

• 实验研究 Experimental research •

椎体成形术中骨水泥渗漏对椎间盘生化改变的影响

赵 辉, 倪才方, 黄 健, 陈 珑, 唐天驷, 杨惠林

【摘要】 目的 探讨骨水泥椎间盘渗漏后椎间盘糖胺多糖(GAG)含量变化,以及 GAG 含量的改变与骨水泥种类、骨水泥渗漏量和渗漏后的时间是否有关。**方法** 选用 16 只成年家犬按模型制作后观察时间点随机分为 12 周及 24 周两组。每只犬 L1/2 ~ L5/6 共 5 个椎间盘为实验对象,随机分成 A(对照组)、B1(PMMA 0.1 ml)、B2(PMMA 0.3 ml)、C1(CPC 0.1 ml)、C2(CPC 0.3 ml)5 组。对 12 及 24 周观察时间内骨水泥组及对照组行方差分析,用析因设计的方差分析比较两种骨水泥之间、两种剂量之间的 GAG 含量有无差别。**结果** 两两比较 12 周及 24 周骨水泥组的椎间盘 GAG 含量与对照组差别均有统计学意义($P < 0.05$)。在骨水泥组内行析因设计的方差分析,术后两观察时间之间、两种骨水泥之间、两种剂量之间椎间盘 GAG 含量差别均有统计学意义。**结论** 骨水泥椎间盘渗漏会导致椎间盘的 GAG 含量下降,蛋白多糖合成下降。椎间盘的 GAG 含量改变与骨水泥渗漏入椎间盘量有关,与骨水泥渗漏入椎间盘后时间有关,与骨水泥类型有关。

【关键词】 椎间盘退变;蛋白多糖;糖胺多糖

中图分类号:R681.5 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2011)-08-0641-04

The effect of cement leakage occurred during vertebroplasty on intradiscal biochemistry variations

ZHAO Hui, NI Cai-fang, HUANG Jian, CHEN Long, TANG Tian-si, YANG Hui-lin. Department of Interventional Radiology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

Corresponding author: ZHAO Hui, E-mail: zhaohui800@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of intradiscal cement leakage occurred during vertebroplasty on the changes of glycosaminoglycan contents in the disc, and to analyze the relationship of disc biochemistry to the time interval after the procedure, to the kinds of bone cement and to the amount of cement leakage. **Methods** Sixteen adult dogs (15 - 17 kg) were randomly divided into 12-week group and 24-week group. Five lumbar intervertebral discs (L1/2 - L5/6) in each dog were classified into 5 groups: one disc was used as control group and the remaining four discs were used as bone cement groups (PMMA and CPC). Each of cement groups was classified into 2 dose subgroups (0.1 ml and 0.3 ml). The lumbar intervertebral discs of the dog were punctured with an 18-gauge needle, and bone cement was injected into them in cement groups. Control discs were only punctured and injected with nothing. The contents of glycosaminoglycan in the annulus fibrosus and nucleus pulposus of discs were determined and were analyzed for their biochemical properties. ANOVA and Scheffe-test were used to make the statistical analyses. **Results** In control group, the contents of glycosaminoglycan in annulus fibrosus and nucleus pulposus were not significantly different between 12-week group and 24-week group ($P < 0.05$). In 12-week group, significant difference in the contents of glycosaminoglycan existed between the control group and the bone cement groups when analysis of variance was used ($P < 0.05$), and the same result was observed in 24-week group ($P < 0.05$). By using Scheffe test, no matter in the 12-week group or in the 24-week group, the contents of glycosaminoglycan in annulus fibrosus and nucleus pulposus of cement groups were significantly different from those of the control group ($P < 0.05$).

Significant difference existed between the groups with different time interval, using different doses and belonging to different category of bone cement in bone cement groups when univariate analysis of variance

基金项目:江苏省“135”工程重点人才基金(RC2003097)

作者单位:226001 南通大学附属医院介入放射科(赵 辉、黄 健);苏州大学附属第一医院介入放射科(倪才方、陈 珑);骨科(唐天驷、杨惠林)

通信作者:赵 辉 E-mail: zhaohui800@163.com

was employed ($P < 0.05$). **Conclusion** The contents of glycosaminoglycan in annulus fibrosus and in nucleus pulposus show some changes after intradiscal cement leakage. And these changes are obviously related to the time interval after operation, the category of cement and the amount of cement leakage. (J Intervent Radiol, 2011, 20: 641-644)

【Key words】 intervertebral disc degeneration; proteoglycan; glycosaminoglycan

蛋白多糖是椎间盘的主要成分之一,椎间盘退行性变时通常表现为蛋白多糖的含量减少,并进一步导致含水量下降。糖胺多糖(GAG)是蛋白多糖的基本组成单位,本实验通过对 GAG 的含量测定,从生化角度分析骨水泥椎间盘渗漏后椎间盘蛋白多糖的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

