

·实验研究 Experimental research·

X 线导引下针刺诱导兔椎间盘退行改变的研究

王 伟, 盛娜萍, 江永焰, 叶 刚, 林波森, 全显跃, 俞志坚

【摘要】 目的 采用 X 线导引下针刺诱导建立兔椎间盘退行性变(退变)模型,并对椎间盘进行 T₂ Mapping 检测,为深入研究椎间盘退变的磁共振(MR)定量检测奠定基础。方法 选择新西兰大白兔 5 只,在 X 线导引下采用穿刺髓核和穿刺软骨终板两种手术方式,分别在穿刺前、穿刺后 30 min、4 和 8 周进行常规 T₂WI、T₂ Mapping 成像和 CT 三维重建等影像学检查,8 周时对诸椎间盘进行病理学分析。结果 造模后 30 min,各椎间盘 MR 信号未见明显异常;4 周穿刺髓核组 T₂WI 信号明显降低,高信号区范围缩小;T₂ Mapping 显示高值范围明显缩小;8 周髓核变化与 4 周类似,未见明确退变进展;正常对照组和穿刺软骨终板组的椎间盘信号和量值改变不明显。病理学检查发现穿刺髓核组的髓核组织发生非常明显的退变,而穿刺软骨终板组发生轻度退变。结论 采用 X 线导引下针刺椎间盘髓核的方式成功建立兔椎间盘退变模型,此模型具有操作简单、经济、并发症低、影响因素少等优势,并且证明了 T₂ Mapping 技术可用于兔椎间盘退变的检测,为深入研究 MR 定量技术对椎间盘退变的价值奠定了基础。

【关键词】 椎间盘退行性改变;磁共振;穿刺;动物实验

中图分类号:R681.53 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2013)-12-1021-06

Needle puncturing-induced intervertebral disc degeneration: an experimental study in rabbits WANG Wei, Sheng Na-ping, JIANG Yong-yan, YE Gang, LIN Bo-miao, QUAN Xian-yue, YU Zhi-jian. Department of Radiology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510282, China

Corresponding author: YU Zhi-jian, E-mail: simonyu9962@hotmail.com

【Abstract】 Objective To establish a reproducible rabbit model of intervertebral disc degeneration by needle puncturing under X-ray guidance, to check the intervertebral disc with T₂ mapping technique in order to lay the foundation of MR quantitative technology. **Methods** Five healthy New Zealand white rabbits were used in this study under the approval from Institutional Animal Care Use Committee. The nucleus pulposus and cartilage endplates were destructed respectively through needle puncturing under X-ray guidance. The degeneration of intervertebral disc was evaluated by using MR T₂WI, T₂ mapping and CT 3-D reconstruction techniques at the following points of time: pre-puncturing, 30 minutes, 4 weeks and 8 weeks after the procedure. Pathological examination of the intervertebral discs was conducted at 8 weeks after the procedure. **Results** On T₂WI and CT images obtained at 30 minutes after the treatment, no changes of intervertebral disc was found. At 4 and 8 weeks after the procedure, the signal intensity of the punctured discs decreased obviously, while the signal intensity at other disc levels showed no any difference when compared with the control group. T₂ mapping showed that the values of nucleus pulposus of punctured discs became significant lower at 4 and 8 weeks after the procedure, while the values of other discs remained the same as before. **Conclusion** Under X-ray guidance needle puncturing to destroy the nucleus pulposus can successfully establish the model of intervertebral disc degeneration in rabbits. This technique is simple, economical and

reproducible with fewer complications. T₂ mapping technique can quantitatively evaluate the extent of disc degeneration in rabbits. This study has laid the foundation for further study on the degeneration of

基金项目:广东省科技计划项目基金资助项目 (2011B031800052)

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2013.12.015

作者单位:510282 广州 南方医科大学珠江医院影像诊断科
通信作者:俞志坚 E-mail: simonyu9962@hotmail.com

intervertebral disc with MR quantitative technology.(J Intervent Radiol, 2013, 22: 1021-1026)

【Key words】 intervertebral disc degeneration; magnetic resonance imaging; puncture; experimental animal

