

· 基础研究 ·

轴向负载诱导小鼠椎间盘退变模型的建立

劳杨骏¹, 裘一丹², 徐彬¹, 盛红枫¹, 沈立锋¹, 刘亦杨¹, 余伟波¹, 吴承亮²

(1. 浙江省立同德医院, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要 目的:探讨建立轴向负载诱导小鼠椎间盘退变模型的有效方法。**方法:**将 24 只 16 月龄 SPF 级小鼠随机分为模型组和对照组, 每组 12 只。每日 10:00、15:00、19:00 将模型组小鼠放入自制热板鼠笼中, 打开热板并设定温度为 50 ℃, 从小鼠开始跳跃至力竭约 10 min 左右; 对照组小鼠不做任何处理。分别于造模 1 个月和 3 个月从模型组和对照组随机抽取 6 只小鼠, 采用颈椎脱臼法处死, 完整取下 L₃₋₄ 椎间盘和 L₃、L₄ 椎体, 制作连续冠状位切片后, 分别行苏木素 - 伊红 (hematoxylin - eosin, HE) 染色和阿尔新蓝 - 苏木素 (alcian blue - hematoxylin, ABH) 染色, 在光学显微镜下观察腰椎间盘组织形态学变化, 通过免疫组织化学染色法在光学显微镜下观察腰椎间盘组织中 II 型胶原蛋白的表达情况, 并通过绘图软件测量椎间盘高度和软骨终板厚度。**结果:**①腰椎间盘组织形态学观察结果。HE 染色显示造模 1 个月及 3 个月后, 对照组腰椎间盘组织基本正常; 模型组腰椎间盘组织可见退行性改变, 其中造模 3 个月后较造模 1 个月后退变更严重, 椎间盘纤维环出现裂隙, 软骨终板分层结构紊乱、排列不规则, 髓核破坏或皱缩, 软骨终板内出现多个骨化中心。ABH 染色结果显示造模 1 个月和 3 个月后, 对照组软骨终板细胞排列整齐, 软骨终板细胞数目较多, 软骨基质染色较蓝, 部分椎间盘软骨终板内存在较少呈红染的骨化中心, 但骨化中心形态较小; 模型组软骨终板细胞排列混乱, 细胞数目明显减少, 且软骨基质染色变浅, 软骨终板出现多个骨化中心, 且骨化中心形态较大。②腰椎间盘免疫组织化学观察结果。造模 1 个月和 3 个月后, 对照组 II 型胶原蛋白在髓核、纤维环内层和软骨终板均有阳性表达, 染色较深; 模型组 II 型胶原蛋白的阳性表达在髓核中央及纤维环外层较对照组明显降低, 且造模 3 个月后 II 型胶原蛋白在髓核与纤维环外层的表达较造模 1 个月后降低更明显。③腰椎间盘形态学测量结果。造模 1 个月后, 模型组椎间盘高度和软骨终板厚度均小于对照组 [(0.211 ± 0.063) mm, (0.289 ± 0.050) mm, $t = 2.984$, $P = 0.007$; (0.074 ± 0.011) mm, (0.097 ± 0.015) mm, $t = 2.813$, $P = 0.023$]; 造模 3 个月后, 模型组椎间盘高度与对照组比较, 差异无统计学意义 [(0.197 ± 0.052) mm, (0.235 ± 0.053) mm, $t = 1.478$, $P = 0.163$]; 模型组软骨终板厚度小于对照组 [(0.060 ± 0.012) mm, (0.093 ± 0.018) mm, $t = 4.092$, $P = 0.001$]。**结论:**用热板诱导小鼠跳跃, 可以有效建立轴向负载诱导小鼠椎间盘退变模型。

关键词 椎间盘退行性变; 小鼠; 疾病模型, 动物; 轴向负载; 热板; 动物实验

A mouse model of intervertebral disc degeneration induced by axial loads

LAO Yangjun¹, QIU Yidan², XU Bin¹, SHENG Hongfeng¹, SHEN Lifeng¹, LIU Yiyang¹, YU Weibo¹, WU Chengliang²

1. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, Zhejiang, China

2. Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the effective method for building mouse models of intervertebral disc degeneration induced by axial loads. **Methods:** Twenty - four 16 - month - old SPF - grade mice were randomly divided into model group and control group, 12 cases in each group. The mice in model group were put into a self - made heating plate cage at 10:00, 15:00 and 19:00 every day. The heating plate was turned on and its temperature was set to 50 ℃. Every time the mice kept jumping for about 10 minutes and were exhausted in the end. The mice in control group were not given any intervention. Six mice were randomly selected out from each group respectively and were executed by using cervical dislocation method after 1 - and 3 - month modeling respectively. Their L₃₋₄ intervertebral disc and bilateral adjacent vertebral bodies were fetched out completely and were sectioned continuously in coronal position for hematoxylin - eosin (HE) staining and alcian blue - hematoxylin (ABH) staining. The histological and morphological changes of lumbar intervertebral disc tissues were observed under the optical microscope, and the protein expression levels of type II collagen in lumbar intervertebral disc tissues were detected by using immunohistochemical staining, and the intervertebral disc height and cartilage endplate thickness were measured by using drawing software. **Results:** HE staining results demonstrated that lumbar intervertebral disc tissues of mice were basically normal in control group after 1 - and 3 - month modeling respectively, while degenerative changes were found in lumbar intervertebral disc tissues of mice in model

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573994); 浙江省基础公益研究计划项目 (LGF19H60007)

group and degenerative changes were more visible after 3-month modeling. The degeneration presented with (1) cracks in intervertebral disc annulus fibrosus, (2) disordered and irregularly arranged layered structure of cartilage endplate, (3) damaged or wizened nucleus pulposus, and (4) multiple ossification centers in cartilage endplate. ABH staining results showed that after 1- and 3-month modeling, abundant and regularly arranged cartilage endplate cells were found in control group, and the cartilage matrix presented with blue staining, and a few littish red stained ossification centers were found in cartilage endplate of some intervertebral discs; while cartilage endplate cells arranged disorderly and decreased significantly in model group, and cartilage matrix presented with light-coloured staining, and multiple largish ossification centers appeared in cartilage endplate. The immunohistochemical staining results of lumbar intervertebral disc tissues showed that positive expressions of type II collagen were found in nucleus pulposus, inner layer of fibrous rings and cartilage endplate in control group after 1- and 3-month modeling, and the cells were dark stained; while the positive expressions of type II collagen were obviously lower in center of nucleus pulposus and outer layer of fibrous rings in model group compared to control group, and more obvious decrease was found after 3-month modeling. The intervertebral disc height and cartilage endplate thickness were smaller in model group compared to control group after 1-month modeling (0.211 ± 0.063 vs 0.289 ± 0.050 mm, $t = 2.984$, $P = 0.007$; 0.074 ± 0.011 vs 0.097 ± 0.015 mm, $t = 2.813$, $P = 0.023$). There was no statistical difference in intervertebral disc height between model group and control group after 3-month modeling (0.197 ± 0.052 vs 0.235 ± 0.053 mm, $t = 1.478$, $P = 0.163$). The cartilage endplate thickness was smaller in model group compared to control group (0.060 ± 0.012 vs 0.093 ± 0.018 mm, $t = 4.092$, $P = 0.001$). **Conclusion:** The mouse model of intervertebral disc degeneration induced by axial loads can be built effectively by using heating plate for forcing mouse to jump.

Keywords intervertebral disc degeneration; mice; disease models, animal; axial load; hot plate; animal experimentation

随着老龄化社会的发展和 unhealthy 的生活方式,越来越多的人正遭受着椎间盘退变所带来的痛苦,而目前对椎间盘退变的机理认知甚少,临床治疗效果并不令人满意^[1]。构建椎间盘退变动物模型是探究人类椎间盘退变机制和研发相关治疗药物的关键^[2]。目前椎间盘退变的模型主要有应力改变型椎间盘退变模型、物理损伤型椎间盘退变模型、转基因动物模型和混合模型^[3-4]。许多实验动物都能用于椎间盘退变相关研究,如猪^[5]、狗^[6]、牛^[1]、羊^[7]、兔^[8]、大鼠^[9]、小鼠等。而小鼠腰椎和尾椎椎间盘与人类椎间盘结构最为相似^[10],其力学特性也最为相似^[11],因此小鼠是一种理想的用于椎间盘退变相关研究的模型动物。椎间盘的退变和日常生活劳作所产生的脊柱轴向负载有较大的关联,有研究表明周期性的轴向负荷是人类椎间盘退变的危险因素^[12-14]。因小鼠在跳跃时会自发地前肢离地、双后肢站立,其周期性的跳跃可以模拟人类在日常生活中产生的轴向力学负荷。本实验采用自制热板鼠笼使小鼠自发跳跃,拟建立轴向负载诱导小鼠腰椎间盘退变模型,以期临床治疗椎间盘退行性疾病提供实验基础。

