氯胺酮(0.1 g/kg)腹腔注射麻醉,无菌操作下经腰背侧正中入路进入,分开腰部筋膜,分离暴露卵巢,结扎输卵管和周围血管后,摘除卵巢,逐层缝合至皮肤,切口缝合处涂金霉素眼膏防止感染,然后按相同的方法摘除另一侧卵巢。术后再次置入特殊饲养笼饲养,方法同前。术中及术后过程中无死亡。共观察 8 个月。

正常组大鼠未施加任何手术,喂养在普通饲养笼中。过程中无死亡。共观察 8 个月。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 Micro-CT 观察 每组取出的椎体标本,将其在 4%的多聚甲醛溶液中固定备用,检测前,标本用自来水冲洗 1 h,冲洗完毕后,将标本用泡沫塑料纸卷紧后塞入检测管,然后将检测管置入 Micro-CT,设定扫描大鼠股骨的参数后进行预扫描,根据预扫描图像,设置参考线,选定扫描范围,然后沿标本

长轴方向扫描,获取连续的 Micro-CT 图像,扫描结束后,选取感兴趣区(region of interest, ROI),进行骨形态计量学计算及三维形态的重建。结构参数包括:骨小梁体积量(bone volume, BV);骨体积分数(bone volume fraction, BVF),为骨小梁体积(bone volume, BV)与样本体积(total volume, TV)的比值,即 BV/TV,通常指 ROI 内代表骨性结构体素的总体积与区域内所有体素的总体积之比;骨小梁数目(trabecular number, Tb.N),指给定长度内骨组织与非骨组织的交点数量;各向异性的程度(degree of anisotropy, DA),是 ROI 平均截距长度椭圆中长短径的比值;连接密度(connectivity density, Conn.D);骨小梁分离度(trabecular separation/spacing, Tb.Sp),是指骨小梁之间的髓腔平均宽度;骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th),是指骨小梁的平均厚度。

1.5.2 藏红 O-快绿染色观察 取腰椎以 4%多聚甲醛固定 24 h。清水冲洗 2 h 后,20%乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙,每周换液 2 次,共 8 周。脱水、透明、包埋,连续 5 μm 矢状位或冠状位切片,藏红 O-快绿染色。常规脱蜡至水,苏木素染液染 2 min 后,自来水冲洗,盐酸乙醇分化 5 s,氨水蓝化 10 min,5%固绿染液染 5 min,冰醋酸快速漂洗,清水快速漂洗,5%藏红染液染 5 min,蒸馏水洗,常规脱水透明封片。藏红染色部分(红色)表示软骨(蛋白多糖),固绿染色部分(蓝绿色)表示骨组织。

在光学显微镜下观察每个椎间盘正中矢状面,测量椎间盘的高度、前后的高度差及软骨板的厚度(单位为 μm)。

1.5.3 免疫组织化学法 将切片置 59 °C 恒温电烤箱中 5 min,常规脱蜡至水后,蒸馏水洗 1 min,蛋白酶 K 消化 10 min, PBS 洗 2 min×3 次,3% H₂O₂ 与甲醇 1:50 溶液中孵育 15 min, PBS 洗 2 min×3 次,试剂 A37 °C 10 min,加兔多克隆抗体 Col II (1:150 稀释, abcam, 美国), ColX (1:100 稀释, abcam, 美国)一抗, 4 °C 过夜, PBS 洗 2 min×3 次,生物素标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 37 °C 孵育 45 min, PBS 洗 2 min×3 次,

试剂 C 37 °C 孵育 10 min, PBS 洗 2 min×3 次, DAB 显色剂显色,苏木素复染,常规脱水透明,中性树脂封片。棕黄色为阳性染色,无着色为阴性。阴性对照用 PBS 代替一抗。各个标本在光学显微镜下观察。

1.5.4 Real-time PCR 法 取腰椎间盘组织置入盛有 1 ml TRIzol 的 2 ml 离心管,经多样品组织研磨机粉碎后,吸出混合液,重新放置于 1.5 ml 的离心管中,采用一步法抽提 mRNA,检测其质量和完整性逆转录后,采用实时荧光定量 PCR 的方法检测基因表达。引物序列及合成参考文献[1]。由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。每组的每个样品设立 3 个复孔,取均值。将所得 Ct 值按照 2^{-ΔΔt} 的方法[2],进行处理后,再进行统计分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Micro-CT 椎体观察 三维重建结果显示,肾虚型腰椎间盘退变组(图 1c)椎体骨小梁体积量、体积分数及数量明显小于正常对照组(图 1a)和腰椎间盘退变组(图 1b),与正常对照组比较差异有统计学意义(表 1, *P* = 0.036, *P* = 0.009, *P* = 0.028);而骨小梁分离度较腰椎间盘退变组(图 1b)、正常对照组高,与正常对照组比较差异有统计学意义(*P* = 0.009),各向异性程度较腰椎间盘退变组和正常对照组高,差异无统计学意义(表 1);骨小梁厚度由高到低依次为腰椎间盘退变组、正常对照组、肾虚型腰椎间盘退变组;3 组椎体骨小梁连接密度比较虽没有统计学意义,但呈下降趋势。

