

· 基础研究 ·

## 椎间纤维融合治疗脊柱节段不稳的实验研究\*

董明岩<sup>1</sup>, 牛伟民<sup>2</sup>, 于德水<sup>1</sup>, 李 振<sup>2</sup>, 李大力<sup>1</sup>

(1. 辽宁医学院附属第一医院骨科, 辽宁锦州 121001; 2. 辽宁医学院研究生院, 辽宁锦州 121001)

**摘要:**目的 研究椎间纤维融合后脊柱节段的稳定性,探讨一种治疗脊柱不稳的新方法。方法 手术剥离纤维环并去除髓核后,刮除软骨终板,在椎间植入环状聚乳酸-聚羟基乙酸(PLGA)可吸收支架,以期椎间纤维组织及血管长入,达到椎间微动融合,模拟椎间盘的生物力学功能。将 12 只 6~8 月龄的新西兰白兔随机分为两组,均摘除 L<sub>4-5</sub> 椎间盘髓核,A 组在椎间植入 PLGA 可吸收支架;B 组单纯髓核摘除。于术前、术后 12 周行 X 线检查,运用 Image J 软件测量椎间盘高度指数(DHI)计算%DHI,分别于术后 8、12 周处死动物,行组织病理及免疫组织化学染色观察。结果 11 只实验动物术后存活至预期时间。12 周后,侧位 X 线片示两组实验动物椎间高度较术前均有下降,两组椎间高度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),A、B 两组实验动物屈伸活动度与术前相比差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。动力位相显示两组实验动物手术节段椎体无明显移位及反向成角。术后 8 周组织学观察:B 组椎间盘内纤维组织增生形成瘢痕样组织;A 组有大量类软骨细胞增生伴丰富的新生血管长入,未见到支架材料结构。结论 利用椎体骨髓血及其诱导成骨作用可以形成椎间纤维融合;椎间纤维融合能够维持一定的脊柱节段稳定性并保留部分生理活动功能。

**关键词:**椎间纤维融合;聚乳酸聚酯;新西兰兔

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)28-2949-02

## Intervertebral fiber fusion for treating spine segmental instability: a experimental study\*

Dong Mingyan<sup>1</sup>, Niu Weimin<sup>2</sup>, Yu Deshui<sup>1</sup>, Li Zhen<sup>2</sup>, Li Dal<sup>1</sup>

(1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Graduate School of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

**Abstract: Objective** To detect the segmental stability of fiber fusion, and to develop a new procedure for treating spine segmental instability. **Methods** After L<sub>4/5</sub> nucleotomy, cartilage endplate was struck off, then a ringlike PLGA scaffold was implanted. The composite was tested in 12 New Zealand white rabbits (6-8 months old) which were randomly divided into 2 groups; nucleotomy with PLGA implantation (group A) after drilling holes on the vertebral endplate, nucleotomy alone (group B). X-ray were performed before and 12 weeks after the operation, the DHI were measured using Image J software. Evaluation of disc height, segmental stability, flexion-extension ROM, biomechanics and immunohistochemical analysis were performed and their results were recorded. **Results**

11 animals were alive after operation. 12 weeks later, disc height decreased in both groups, no insignificant difference between group A and group B ( $P>0.05$ ), no insignificant difference between ROM of two groups and preoperative ( $P>0.05$ ). The Flexion-extension lateral X-ray of two groups hadn't showed Vertebral surge or reverse angle. No PLGA scaffolds structure was found at 8 weeks postoperatively, fibrillar connective tissue formation was evidenced in both groups, but amount of chondrocyte cells and neo-capillaries proliferated in group A. **Conclusion** Bone marrow blood of vertebra can form relatively effective fiber fusion as well as reconstruct segmental stability and preserve segmental motion.

