

·实验研究 Experimental research·

骨水泥椎间盘渗漏动物模型的建立

赵 辉, 倪才方, 黄 健, 赵苏鸣, 陈 琰, 唐天驷, 杨惠林, 倪海燕

【摘要】 目的 建立一种可模拟人椎体成形术中骨水泥椎间盘渗漏的动物模型。**方法** 采用成年健康杂种犬 8 只, 每只犬取 L2/3 ~ L5/6 共 4 个椎间盘为实验对象, 4 个椎间盘随机分入 A、B、C、D 组, 每组 8 个。A 组和 B 组用 18 G 穿刺针穿刺椎间盘纤维环, A 组不注入任何物质, B 组注入 0.3 ml 聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA); C 组和 D 组用 16 G 穿刺针穿刺椎间盘纤维环, C 组不注入任何物质, D 组注入 0.3 ml PMMA。分别于造模后 6、12、24 周行 MR 检查, 计算 MR 指数并对其进行统计分析。**结果** MR 检查发现, A 组髓核、纤维环结构完好, 纤维环呈均匀低信号, T₂ 加权像髓核呈均一高信号。C 组 T₂ 加权像髓核信号不同程度降低且不均一, 髓核中心可见不规则的斑点状低信号, 其相对高信号区面积减小。B、D 组椎间隙相应上下椎体面变毛糙。T₂ 加权像髓核信号不同程度降低且不均一, 髓核中心可见不规则的斑点状更低信号, 髓核形态不规则, 其相对高信号区面积不同程度减小。造模后 6 周, B 组与 D 组的 MR 指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 12 和 24 周时组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。造模后 6、12、24 周, B、C、D 组 MR 指数比较, 组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 18 G 穿刺针单次穿刺犬椎间盘纤维环不会导致其退变, 用 18 G 穿刺针经皮穿刺犬椎间盘纤维环注射骨水泥可建立骨水泥椎间盘渗漏模型, 具有创伤小、模型制作成功率高等优点。此动物模型适合于研究骨水泥椎间盘渗漏对椎间盘生理、生化及病理等影响的机制。

【关键词】 椎间盘; 聚甲基丙烯酸甲酯; 渗漏; 磁共振成像; 动物模型

中图分类号: R681.53 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2013)-10-0838-05

Establishment of animal model of intradiscal bone cement leakage in vertebroplasty ZHAO Hui, NI Cai-fang, HUANG Jian, ZHAO Su-ming, CHEN Long, TANG Tian-si, YANG Hui-lin, NI Hai-yan.
Department of Interventional Radiology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu Province 226001, China

Corresponding author: NI Hai-yan, E-mail: 1514160991@qq.com

【Abstract】 Objective To establish an animal model of intradiscal bone cement leakage which can mimic the intradiscal bone cement leakage in clinical vertebroplasty in patients. **Methods** Eight healthy adult dogs were used for this study. Four lumbar intervertebral discs (from L1/2 to L5/S1) were taken for experiment. The four discs of each dog were randomly divided into group A, B, C and D. In Group A, the fibrous rings of discs were only stabbed by an 18-gauge needle and were injected with nothing. In Groups B, the fibrous rings of discs were stabbed by an 18-gauge needle and were injected with 0.3 ml polymethylmethacrylate (PMMA). In Group C, the discs were only stabbed by a 16-gauge needle and were injected with nothing. In Group D, the discs were stabbed by a 16-gauge needle and were injected with 0.3 ml PMMA. MRI scanning of all discs was performed at 6, 12 and 24 weeks after the injection. MRI indices (MRII) of all discs were calculated. The results were statistically analyzed by using ANOVA and Scheffe test. **Results** Intervertebral disc degeneration was not found in group A on MR images. In group C, the stabbed discs exhibited a progressive decrease in MRII, which started at 6 weeks after puncture and were kept going

till 24 weeks. A progressive decrease in MRII of the stabbed discs were seen in both group B and group D, which started at 6 weeks after puncture and were kept going till 24 weeks. Scheffe test indicated that no statistically significant

基金项目: 南通市科技局 HS2012056

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2013.10.014

作者单位: 226001 江苏南通大学附属医院介入放射科 (赵辉、黄 健、赵苏鸣); 苏州大学附属第一医院介入放射科 (倪才方、陈 琰), 骨科 (唐天驷、杨惠林、倪海燕)

