

动静力失衡性大鼠颈椎间盘退变模型的动态观察^{*}

王拥军 施 杞 沈培芝 徐 宇 刘 梅 陈 锋

内容提要 目的 动态观察大鼠颈部动静力失去平衡后颈椎间盘退变的过程与程度。方法 选择 8 月龄清洁级 SD 大鼠 60 只,随机分为 3 月、5 月、7 月 3 个对照组,3 月、5 月、7 月 3 个模型组,每组 10 只。在建立动静力失衡性大鼠颈椎间盘退变模型的基础上(对照组为不作手术的正常大鼠),组织形态学评判颈椎间盘退变的程度,并检测前列腺素 E_2 (PGE_2)、6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto- $PGF_{1\alpha}$) 含量和胶原酶 (MMP-1) 活性。结果 (1) 3 月模型组可见颈椎间盘纤维环出现裂隙,排列轻度不规则,髓核出现皱缩或变小,少数椎间盘可见髓核轻度突出;5 月模型组大鼠椎间盘髓核完全纤维化,7 月模型组椎间盘突出或骨赘形成。(2) 与同期对照组比较,5 月和 7 月模型组大鼠 MMP-1 活性明显升高 ($P < 0.05$); PGE_2 和 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ 含量均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(3) 模型组组间比较,5 月和 7 月组大鼠 MMP-1 活性比 3 月组升高 ($P < 0.05$); 5 月组 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ 较 3 月组升高 ($P < 0.05$)。结论 颈椎间盘退变是一渐进性的过程,通过破坏大鼠颈部动静力平衡系统,可以加快颈椎间盘退变进程,从而进一步阐述了“动力失衡为先,静力失衡为主”的颈椎病病理学说。

关键词 颈椎间盘 动物模型 退变 生物力学平衡

Dynamic Observation on Imbalance of Dynamic and Static Forces and Degenerated Cervical Intervertebral Disc in Rats WANG Yong-jun, SHI Qi, SHEN Pei-zhi, et al *Institute of Orthopedics and Traumatology, Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)*

Objective: To study the relation between biomechanical imbalance and the degree and course of degeneration of cervical intervertebral disc in rats. **Methods:** Sixty SD rats, 8 months old, were randomly divided into 6 groups, the control and model groups of 3, 5, 7 months, 10 in each group. The cervical disc dynamic and static forces imbalance of degeneration model was established to assess the degree of degeneration as well as the content some inflammatory mediators (prostaglandin E_2 , 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$) and collagenase (MMP-1) activity.

Results: (1) In 3 months model group and 5 months control group, fibrous ring of intervertebral disc showed some fissure and slight irregular arrangement, nucleus pulposus shrunken or became smaller, mild herniation of nucleus pulposus was seen in some disc. The nucleus pulposus of intervertebral disc in 5 months model group was fibrosed completely and the disc in 7 months model group herniated or became osteophytosis. (2) Compared with the control group of same time period, MMP-1 was increased significantly in the 5 months and 7 months model groups ($P < 0.05$), and prostaglandin E_2 and 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ elevated in the model groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (3) Comparison between model groups, MMP-1 activity in 5 months and 7 months groups was higher than that in the 3 months group ($P < 0.05$), and 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ was higher in 7 months group than that in 3 months group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Cervical intervertebral disc undergoes a progressive degenerating process. By breaking the dynamic-static balance of neck in rats could accelerate the progression of degeneration. The fact could be used to elucidate the theory of pathogenesis of cervical spondylopathy, dynamic force imbalance in priority and static force imbalance in predominance.