2.2 藏红 O-快绿染色观察 藏红 O-快绿染色显示正常对照组纤维环排列规则,髓核萎缩不明显,软骨板较厚,钙化集中软骨终板后、中部(图 2a),椎间盘前后高度差较大,自椎间盘软骨板中点测量的高度也较其他两组高(表 2);腰椎间盘退变组纤维环排列较规则,髓核轻度萎缩,软骨板较正常对照组薄,比较差异有统计学意义(表 2, *P* = 0.001),钙化集

表 1 各组椎体 Micro-CT 骨形态学测量($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Micro-CT bone morphology measurement of vertebral body in each group($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 | 骨小梁体积量 | 骨体积分数 | 骨小梁数目 | 各向异性程度 | 连接密度 | 骨小梁分离度 | 骨小梁厚度 |
|------------|----|-----------------|-------------|------------|-----------|-------------|-------------|-----------|
| 正常对照组 | 10 | 1 072.20±2.40 | 0.58±0.02 | 5.31±0.06 | 1.67±0.03 | 52.57±7.29 | 0.18±0.01 | 0.12±0.01 |
| 腰椎间盘退变组 | 10 | 1 040.30±18.10 | 0.51±0.12 | 4.77±1.07 | 1.70±0.04 | 49.86±10.59 | 0.22±0.05 | 0.12±0.01 |
| 复合模型组 | 10 | 1 035.72±20.44* | 0.40±0.07** | 3.74±0.57* | 1.73±0.03 | 43.31±8.00 | 0.26±0.04** | 0.11±0.01 |
| <i>F</i> 值 | - | 3.091 | 5.104 | 2.767 | 0.878 | 1.882 | 4.363 | 1.714 |
| <i>P</i> 值 | - | 0.090 | 0.029 | 0.111 | 0.492 | 0.211 | 0.042 | 0.241 |

注:与正常对照组比较,**P* < 0.05; ***P* < 0.01。与腰椎间盘退变组比较, Δ *P* < 0.05; ΔΔ *P* < 0.01

Note: Compared with control group, * *P* < 0.05; ** *P* < 0.01; compared with lumbar IDD group, Δ *P* < 0.05; ΔΔ *P* < 0.01

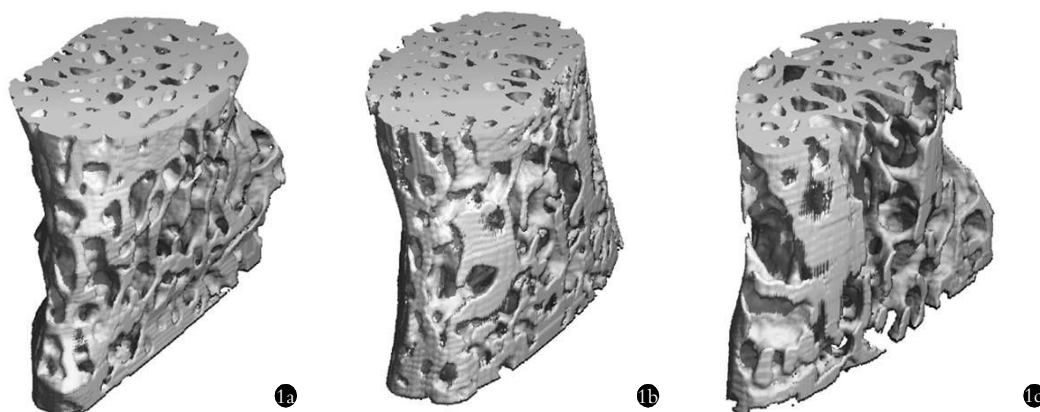


图 1 各组 Micro-CT 三维重建图 1a. 正常对照组 1b. 腰椎间盘突出退变组 1c. 肾虚型腰椎间盘突出退变组(复合模型组)

Fig. 1 3-dimensional reconstruction of Micro-CT 1a. Normal control group 1b. Lumbar IDD group 1c. Lumbar IDD with kidney deficiency group (combined group)