通信作者: 倪海燕 E-mail: 1514160991@qq.com

difference in the degree of MRII existed between group B and group D at six weeks ($P > 0.05$), although at 12 and 24 weeks the difference was significant ($P < 0.05$). At 6, 12 and 24 weeks after the procedure, the differences in MRII between each other among group B, C and D were statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion Single puncture of the dog's fibrous ring of disc with an 18-gauge needle will not cause its degeneration. Percutaneous injection of PMMA into disc with an 18-gauge needle can successfully establish intradiscal bone cement leakage model in dogs. This technique is mini-invasive with high success rate. This model is very suitable for the study concerned with the effect of intradiscal bone cement leakage on the physiology, biochemistry, and pathology of intervertebral disc. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 838-842)

【Key words】 intervertebral disc; polymethylmethacrylate; leakage; magnetic resonance imaging; animal model

骨水泥椎间盘渗漏是椎体成形术中的常见并发症。本实验建立一种可模拟人椎体成形术中骨水泥椎间盘渗漏动物模型,以研究骨水泥椎间盘渗漏对椎间盘的影响及其机制、病理生理变化等,为今后椎体成形术中骨水泥的优化选择提供相应的理论基础,为避免或降低骨水泥对椎间盘的影响,以及骨水泥椎间盘渗漏后的治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

取 24 ~ 26 月龄成年健康杂种犬 8 只,雌雄不拘,体重 15 ~ 17 kg,由苏州大学实验动物中心提供并饲养。每只犬取 L2/3 ~ L5/6 共 4 个椎间盘为实验对象,4 个椎间盘随机分配至 A、B、C、D 组,每组 8 个。A 组和 B 组用 18 G 穿刺针穿刺椎间盘纤维环,前者不注入任何物质,后者注入聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA, 化工部晨光化工研究所医用高分子制药厂) 0.3 ml; C 组和 D 组用 16 G 穿刺针穿刺椎间盘纤维环,前者不注入任何物质,后者注入 PMMA 0.3 ml。模型制作后分别于 6、12、24 周行 MR 检查。

1.2 模型制作方法

犬经 3% 戊巴比妥钠静脉麻醉后 (1 ml/kg), 右侧背部备皮,左侧卧位于 DSA 机床上。常规消毒、铺巾。所有犬模型制作前摄腰椎正侧位片,确认椎体及椎间隙无异常,即排除椎体及椎间盘病变者入组。透视下分别用 16、18 G 穿刺针从右侧方入路分别穿刺 L2/3、L3/4、L4/5、L5/6 椎间盘纤维环,经正侧位透视确定针尖位于椎间盘中心,所有穿刺操作均一次性成功完成,避免穿刺针对纤维环行 2 次穿刺而引起过多损伤。B、D 两组针尖到位后调制 PMMA, PMMA 粉液比为 2 : 1, 粉剂中硫酸钡含量为 20%。骨水泥体外调制后,用 Murphy Quick 1 ml 注射器抽取,排清空气,待到拉丝期,分别注入对应

椎间盘(图 1)。注入后待骨水泥凝固前拔针,穿刺针拔出时机过早,骨水泥会经纤维环穿刺针道向外渗漏;穿刺针拔出时机过晚,针尖与注入椎间盘内的骨水泥粘连,椎间盘内骨水泥会随穿刺针拔出产生位移,加重损伤髓核组织。



图 1 骨水泥位于椎间盘中心

1.3 MR 检查和分析方法

模型制作后分别于 6、12、24 周行 MR 检查,犬麻醉后仰卧位固定于固定架内。采用表面线圈,矢状面扫描参数如下:FSE T₁WI (TR 324 ms, TE 12 ms, 2 次采集), FSE T₂WI (TR 4 188 ms, TE 112 ms, 2 次采集), FOV 350 mm, 矩阵 512 × 512, 层厚 4 mm, 层距 3 mm; 横断面扫描参数如下:PSAT T₂WI (TR 4 188 ms, TE 112 ms, 2 次采集), FOV 250 mm, 矩阵 512 × 512, 层厚 4 mm, 层距 3 mm。