Key words cervical intervertebral disc, animal model, degeneration, biomechanical balance

^{*} 上海市科学技术发展基金项目(No. 964919019, 984319101)

上海中医药大学骨伤科研究所(上海 200032)

原因⁽¹⁾。退变的椎间盘出现含水能力降低,蛋白多糖含量下降,胶原类型发生转换,炎症介质大量释放。颈椎间盘的退变是动静力共同失去平衡的综合性动态过程。以往颈椎间盘退变模型的研究,有的偏重于颈椎静力平衡失调^(2~7),有的偏重于颈椎动力平衡失调⁽⁸⁾。本研究在借鉴上述各种模型优点的基础上,齐同实验条件,采用多个观察时段,统一用公认的观察指标,进一步动态观察颈部动静力失衡后颈椎间盘退变的过程和程度。

材料与方法

1 动物与分组 选择 8 月龄清洁级 SD 大鼠 60 只,体重(240±20)g,由上海中医药大学实验动物中心提供。随机分为 3 月、5 月、7 月 3 个对照组,3 月、5 月、7 月 3 个模型组,每组 10 只,雌雄各半。

2 造模方法 将各模型组大鼠颈后部剪毛和清洁后,按氯氨酮 0.1g/kg 体重行肌肉注射麻醉,取颈背部正中纵向切口,长约 2~2.5cm,切开皮肤后,横向切断颈夹肌和头、颈、寰最长肌,切除颈膈肋肌与头半棘肌,然后依次切除 C₂~C₇ 棘上和棘间韧带,建立动静力失衡性大鼠颈椎间盘退变模型。各对照组为不行手术的正常大鼠。

3 取材时间与方法 分别于术后 3、5、7 个月,4 倍手术显微镜下沿上、下软骨终板与椎体的交界面切下 C₄~C₅ 椎间盘及相邻部分椎体,正中矢状面剖开,多聚甲醛浸泡固定标本。

4 颈椎间盘组织形态学观察 椎间盘 EDTA 液脱钙,经脱水、透明、包埋,连续 8μm 横断面切片,HE 及甲苯胺蓝染色。在 Olympus BH-2 生物显微镜下观察每个正中矢状面椎间盘。

5 椎间盘退变程度的评判方法

5.1 组织形态学评判指标 光镜对颈椎间盘组织形态学观察,按 Miyamoto 等⁽²⁾的分级标准将椎间盘分为 1~5 级,分别定为 1、2、3、4、5 分。

5.2 椎间盘组织中前列腺素 E₂(PGE₂)和 6-酮-前列腺素 F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})检测 4℃ 条件下切取 C₂~C₄ 椎间盘组织,称重后加入 0.02mol/L 磷酸缓冲液(PBS)中,调整液体量,使每毫升 PBS 含湿重组织 0.1g,冰水浴中电动匀浆 5000r/min,30s;3000r/min 离心 3min,取上清液备用。PGE₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 采用酶联免疫测定方法。

5.3 胶原酶(MMP-1)活性的检测 取上清液 100μl,以 0.2% ³H-I 型胶原蛋白作为底物,混匀孵育 1h,加入 10% 三氯乙酸,离心 3min,取上清液加入液体闪烁剂,以 Beckman 液闪仪测 cpm 值,以每分钟 1mg 降解胶原蛋白底物为 1 个酶活性单位(IU/g)。

37℃,24h;10 000r/min 离心 3min,取上清液加入液体闪烁剂,以 Beckman 液闪仪测 cpm 值,以每分钟 1mg 降解胶原蛋白底物为 1 个酶活性单位(IU/g)。

6 统计学方法 原始数据输入 SPSS 8.0 统计软件包,显著性检验采用两样本均数比较的 *t* 检验。

结 果

1 颈椎间盘组织形态学观察 显微镜下见 3 月、5 月对照组椎间盘由外周规则排列的纤维环和中央大的髓核组成,软骨板分为生长软骨层和关节软骨层,潮标清晰可见(见图 1);3 月模型组及 7 月对照组可见椎间盘纤维环出现裂隙,排列轻度不规则,髓核出现皱缩或变小,少数椎间盘可见髓核轻度突出,软骨板可见不规则增生、钙化,潮标前移(见图 2);5 月模型组大鼠椎间盘髓核完全纤维化,纤维环板层状结构消失、玻璃样变(见图 3);7 月模型组部分椎间盘骨赘形成,其细胞成分为肥大的软骨细胞,由软骨终板延伸增殖而来(见图 4)。

2 6 组大鼠颈椎间盘退变程度分级 见表 1。与同期对照组比较模型组分值均升高($P<0.01$);与 3 月模型组间比较,7 月模型组分值均明显升高($P<0.01$)。