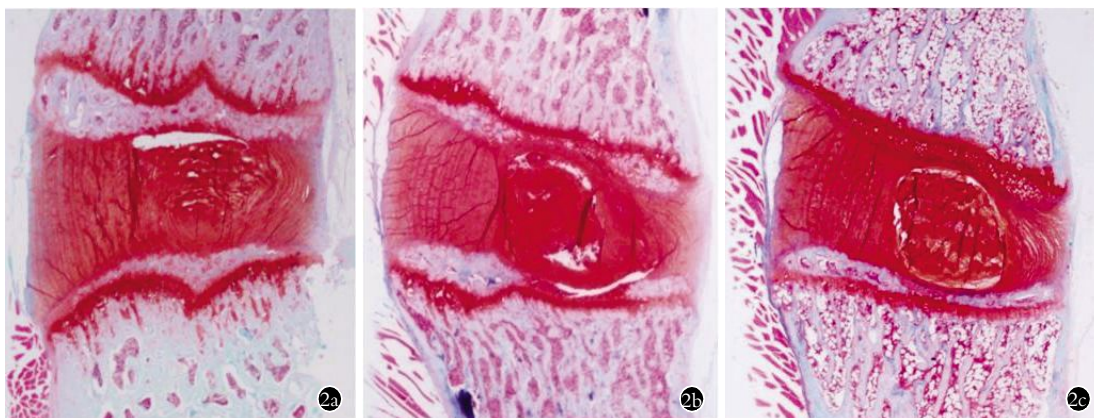


图 2 腰椎间盘藏红 O-快绿染色(矢状位切片,光学显微镜x20) 复合模型组(2c) 组纤维环排列紊乱,髓核较小,钙化集中软骨终板前、后部,且较正常对照组(2a)和腰椎间盘突出退变组(2b)减少

Fig. 2 Safranin O-fast green staining of lumbar intervertebral disc (sagittal slices, light microscopy x20) Fiber ring of composite model group (2c) was arranged disorder, nucleus pulposus was lesser, calcification located on posterior and forepart of the cartilage endplate, and reduced in normal control group(2a) and lumbar disc degeneration group(2b)

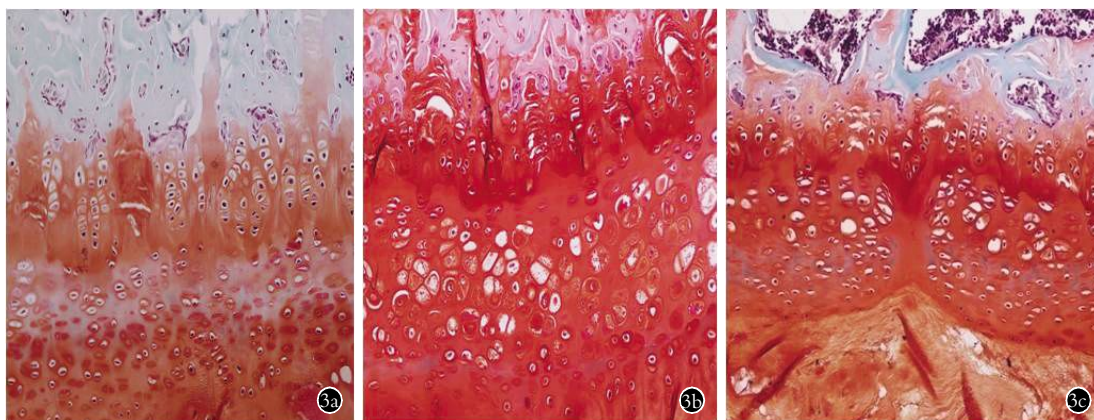


图 3 软骨终板藏红 O-快绿染色(冠状位切片,光学显微镜x200) 复合模型组(3c)椎间盘软骨板较正常对照组(3a)和腰椎间盘突出退变组(3b)发育不全

Fig. 3 Safranin O-fast green staining of cartilage plate in coronal view (coronal slices, light microscopy x200) hypoplasia of cartilage plate in combined group(3c) was worse than that of in control group(3a) and lumbar intervertebral disc degeneration group(3b)

中软骨终板前、后部(图 2b),椎间盘前后高度差较正常对照组大,自椎间盘软骨板中点测量的高度较正常对照组略低;复合模型组纤维环排列紊乱,髓核较小,软骨板厚度较前两组呈下降趋势,较正常对照

组比较差异有统计学意义(表 2, $P=0.001$),钙化集中软骨终板前、后部,较其他两组减少(图 2c),软骨板发育不全,出现缺失(图 3),椎间盘前后高度差及自椎间盘软骨板中点测量的高度较正常对照组和腰椎