1 材料与仪器

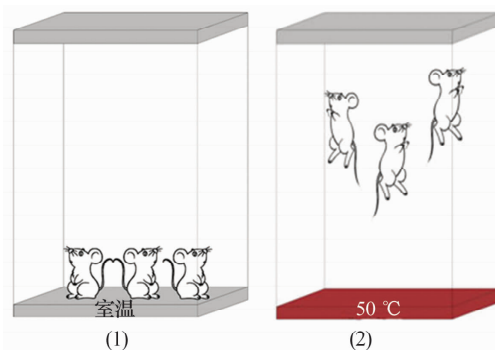
1.1 实验动物 16 月龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠(不分雌雄)24 只,体质量(30.0 ± 0.73)g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,实验动物合格证号 SCXK(沪)2003-0016。实验方案通过医学动物实验

伦理委员会批准。

1.2 实验试剂和仪器 II 型胶原兔抗鼠抗体(美国 abcam 公司),自制热板鼠笼(浙江中医药大学骨伤研究所),EC350-1 型石蜡包埋机(美国 thermo 公司),Tissue-Tek VIP5Jr 型组织脱水机(日本 sakura 公司),HM325 型组织切片机(美国 thermo 公司),Scope A1 光学显微镜(德国 ZEISS 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与造模 将 24 只 16 月龄健康 SPF 级小鼠随机分为模型组和对照组,每组 12 只。每日 10:00、15:00、19:00 将模型组小鼠放入自制热板鼠笼中,打开热板并设定温度为 50℃,从小鼠开始跳跃至力竭约 10 min 左右,结束后将小鼠放回普通饲养笼中(图 1)。对照组小鼠不做任何处理。



(1) 在未加热的热板上,小鼠自由活动如常;(2) 热板加热至 50℃时,小鼠不堪笼底高温开始跳跃

图 1 自制热板鼠笼诱导小鼠跳跃示意图

2.2 动物取材与切片制备 分别于造模 1 个月和 3 个月从模型组和对照组随机抽取 6 只小鼠,采用颈椎脱臼法处死,完整取下 L₃₋₄ 椎间盘和 L₃、L₄ 椎体,用 4% 多聚甲醛固定 72 h。清水冲洗后,用 20% 乙二胺四乙酸脱钙 4 周,每周换液 3 次。常规脱水、透明、石蜡包埋,连续冠状位切片,厚度 3 μm。

2.3 腰椎间盘组织形态学观察 取造模 1 个月和 3 个月对照组和模型组一部分切片分别进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、阿尔新蓝-苏木素(alcian blue-hematoxylin, ABH)染色。HE 染色:60℃烘片过夜后,常规脱蜡至水,苏木精染色 1 min,蒸馏水洗至不再褪色,PBS 浸泡 1 min,蒸馏水洗 3 遍,伊红染色 1 min,常规脱水透明封片。ABH 染色:60℃烘片过夜后,常规脱蜡至水,盐酸乙醇分化 30 s,阿尔新蓝染色 10 min,蒸馏水洗至不再褪色,盐酸乙醇分化 3 s,快速漂洗后氨水蓝化 15 s,蒸馏水漂洗后用 95% 乙醇浸泡 1 min,苏木素染色 1 min,常规脱水透明封片。100 倍光学显微镜下观察腰椎间盘组织形态学变化并摄片。

2.4 腰椎间盘免疫组织化学观察 将 2 组剩余切片置 60℃烘箱中烘烤过夜后,常规脱蜡至水,在 3% 过氧化氢中浸泡 20 min 后 PBS 洗 4 遍,在含有 0.2 g 胃蛋白酶的 0.01 N 的盐酸溶液中修复抗原 50 min 后 PBS 洗 4 遍,羊血清(1:20)封闭非特异性抗原 20 min 后加入 II 型胶原抗体(1:100)4℃过夜,室温放置 30 min, PBS 洗 10 min,在生物素标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:1000)中室温孵育 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min, DAB 显色剂显色,苏木素复染,常规脱水透明,中性树胶封片。400 倍光学显微镜下观察各个标本 II 型胶原蛋白表达情况(棕黄色为阳性染色)。

2.5 腰椎间盘形态学测量 在光学显微镜下拍摄模型组与对照组每个椎间盘正中冠状面图片(×100),将获得的图片导入制图软件中,用制图软件测量冠状位椎间盘高度和软骨终板厚度。