表 1 6 组大鼠颈椎间盘退变程度 Miyamoto 分级评分值结果比较 (分 $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	形态学分级评分
3 月对照	10	1.30±0.48
3 月模型	10	2.70±0.68**
5 月对照	10	1.40±0.52
5 月模型	10	3.10±0.87**
7 月对照	10	1.70±0.82
7 月模型	10	4.40±0.70**△△

注:与同期对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 3 月模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;下表同

3 6 组大鼠椎间盘组织中 MMP-1、PGE₂ 及 6-keto-PGF_{1α} 测定结果 见表 2。各对照组之间比较,5 月和 7 月组虽然较 3 月组 MMP-1、PGE₂、6-keto-PGF_{1α} 有升高趋势,但差异无显著性;与同期对照组比

表 2 6 组大鼠椎间盘组织中 MMP-1、PGE₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MMP-1 (IU/g)	PGE ₂ (pg/mg)	6-keto-PGF _{1α} (pg/mg)
3 月对照	10	2.68±0.59	11.20±1.79	10.35±1.53
3 月模型	10	3.39±0.73	18.03±4.71*	16.94±1.58**
5 月对照	10	3.69±0.85	12.26±1.75	11.91±1.93
5 月模型	10	7.77±0.92*△	21.74±3.17**	20.42±1.15**△
7 月对照	10	3.51±0.98	11.08±1.41	13.19±2.30
7 月模型	10	6.25±0.99*△	14.65±2.33*	19.30±2.67**