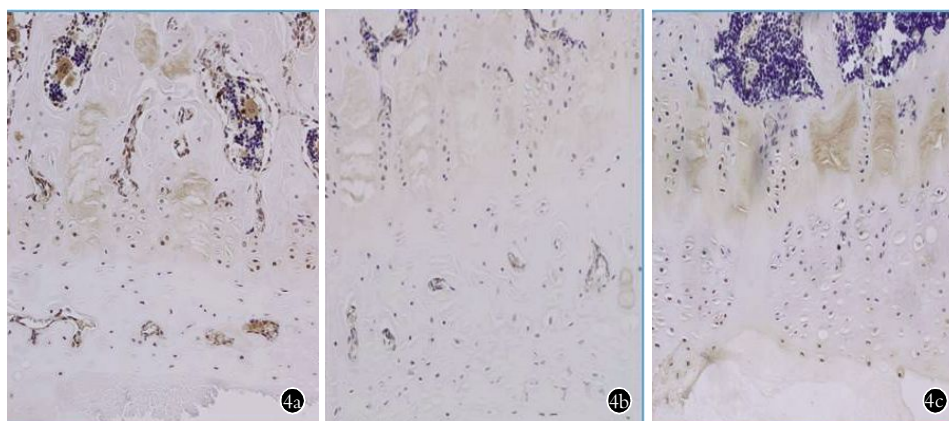


图 4 腰椎间盘软骨板 II 型胶原免疫组织化学染色(光学显微镜×200) 复合模型组(4c)椎间盘软骨板中 II 型胶原蛋白的表达较正常对照组(4a)和腰椎间盘退变组(4b)明显降低

Fig. 4 Immunohistochemical staining of type II collagen in cartilage plate of lumbar intervertebral disc(Light microscopy×200) expression of type II collagen in disc cartilage plate of combined group(4c) was obviously decreased than control group(4a) and lumbar disc degeneration group(4b)

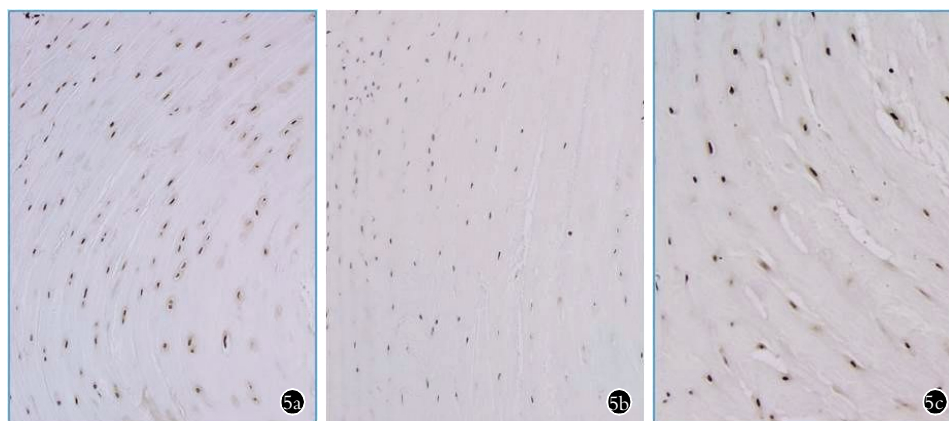


图 5 腰椎间盘纤维环 II 型胶原免疫组织化学染色(光学显微镜×200) 复合模型组(5c)椎间盘纤维环中 II 型胶原的表达较正常对照组(5a)弱,腰椎间盘退变组(5b)强

Fig. 5 Immunohistochemical staining of type II collagen in annulus fibrosus of lumbar intervertebral disc (Light microscopy×200) Expression of type II collagen in disc fibrous rings of combined group(5c) was stronger than normal control group(5a) and lumbar disc degeneration group(5b)

表 2 各组椎间盘形态学测量

Tab.2 Morphology measurement of intervertebral disc in each group

| 组别 | 鼠数 | 前后高度差 | 椎间盘高度 | 软骨板厚度 |
|---------|----|-----------|-----------|------------|
| 正常对照组 | 10 | 2.54±0.32 | 4.81±0.45 | 1.05±0.20 |
| 腰椎间盘退变组 | 10 | 2.66±0.81 | 4.66±0.07 | 0.56±0.06* |
| 复合模型组 | 10 | 1.89±0.75 | 4.49±0.31 | 0.56±0.03* |
| F 值 | - | 0.819 | 0.819 | 14.342 |
| P 值 | - | 0.519 | 0.519 | 0.001 |

注: *与正常对照组比较, P<0.01

Note: Compared with control group, *P<0.01

间盘退变组呈下降趋势(表 2)。

2.3 免疫组织化学法检测

2.3.1 II 型胶原 正常对照组 II 型胶原阳性细胞在软骨板(图 4a)和纤维环(图 5a)均有表达。与正常对照组相比,腰椎间盘退变组 II 型胶原在软骨板(图 4b)和纤维环(图 5b)中阳性细胞表达减少;复合模型组(图 4c, 图 5c) II 型胶原在软骨板中的阳性表达