参照 Sobajima 等^[1]方法计算 MR 指数,对椎间盘退变进行定量分析。在矢状位 T₂ 像找出最中间的层面,即显示髓核矢状位最大的纵切面,利用 PACS 系统,将图像放大,用鼠标描出髓核所在的相对高信号区,系统自动算出所描的髓核面积及平均信号值(图 2)。髓核面积与平均信号值的乘积即为 MR 指数(magnetic resonance imaging index, MRII)。

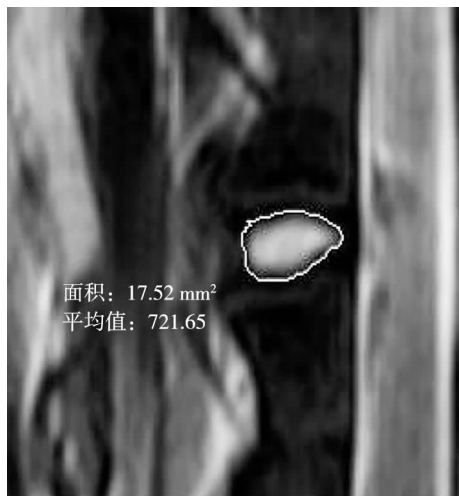


图2 在 PACS 系统上描出髓核所在区域,系统自动计算出此区域的面积及信号平均值

1.4 统计分析

采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析。对 6、12、24 周的 MR 指数行方差分析,然后用 Scheffe 法两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

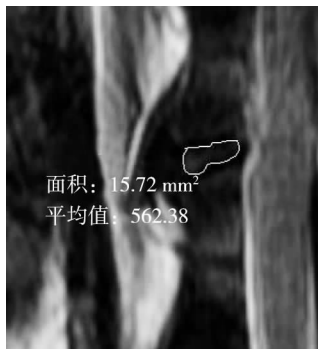


图3 C组12周T₂加权像

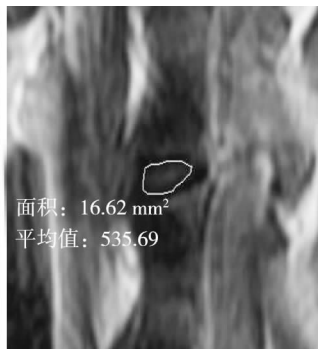


图4 C组24周T₂加权像

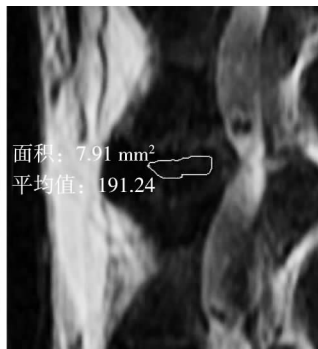


图5 D组24周T₂加权像

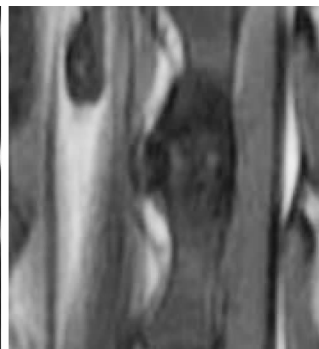


图6 D组24周T₁加权像矢状位

表1 4组椎间盘 MR 指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MR 指数 (mm ² × GY)		
	6 周	12 周	24 周
A 组	16 226.75 ± 1 958.13	15 104.6 ± 3 312.17	15 762.88 ± 2 079.45
B 组	7 323.00 ± 708.76	5 942.18 ± 839.27	1 985.58 ± 593.49
C 组	12 401.19 ± 1 481.40	11 144.38 ± 1 302.85	10 382.25 ± 1 124.58
D 组	7 181.38 ± 625.93	4 628.63 ± 455.60	1 777.12 ± 197.56
F 值	88.13	55.11	249.26

注:除 B 组与 D 组相比 $P > 0.05$ 外,其余两两相比 $P < 0.05$

分别在观察 6、12、24 周时对 A、B、C、D 组间 MR 指数行方差检验,6 周时的 F 值 = 88.13,12 周时 F = 55.11,24 周时 F = 249.26,组间差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。然后用 Scheffe 法两两比较,B 组与 D 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),其余两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。对 A

