

# 腰椎黄韧带肥厚动物模型的研究进展

赵宇<sup>1</sup>, 郭双<sup>1</sup>, 陈灿<sup>1</sup>, 陈一仁<sup>1</sup>, 杜梦凡<sup>1</sup>, 牛素生<sup>2</sup>, 张燕<sup>2</sup>

(1. 福建中医药大学中医学院, 福建 福州 350122;

2. 福建中医药大学中医骨伤及运动康复教育部重点实验室, 福建 福州 350122)

**摘要** 腰椎黄韧带肥厚是腰椎管狭窄的重要原因,可严重影响患者的健康和生活质量。建立腰椎黄韧带肥厚动物模型,有助于研究腰椎黄韧带肥厚的发病机制及治疗、预防方法。本文从模型动物和造模方法两大方面对腰椎黄韧带肥厚动物模型的研究进展进行了综述。

**关键词** 黄韧带;腰椎;椎管狭窄;模型,动物;综述

黄韧带附着于相邻的椎弓板,在上位椎弓板的下缘和内面,以及下位椎弓板的上缘和外缘,是椎管后壁及后外侧壁的重要组成部分,具有限制脊柱过度前屈,维持人体直立姿势的作用。黄韧带增厚会导致腰椎管狭窄,压迫神经根或马尾,从而导致腰痛和间歇性跛行。腰椎黄韧带肥厚是腰椎管狭窄的重要原因<sup>[1-2]</sup>。黄韧带主要由弹性纤维和胶原纤维组成,其中弹性纤维约占 80%,胶原纤维约占 20%<sup>[3]</sup>。肥厚的黄韧带表现为胶原纤维增多和弹性纤维丧失、钙化及软骨化生等退行性改变<sup>[4-8]</sup>。机械应力、活动水平、年龄、生长因子水平等因素被认为与黄韧带肥厚的发生有关<sup>[9-12]</sup>。但在黄韧带肥厚的发生过程中起决定性作用的因素仍然未知<sup>[13]</sup>。理想的动物模型可为研究腰椎黄韧带肥厚的发病机制及治疗、预防方法等提供良好的载体。本文从模型动物和造模方法两大方面对腰椎黄韧带肥厚动物模型的研究进展进行综述,以期为相关研究提供参考。

## 1 模型动物

模型动物的选择对动物模型的构建非常重要,所选动物要符合伦理要求、具有可重复性,且能充分模拟人类的病理过程。小鼠、大鼠和兔由于易于饲养、成本较低,是目前用于构建腰椎黄韧带肥厚模型的主要动物<sup>[14-16]</sup>。犬、羊等动物的脊柱结构与人类较为相似<sup>[17-18]</sup>,但用于动物模型构建,饲养要求高、经济成本高。猴为非人灵长目动物,其腰椎的解剖结构与人类最为相似<sup>[19]</sup>,但受到实验动物伦理学和高昂价格的限制,无法普遍应用。

基金项目:福建省自然科学基金项目(2023J01862)

通讯作者:张燕 E-mail:332780195@qq.com

**1.1 鼠** 实验小鼠的寿命一般为 24 个月,实验大鼠的寿命一般为 2.0~3.5 岁<sup>[20]</sup>。小鼠有 6 节腰椎,黄韧带位于硬脊膜囊与关节突关节之间,肥厚的黄韧带表现为弹性纤维与胶原纤维的比值降低<sup>[14]</sup>,与人类黄韧带肥厚的表现相似。大鼠也有 6 节腰椎,腰椎背部有向背外侧方向突出的乳突,L<sub>1</sub>~L<sub>4</sub> 乳突较明显,L<sub>5</sub>~L<sub>6</sub> 乳突不明显<sup>[21]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup>发现,大鼠正常黄韧带弹性纤维致密,肥厚的黄韧带弹性纤维与胶原纤维的比值与人肥厚的黄韧带相似。选择小鼠和大鼠作为模型动物构建腰椎黄韧带肥厚模型,可以较好地模拟人腰椎黄韧带肥厚的病理变化,且具有容易获取、成本低、培育周期短、可大规模饲养的优点。但鼠的腰椎结构与人存在差异,且椎体体积较小,黄韧带体积小且薄,在造模及干预操作时存在一定困难。