**Key words:** intervertebral fiber fusion; poly L-lactic-co-glycolic acid (PLGA); New Zealand white rabbits

脊柱节段不稳即脊柱节段失稳,是指在顺利负荷作用下,脊柱失去其维持正常活动范围和活动方式的能力,一般不伴有明显畸形和神经功能障碍<sup>[1]</sup>。现有的手术治疗方法只能在手术后短期内达到缓解症状和维持脊柱运动功能和稳定性,大部分手术患者其手术邻近椎间盘相继出现的退行性变和生物力学特性改变越来越引起医学界的重视<sup>[2]</sup>。近年来,组织工程(tissue engineering)技术研究的深入和组织工程间盘研究的开展,以及可吸收材料在临床上的广泛应用,为治疗椎间盘源性腰椎不稳开辟了一个新领域。

**1 材料与方**

**1.1 聚乳酸聚酯可吸收多孔支架** 聚乳酸-聚羟基乙酸(poly L-lactic-co-glycolic acid, PLGA)可吸收多孔支架由成都迪康公司提供,将其制备成直径 5 mm、厚 1 mm 的圆环状,置于 75%

乙醇中浸泡 2 h,中间更换乙醇一次,然后用 250 mL 生理盐水反复冲洗,将其放于器械台上用盐水纱布覆盖备用。

**1.2 实验动物及其分组** 兔的腰椎解剖与人类相似,其骨性解剖部位可以提供足够的空间进行移植物植入,融合率与人相似,而且兔便于饲养和维护,成本效应很高<sup>[3]</sup>。本研究采用 6~8 个月龄清洁级新西兰白兔 12 只,雌雄不限,体质量 2.5~3.0 kg,均接受手术,所有手术均由同一名脊柱外科医师完成。实验动物由辽宁医学院实验中心提供,随机分为 A 组和 B 组予不同处理。

**1.3 手术方法** 10%水合氯醛 10 mL/kg 腹腔麻醉,经腹膜外入路暴露椎间盘<sup>[4]</sup>。左侧缘切开 L<sub>4-5</sub> 纤维环并向前方掀起,适度撑开椎间隙后,去除髓核组织。A 组用小刮匙刮除上下缘中央局部软骨终板直达椎体骨面,生理盐水冲洗后,置入聚乳

\* 基金项目:辽宁省教育厅基金资助项目(2009A452)。

酸聚酯可吸收多孔支架;B组原位缝合纤维环,逐层缝合切口。术后肌注青霉素 80 万 U/d,连续 3 d 以预防切口感染。

**1.4 影像学评价** 分别于术前、术后即时、术后 12 周摄取实验动物腰椎侧位及前屈位 X 线片。技术参数:65 kV,24 mAs,距离 100 cm,投照中心位于髂嵴上方 5 cm,保持各检测时间点成像条件一致。影像资料(digital radiography,DR)由 Image J 软件处理,观察手术处理节段的椎间高度、脊柱活动度(ROM)及椎体序列,参照文献[5]测定椎间盘高度指数(disc high index,DHI),计算并比较各组的% DHI(两组术后 DHI÷所有动物术前 DHI 均值×100%)。

**1.5 组织学观察** 每组分别于术后 4、8、12 周各处死 2 只动物,取出术区椎间盘与相邻椎体,用甲醛固定 24 h,脱钙液脱钙 2 周后石蜡包埋、切片,行 HE 染色行组织形态学常规观察、免疫组织化学染色观察。

**1.6 统计学处理** 采用统计软件 SPSS17.0 对所得数据进行分析,采用纵向资料裂区设计方差分析法,将不同时间点的数据统一进行统计学比较,各组间的比较 Fisher's 方差分析,均数间比较用 *t* 检验,检验水准设定为  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 动物情况** 所有动物顺利完成手术,手术时间 45~90 min,出血量 5~10 mL。所有动物手术切口 I/甲级愈合,1 只雌性兔子于术后 2 周死亡,3 只兔子(1 雄 2 雌)术后发生左侧后肢不全性运动功能障碍,均于术后 5 d 内恢复。