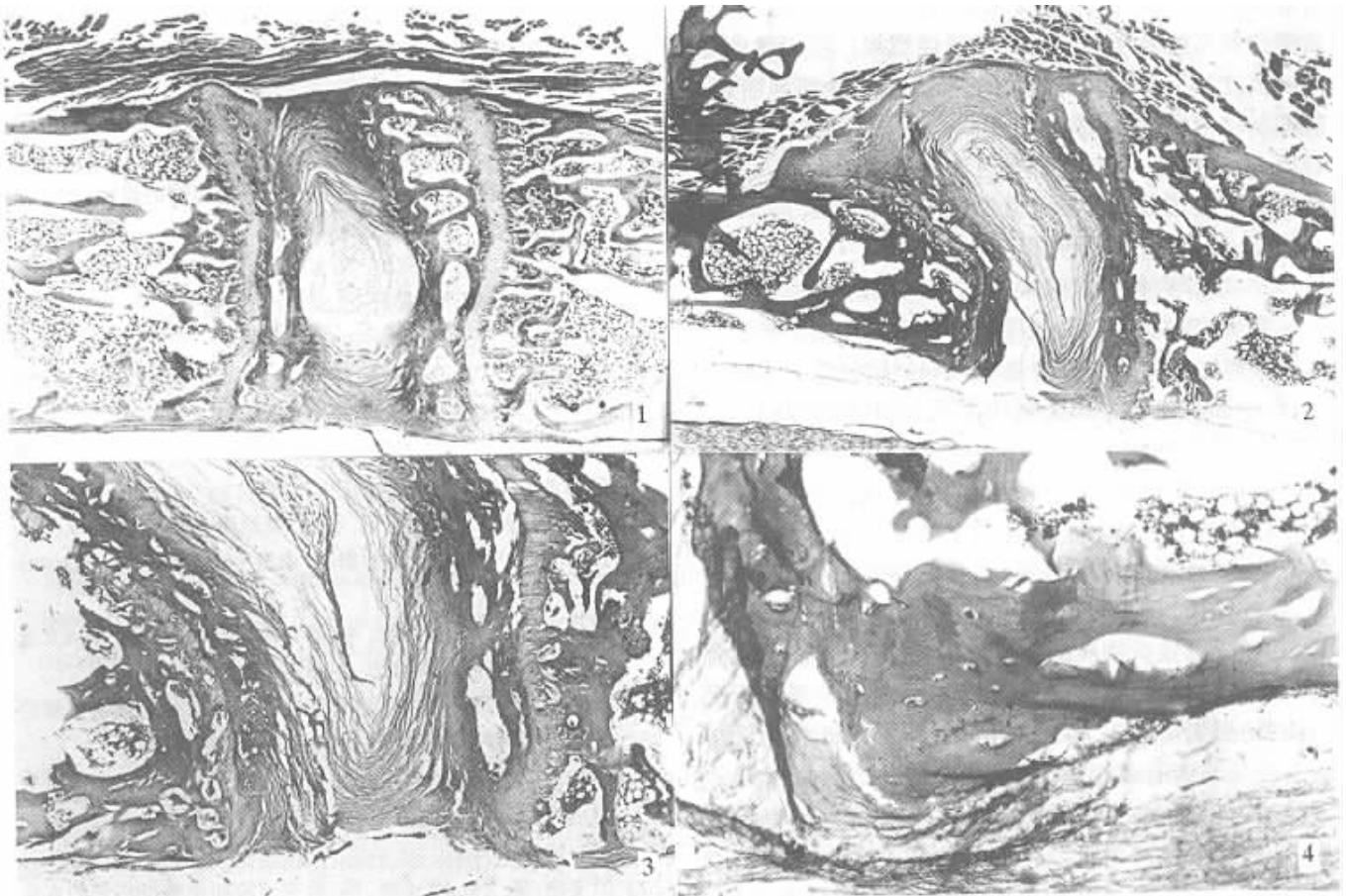


图 1 3 月对照组大鼠椎间盘(5 月对照组大鼠类同); $\times 20$ 图 2 3 月模型组大鼠椎间盘(7 月对照组大鼠类同); $\times 20$ 图 3 5 月模型组大鼠椎间盘; $\times 20$ 图 4 7 月模型组大鼠椎间盘; $\times 20$

较 5 月和 7 月模型组 MMP-1 活性均明显升高($P < 0.05$) 3 个时间段组间 PGE_2 和 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 模型组组间比较 5 月和 7 月组 MMP-1 活性均较 3 月组明显升高($P < 0.05$), 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 5 月模型组较 3 月组明显升高($P < 0.05$)。

讨 论

1 关于颈椎的动力与静力平衡系统 骨骼和韧带维持关节稳定和平衡的作用称为静力平衡,肌肉维持该作用称为动力平衡,颈部正常的生理运动及其稳定性总是在静力平衡的基础上,依靠肌肉的作用来随时调整以达到动力平衡完成的。在颈椎病发病机制中,颈椎动力性平衡容易失调,出现也较早,且失去动力平衡,颈椎当即不能维持其正常的功能,失去静力平衡,颈椎的变化比较缓慢。通过实验研究我们已证实颈椎动力和静力失衡都可以诱导椎间盘退变,出现软骨终板钙化,营养代谢降低,金属蛋白酶活性升高,细胞因子及炎症介质释放等表现^(6~11),并且可以进一步

诱导骨赘形成⁽¹²⁾。在这些研究的基础上,我们提出了“动力失衡为先,静力失衡为主”的颈椎病病机学说⁽⁶⁾。本研究发现,颈椎间盘是一渐进性退变的过程,通过破坏大鼠颈部动静力平衡系统,可以加快颈椎间盘退变这一进程,且随着造模时间的延长,椎间盘中 MMP-1 活性、 PGE_2 和 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量均升高,大鼠造模 5 个月左右上述指标达到峰值,之后维持一段时间,在促进椎间盘细胞与细胞外基质退变的同时,也逐渐被吸收。

2 退变的椎间盘中炎症介质与胶原酶的改变 PGE_2 和 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 均为强烈的血管扩张剂,并在炎症过程中刺激有关组织神经产生疼痛。越来越多的研究证实炎症反应是盘源性颈痛和颈部神经根炎的重要发病机制^(6,7,13)。本实验证实颈椎间盘退变以后出现的炎症反应并不完全与椎间盘退变程度成正比,可能在退变的早、中期释放较多。胶原酶是一种重要的基质金属蛋白酶,正常椎间盘内胶原酶多处于潜伏状态,随着椎间盘退变,酶激活物从细胞内释放进入基质,激活潜伏状态的胶原酶使胶原酶活性增加。椎间盘内环