**1.2 兔** 兔是骨科疾病研究中常用的模型动物,其寿命一般为 8~12 岁<sup>[20]</sup>。新西兰兔一般有 7 节腰椎,部分存在副胸椎者有 6 节腰椎<sup>[22]</sup>。兔的腰椎棘突两侧有起源于上关节突后表面的向背外侧和头侧方向突出的乳突,椎间隙较为狭窄,黄韧带位于相邻椎体之间。Kroeber 等<sup>[23]</sup>发现与啮齿类动物相比,兔的腰椎关节突关节、椎旁肌肉、韧带和椎间盘与人的同源性更高。加之兔的腰椎椎体和黄韧带体积较小鼠和大鼠大,更便于实验操作,故相对于小鼠和大鼠,兔更适合作为腰椎黄韧带肥厚的模型动物。

**1.3 犬** 大型犬的寿命一般为 6~7 岁,小型犬的平均寿命约为 16 岁。犬的腰椎有 7 节,椎体及椎间盘的矢径、横径、高度自 L<sub>1</sub> 至 L<sub>7</sub> 逐渐增加,解剖结构与人类相似,且犬喜蹲坐,其腰椎受力情况与人类腰椎受力情况具有相似性<sup>[24]</sup>。对有间歇性跛行、大小便

失禁等症状的老年犬,影像检查可见腰椎黄韧带肥厚及退行性腰椎管狭窄,其发病机制、治疗方法也与人类大致相似<sup>[25]</sup>。相对于鼠和兔,犬的腰椎椎体及黄韧带体积更大,且犬对创伤性手术造模的耐受性较好<sup>[7]</sup>。因此,犬可能成为腰椎黄韧带肥厚的理想模型动物。但成本较高、培育周期较长的问题,限制了犬作为模型动物的应用。

**1.4 绵羊** 绵羊的腰椎有 6 节,腰椎椎体体积大约为人类的一半,椎管结构与人的腰椎具有较高的相似性。在生物力学方面,绵羊腰椎单节段轴向旋转的程度与人类相近<sup>[26]</sup>。绵羊相对于鼠和兔更强壮,对于创伤性手术造模的耐受性更好。但绵羊颈椎和腰椎骨性终板的前后径几乎是相等的,而人类骨性终板的前后径从颈椎至腰椎是逐渐增加的<sup>[27]</sup>。且作为模型动物,绵羊同样存在成本较高,培育周期较长,不易于大规模饲养等缺点。

**1.5 猴** 目前用于动物模型研究的非人灵长目动物主要是绒猴和猕猴。猴的腰椎解剖结构和脊柱生物力学结构与人类接近<sup>[19]</sup>,是最为理想的腰椎黄韧带肥厚模型动物。但相较于其他动物,非人灵长目动物有意识和自我意识,有认知事物和表达情感的能力,可表达抑郁、焦虑和欢乐等情绪,且寿命较长。实验研究对猴原有生活方式的破坏,有可能使它们遭受比其他实验动物更大的痛苦<sup>[28]</sup>。故以非人灵长目动物作为模型动物,在动物伦理方面存在较大争议<sup>[29]</sup>。

## 2 造模方法

腰椎黄韧带肥厚动物模型的传统造模方法主要分手术和非手术两大类。手术造模是通过手术破坏动物腰椎原有的力学结构,使腰椎融合或失稳,造成机械应力集中而引起腰椎黄韧带肥厚。手术造模的效果确切,但不易操作。非手术造模是通过应力装置或使动物长期保持特定姿势,造成机械应力集中而引起腰椎黄韧带肥厚。相对于手术造模,非手术造模可较好地模拟人腰椎黄韧带肥厚的病理变化过程,但此类方法造模周期较长,造模成功率和稳定性有待进一步验证。除这些以改变动物腰椎机械应力进行造模的传统方法外,也有研究者采用溶血磷脂酸(lyso-phosphatidic acid, LPA)诱导黄韧带细胞增殖,抑制其细胞凋亡的方法,进行腰椎黄韧带肥厚造模。