2.6 数据统计学处理 采用 SPSS13.3 统计软件对所得数据进行统计学分析,2 组小鼠造模 1 个月和 3 个月后体质量、椎间盘高度和软骨终板厚度的组间比较均采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

2 组小鼠均未出现死亡。造模 1 个月和 3 个月后,2 组小鼠体质量比较,差异均无统计学意义[造模 1 个

月后:模型组(29.970 ± 0.620)g,对照组(30.300 ± 1.110)g, $t = 0.640$, $P = 0.530$;造模 3 个月后:模型组(30.60 ± 0.58)g,对照组(31.68 ± 1.39)g, $t = 1.760$, $P = 0.110$]。

3.1 腰椎间盘组织形态学观察结果 HE 染色显示:造模 1 个月及 3 个月后,对照组腰椎间盘组织(由规则排列于外的纤维环、中央的髓核和上下软骨终板构成)基本正常,外层纤维环排列规则、呈同心圆逐层分布,内层纤维环逐渐向髓核过渡,髓核均匀地被纤维环所包绕,软骨终板分为透明软骨层和关节软骨层,软骨细胞密集,潮标清晰可见,钙化的关节软骨极薄;模型组腰椎间盘组织可见退行性改变,其中造模 3 个月后较造模 1 个月后退变更严重,椎间盘纤维环出现裂隙,软骨终板分层结构紊乱,排列不规则,髓核破坏或皱缩,软骨终板内出现多个骨化中心,严重者已被骨组织所替代(图 2)。

ABH 染色结果显示:造模 1 个月和 3 个月后,对照组软骨终板细胞排列整齐,软骨终板无论是透明软骨层还是关节软骨层细胞数目均较多,软骨基质染色较蓝,部分椎间盘软骨终板内存在较少呈红染的骨化中心,但骨化中心形态较小;模型组软骨终板细胞排列混乱,细胞数目明显减少,且软骨基质染色变浅,软骨终板出现多个骨化中心,且骨化中心形态较大,严重者出现骨化成片、替代原本的软骨细胞(图 3)。

3.2 腰椎间盘免疫组织化学观察结果 造模 1 个月和 3 个月后,对照组 II 型胶原蛋白在髓核、纤维环内层和软骨终板均有阳性表达,染色较深;模型组 II 型胶原蛋白的阳性表达在髓核中央及纤维环外层较对照组明显降低,且造模 3 个月后 II 型胶原蛋白在髓核与纤维环外层的表达较造模 1 个月后降低更明显(图 4)。

3.3 腰椎间盘形态学测量结果 通过绘图软件所测量椎间盘高度和软骨终板厚度如图 5 所示(1 像素 = 0.002 5 mm)。造模 1 个月后,模型组椎间盘高度和软骨终板厚度均小于对照组;造模 3 个月后,模型组椎间盘高度与对照组比较,差异无统计学意义;模型组软骨终板厚度小于对照组(表 1、表 2)。