成年健康杂种犬 16 只,雌雄不拘,24 ~ 26 月龄,体重 15 ~ 17 kg,由苏州大学实验动物中心提供并饲养。按模型制作后观察时间随机分为 12 周和 24 周两组,每组 8 只,每只犬 L1/2 ~ L5/6 共 5 个椎间盘为实验对象,随机分配至 A、B1、B2、C1、C2 实验小组。A 为对照组,不注入任何物质,B1 和 B2 分别为注入 PMMA 0.1 ml 和 0.3 ml,C1 和 C2 分别为注入 CPC 0.1 ml 和 0.3 ml。

1.2 模型制作方法

犬经 3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)静脉麻醉后,常规消毒、铺巾,侧卧透视下分别用 18 G 穿刺针(Terumo 公司)从右侧方入路分别穿刺 L1/2、L2/3、L3/4、L4/5、L5/6 椎间盘的纤维环,经正侧位透视确定针尖位于椎间盘中心确认为穿刺成功,分别调制 CPC(上海瑞邦生物有限公司)及 PMMA(化工部晨光化工研究所医用高分子制药厂)。PMMA 粉剂、硫酸钡(上海马鹿制药厂)、液体比值为 8 g : 2 g : 5 ml。两种骨水泥体外调制后,用 Murphy Quick 1ml 注射器抽取,排清空气,待到拉丝期,分别按设计量注入对应椎间盘(经体外测试 18 G 穿刺针内腔容积为 0.1 ml,注射骨水泥时应将此容积量扣除)。注入后待骨水泥凝固前拔针。CT 薄层扫描及重建,见骨水泥位于椎间盘内。

1.3 取材和部位

分别于模型制作后 12 和 24 周,用空气栓塞法各处死一组(8 只)动物。取出包括 L1 ~ L6 整段腰椎,剔除周围组织,生理盐水冲去血迹,4 倍光镜下分离椎间盘的髓核和纤维环,进行生化分析。

1.4 GAG 含量测定^[1]

1.4.1 匀浆制备 切取少许纤维环标本,称取每份标本用量;切碎后加入 0.1 mol/L NaOH 1.5 ml,在冰水槽中用匀浆器制成乳白色匀浆;加入 0.1 mol/L HCl 调至中性。

1.4.2 GAG 提取 在各试管中加入胰蛋白酶 1 mg/ml,混匀后 37℃保存 24 h;加入 60%三氯醋酸至终浓度为 10%,混匀后放置 24 h;14 000 g 离心 20 min,留上清液,加入 4 倍体积无水乙醇,放置 48 h 出现白色絮状沉淀;以 14 000 g 离心 20 min,弃上清液,沉淀溶于 1 ml 蒸馏水中即得 GAG 溶液。

1.4.3 GAG 含量测定 取 GAG 溶液 0.1 ml(标准管中取 1 mg/ml 氨基半乳糖 0.1 ml),以 6 mol/L HCl 水解 GAG 游离出氨基己糖;加入乙酰丙酮 10.5 ml,90℃水浴 30 min,使氨基己糖生成吡咯衍生物;冷却后加入 95%乙醇 2.5 ml,混匀后放置 20 min,加入对二甲胺基苯甲醇混匀后显红色,10 min 内用 530 nm 分光光度计测定吸光值 A。纤维环 GAG 含量 = (样本管 A 值/标准管 A 值) × 1 × 0.1 × (沉淀物稀释倍数/样本用量)(单位:g/100 g 湿重纤维环)。

1.4.4 髓核 GAG 含量测定方法同上。

1.5 统计分析

用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。对 12 及 24 周观察时间内骨水泥组及对照组结果行方差分析,然后用 scheffe 法两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;用析因设计的方差分析比较两种骨水泥之间、两种剂量之间的 GAG 含量有无差别。

2 结果

对照组纤维环及髓核 GAG 含量在模型制作后 12 周及 24 周间差异无统计学意义($P > 0.05$)。分别在 12、24 周内对骨水泥组(B1 组、B2 组、C1 组、C2 组)及对照组纤维环及髓核髓核 GAG 含量行方差检验,与对照组相比,12 周组 F 值分别为 92.43、15.98,24 周组 F 值分别为 258.95、76.04 差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。各组两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),对骨水泥组术后 2 个不同观察时间之间、2 种不同骨水泥之间、2 种不同剂量之

表 1 各组 GAG 含量比较

(g/100g 湿重, $\bar{x} \pm s$)