### 2.1 手术造模

**2.1.1 腰椎融合** Hayashi 等<sup>[10]</sup>对兔行后外侧植骨

融合术,使腰椎机械应力集中于 L<sub>3-4</sub> 节段黄韧带进行腰椎黄韧带肥厚造模,术后 16 周时形态学检查发现模型动物的腰椎黄韧带表现为弹性纤维断裂,软骨基质增加,与腰椎管狭窄症患者肥厚的黄韧带相似。此造模方法提供了一种评估机械应力变化对腰椎黄韧带的影响的方法,但其对操作人员技术水平有一定要求,且改变了动物的腰椎结构,不适用于针对腰椎黄韧带肥厚的生物力学及手术治疗的研究。

**2.1.2 腰椎失稳** 除机械应力集中导致黄韧带肥厚外,腰椎失稳也可引起腰椎黄韧带肥厚<sup>[12]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup>通过切除大鼠腰椎 L<sub>5-6</sub> 节段椎旁肌、棘突和磨碎双侧关节突关节的方法,使 L<sub>5-6</sub> 节段失稳,术后 8 周发现大鼠腰椎黄韧带厚度及轴向横截面积显著增加,背侧胶原纤维增多,弹性纤维相对胶原纤维的比率降低。但该造模方法切除较多腰椎骨性结构及肌肉,破坏了腰椎力学结构,且出血量大,术后易形成骨赘,同样不适用于针对腰椎黄韧带肥厚的生物力学及手术治疗的研究。

### 2.2 非手术造模

**2.2.1 应力装置刺激** Saito 等<sup>[14]</sup>设计了由移动床、皮带和驱动器组成的机械应力装置,并应用该装置持续屈伸小鼠脊柱,模拟应力刺激条件,将机械应力充分加载到小鼠的腰椎黄韧带,刺激 12 周后,小鼠腰椎黄韧带横截面积、厚度均明显增加。但该研究并未观察到与人黄韧带肥厚相似的标志性变化,如巨噬细胞浸润、转化生长因子-β 表达增加等,且机械应力装置操作较复杂,需要对小鼠多次麻醉。

**2.2.2 双足站立** Zheng 等<sup>[15]</sup>利用鼠的恐水性使小鼠持续保持双足站立姿势,发现小鼠腰椎黄韧带横截面积随造模时间增加而增加,10 周时腰椎黄韧带胶原纤维明显增多,弹性纤维的面积增加但密度低于胶原纤维,腰椎关节突关节的退变与老年小鼠相比无明显差异。该方法不需要重复麻醉,装置简单,但小鼠在站立过程中姿势存在差异,其造模效果的可重复性及个体差异有待验证。

**2.3 LPA 诱导** Zhou 等<sup>[16]</sup>在部分切除大鼠腰椎的棘突及相邻椎体棘上韧带和棘间韧带后,将负载 LPA 的明胶海绵置于硬脊膜和黄韧带之间,成功建造了腰椎黄韧带肥厚模型;并认为 LPA 可通过激活 LPAR1-Akt 信号通路诱导黄韧带细胞增殖,抑制其细胞凋亡,最终造成黄韧带肥厚。但采用该方法造模后模型动

物腰椎黄韧带肥厚的病理变化过程,以及造模前后腰椎生物力学的变化尚未验证。

### 3 小 结

腰椎黄韧带肥厚动物模型的建造仍处于探索阶段,目前尚无公认的造模方法。在模型动物的选择方面,小鼠和大鼠因具有容易获取、成本低、培育周期短、可大规模饲养等优点常成为首选。腰椎融合、腰椎失稳及 LPA 诱导造模均为有创操作,虽造模效果确切,但破坏了动物的腰椎结构。采用应力装置刺激及双足站立姿势的方法造模,可模拟黄韧带肥厚病变过程中腰椎的生物力学变化,但造模周期长,对动物的存活率有影响。稳定、可重复及可准确模拟出腰椎黄韧带肥厚病理变化过程的动物模型才是理想的动物模型。建立理想的腰椎黄韧带肥厚动物模型,可利用现有方法的优点,尽量准确地模拟人类腰椎黄韧带肥厚的病理过程,缩短造模周期,以提高造模的准确性和可重复性。