2 结果

模型制作过程中未发生骨水泥渗漏至椎间盘外,所有穿刺均一次成功,无重复穿刺,动物无死亡。模型制作后 6、12、24 周 MR 检查发现,A 组髓核、纤维环结构完好,T₂ 加权像髓核呈高信号,纤维环呈均匀低信号(图 2);C 组 T₂ 加权像髓核信号不同程度降低且不均一,髓核中心可见不规则的斑点状更低信号,其相对高信号区面积减小,A、C 组椎间隙无明显狭窄(图 3、4)。B、D 组椎间隙不同程度狭窄,椎间隙相应上下椎体面变毛糙;T₂ 加权像髓核信号不同程度降低且不均一,髓核中心可见不规则的斑点状更低信号,其相对高信号区面积减小,髓核形态不规则,24 周时更为明显;纤维环内见斑片状、线状高信号;纤维环与髓核境界不清;T₁ 加权像见椎间隙内不规则斑片状低信号,椎间盘形态不规则(图 5、6);部分椎间盘邻近椎体内可见骨髓水肿、脂肪变性及许莫结节形成。随着观察时间的延长,B、C、D 组的 MR 指数有降低趋势,提示椎间盘退变程度随着时间的延长在进展(表 1)。

组内 3 个观察时间的 MR 指数行方差检验,差异无统计学意义 ($F = 0.039, P > 0.05$),而 B、C、D 组两两比较差异均有统计学意义 (F 值分别为 118.15、4.838、274.77, $P < 0.05$),见图 7。

3 讨论

理想的骨水泥椎间盘渗漏动物模型应当具备以下特点:尽可能接近椎体成形术中骨水泥椎间盘渗漏的客观规律;模型重复性好;所选动物解剖和生理特点尽可能与人类近似。临床上椎体成形术中骨水泥椎间盘渗漏是骨水泥通过椎体终板(医源性或病理性)进入椎间盘,如果以此方式建立动物模型,我们需将穿刺针从实验动物头侧或尾侧斜行经

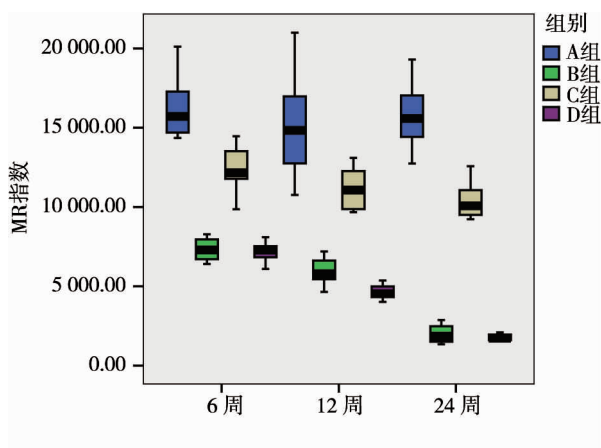


图7 不同观察时间各组 MR 指数比较箱式图

椎体骨皮质穿通椎体终板注射骨水泥,这样既能模拟人椎体成形术中骨水泥通过破裂的终板渗漏入椎间盘内,又不损伤纤维环。但我们通过预实验发现此方法有以下缺点:① 穿刺针无法穿透椎体骨皮质,需预先用同样粗细的克氏针建立穿刺通道。② 犬椎体较小,在 X 线透视定位下用克氏针由电钻经椎体钻透至椎体终板中心操作较为复杂,且定位不易准确。③ 如切开皮肤剥离肌肉,暴露椎体后用克氏针由电钻经椎体钻透椎体终板中心,此方法虽定位准确,但创伤大,出血多,剥离肌肉后可能会引起脊柱应力变化。④ 克氏针钻入时深浅控制不当会对髓核造成损伤。⑤ 此入路必定要损伤终板,而终板损伤可能会引起椎间盘退行性变。Cinotti 等^[2]研究猪腰椎间盘软骨终板损伤模型,经 MRI、组织学及生化检查发现,椎间盘软骨终板损伤后组织内细胞成分、蛋白多糖 (proteoglycan, PG)、水分均相应减少,认为终板损伤可导致猪椎间盘的退行性变,退变严重程度与损伤程度相关。