较正常对照组和腰椎间盘退变组减弱,但在纤维环上的表达较正常对照组弱,较腰椎间盘退变组强。

2.3.2 X 型胶原 X 型胶原主要表达于椎间盘的软骨层。正常对照组(图 6a)椎间盘 X 型胶原在软骨板的骺板层(生发层)表达较多,软骨终板层较少表达;腰椎间盘退变组(图 6b)椎间盘 X 型胶原在整个软骨层表达较正常对照组高;复合模型组(图 6c)椎间盘 X 型胶原表达在骺板层表达较正常对照组和腰椎间盘退变组明显高,但在软骨终板层表达较正常对照组略高,较腰椎间盘退变组略低。

2.4 Real-time PCR 法检测结果 结果见表 3。腰椎间盘退变组和复合模型组 Col2a1 基因表达均较正常对照组低,差异有统计学意义 (P=0.000, P=0.000); Aggrecan 基因的表达,腰椎间盘退变组和复合模型组均较正常对照组下调,差异有统计学意义 (P=0.000, P=0.000),复合模型组较腰椎间盘退变组上调,差异有统计学意义 (P=0.016); 腰椎间盘退变组和复合模型组的 Col10a1、MMP-13、ADAMTS 基

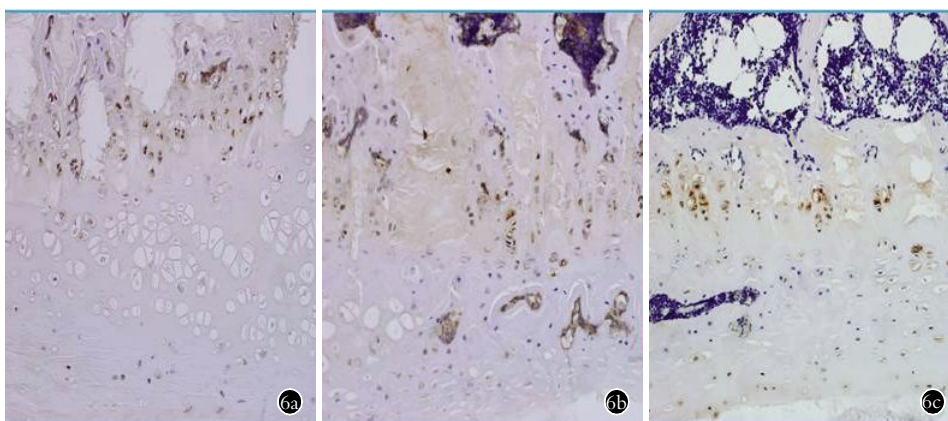


图 6 腰椎间盘软骨板 X 型胶原免疫组织化学染色(光学显微镜×200) 复合模型组(6c)椎间盘 X 型胶原表达在软骨板层表达较正常对照组(6a)和腰椎间盘退变组(6b)明显高,但在软骨终板层表达较正常对照组略高,较腰椎间盘退变组略低

Fig.6 Immunohistochemical staining of X collagen in cartilage plate of lumbar intervertebral disc(Light microscopy×200) Expression of type X collagen in the epiphyseal plate layer of combined group (6c) intervertebral disc was significantly higher than control group (6a) and lumbar disc degeneration group(6b), but expression in the cartilage endplate layer was slightly higher than control group, while lower than lumbar degeneration group

表 3 各组腰椎间盘组织 Col2a1、Aggrecan 和 MMP-13 mRNA 表达

Tab.3 Expression of Col2a1, Aggrecan and MMP-13 mRNAs of lumbar intervertebral disc in each group

| 组别 | 鼠数 | II 型胶原 | 聚集蛋白聚糖 | 基质金属蛋白酶-13 | X 型胶原 | 聚集蛋白聚糖降解酶 2 |
|---------|----|-------------|--------------|---------------|-----------|-------------|
| 正常对照组 | 10 | 1.00±0.11 | 1.00±0.07 | 1.00±0.11 | 1.01±0.22 | 1.02±0.24 |
| 腰椎间盘退变组 | 10 | 0.56±0.04** | 0.52±0.04** | 1.42±0.23 | 1.25±0.30 | 2.38±0.14** |
| 复合模型组 | 10 | 0.54±0.04** | 0.67±0.03**△ | 5.08±0.66**△△ | 1.42±0.32 | 2.28±0.63** |
| F 值 | - | 38.924 | 76.873 | 90.193 | 1.531 | 10.866 |
| P 值 | - | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.290 | 0.010 |