### 参考文献

- [1] SAKAI Y, ITO S, HIDA T, et al. Clinical outcome of lumbar spinal stenosis based on new classification according to hypertrophied ligamentum flavum [J]. *J Orthop Sci*, 2017, 22(1):27-33.
- [2] MUNNS J J, LEE J Y, ESPINOZA ORÍAS A A, et al. Ligamentum flavum hypertrophy in asymptomatic and chronic low back pain subjects [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0128321.
- [3] CHEUNG P W H, TAM V, LEUNG V Y L, et al. The paradoxical relationship between ligamentum flavum hypertrophy and developmental lumbar spinal stenosis [J]. *Scoliosis Spinal Disord*, 2016, 11(1):26.
- [4] REYES-SÁNCHEZ A, GARCÍA-RAMOS C L, DERAS-BARRIENTOS C M, et al. Ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis, disc herniation and degenerativespondylolisthesis. An histopathological description [J]. *Acta Ortop Mex*, 2019, 33(5):308-313.
- [5] SHAFIQ N, SUZUKI A, TERAJ H, et al. Cellularity and cartilage matrix increased in hypertrophied ligamentum flavum: histopathological analysis focusing on the mechanical stress and bone morphogenetic protein signaling [J]. *J Spinal Disord Tech*, 2012, 25(2):107-115.
- [6] YANAGISAWA A, UEDA M, SUEYOSHI T, et al. Amyloid deposits derived from transthyretin in the ligamentum flavum as related to lumbar spinal canal stenosis [J]. *Mod Pathol*, 2015, 28(2):201-207.
- [7] SPLENDIANI A, FERRARI F, BARILE A, et al. Occult neural foraminal stenosis caused by association between disc degeneration and facet joint osteoarthritis: demonstration with dedicated upright MRI system [J]. *Radiol Med*, 2014, 119(3):164-174.
- [8] 阿力木江·阿西木, 吐尔洪江·阿布都热西提, 艾尔肯·阿木冬. 腰椎黄韧带肥厚与细胞凋亡关系的实验研究 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(92):18039-18041.
- [9] 周纲, 张玉坤, 黄卫民. 中国新疆地区腰椎管狭窄患者腰椎黄韧带肥厚的危险因素分析: 回顾性、单中心、病例分析 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(19):2993-2998.
- [10] HAYASHI K, SUZUKI A, ABDULLAH AHMADI S, et al. Mechanical stress induces elastic fibre disruption and cartilage matrix increase in ligamentum flavum [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):13092.
- [11] WANG B, GAO C, ZHANG P, et al. The increased motion of lumbar induces ligamentum flavum hypertrophy in a rat model [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2021, 22(1):334.
- [12] HAYASHI K, SUZUKI A, TERAJ H, et al. Fibroblast growth factor 9 is upregulated upon intervertebral mechanical stress-induced ligamentum flavum hypertrophy in a rabbit model [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2019, 44(20):E1172-E1180.
- [13] SUN C, ZHANG H, WANG X, et al. Ligamentum flavum fibrosis and hypertrophy: molecular pathways, cellular mechanisms, and future directions [J]. *FASEB J*, 2020, 34(8):9854-9868.
- [14] SAITO T, YOKOTA K, KOBAYAKAWA K, et al. Experimental mouse model of lumbar ligamentum flavum hypertrophy [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1):e0169717.
- [15] ZHENG Z Y, LI P, AO X, et al. Characterization of a novel model of lumbar ligamentum flavum hypertrophy in bipedal standing mice [J]. *Orthop Surg*, 2021, 13(8):2457-2467.
- [16] ZHOU T, DU L, CHEN C, et al. Lysophosphatidic acid induces ligamentum flavum hypertrophy through the LPAR1/Akt pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(4):1472-1486.
- [17] ETIENNE A L, PEETERS D, BUSONI V. Ultrasonographic percutaneous anatomy of the caudal lumbar region and ultrasound-guided lumbar puncture in the dog [J]. *Vet Radiol Ultrasound*, 2010, 51(5):527-532.
- [18] 高山松, 霍建忠, 季兴华. 不同压迫速率下羊颈脊髓的病理变化研究 [J]. *中国临床医学*, 2013, 20(4):477-479.