透视监控下经皮穿刺纤维环入路注射骨水泥,也可模拟骨水泥椎间盘内渗漏,同时也不损伤椎体终板。穿刺纤维环后由于纤维环的弹性作用可将穿刺通道封闭,穿刺针拔出后粘稠期状态的骨水泥不会经纤维环穿刺针道向外渗漏。在预实验中,我们用 18 G 穿刺针穿刺犬腰椎间盘,用 Murphy Quick 注射器最大限度注射 PMMA,直至无法注入或发生骨水泥漏出椎间盘外,注射骨水泥量为 0.5 ~ 0.6 ml。考虑上述因素我们将制作模型骨水泥注射量设为 0.3 ml。此模型只需在透视下完成,操作简单,不需切开皮肤分离肌肉,创伤极小。本研究使用此法穿刺,模型制作过程中未发生骨水泥渗漏至椎间盘外,所有模型均一次穿刺制作成功,无重复穿刺,动物无死亡。

在实验动物的选择上,灵长类动物 (如恒河猴) 的解剖和生理特点与人类近似,是建立椎间盘退变动物模型的理想选择。但由于价格昂贵并受到国家相关法律的保护,因此在应用上受到诸多限制^[3]。动物大小与椎间盘的生物力学特性密切相关,小动物椎间盘相对较小,重力负荷小,易损伤,损伤后易修复,对人类椎间盘退变的模拟度低。小动物椎间盘需要细穿刺针穿刺,直径过小的穿刺针内腔太小,骨水泥无法通过,相对较粗的穿刺针穿刺纤维环本身就会导致椎间盘退变。在椎间盘组织学结构、生物化学方面,犬与人相似,目前常用四足动物制作椎间盘退变模型,其椎体致密骨小梁从头侧至足侧走行,表明四足动物椎体承受力学轴线与脊柱轴线一致,与人类相近^[4]。本研究用犬作为实验对象模拟骨水泥椎间盘渗漏,在椎间盘承受力学方面与人有相似之处。

大小合适的穿刺针既要穿刺纤维环不会导致椎间盘退变,又要骨水泥能从其内腔中通过是成功建立此模型的关键。有研究证实,纤维环损伤可导致椎间盘退变,针刺椎间盘引起退变的程度和速度与穿刺针的直径、针刺次数密切相关^[5]。An 等^[6]认为 27 G 穿刺针损伤兔纤维环后不引起椎间盘退变,适合椎间盘注射生长因子、质粒、药物、细胞等物质,而 Kim 等^[7]用 21 G 针刺 3 针比 18 G 刺 1 针能够更快的引起兔椎间盘退变。Sobajima 等^[1]采用 16 G 穿刺针穿刺兔椎间盘,在 3 周时 MRI 显示椎间盘开始退变。根据文献综述,穿刺针直径越小,对纤维环影响越小,但过小直径的穿刺针骨水泥无法从其内腔中通过。在预实验中,我们选择 16、18、20 G 穿刺针穿刺实验犬椎间盘注射骨水泥,骨水泥无法通过 20 G 穿刺针内腔进入椎间盘。本组研究结果提示,16 G 穿刺针穿刺犬纤维环后会导致椎间盘退变,而 18 G 穿刺针穿刺犬纤维环未发现椎间盘退变。用 18 G 穿刺针制作骨水泥椎间盘渗漏模型,在分析骨水泥渗漏对椎间盘影响因素时可排除穿刺针对纤维环损伤的因素。

MRI 能精确呈现退变引起的椎间盘形态变化,是诊断椎间盘退变的重要影像学依据^[8]。在 MRI 的 T₂ 加权像中,髓核的信号强度由组织的 T₂ 值所决定,含水多的组织具有长 T₂ 值,呈现高信号;T₂ 加权像信号降低,则反映椎间盘开始丢失水分^[8]。正常髓核信号均匀,与纤维环分界清楚,在 T₂ 像上表现为高信号。在椎间盘退变早期, T₂ 加权像上即可出现中央水平状低信号区,反映椎间盘开始丢失水分。