境的改变和不断受到的机械作用使椎间盘细胞崩解,酶抑制物合成减少,激活潜伏状态的胶原酶使椎间盘胶原分解加速。本实验中 5 月和 7 月模型组胶原酶活性均有明显增加,使椎间盘退变加重、加快,同 Kang 及 Kanemoto^[14,15]的研究相吻合。

3 动静力失衡的结局 颈椎的动静力系统失衡在颈椎病的发生和发展过程中起到协同作用。外在致病因素通过直接或间接的途径影响颈椎的动力平衡系统,即颈部肌肉软组织受到长期反复持久的劳损与刺激,导致颈肌减弱,动力系统失衡之后引起由颈部椎体-韧带-椎间盘组织构成的静力平衡系统的失衡,最终导致整个颈椎系统生物力学功能的紊乱,使颈椎稳定性丧失,颈椎间盘退变,继则纤维环破裂,髓核突出,并使椎体塌陷,椎间隙狭窄,终致颈部神经根、血管、脊髓受到致炎物质的化学性刺激和(或)椎间盘、骨赘的机械性压迫,出现复杂多变的颈椎病表现。所提出的“动力失衡为先,静力失衡为主”的颈椎病病机学说对指导临床有重要意义,说明由椎间盘退变引起的颈椎病可以通过推拿、导引、医疗体操、理疗、中药内服、外敷等手段改善肌肉的肌力状态,恢复颈椎的动力平衡,纠正或补偿静力平衡,重建颈椎力学平衡系统,从而防治颈椎病的发生与发展。

参 考 文 献

1. Gruber HE, Hanley EN. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc-comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine* 1998;23:751—757.
2. Whitehill R, Monran DJ, Fechner RE, et al. Cervical ligamentous instability in a canine in vivo model. *Spine* 1987;12(10):959—963.
3. Osti OL, Vernon RB, Frcrath RE, et al. Annulus tears and

intervertebral disc degeneration. *Spine* 1990;15(8):762—767.

4. Miyamoto S, Yonenobu K, Keiro O. Experimental cervical spondylosis in the moruse. *Spine* 1991;16(S10):495—500.
5. 赵定麟, 陈德玉, 沈强. 实验性颈椎病模型的设计. *中华外科杂志* 1993;31(8):453—455.
6. 施杞, 郝永强, 彭宝淦, 等. 动静力平衡失调与颈椎病—颈椎病动物模型的实验研究. *上海中医药大学学报* 1999;13(1):52—54.
7. 彭宝淦, 施杞, 沈培芝, 等. 一个新的颈椎病动物模型. *中国中医骨伤科杂志* 1996;4(5):10.
8. 郝永强, 施杞. 大鼠颈椎病实验模型的设计与建立. *中国矫形外科杂志* 1999;4(4):282—284.
9. 王拥军, 施杞, 石印玉, 等. 芪麝颈康方对退变椎间盘 IL-1、IL-6、TNF- α 含量的影响. *中国中医骨伤科杂志* 2000;8(1):9—12.
10. 彭宝淦, 王拥军, 施杞, 等. 退变椎间盘中 IgG 及 IgM 含量变化. *中国矫形外科杂志* 1998;3(3):250.
11. 郝永强, 施杞. 颈椎动力平衡失调大鼠椎间盘蛋白多糖的观察. *中国骨伤* 1999;12(1):11—13.
12. 王拥军, 施杞, 沈培芝, 等. 芪麝颈康方对兔退变颈椎骨赘形成部位 ALP 活性的影响. *中国中西医结合杂志* 2000;20(3):199—204.
13. 彭宝淦, 施杞, 贾连顺, 等. 退变椎间盘致炎机制的实验研究. *第二军医大学学报* 1999;20(8):501—504.
14. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6 and prostaglandin E₂. *Spine* 1995;20(21):2373—2728.
15. Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human intervertebral discs. *Spine* 1996;21(1):1—8.

(收稿 2000-09-01 修回 2000-11-05)