腰椎间盘突出退行性变 (intervertebral disc degeneration,IVDD)是引起下腰痛的重要原因,学者们提出神经纤维异常增殖、生物化学因素、生理因素、遗传因素等多种病因假说^[1],虽然这些假说均在实验中得到初步证实,但尚未形成统一公认的病因假说。临床上,基于不同阶段的病理生理改变,研究了多种治疗方法,包括药物治疗、介入治疗、基因治疗、干细胞治疗、脊柱融合和非融合技术、生物替代技术以及异体椎间盘移植,对延缓和治疗椎间盘病变有一定疗效。由于人类自身的 IVDD 是缓慢进展的过程,因此建立可反映退行性变(退变)客观规律、重复性好的动物模型是研究 IVDD 病因、诊断和治疗的迫切需要。本研究在既往诱导 IVDD 动脉模型的经典方法/纤维环穿刺法的基础上,采用 X 线引导下穿刺髓核及穿刺破坏软骨终板两种方法,探讨微创方法建立 IVDD 动物模型并进行磁共振(MR)定量检测。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

选用 6 月龄雌性清洁级健康新西兰大白兔 5 只(南方医科大学动物实验中心提供),体重(3.0 ± 0.25)kg,给予适应性饲养 1 周,如动物状态良好则纳入研究。实验中对动物处置符合动物伦理学标准。

1.2 术前准备

按每公斤 1 ml 3%戊巴比妥钠生理盐水溶液为标准制备麻醉药。从兔耳缘静脉缓慢注入麻醉药物至深度麻醉。医用胶布固定静脉输液针并连接三通管,用 5 u/ml 肝素钠生理盐水溶液 2 ~ 3 ml 封管。

1.3 手术方式

1.3.1 穿刺髓核 透视下首先用克氏针定位 L5/L6 椎间隙平面并在体表标记。将腹内脏器向对侧推移,使用 18 G 穿刺针破皮,采用与 L5/L6 椎间隙平面一致、与上下横突所在平面呈 30°角方向缓慢进针。穿刺针穿行于肌肉时手感阻力较小,可继续进针,遇阻力后针头上下移动、探查,如针尖触到上下为坚硬组织、中间为稍软组织时,加照正侧位腰椎 X 射线影像,如针头位于椎间隙平面,表明针头已触及 L5/L6 椎间盘纤维环组织,维持穿刺角度继续进针,针尖至椎间隙中心,维持 60 s,拔出针头(图 1)。

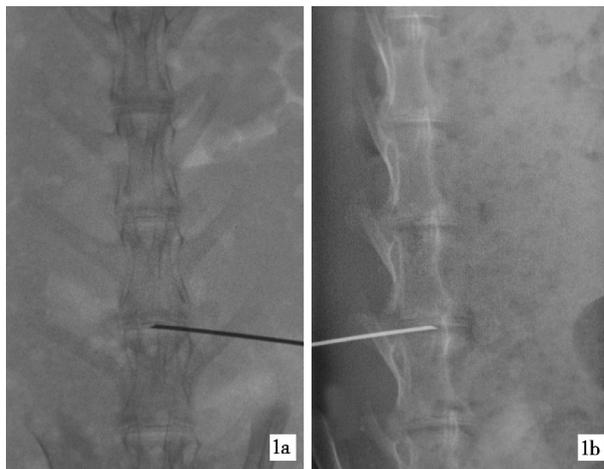


图 1 正位(1a)、斜位(1b)示穿刺针尖位于 L5/L6 椎间盘中心

1.3.2 穿刺软骨终板 首先用克氏针定位于 L4 椎体上缘软骨终板处并在体表标记。将腹内脏器向对侧推移,用骨穿针破皮,采用与 L4 椎体上缘一致方向缓慢进针。穿刺针穿行于肌肉时手感阻力较小,可继续进针,遇阻力后透视下观察,如针头位于椎体上缘软骨终板水平,左手固定椎体继续进针,至骨穿针针头位于中间,维持 60 s,拔出针头(图 2)。