4 讨论

本实验所建立模型是通过对小鼠腰椎间盘施加轴向负载,模拟人类日常生活中产生的力学环境而诱导椎间盘退变的动物模型。目前虽然有许多改变椎

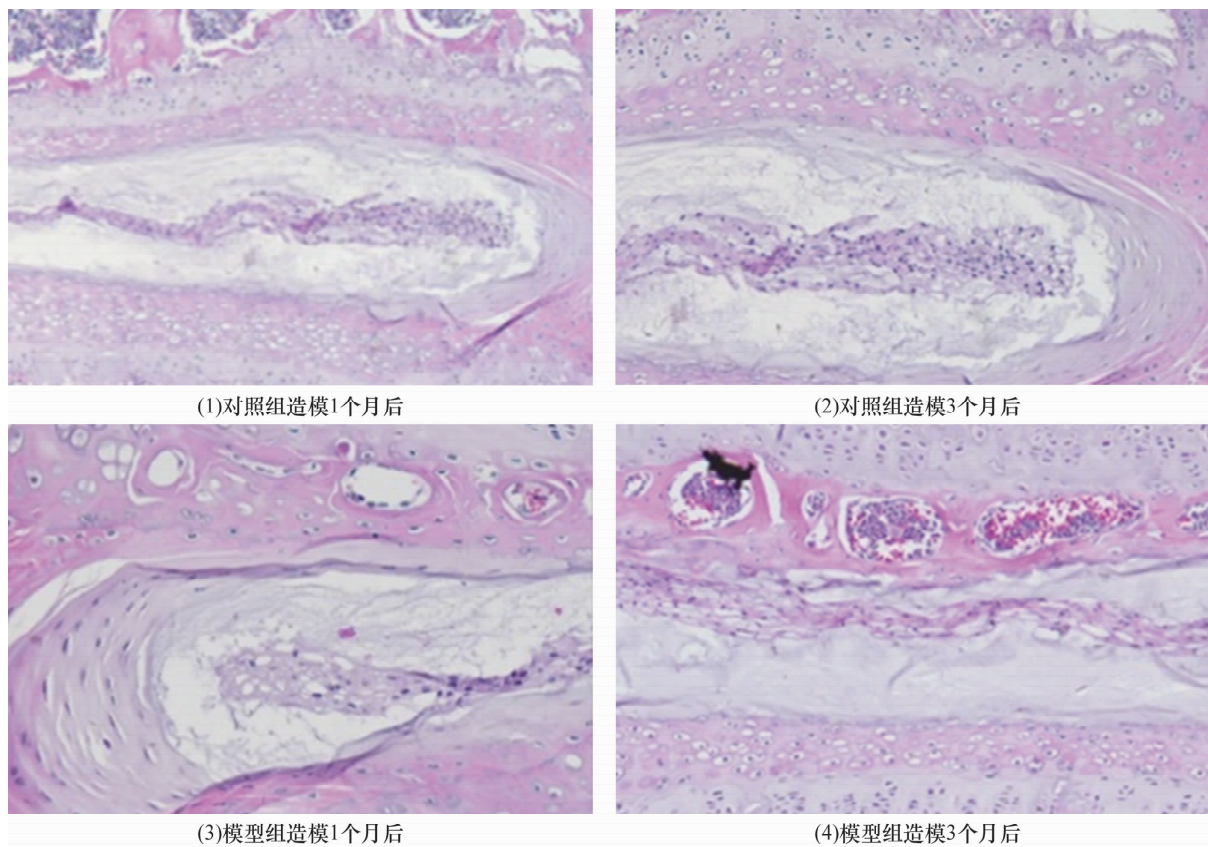


图 2 2 组小鼠椎间盘组织苏木素 - 伊红染色结果 (× 100)