注:与正常对照组比, *P<0.05; **P<0.01。与腰椎间盘退变组比, △P<0.05; △△P<0.01

Note: Compared with control group, *P<0.05; **P<0.01. Compared with lumbar IDD group, △P<0.05; △△P<0.01

因表达均较正常对照组高, 其中 MMP-13 基因表达复合模型较腰椎间盘退变组和正常对照组较高, 差异有统计学意义(P=0.000, P=0.000), ADAMTS-5 基因表达, 腰椎间盘退变组和复合模型组均较正常对照组比较差异有统计学意义(P=0.006, P=0.008), Col10a1 基因表达各组间比较差异无统计学意义。

3 讨论

疾病动物模型是研究临床疾病的良好平台和载体。为了结合当代西医学研究的成果, 更好地服务于临床, 医生需把辨证和辨病相结合, 建立具有中医特色的病证结合模型, 对于科学地诊治临床疾病显得尤为重要。大鼠直立腰椎间盘退变模型是目前公认的、能较好地模拟人椎间盘退变发生过程的动物模型^[3-5], 如果能结合本病常见的发病原因及证候, 就可以使“证”被“病”加以限定, 使许多模糊的繁杂因素变得相对清晰, 增加了模型的变量, 为研究提供了详尽信息, 更符合临床实际, 能更准确地阐明中医传统理论体系之精髓^[3]。本研究通过去除卵巢造成雌激素合成、分泌减少, 模拟临床机体退变过程中出现的雌激素变化——肾虚表征, 同时去前肢, 模拟人体的直立行走, 在其过程中出现的椎间盘退行性改变, 已为有关动物模型^[6]所证实。试图建立一种符合临

床的, 既有直立行走时自身重力等因素的影响, 又有自然或病理雌激素改变影响的椎间盘退变模型, 为实验室和临床研究椎间盘退变的病理变化过程、治疗以及预防提供一个科学的实验平台。

3.1 中医对肾及肾虚的认识 中医常把性器官称为肾, 现代医学认为中医所谓的肾已经历了“从实体到功能状态的演化”^[7], 应涵盖泌尿、生殖和内分泌系统。有学者^[8]通过去除动物卵巢的方法建立了肾虚型疾病动物模型, 并把动物的行为学改变和雌激素下降作为判别肾虚证的临床指标^[9-10]。由于肾气的盛衰主宰着机体的生命过程, 并表征于齿、筋、骨、肌肉、发、天癸、精、脉等, 因而本实验在判定肾虚时, 把骨骼的荣枯, 即骨质疏松作为肾虚的指标之一。

本研究采用 Micro-CT 扫描技术测定动物椎体密度, 比双能 X 线吸收法能更准确地测量骨密度^[11]。三维重建结果表明复合模型组的椎体骨小梁在厚度、密度均较正常对照组和腰椎间盘退变组低, 可能是由于复合模型组的大鼠在去除卵巢后, 正常的骨代谢受到了影响, 破骨作用大于成骨作用, 在松质骨占多数的椎体中, 骨小梁的数量和体积下降的非常明显, 为了有效应对直立姿势下自身重力因素对椎体结构完整性的不利影响, 机体自身只能在骨

小梁分离度增高情况下,通过增加各向异性的强度来维持其支撑功能。这出现了复合模型组动物椎体在发生骨质疏松的同时,其椎间盘软骨板也出现了钙化、密度增高的现象。

3.2 去卵巢和双前肢对大鼠椎间盘组织形态学的影响 椎间盘退变的患者多有椎间隙狭窄和椎间盘的髓核、纤维环以及软骨终板退变,其中椎间盘高度是定量分析椎间盘退变程度的重要指标^[12-13]。本研究发现藏红 O-快绿染色的大鼠标本中,正常对照组、腰椎间盘退变组和复合模型组的椎间盘中位高度呈下降趋势,且通过各组标本的矢状位切片发现,正常对照组软骨终板钙化区主要集中于后、中部,软骨板在 3 个实验组中最厚,而腰椎间盘退变组和复合模型组的软骨终板钙化区主要集中于前、后部,腰椎间盘退变组的软骨板最薄,复合模型组的软骨板相对较薄,这可能是由于正常对照组的大鼠爬行运动时间相对于其他两组较多,椎体后部肌肉相对薄弱,椎间盘受到的牵应力主要集中于后部,因而其钙化部位主要出现于椎间盘的后、中部,而去除了前肢的两组动物,因为受到垂直方向的自身重力因素的干预,钙化部位主要集中于椎间盘的前、后部。同时本实验也发现复合模型组的椎间盘标本冠状位切片中软骨板发育不全、变薄、局部出现断裂,这也许是由于去除卵巢后雌激素水平下降,软骨板、纤维环和髓核中的软骨细胞、软骨样细胞的性激素敏感活性下降,抑制了其正常的胶原和蛋白合成,引起的软骨损伤,这种损伤可能是导致椎体松质骨——软骨板——髓核之间的液流、物质交换紊乱甚至障碍的根本原因,是椎间盘退变的起源。椎间盘内的脊索细胞退变消失,最终完全被软骨细胞取代,脊索性髓核向纤维软骨样髓核的转化是椎间盘为适应不断变化的应力状态而发生的自然过程,是一种动物演变过程的快进,真正影响椎间盘退变的,是伴随生命发育全过程的内分泌(雌、雄激素),以及它们和炎症免疫之间的关系。椎间盘退变的原因可能是内分泌或其他因素影响的软骨板退变在先,髓核退变在后,而不是通常所说的髓核退变在先,这有待于进一步验证。