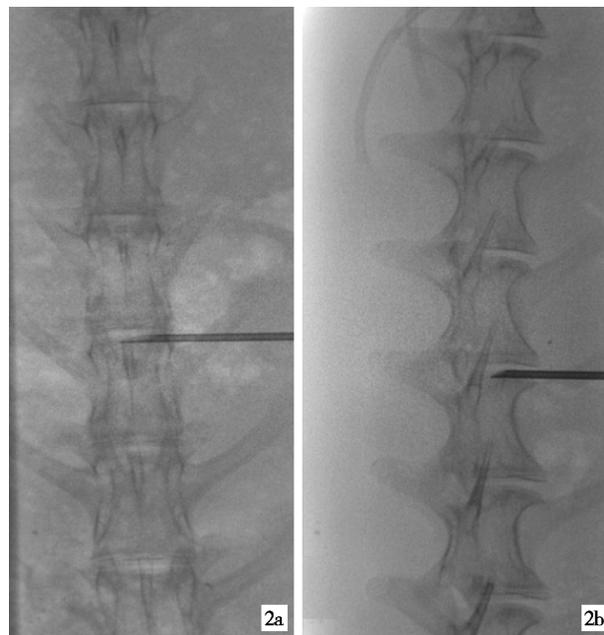


图 2 正位(2a)、侧位(2b)示穿刺针尖位于 L4 椎体上缘软骨终板中心

L4/L5、L6/L7 椎间盘及上下软骨终板不处理,作为对照组。

穿刺部位消毒包扎,肌注青霉素 40 万 u,待动

物苏醒后放入兔笼。

1.4 影像学检查

在穿刺前、穿刺后 30 min、穿刺后 4 周和 8 周行 MRI 检查,监测 IVDD 进展情况。对兔腰椎行矢状位 T₂WI 扫描,参数如下 TR = 3 000 ms,TE = 120 ms,FOV = 100 mm × 100 mm,层厚 2.5 mm,层数 5,矩阵 256 × 256。T₂ Mapping 成像参数如下:TR = 1 263 ms,TE = n × 20 ms,FOV = 100 mm × 100 mm,层厚 5 mm,层数 3,矩阵 256 × 256。在穿刺前、穿刺后 4 周及穿刺后 8 周行 64 排螺旋 CT 检查,观察椎间隙及骨质改变。