部位	组别	12周	24周
纤维环	A组	10.18 ± 0.65	10.34 ± 0.77
	B1	6.64 ± 0.78	4.56 ± 0.26
	B2	5.51 ± 0.56	3.65 ± 0.36
	C1	6.71 ± 0.43	6.66 ± 0.45
	C2	6.56 ± 0.45	5.23 ± 0.44
F 值		92.43	258.95
P 值		0.000 (B1和B2比较 $P > 0.05$, 其余两两 比较 $P < 0.05$)	0.000 (所有两两比 较 $P < 0.05$)
髓核	A组	10.19 ± 0.60	10.01 ± 0.46
	B1	8.13 ± 1.52	6.63 ± 0.67
	B2	6.37 ± 0.47	6.16 ± 0.63
	C1	6.80 ± 1.86	9.10 ± 0.58
	C2	6.45 ± 0.27	8.55 ± 0.45
F 值		15.98	76.04
P 值		0.000 (B1和C2比较 $P > 0.05$, B2和C1比较 $P > 0.05$, C1和C2比较 $P > 0.05$, 其余两两比较 $P < 0.05$)	0.000 (B1和B2比 较 $P > 0.05$, 其余 两两比较 $P < 0.05$)

间的 GAG 含量分别进行析因设计的方差分析, F 值分别为 115.48、97.96、185.30, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

椎间盘组织学上由细胞及细胞外基质形成, 细胞外基质主要由胶原纤维和蛋白多糖组成。椎间盘根据负荷大小、水分多少、胶原拉紧和彼此缠结的牢固程度以及蛋白多糖状态的改变, 其形态及各种理化和生理功能也发生改变。椎间盘由于机械、营养、生物等各种因素造成损伤, 导致椎间盘细胞因子减少, 炎症介质增多, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和其他蛋白水解酶含量及活性增加。引起细胞外基质降解, 髓核细胞数目减少, 进而使蛋白多糖、胶原的合成减少, 导致椎间盘的退行性变^[2]。

蛋白多糖是一种由多肽为主链, 以许多氨基多糖为侧链组成的大分子体; 在体内具有多方面功能。蛋白多糖单体(亚单位)由包埋于中央的核心蛋白及其两侧的 GAG 链组成。椎间盘组织中蛋白多糖可与胶原及弹性蛋白形成稳定的结构, 具有黏合、润滑及缓冲外界压力的作用, 同时具有较强的水化作用, 使椎间盘具有正常渗透压和电离子浓度, 以保证椎间盘不断得到营养和维持正常功能。IVDD 髓核细胞合成蛋白多糖聚合体下降, 由于基质降解酶活性升高使聚合体分解加速, 蛋白多糖含

量和成分改变被认为是椎间盘退变最早出现的生化改变之一, 故蛋白多糖含量常被用来作为 IVDD 的早期生物学指标。有研究表明蛋白多糖的减少与椎间盘的退变程度呈正比。GAG 是蛋白多糖的基本组成单位, 通过测定 GAG 可间接反应蛋白多糖的含量^[3]。

椎间盘所处的生物力学环境直接影响椎间盘细胞的代谢, 特别是压力负荷对椎间盘基质的产生和细胞活性有所影响。本实验的结果表明骨水泥椎间盘渗漏后纤维环及髓核 GAG 含量下降, 下降程度与渗漏后时间及骨水泥渗漏量的大小相关。综合文献报道并结合本组实验结果, 我们分析可能有如下原因导致纤维环及髓核 GAG 含量的改变。首先, 骨水泥注入椎间盘后可直接推挤压迫髓核, 使其碎裂、移位、变形; 其同时使椎间盘应力传递不均匀, 从而导致胶原纤维肿胀、扭曲、断裂, 开始在内层纤维环形成裂隙, 并由内向外扩展。其次椎间盘是闭合的缓冲系统, 骨水泥渗入导致椎间盘内的应力增高, 应力重新分配, 应力的增高与骨水泥量成正相关。有研究表明应力在椎间盘重新分配时, 首先髓核压力提高, 纤维环张力增加, 当外力持续存在并超过椎间盘的膨胀压, 髓核容积随之减少, 其后压力被重新分布到内层纤维环, 继而引发局部生物学反应^[4-5]。如果应力持续加大到致使椎间盘膨出的压力时, 髓核就会流失, 而导致髓核体积的缩小。髓核流失后, 纤维环内的压力就随之重新分布。这两个生物学现象(髓核体积缩小、纤维环压力的重新分布)引起椎间盘退变的重要生物学因素。