3.3 去卵巢和双前肢对大鼠椎间盘细胞外基质的影响 II 型胶原是构成椎间盘软骨板胶原的主要成分,在纤维环中有一定的分布,它形成了软骨板的纤维网状支架^[14],相对于 I 型胶原来说体积较大,含水量也较高,从而使其能够承受椎间盘受到的各种压应力、剪切力,吸收震荡,保护椎体和椎间盘等其他结构与功能的稳定性,当其在椎间盘中的含量下降时,将对椎间盘的稳定性产生严重影响^[15]。本研究发现正常对照组中 II 型胶原在软骨板和纤维环均有

表达。与之相比,腰椎间盘退变组中 II 型胶原在软骨板和纤维环中的阳性表达减少;复合模型组中 II 型胶原的阳性表达与正常组和腰椎间盘退变组比较均明显降低,但在纤维环上的表达较强。椎间盘组织 II 型胶原基因 mRNA 表达显示复合模型组和腰椎间盘退变组较正常对照组明显下调,这表明通过去卵巢和双前肢建立的复合模型中腰椎间盘软骨板的功能较腰椎间盘退变组、正常对照组退变更为明显。X 型胶原的出现标志着肥大软骨细胞的出现,并开始出现基质钙化^[16]。免疫组化和 RT-PCR 结果显示复合模型组椎间盘软骨板的生发层和终板层中 X 胶原蛋白的表达以及椎间盘中 X 型胶原基因 mRNA 的表达均较正常对照组明显,这佐证了前面对复合模型组腰椎间盘形态学的观察结果,软骨板的钙化会影响椎间盘正常的生理过程。

蛋白多糖是椎间盘细胞外基质的另一主要成分,是维持椎间盘正常结构、代谢和生物力学性能的生化基础。本研究发现腰椎间盘中 Aggrecan 基因 mRNA 表达较正常对照组下调,其聚集蛋白聚糖降解酶 2 (aggrecanase-2) 基因的表达,腰椎间盘退变组和复合模型组均较正常对照组上调,它的上调促进了椎间盘中聚集蛋白聚糖的降解,这种改变的结果是椎间盘软骨板的结构发生了重构,复合模型组的椎间盘终板钙化、生物力学性能等发生了改变,软骨板退变愈加明显。

基质金属蛋白酶 MMPs 属于蛋白水解酶家族,参与降解全身各种组织的细胞外基质^[17-18],参与细胞迁移、组织构建和发育。目前报道参与椎间盘退变的 MMPs 主要有 MMP-1、MMP-3、MMP-13。MMP-13 又称胶原酶-3,由软骨细胞分泌,降解 II 型胶原的关键酶。本研究发现复合模型组的大鼠在去除卵巢和双前肢后,MMP-13 基因 mRNA 的表达明显高于正常对照组和去除双前肢的腰椎间盘退变组,说明其椎间盘基质的降解程度在 3 组中最严重。

本实验结果表明,去卵巢和前肢的大鼠在出现腰椎间盘退变的同时,椎体出现了骨质改变,符合前人诊察肾虚的“骨象”指标,因而本实验为建立符合临床病变特征的肾虚型腰椎间盘退变模型奠定了一定的科学基础。

参考文献

- [1] Liang QQ, Cui XJ, Xi ZJ, et al. Prolonged upright posture induces degenerative changes in intervertebral discs of rat cervical spine[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2011, 36(1): 14-19.
- [2] 杨舒,王新月,杨雪,等. 黄芪桔梗汤及黄芪黄连汤对克罗恩病大鼠肺与结肠 ICAM-1 蛋白及 mRNA 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(9): 1227-1232.
Yang S, Wang XY, Yang X, et al. Effects of Huangqi Jiegeng Decoction and Huangqi Huanglian Decoction on the protein and