1.5 病理学检查

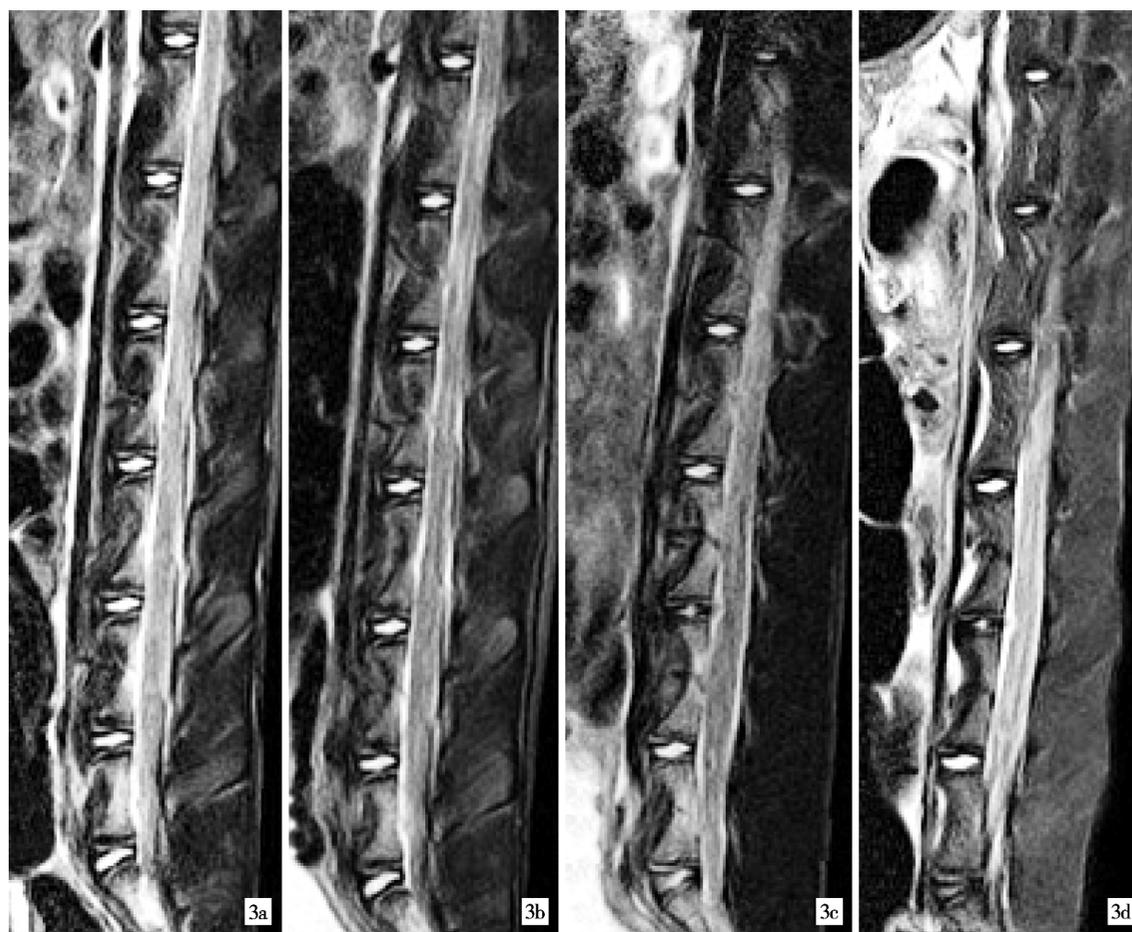
完整游离兔的脊柱,对诸椎体椎间盘进行分

割,石蜡切片苏木精-伊红(HE)染色,封片后镜下观察。

2 结果

2.1 影像学结果

MR 显示造模后 30 min 各椎间盘信号未见明确异常;4 周时穿刺髓核组椎间盘 T₂WI 高信号髓核区面积减少,8 周时髓核变化与 4 周时类似,未见退变进展;T₂ Mapping 显示高值范围明显缩小;8 周时髓核变化与 4 周类似,未见明确退变进展;余各椎间盘(包括正常对照组和穿刺软骨终板组)髓核信号及 T₂ 值改变不明显(图 3、4)。CT 结果显示各组在不同时期椎间盘高度无减少、椎体骨质未见增生。



3a 术前

3b 术后 30 min,各组椎间盘信号未见改变

3c 术后 4 周,L5/6 椎间盘高信号区面积缩小

3d 术后 8 周,L5/6 改变大致同第 4 周,其他椎间盘未见明确异常

图 3 造模前、后各期 T₂WI 图像

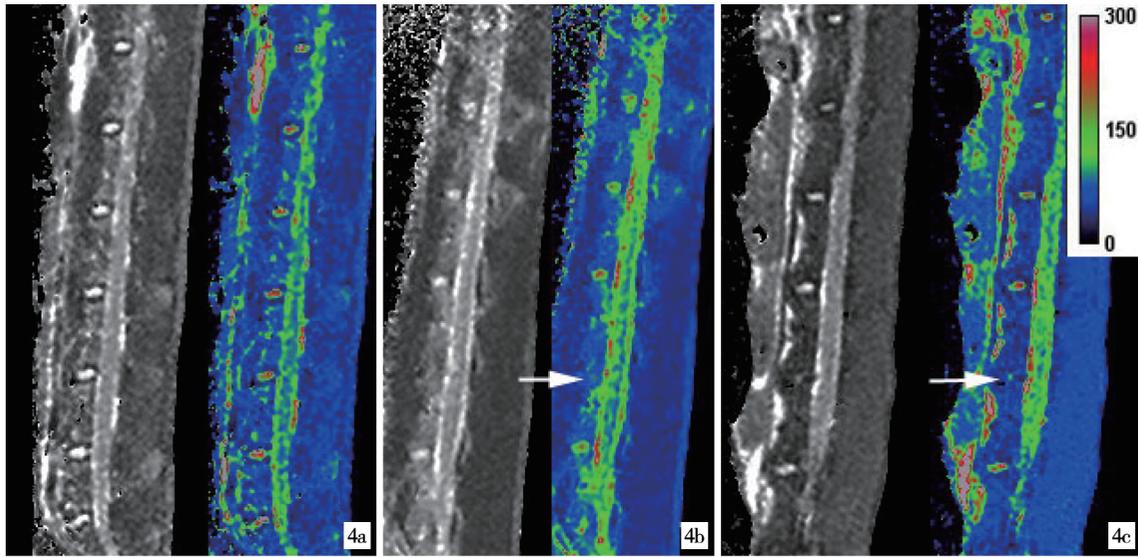
2.2 病理结果

正常髓核组织间见较多的脊索细胞呈岛状均匀分布,形态正常,周围有丰富的嗜碱性粘液样软骨基质,呈透明胶质样,胶原纤维排列整齐致密;穿刺软骨终板组脊索细胞减少,可见较多陷窝细胞;