文献报道, 体外培养的牛和猪的椎间盘在受到压应力、张应力和震动时, 蛋白多糖的合成降低^[6]。在椎间盘运动过程中, 张应力是纤维环主要的载荷形式。研究表明在异常生物力学环境下, 则可直接导致终板蛋白多糖含量的不断减少和成分比例的改变, 提示长时间的应力作用可促使软骨终板蛋白多糖聚合体解聚、含量减少、成分构成发生变化, 是导致椎间盘退变的重要机制之一; 在异常应力下, 终板的血管分布明显减少, 使得细胞外环境氧合及葡萄糖等营养物质减少, 这可能是异常应力导致终板加速退变的重要机制^[7]。

椎间盘的代谢更多地依赖于间歇性的压力负荷, 且与压力负荷的频率和强度相关。因为间歇性压力负荷有利于椎间盘内压力差的维持, 从而使流动的物质可以随着压力梯度转移, 保证了代谢产物向外围移动及营养物质在椎间盘内扩散。不适当的

压力负荷将减少蛋白多糖的合成,减少 MMPs 组织抑制因子(TIMP)的产生,影响细胞代谢和表达,破坏维持椎间盘结构的基础。Hutton 等^[8]研究发现,椎间盘静水压为 1 MPa 时髓核的胶原和蛋白多糖合成被激活,而在纤维环则被抑制,因而认为静水压直接影响椎间盘细胞胶原和蛋白多糖的合成。动物实验证实,异常高应力促进软骨细胞合成蛋白聚糖,从而影响髓核蛋白聚糖的合成,同时异常高应力加速生长板软骨细胞的退行性变,使终板损伤,软骨终板增厚,终板下血窦明显减少。

在椎间盘退行性变过程中,由于细胞的活力降低,蛋白多糖合成和维持的能力下降,进而大分子的合成减少。随着蛋白多糖数量减少的同时,其质量也受到影响。较大的蛋白多糖聚合体的碎片开始出现,非聚合的蛋白多糖增加。基质内 GAG 的比例发生变化,硫酸角质素多于硫酸软骨素,使得基质的吸水能力下降。连接蛋白也受到影响,许多小碎片开始出现。蛋白多糖的裂解和基质维持能力的下降,使降解的大分子不断累积。这些降解产物可使扩散能力下降和终板周围血流变缓,吸引水分子能力的降低,又加重了扩散能力的损害程度。氧、营养成分和代谢废物运转能力的下降,进一步加速了细胞的死亡和基质的降解,从而使这种恶性循环不断地加重。

PMMA 由甲基丙烯酸甲酯聚合体和甲基丙烯酸甲酯单体组成,单体有细胞毒性,粉剂与液体混合时发生热的聚合反应,临床上常在粉剂中加入 20%硫酸钡用来增加其显影能力。CPC 是一类以各种磷酸盐为主要成份,具有高度的生物相容性、降解活性、成骨活性、固化过程等温性等特点。在本研究中我们发现,PMMA 组椎间盘纤维环和髓核 GAG 的含量减少程度较 CPC 组重,这可能与 PMMA 单

体毒性及产热等特性有关。

本研究通过建立 2 种骨水泥及不同剂量骨水泥椎间盘渗漏模型,在两个时间观察点对纤维环及髓核进行 GAG 含量的测定。骨水泥椎间盘渗漏会导致椎间盘 GAG 的含量改变,蛋白多糖合成下降。GAG 的含量改变与骨水泥类型、渗漏后时间及渗漏量有关。

[参考文献]

- [1] 谭炳毅,张佐伦,袁泽农,等. 颈椎间盘纤维环及髓核生化成分的分析[J]. 中国矫形外科杂志, 2000, 7: 642 - 644.
- [2] Hamilton DJ, Pilliar RM, Waldman S, et al. Effect of circumferential constraint on nucleus pulposus tissue *in vitro*[J]. Spine J, 2010, 10: 174 - 183.
- [3] Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, et al. Human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30: 2743 - 2748.
- [4] Maclean JJ, Lee CR, Alini M, et al. The effects of short-term load duration on anabolic and catabolic gene expression in the rat tail intervertebral disc[J]. J Orthop Res, 2005, 23: 1120 - 1127.
- [5] Oliphant D, Frayne R, Kawchuk G. A new method of creating intervertebral disc disruption of various grades [J]. Clin Biomech, 2006, 21: 21 - 25.
- [6] Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, et al. Human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30: 2743 - 2748.
- [7] Espinoza AO, Malhotra NR, Elliott DM. Rat disc torsional mechanics: effect of lumbar and caudal levels and axial compression load[J]. Spine J, 2009, 9: 204 - 209.
- [8] Hutton WC, Elmer WA, Boden SD, et al. The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism[J]. Spine (Phila Pa 1976), 1999, 24: 1507 - 1515.

(收稿日期:2011-02-09)