**2.2 影像学观察与测量** 术后 12 周 X 线片示:两组动物椎间盘高度均较术前有所下降,两组动物椎间高度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );两组腰椎活动度与术前相比差异无统计学意义( $P>0.05$ );两组动物 L<sub>4-5</sub> 椎体间未显示明显移位及反向成角;两组手术节段椎体终板下骨均显示不同程度硬化。

**2.3 组织学与免疫组织化学染色观察** A 组:8 周时手术部位可见少量新生毛细血管及类软骨组织出现,纤维组织排列不规则,并见少量的胶原纤维及成纤维细胞,未观察到 PLGA 支架材料结构;12 周时可见大量的胶原纤维、软骨组织交互长入,排列杂乱无序,此时的胶原纤维较 4 周时增多。B 组:8 周时髓核摘除区大量纤维细胞增生,第 12 周时,手术区域仍为大量纤维细胞和瘢痕组织。

## 3 讨 论

长期以来,脊柱融合术在治疗脊柱不稳以及减压后固定取得肯定的疗效,其得益于脊髓神经减压和脊柱的稳定与脊柱序列的维持<sup>[6]</sup>。但脊柱融合存在诸多并发症,如邻近节段退变(adjacent segment degeneration,ASD)、继发性失稳、生理活动的丧失,部分患者症状明显而需要手术干预。原有脊柱的力学行为在融合术后被改变,导致邻近椎体的应力分布及运动模式改变,相邻节段应力相对集中、活动度代偿性增大和稳定性丢失等改变导致退变加速<sup>[7]</sup>。内固定的强度越大,邻近节段越易出现不稳和退行性变<sup>[8]</sup>。Mummaneni 和 Haid<sup>[9]</sup> 通过建立 L<sub>1-5</sub> 腰椎有限元模型的研究发现,融合术后邻近节段终板 von Mises 应力明显增加,在屈曲压缩载荷下,后路椎间融合术模型组增加 117%,邻近节段纤维环压力增加。因此,业界同仁一直在努力探索一种新方法,既能达到解决病变节段的问题,又能预防邻近节段退变(ASD)。

组织工程椎间盘从提出概念到广泛开展实验研究经过 10 多年的发展,尚处于起步阶段<sup>[9-14]</sup>。国内阮狄克等<sup>[13]</sup> 通过组织工程椎间盘在 Beagle 犬椎间盘原位移植,减缓了椎间盘退

变的进展,维持了脊柱节段的稳定性及生理活动功能,为椎间盘退变性疾病的治疗揭示了一个新方向。陈清河和叶君健<sup>[14]</sup> 课题组发现将细胞组织工程细胞或细胞支架复合体植入退变缺损的椎间盘内,能够逆转和修复椎间盘细胞病理性改变,为退变的椎间盘组织和功能恢复提供了全新的治疗策略。动物实验发现,在骨髓血流通的区域有骨细胞及软骨细胞,无骨髓血流通区(骨蜡充填)为纤维瘢痕组织<sup>[15]</sup>。阮狄克等<sup>[13]</sup> 在研究中也曾将 PLGA 植入椎间内作为对照,其之所以没有达到良好的生物力学稳定性,作者认为是与软骨终板没有刮除、支架孔隙过小、结构过密有关。

作者利用椎体内红骨髓的造血和诱导成骨作用,在支架吸收的同时纤维组织和新生毛细血管长入,从而达到椎间纤维融合,模拟椎间盘的生物力学功能。本研究中,腰椎间盘摘除后,处理间盘中央部位的终板软骨后,利用 PLGA 支架的有效支撑和椎体终板骨髓血的成纤维和成软骨作用,达到最大程度的保留椎间高度、手术节段的稳定性及活动度的目的。