穿刺髓核组组织变性明显,出现较多成纤维样细胞,胶原排列紊乱(图 5)。

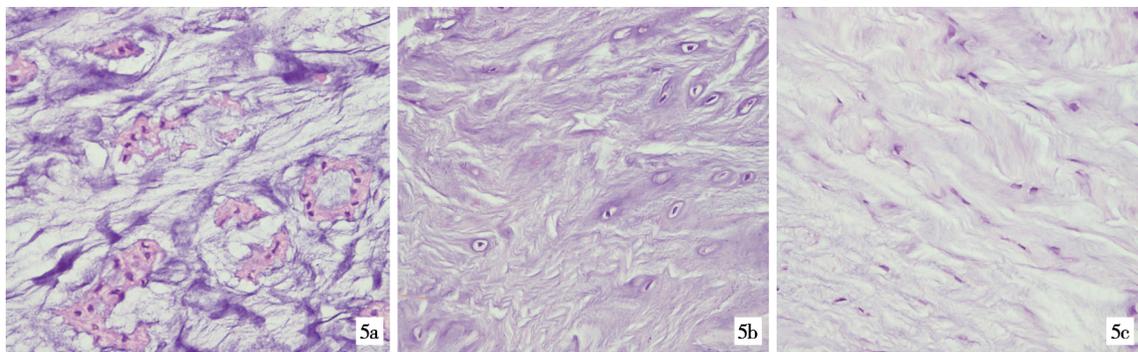
3 讨论

目前 IVDD 动物模型包括自发性模型和诱发性



4a 术前 4b 术后 4 周, L5/6 髓核值降低, 高 4c 术后 8 周, 改变大致同第 4 周
值范围明显缩小

图 4 腰椎间盘突出变的 T₂ Mapping 成像(原始图 + 伪彩图)



5a 正常对照组脊索细胞呈岛状均匀分布 5b 穿刺软骨终板组脊索细胞减少, 可 5c 穿刺髓核组髓核内细胞数目明显减少, 细胞多为成纤维样细胞(HE, × 200)
(HE, × 200) 见陷窝细胞(HE, × 200) 少, 细胞多为成纤维样细胞(HE, × 200)

图 5 腰椎间盘突出程度受穿刺方式影响

模型。自发性模型是无损伤、最近似生理退变的模型, 但受动物种类的限制不适于大范围普遍研究。诱发性模型是对实验动物进行预处理或后处理, 包括基因敲除、改变椎间盘力学负荷及损伤椎间盘自身结构等。纤维环损伤模型由于简单、方便的优点广泛用于 IVDD 的研究, 常采用刀片划割及针刺方法直接损伤纤维环, 刀片划割对纤维环破坏较大, 可引起椎间盘急剧退变, 不似 IVDD 缓慢的病理过程, 而且损伤程度不易控制。针刺模型引起椎间盘缓慢退变, 比较真实的模拟人类 IVDD 的过程, 穿刺的深度和时间均可控, 实验可重复性较好, 因此是较理想的建模方式。目前, 我们所知针刺模型都是采用经纤维环穿刺髓核的方式。本实验除了采用此方法外, 还设计了穿刺方式即针刺软骨终板方式, 其理论基础是椎间盘髓核和内层纤维环是乏血供的胶原和软骨组织, 正常情况下髓核内的营养主要通过经过终板的弥散作用供应, 随着年龄的增长终

板硬化, 经过终板的弥散作用减弱, 髓核营养不良最终触发 IVDD 的级联反应, 因此可认为终板硬化要早于髓核退变, 人为破坏软骨终板可能会造成髓核营养障碍从而诱发 IVDD, 较直接穿刺髓核更接近生理退变, 本研究在这方面进行了尝试。

实验报道中约 50% 采用兔作为实验动物, 30% 采用大鼠, 偶见采用猪、牛、羊及人的椎间盘报道。兔相对于大鼠椎间盘体积大, 手术及穿刺相对容易, 穿刺深度及损伤程度更易控制, 术后影像学监测图像质量佳、测量误差小, 兔对手术的耐受力强, 感染及死亡发生率更小。本研究采用兔作为实验动物主要考虑是获得方便、费用较低、扫描实验设备齐全、麻醉等手术处理简单, 饲养方便, 所有实验动物均存活, 耐受力较好。