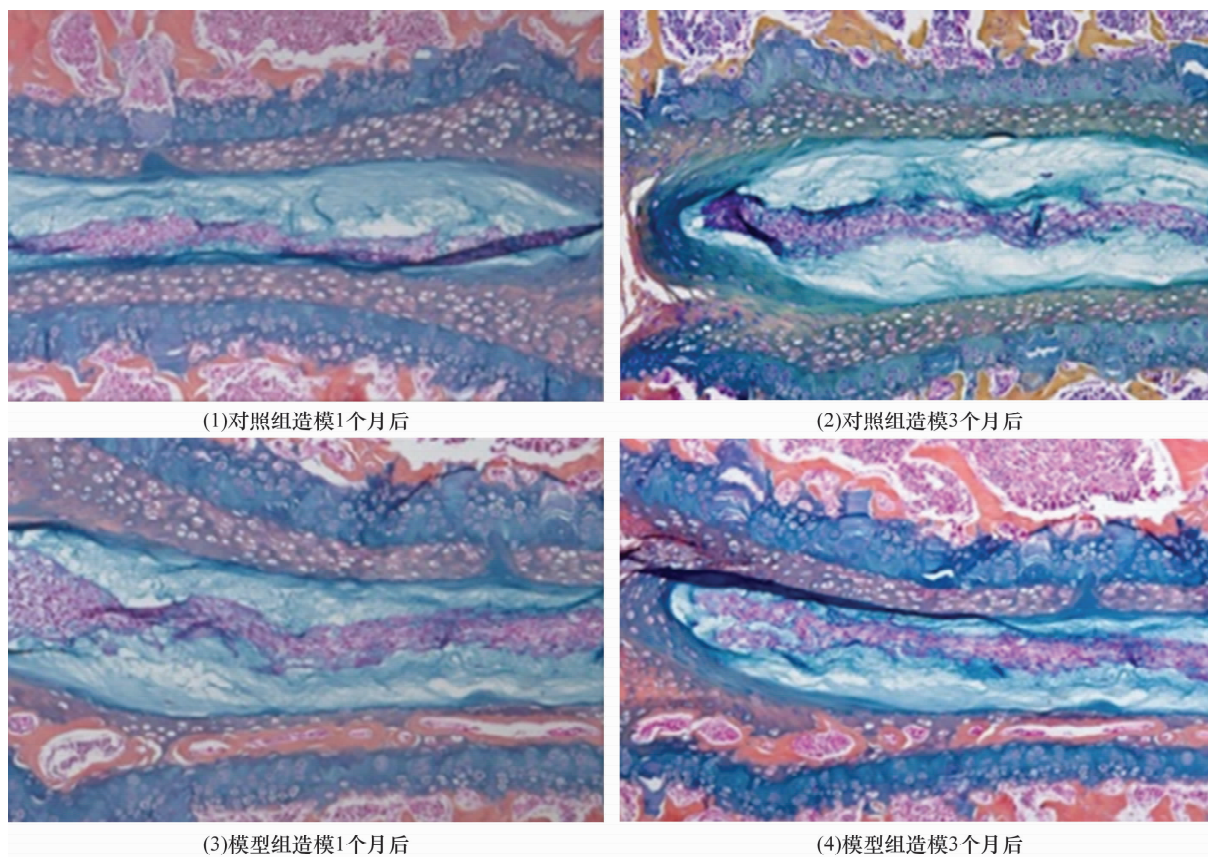


图 3 2 组小鼠椎间盘组织阿尔新蓝 - 苏木素染色结果 (× 100)

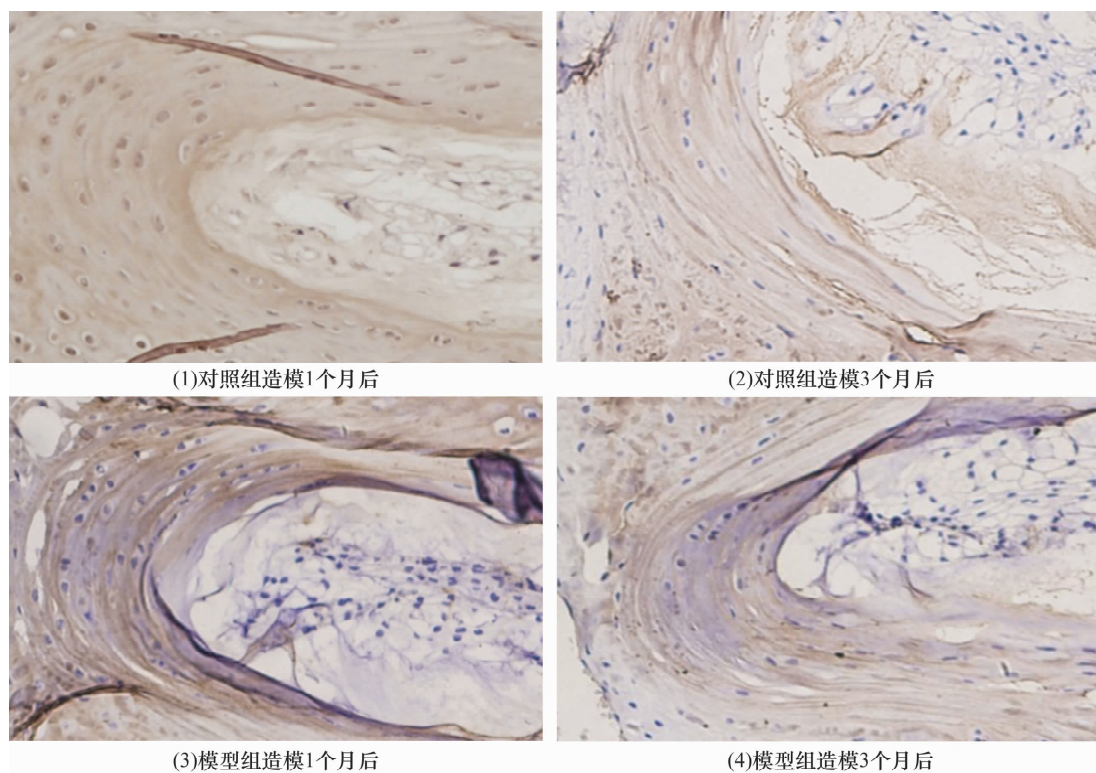


图 4 2 组小鼠椎间盘 II 型胶原免疫组织化学染色结果 (×400)