但是,实验结果与预期仍有差距:(1)两组椎间高度、腰椎活动度比较差异无统计学意义;(2)两组动力位片并没有类似人类的椎间不稳所引起的 X 线改变。分析其原因可能是本研究存在以下缺陷与不足:(1)样本量过小;(2)四足动物的脊柱生物力学与人类依然存在差异;(3)实验动物术后均在笼内单独喂养,活动范围有限,活动量明显受限,对实验效果有一定影响;(4)术后影像学资料都是在动物处死后所取得的,与动物在生理活动时情况有一定差距。期待更深入和更为科学的实验研究的广泛开展,并尽可能在猩猩、类人猿等直立行走的灵长类大动物中进行。

## 参考文献:

- [1] 龙厚清. 脊柱节段稳定性评价[J]. 脊柱疾病分类诊断学, 2007,12(1):164-167.
- [2] Huang RC, Sandhu HS. The current status of lumbar total disc replacement[J]. Orthop Clin North Am, 2004,35(1):33-42.
- [3] 剧荣森, 郭昭庆. 脊柱融合的实验研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2010,20(1):63-68.
- [4] 王非, 瞿东滨, 金大地. 侧方入路显露兔腰椎间盘及椎间盘内的注射方法[J]. 中华实验外科杂志, 2003,3(20):304-306.
- [5] Sakai D, Mochida J, Lwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting marrow stroma cell embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc[J]. Biomaterials, 2006, 27(3):335-345.
- [6] 袁文. 脊柱非融合技术是融合术的终结者吗? [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008,18(1):11-13.
- [7] Weinhoffer SL, Guyer RD, Herbert M, et al. Intradiscal pressure measurements above an instrumented fusion: A cadaveric study[J]. Spine, 1995,20(5):526-531.
- [8] 王义生. 脊柱融合术与非融合术不是相互替代而是互补[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011,21(1):7-8.
- [9] Mummaneni PV, Haid RW. The future in the care of the cervical spine: Inter-body fusion and arthroplasty [J]. Neurosurg Spine, 2004,1(2):155-159.
- [10] Mizuno H, Roy AK, Vacanti CA, et al. Tissue-engineered composites of annulus fibrous and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement[J]. Spine, 2004, 29(12): 1290-1298.

肿、胰腺组织出血及炎性细胞的浸润。VEGF 基因的表达受缺血缺氧、多种细胞因子、类固醇激素、瘤基因、抑瘤基因产物及一些小分子物质等因素的调控,VEGF 能促使组织形成新生血管,提高血管通透性,在已知的微血管高渗透性诱导物中作用最强,是组织胺的 50 000 倍<sup>[12-14]</sup>。一般认为,当 VEGF 在局部组织分泌时,VEGF 与相应受体结合后,通过多条信号通路的传递,可增加内皮细胞的移动、新生血管的形成以及促进内皮细胞周围的周细胞、内皮细胞分泌基质金属蛋白酶等,结果导致血管内液体及蛋白外渗至组织中,引起血压降低、组织低灌注<sup>[15-16]</sup>。

本实验中 SAP 组大鼠各时点血清淀粉酶的含量均明显高于假手术组,并随时间递增而升高趋势,这与 SAP 发展过程中胰腺组织病理损伤程度变化相一致,因此,血清淀粉酶水平可在一定程度上反映胰腺组织病理损伤程度。此外,SAP 组腹水量较正常组明显增加,且随观测时间的延长而增多,提示 SAP 早期即存在微循环通透性增加,并随时间延长有加重趋势。另据文献报道,细胞内的渗透压改变、胰腺间质水肿、淋巴回流受阻、组织静水压增高等因素可能也参与了胰腺微循环障碍的发生过程<sup>[17]</sup>。本实验免疫组织化学染色结果显示,VEGF 蛋白在正常组胰腺组织很少表达,且在各时点的表达变化不大,而在 SAP 组腺泡细胞、炎性细胞等的胞浆及胞核内广泛表达,且在 SAP 早期即有升高,提示 VEGF 可能作为 SAP 发生的始动性因素之一,参与了胰腺微循环血管通透性改变、胰腺出血坏死等胰腺炎症病理性损伤过程。因此,作者推测阻抑 VEGF 基因或抑制其下游产物表达有可能成为一种新的干预 SAP 的有效治疗手段。