不同穿刺前导引方式可对建模成功率及实验结果产生影响。导引手术主要分为经腹膜外路径手术、X 线导引及 CT 导引三种方式。75% 的研究者采

用椎体侧方切开皮肤及软组织,在腹膜外切断椎体周围肌肉和韧带后暴露椎间盘纤维环,肉眼直视下进行穿刺的方式。Zhou 等^[2]和 Hsieh 等^[3]采用 CT 或 X 线等影像设备引导下穿刺亦取得较好效果,王鹏等^[4]通过术后解剖证实了 X 线引导下穿刺的安全性和准确性。相对于腹膜外路径手术,X 线引导下穿刺手术创伤小,方法简单,影像科医生可单独完成,术后恢复快,感染率和死亡率低,并且可以较好控制穿刺深度便于建模标准化。另外,腹膜外路径手术损伤的椎体周围肌肉和韧带可加重椎间盘退变,X 线导引则可减少这种叠加效应;CT 导引精确性更高,对穿刺深度控制较好,但穿刺效率较低,尤其破坏软骨终板的穿刺由于骨质较硬,针尖可在椎体表面滑动,对操作者力度和方向的控制要求较高。

穿刺针的外径、针刺深度、频率及持续时间均可能与退变程度相关。外径越大、穿刺越频繁诱发退变的可能性越大^[5-7],因此,在实验中选择适合的穿刺针是顺利完成实验和正确解析实验结果的前提,本实验旨在比较两种方法建模的效果,因此采用易诱发退变的 18 G 针,直径超过椎间隙高度的 50%。针刺深度对退变程度也有一定影响^[8],本研究穿刺深度控制在髓核中间,采用单次穿刺。由于常规的穿刺针不能穿透骨质,因此对软骨终板及终板下骨的穿刺则采用更粗的骨穿针。

活体内 IVDD 的检测主要依赖影像学检查,而离体椎间盘则可检测生物力学、组织学、生物化学、分子生物学等多种指标。

影像学检查常用的包括 X 线平片及 MRI。X 线平片常用椎间盘高度指数作为诊断 IVDD 的比较可靠指标^[9-10],此外,X 线也可显示骨赘形成及终板硬化等退变晚期征象,可作为退变程度分级指标。MRI 是 IVDD 的首选检查,其信号的变化可以反映髓核内细胞和基质的改变^[10-12]。本研究采用 MRI 及 CT 等影像学方法对椎间盘的退变进行检测,以造模前及正常椎间盘作为对照,造模后 30 min 检查,未发现椎间盘及骨质信号异常;造模后 4 周可见穿刺髓核组 T₂WI 高信号的髓核面积缩小、信号降低,8 周后复查髓核改变大致同前,高信号区未见进一步缩小。研究时段内穿刺软骨终板组椎间盘信号未见明确异常;CT 示 DHI 及椎体骨质均未见异常。

穿刺髓核组明显诱发了椎间盘的退变,这同以前的研究结果一致,认为与纤维环撕裂后髓核炎性反应、力学性能改变等因素有关,比较 4 周与 8 周髓核 MRI 图像,并未发现退变明显进展,可能代表

穿刺后诱发的 IVDD 更应视为急性病变过程,急性损伤后退变速度延缓,更多实验证明给予足够长时间(例如 12 周)退变程度会进一步加重。

本研究中穿刺软骨终板组影像学未能见到明确 IVDD,病理学则见早期退变,可能与以下原因相关:① 营养物质通过上下终板进行弥散,实验仅破坏了一侧终板;终板结构覆盖于椎体上下面呈方形,穿刺针仅破坏穿刺通道上的软骨;这些导致软骨终板破坏范围不够,不足以使髓核营养供应剧烈减少。② 观察时间不足。③ 不能排除这种轻度改变是受邻近节段椎间盘退变的影响。因此需严格设计破坏范围更大的实验方式或延长观察时间。另一方面,此研究也提示相对于穿刺髓核的方式,穿刺软骨终板的方式诱发 IVDD 的进展更为缓慢,可能更类似与人类椎间盘退变。

对兔退变椎间盘进行 MR 定量测量并研究其变化规律是建模的目的,我们对椎间盘进行 T₂ Mapping 成像,可以发现退变椎间盘髓核的 T₂ 值明显降低,造模后 4 周较 8 周退变髓核显示不清。CT 检查在各组均未发现异常,提示其对椎间盘退变敏感性较差。