这一征象较反映形态结构异常的征象出现早,现早期椎间盘退变具有重要意义^[9-10]。随着退变进展,T₂加权像上髓核信号普遍降低。严重者髓核皱缩,椎间盘内积气,出现所谓“真空现象”。同时硬膜囊前缘受压、椎间盘后移及椎间隙狭窄,这些表现反映了纤维环强度降低、髓核后突、含水量减少,从而出现椎间盘高度下降,说明椎间盘退变病理改变进一步发生、发展^[11-13]。在本实验中,MRI 检查 A 组(18 G 穿刺针穿刺组)未见椎间盘退变征象。B 组(16 G 穿刺针穿刺组)于 6 周发现有轻度退变,随着时间的延长,退变程度有所加重。随着时间延长骨水泥组椎间盘 MR 指数总体上呈现逐渐降低趋势。椎间盘的水含量与 T₂ 弛豫时间呈直线相关关系,在 T₂WI 上呈现低信号椎间盘的蛋白多糖含量和硫酸软骨素/硫酸角质素之比较呈高信号的椎间盘髓核显著下降^[14-15]。因此,注射骨水泥后,MRI 不仅从二维角度反映椎间盘在退变过程中的形态变化,而且还反映了退变过程中水、蛋白多糖等含量的降低,这符合椎间盘退变的客观规律^[10]。随着时间的延长,椎间盘退变程度加重。结果证实穿刺纤维环注射骨水泥可以引起犬椎间盘退变,这种退变是一个缓慢渐进的过程,从而进一步验证了模拟人椎体成形术中骨水泥椎间盘渗漏模型的成功。

综上所述,犬作为实验对象模拟骨水泥椎间盘渗漏,在椎间盘承受力学方面与人有相似之处。18 G 穿刺针单次穿刺犬纤维环不会导致其退变。用 18 G 穿刺针经皮穿刺椎间盘纤维环注射骨水泥可建立骨水泥椎间盘渗漏模型,在分析骨水泥渗漏对椎间盘影响因素时可排除穿刺针对纤维环损伤的因素。经穿刺针注射骨水泥,注射量精确。此模型只需在透视下完成,不需切开皮肤分离肌肉,创伤极小,操作简单,模型制作成功率高。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] Cinotti G, Della Rocca C, Romeo S, et al. Degenerative changes of porcine intervertebral disc induced by vertebral endplate injuries[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30: 174 - 180.
- [3] 西永明, 胡有谷. 椎间盘退变模型的建立及其历史和现状[J]. 中华骨科杂志, 2000, 20: 378 - 379.
- [4] Fyhrie DP, Hoshaw SJ, Hamid MS, et al. Shear stress distribution in the trabeculae of human vertebral bone [J]. Ann Biomed Eng, 2000, 28: 1194 - 1199.
- [5] Kääpä E, Grönblad M, Holm S, et al. Neural elements in the normal and experimentally injured porcine intervertebral disk[J]. Eur Spine J, 1994, 3: 137 - 142.
- [6] An HS, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30: 25 - 31; discussion31.
- [7] 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.
- [8] Milette PC. Classification, diagnostic imaging, and imaging characterization of a lumbar herniated disc[J]. Radiol Clin North Am, 2000, 38: 1267 - 1292.
- [9] Hiwatashi A, Ohgiya Y, Kakimoto N, et al. Cement leakage during vertebroplasty can be predicted on preoperative MRI[J]. Am J Roentgenol, 2007, 188: 1089 - 1093.
- [10] Eduardo BP, Hélio Y, Valdeci MO, et al. Classification of intervertebral disc degeneration by magnetic resonance [J]. Acta Ortop Bras, 2009, 17: 46 - 49.
- [11] Thalgett JS, Albert TJ, Vaccaro AR, et al. A new classification system for degenerative disc disease of the lumbar spine based on magnetic resonance imaging, provocative discography, plain radiographs and anatomic considerations [J]. Spine J, 2004, 4: 167S - 172S.
- [12] Marks M, Newton PO, Petcharaporn M, et al. Postoperative segmental motion of the unfused spine distal to the fusion in 100 patients with adolescent idiopathic scoliosis [J]. Eur Spine J, 2012, 37: 826 - 832.
- [13] Moon CH, Kim JH, Jacobs L, et al. Part 1: dual-tuned proton/Sodium magnetic resonance imaging of the lumbar spine in a rabbit model [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2012, 37: E1106 - E1112.
- [14] Sobajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, et al. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction[J]. Spine J, 2005, 5: 14 - 23.
- [15] 赵 辉, 倪才方, 黄 健, 等. 椎体成形术中骨水泥渗漏对椎间盘生化改变的影响 [J]. 介入放射学杂志, 2011, 20: 641 - 643.

(收稿日期:2013-03-13)

(本文编辑:侯虹鲁)