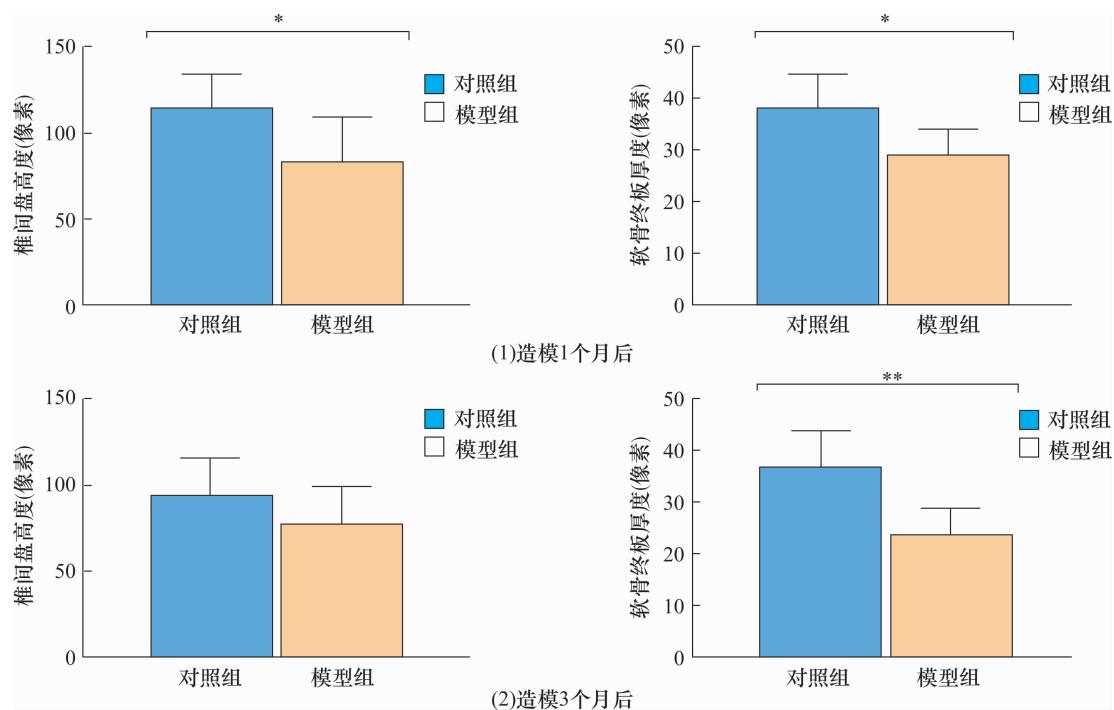


图 5 2 组小鼠造模后椎间盘高度和软骨终板厚度

表 1 2 组小鼠造模后椎间盘高度

组别	样本量 (只)	椎间盘高度($\bar{x} \pm s$, mm)	
		造模 1 个月后	造模 3 个月后
模型组	6	0.211 ± 0.063	0.197 ± 0.052
对照组	6	0.289 ± 0.050	0.235 ± 0.053
t 值		2.984	1.478
P 值		0.007	0.163

表 2 2 组小鼠造模后软骨终板厚度

组别	样本量 (只)	软骨终板厚度($\bar{x} \pm s$, mm)	
		造模 1 个月后	造模 3 个月后
模型组	6	0.074 ± 0.011	0.060 ± 0.012
对照组	6	0.097 ± 0.015	0.093 ± 0.018
t 值		2.813	4.092
P 值		0.023	0.001

间盘应力的退变模型,但这些模型施加在椎间盘上的力多数为一个对称或不对称的静力,这与人类在日常生活中发生椎间盘退变的机制不相符^[15-19]。研究表明,人类椎间盘退变的一个重要危险因素是腰背部重复地屈伸和长期处于振动状态^[20]。以往的椎间盘退变模型不能有效地模拟这一点,因此为了更有效地再现人类椎间盘退变的过程,我们建立了热板诱导小鼠跳跃的模型,促使小鼠主动地直立并且间断跳跃,产生周期性的轴向负荷来诱导椎间盘退变^[21]。目前采用针刺损伤椎间盘诱导椎间盘退变的造模方法更加普遍,通过针刺的方法获得小鼠^[22]、大鼠^[23]、兔^[24]椎间盘退变模型较为常见,但是人类椎间盘退变是一个随着年龄增长,在日常活动中不断加重的缓慢且复杂的过程,而针刺动物椎间盘所造成的是一次性的急性损伤,其椎间盘在被针刺之前,拥有良好的血供和细胞微环境,因此此类模型最适用于模拟外伤所致椎间盘退变,是否真正适用于模拟人类椎间盘退变还有待于进一步研究^[25-26]。