- [72] JUNG J H, BANG C H, SONG G G, et al. Knee osteoarthritis and menopausal hormone therapy in postmenopausal women: a nationwide cross-sectional study [J]. *Menopause*, 2019, 26(6): 598 – 602.
- [73] KIM S, KO Y, LEE H J, et al. Menopausal hormone therapy and the risk of breast cancer by histological type and race: a meta-analysis of randomized controlled trials and cohort studies [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 170(3): 667 – 675.
- [74] BASARIA S, COVIELLO A D, TRAVISON T G, et al. Adverse events associated with testosterone administration [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(2): 109 – 122.
- [75] PHILIPOT D, GUÉRIT D, PLATANO D, et al. p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(1): 1 – 12.
- [76] NG T K, YANG Q, FORTINO V R, et al. MicroRNA-132 directs human periodontal ligament-derived neural crest stem cell neural differentiation [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13(1): 12 – 24.
- [77] TAMAKI M, HAGIWARA A, MIYASHITA K, et al. Improvement of physical decline through combined effects of muscle enhancement and mitochondrial activation by a gastric hormone ghrelin in male 5/6Nx CKD model mice [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(10): 3638 – 3648.
- [78] CAO L, GAO X, CHEN Z, et al. Ghrelin prevents articular cartilage matrix destruction in human chondrocytes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 651 – 655.
- [79] DU K, FANG X, LI Z. Ferulic acid suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced degeneration of chondrocytes isolated from patients with osteoarthritis through the SIRT1/AMPK/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2021, 9(3): 710 – 720.
- [80] BECKER C, LORD S R, STUDENSKI S A, et al. Myostatin antibody (LY2495655) in older weak fallers: a proof-of-concept, randomised, phase 2 trial [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3(12): 948 – 957.
- [81] ZHAO C, SHAO Y, LIN C, et al. Myostatin serum concentrations are correlated with the severity of knee osteoarthritis [J]. *J Clin Lab Anal*, 2017, 31(5): e22094.
- [82] HINKLE R T, DOLAN E, CODY D B, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition reduces skeletal muscle atrophy [J]. *Muscle Nerve*, 2005, 32(6): 775 – 781.
- [83] TENOR H, HEDBOM E, HÄUSELMANN H J, et al. Phosphodiesterase isoenzyme families in human osteoarthritis chondrocytes-functional importance of phosphodiesterase 4 [J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 135(3): 609 – 618.
- (收稿日期: 2022-11-14 本文编辑: 吕宁)

(上接第 56 页)

- [19] DUNCAN A E, COLMAN R J, KRAMER P A. Sex differences in spinal osteoarthritis in humans and rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2012, 37(11): 915 – 922.
- [20] 陈玥, 苏丹, 贵文娟, 等. 实验动物与人类年龄相关性研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(11): 116 – 122.
- [21] 金凤. 针刀配合手法治疗腰椎退变的大鼠实验研究及生物力学分析 [D]. 上海: 复旦大学, 2011.
- [22] PALUMBO M, VALDES M, ROBERTSON A, et al. Posterolateral intertransverse lumbar arthrodesis in the New Zealand White rabbit model; I. Surgical anatomy [J]. *Spine J*, 2004, 4(3): 287 – 292.
- [23] KROEBER M W, UNGLAUB F, WANG H, et al. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27(23): 2684 – 2690.
- [24] HOFFMAN J M, CREEVY K E, FRANKS A, et al. The companion dog as a model for human aging and mortality [J]. *Aging Cell*, 2018, 17(3): e12737.
- [25] MEIJ B P, BERGKNUT N. Degenerative lumbosacral stenosis in dogs [J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2010, 40(5): 983 – 1009.
- [26] MAGEED M, BERNER D, JÜLKE H, et al. Is sheep lumbar spine a suitable alternative model for human spinal researches? Morphometrical comparison study [J]. *Lab Anim Res*, 2013, 29(4): 183 – 189.
- [27] WILKE H J, KETTLER A, WENGER K H, et al. Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine [J]. *Anat Rec*, 1997, 247(4): 542 – 555.
- [28] 雷瑞鹏, 邱仁宗. 非人灵长类动物实验的伦理问题 [J]. *科学与社会*, 2018, 8(2): 74 – 88.
- [29] 谭韬, 季维智. 灵长类生物医学前沿探索中的伦理思考 [J]. *科学与社会*, 2021, 11(4): 1 – 11.
- (收稿日期: 2022-06-29 本文编辑: 杨雅)