#### 参考文献:

- [1] Skipworth JR, Pereira SP. Acute pancreatitis[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2008, 14(2): 172-174.
- [2] Mofidi R, Lee AC, Madhavan KK, et al. Prognostic factors in patients undergoing surgery for severe necrotizing pancreatitis[J]. *World J Surg*, 2007, 31(10): 2002-2005.
- [3] Schmidt J, Ebeling D, Ryschich E, et al. Pancreatic capillary blood flow in an improved model of necrotizing pancreatitis in the rat[J]. *Surg Res*, 2002, 106(2): 335-337.
- [4] Carvalho JF, Blank M, Shoenfeld Y. Vascular endothelial growth factor(VEGF) in autoimmune diseases[J]. *J Clin Immunol*, 2007, 27(3): 246-248.
- [5] Wig JD, Bharathy KG, Kochhar R, et al. Correlates of organ failure in severe acute pancreatitis[J]. *JOP*, 2009, 10(3): 271-274.
- [6] Ito Y, Lugea A, Pandol SJ, et al. Substance P mediates cerulein induced pancreatic microcirculatory dysfunction

in mice[J]. *Pancreas*, 2007, 34(1): 138-140.

- [7] Aho HI, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1980, 15(4): 411-413.
- [8] Tian H, Zhang X, Wu C, et al. Effects of baicalin and octreotide on the serum TNF-alpha level and apoptosis in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis[J]. *Inflammation*, 2009, 32(3): 191-194.
- [9] Nakajima T, Ueda T, Takeyama Y, et al. Protective effects of vascular endothelial growth factor on intestinal epithelial apoptosis and bacterial translocation in experimental severe acute pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2007, 34(4): 410-413.
- [10] Zhang XP, Zhang J, Ma ML, et al. Pathological changes at early stage of multiple organ injury in a rat model of severe acute pancreatitis [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010, 9(1): 83-85.
- [11] Bumbasirevic V, Radenkovic D, Jankovic Z, et al. Severe acute pancreatitis: overall and early versus late mortality in intensive care units [J]. *Pancreas*, 2009, 38(2): 122-124.
- [12] Gerber HP, Olazoglu E, Grewal IS. Targeting inflammatory cells to improve anti-VEGF therapies in oncology [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2010, 180(1): 185-187.
- [13] Murukesh N, Dive C, Jayson GC. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(1): 8-13.
- [14] Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability[J]. *Cardiovas Res*, 2010, 87(2): 262-271.
- [15] Azam F, Mehta S, Harris AL. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(8): 1323-1325.
- [16] Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, et al. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation[J]. *Nature*, 2008, 456(12): 809-812.
- [17] Vajanto I, Rissanen TT, Rutanen J, et al. Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and Lacz[J]. *J Gene Med*, 2002, 11(3): 371-374.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-13)

(上接第 2950 页)

- [11] Nesti LJ, Li WJ, Shanti RM, et al. Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous scaffold(HANFS)amalgam[J]. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14(9): 1527-1537.
- [12] Wilke HJ, Heuer F, Neidlinger-Wilke C, et al. Is a collagen scaffold for a tissue engineered nucleus replacement capable of restoring disc height and stability in an animal model? [J]. *Eur Spine J*, 2006, 15(3): 433-438.
- [13] 阮狄克, 辛洪奎, 张超, 等. 组织工程椎间盘体内原位植入

的实验研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2010, 20(7): 581-585.

- [14] 陈清河, 叶君健. 组织工程髓核移植治疗椎间盘退变[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(35): 6602-6606.
- [15] Xiao DM, Xu ZS, Lin BW, et al. Reparation of experimental models of osseous nonunion[J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2005, 9(3): 214-215.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-04-01)