椎间盘退变往往表现为椎间盘高度的丢失及其含水量的降低,本实验结果显示,造模 1 个月后模型组小鼠椎间盘高度较对照组明显降低;而在造模 3 个月后,对照组和模型组椎间盘高度比较,差异无统计学意义,这可能是由于小鼠样本量较小,而椎间盘个体差异较大所致。软骨终板是椎间盘重要的组成部分,在椎间盘新陈代谢中扮演着重要的角色,是椎间盘通过扩散方式获得养分的唯一途径。本实验结果显示,小鼠椎间盘软骨终板不管是模型组还是对照组均出现了一定程度的碎裂和骨化,而模型组软骨终板的碎裂和骨化较对照组明显,这可能是由于本实验所用小鼠年龄较大,软骨终板质量均有不同程度的下降所致。由此可见,软骨终板在椎间盘退变中的作用尤为重要,椎间盘发生退变的启动因素可能与软骨终板的退变有着直接的关系。

椎间盘的主要成分是水、胶原和蛋白多糖,正常情况下纤维环中含有 60% II 型胶原蛋白和 40% I 型胶原,因此胶原的退化和减少也是椎间盘退变的主要组成部分^[27]。本实验结果显示,造模后对照组 II 型胶原蛋白在髓核、纤维环内层和软骨终板均有阳性表达,而模型组 II 型胶原蛋白的阳性表达在髓核中央及纤维环外层较对照组明显降低,且造模 3 个月后 II 型胶原蛋白的表达较造模 1 个月后降低更

明显。

本实验仅从组织形态学和免疫组织化学两方面来观察造模后小鼠椎间盘组织的变化,但是对于一个成熟的造模方法来说,尚需用聚合酶链式反应的方法从分子生物学角度给出相应的椎间盘退变结果,这将是我们今后研究工作的重点。

5 参考文献

- [1] SEGAR A H, FAIRBANK J C T, URBAN J. Leptin and the intervertebral disc: a biochemical link exists between obesity, intervertebral disc degeneration and low back pain – an in vitro study in a bovine model[J]. *Eur Spine J*, 2019, 28 (2): 214 – 223.
- [2] 刁志君, 姜宏, 刘锦涛, 等. 炎症因子在椎间盘退变中的作用[J]. *中医正骨*, 2018, 30(7): 32 – 35.
- [3] 劳杨骏, 徐涛涛, 杨笑奇, 等. 小鼠椎间盘退变模型的构建策略[J]. *中国中医急症*, 2015, 24(10): 1783 – 1786.
- [4] 夏炳江, 童培建. 适宜中医药研究的椎间盘退变动物模型的构建[J]. *中医正骨*, 2016, 28(11): 71 – 73.
- [5] BARCZEWSKA M, JEZIERSKA – WOZNIAK K, HABICH A, et al. Evaluation of regenerative processes in the pig model of intervertebral disc degeneration after transplantation of bone marrow – derived mesenchymal stem cells[J]. *Folia Neuropathol*, 2018, 56(2): 124 – 132.
- [6] STEFFEN F, BERTOLO A, AFFENTRANGER R, et al. Treatment of naturally degenerated canine lumbosacral intervertebral discs with autologous mesenchymal stromal cells and collagen microcarriers: a prospective clinical study[J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(2): 201 – 211.
- [7] PENNICOOKE B, HUSSAIN I, BERLIN C, et al. Annulus fibrosus repair using high – density collagen gel: an in vivo ovine model[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2018, 43(4): E208 – E215.
- [8] GELALIS I D, CHRISTOFOROU G, CHARCHANTI A, et al. Autologous platelet – rich plasma (PRP) effect on intervertebral disc restoration: an experimental rabbit model[J]. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2019, 29(3): 545 – 551.
- [9] SUN Q, LIU F, GAO M, et al. Therapeutic evaluation of acupoint stimulation with needle – scapelon on rat model of degenerative cervical intervertebral discs[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 677 – 684.
- [10] O'CONNELL G D, VRESILOVIC E J, ELLIOTT D M. Comparison of animals used in disc research to human lumbar disc geometry[J]. *Spine*, 2007, 32(3): 328 – 333.

(下转第 14 页)