综上所述,X 线引导下针刺微创建 IVDD 模型具有简便经济、损伤少、恢复快、感染率及死亡率低的优点,针刺髓核手术可成功建模,可以作为深入研究 IVDD 原理及验证多种诊断、治疗方法效果的良好载体;破坏软骨终板及终板下骨的穿刺方法可能较穿刺髓核方法更接近 IVDD 的生理过程,但却未能成功建模,可能与破坏程度不够及观察时间较短有关,也提示同样条件下软骨终板的破坏较髓核的破坏对椎间盘的影响更小,可能对指导临床介入治疗有所帮助。T₂ Mapping 成像方法可以应用到兔的 IVDD 模型,较好反映 IVDD 的进程,为后续深入研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] 宋红梅,吴春根,程永德.椎间盘源性疼痛的机制及其治疗进展[J].介入放射学杂志,2012,21:790-794.
- [2] Zhou H, Hou S, Shang W, et al. A new in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration characterized by MRI, radiography, CT/discogram, biochemistry, and histology [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32: 864-872.
- [3] Hsieh AH, Hwang D, Ryan DA, et al. Degenerative anular changes induced by puncture are associated with insufficiency of disc biomechanical function [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009,

34: 998 - 1005.

[4] 王 鹏, 徐海孺, 骆国钢, 等. 经皮穿刺纤维环法诱导兔腰椎间盘退变模型 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19: 668 - 670.

[5] Elliott DM, Yerramalli CS, Beckstein JC, et al. The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33: 588 - 596.

[6] Korecki CL, Costi JJ, Iatridis JC. Needle puncture injury affects intervertebral disc mechanics and biology in an organ culture model[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33: 235 - 241.

[7] Keorochana G, Johnson JS, Taghavi CE, et al. The effect of needle size inducing degeneration in the rat caudal disc: evaluation using radiograph, magnetic resonance imaging, histology, and immunohistochemistry [J]. Spine J, 2010, 10: 1014 - 1023.

[8] Michalek AJ, Funabashi KL, Iatridis JC. Needle puncture injury of the rat intervertebral disc affects torsional and compressive biomechanics differently [J]. Eur Spine J, 2010, 19: 2110 - 2116.

[9] Kim KS, Yoon ST, Li J, et al. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30: 33 - 37.

[10] Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30: 5 - 14.

[11] Sobajima S, Kompel JF, Kim JS, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30: 15 - 24.

[12] Kong MH, Do DH, Miyazaki M, et al. Rabbit model for in vivo study of intervertebral disc degeneration and regeneration [J]. J Korean Neurosurg Soc, 2008, 44: 327 - 333.

(收稿日期:2013-05-26)
(本文编辑:侯虹鲁)

· 消 息 ·

中国抗癌协会肿瘤介入专业委员会护理分会成立

第三届亚太肿瘤介入大会和第十四届中国肿瘤介入大会于 11 月 15 日至 11 月 18 日广州隆重召开。值此会议期间,中国抗癌协会肿瘤介入专业委员会护理分会正式成立。

中国抗癌协会肿瘤介入专业委员会护理学组于 2004 年在广州成立,经过九年的发展,先后成功举办了八届肿瘤介入护理学术会议,为全国护理同仁搭建了交流平台,为推进介入护理专业发展做了大量工作。2013 年护理学组通过了中国抗癌协会肿瘤介入专业委员会的审批,正式成立护理分会。护理分会成立大会由北京大学临床肿瘤医院护理部陆宇晗主任主持,来自全国各大医院 50 余从事肿瘤介入护理工作的同仁参加了成立仪式。中国抗癌协会肿瘤介入专业委员会主任委员杨仁杰教授到会致辞并为核心成员颁发了聘书。陆宇晗主任作为护理分会第一任主任委员,感谢各级学会对护理工作的重视和支持,同时表示将更好地依托这个学术平台,积极引领和推进肿瘤介入护理学科走向规范化、标准化和专业化。会上大家一起讨论制订了护理分会的职责和工作计划。

中国抗癌协会肿瘤介入专业委员会护理分会成立大会在各位委员的热烈讨论中顺利结束,大家纷纷表示将加强沟通,为推动肿瘤介入护理贡献自己的一份力量。

闻利红 许秀芳

中国抗癌协会肿瘤介入专业委员会护理分会