- mRNA expressions of ICAM-1 in the lung and colon of rats with crohn's disease[J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2012, 32(9): 1227-1232. Chinese.
- [3] Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR. The development of fibrocartilage in the rat intervertebral disc[J]. *Anat Embryol (Berl)*, 1995, 192(1): 53-62.
- [4] 李具宝, 赵红云, 赵永见, 等. 益气化痰补肾方对退变椎间盘细胞蛋白聚糖和 X 型胶原 mRNA 表达的影响[J]. *中西医结合学报*, 2011, 9(10): 1138-1144.
Li JB, Zhao HY, Zhao YJ, et al. Effects of Chinese herbal medicine Yiqi Huayu Bushen Recipe on expressions of aggrecan and type X collagen mRNAs in cells from degenerated human intervertebral discs[J]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2011, 9(10): 1138-1144. Chinese.
- [5] Liang QQ, Zhou Q, Zhang M, et al. Prolonged upright posture induces degenerative changes in intervertebral discs in rat lumbar spine[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2008, 33(19): 2052-2058.
- [6] 江建春, 王拥军, 施杞, 等. 颈椎病中医症候模型研究思路初探[J]. *上海中医药杂志*, 2007, 41(2): 5-8.
Jiang JC, Wang YJ, Shi Q, et al. Preliminary study on animal model of Chinese medical syndrome of cervical spondylopathy[J]. *Shang Hai Zhong Yi Yao Za Zhi*, 2007, 41(2): 5-8. Chinese.
- [7] 吴靖平, 陈统一, 陈中伟, 等. 双后肢大鼠椎间盘退变动物模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 24(1): 105-107.
Wu JP, Chen TY, Chen ZW, et al. The development of a degenerative disc animal model in bipedal rats[J]. *Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi*, 2004, 24(1): 105-107. Chinese.
- [8] 江建春, 李晨光, 梁倩倩, 等. 大鼠肾虚型颈椎病模型的建立[J]. *中西医结合学报*, 2008, 6(10): 1034-1039.
Jiang JC, Li CG, Liang QQ, et al. Establishment of a rat model of cervical syndrome with kidney deficiency[J]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2008, 6(10): 1034-1039. Chinese.
- [9] 王拥军, 施杞, 江建春, 等. 大鼠气虚血瘀肾虚型颈椎病模型的建立[J]. *中西医结合学报*, 2008, 6(11): 1152-1158.
Wang YJ, Shi Q, Jiang JC, et al. Establishment of a rat model of cervical syndrome with qi deficiency, blood stasis and kidney deficiency[J]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2008, 6(11): 1152-1158. Chinese.
- [10] 许兵, 刘慧, 金红婷, 等. 经典骨质疏松症模型大鼠的肾虚证研究[J]. *中国骨伤*, 2012, 25(9): 766-770.
Xu B, Liu H, Jin HT, et al. Research on osteoporosis model rats with kidney deficiency syndrome[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2012, 25(9): 766-770. Chinese with abstract in English.
- [11] 张昕, 王峻, 苏晋生, 等. 定量 CT 与双能 X 线吸收测定仪测量腰椎各椎体间骨密度差异性研究[J]. *中国医学影像学杂志*, 2011, 19(12): 884-886.
Zhang X, Wang J, Su JS, et al. Differences of BMD between Lumbar Vertebrae Measured by QCT and DXA[J]. *Zhongguo Yi Xue Ying Xiang Xue Za Zhi*, 2011, 19(12): 884-886. Chinese.
- [12] 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 (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(1): 5-14.
- [13] 黄仕荣, 石印玉, 詹红生. 腰椎间盘突出症临床诊断的思路与程序[J]. *中国骨伤*, 2012, 25(2): 147-151.
Huang SR, Shi YY, Zhan HS. Diagnostic ideas and programs of lumbar intervertebral disc herniation[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2012, 25(2): 147-151. Chinese with abstract in English.
- [14] 李奎锋, 郭立坤, 樊渝江, 等. 胶原水凝胶支架用于软骨组织工程的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2012, 26(11): 1356-1361.
Li KF, Guo LK, Fan YJ, et al. Experimental study on collagen hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2012, 26(11): 1356-1361. Chinese.
- [15] 王拥军, 王利民, 刘宏建, 等. II 型胶原 C 端肽与椎间盘退变及骨性关节炎的相关性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(2): 329-332.
Wang YJ, Wang LM, Liu HJ, et al. Correlation of collagen type II C-telopeptide to intervertebral disc degeneration and osteoarthritis [J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2009, 13(2): 329-332. Chinese.
- [16] Delise AM, Fischer L, Tuan RS, et al. Cellular interactions and signalling in cartilage development[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8(5): 309-334.
- [17] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc[J]. *J Pathol*, 2004, 204(1): 47-54.
- [18] Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(3): 221-233.

(收稿日期: 2013-05-13 本文编辑: 李宜)