

基于影像学和组织学方法研究糖尿病大鼠腰椎间盘退变

韩玺铭, 王超, 朱兵兵, 刘凤霞

【摘要】 目的:探讨糖尿病大鼠模型腰椎间盘的变化及腰椎间盘退变的发生机制。方法:将50只雄性SD大鼠随机分为两组,其中30只作为模型组腹腔注射50 mg/kg链脲佐菌素建立糖尿病大鼠模型,另外20只作为正常对照组。在造模前及造模后第4、8、12周利用X线测量腰椎间隙高度,利用MRI的T₂WI序列分析椎间盘信号强度;同期取大鼠腰椎间盘进行组织学评分,并分析影像学和组织学的关系。进一步检测血清中血脂、IL-6的变化。结果:链脲佐菌素腹腔注射成功建立糖尿病大鼠模型,成功率为60.0%。X线检测结果:造模后第8、12周糖尿病组大鼠腰椎间隙均减小,与对照组相比差异有统计学意义($P=0.002, P=0.001$)。MRI检测结果:造模后第8、12周糖尿病组大鼠腰椎间盘退变等级均明显增加,与对照组相比差异有统计学意义($P=0.012, 0.011$)。造模后第8、12周糖尿病组大鼠组织评分显著增高,与对照组相比差异有统计学意义($P=0.000, 0.000$)。组织学评分与腰椎间隙高度呈负相关($r=-0.818, P=0.001$),与腰椎间盘退变等级呈正相关($r=0.858, P=0.000$)。糖尿病组大鼠血脂浓度增高,但与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。造模后第8、12周糖尿病组大鼠血清中IL-6含量增高,与对照组相比差异有统计学意义($P=0.044, 0.013$)。结论:糖尿病大鼠模型发生腰椎间盘退变,且随着病程延长,退变等级增高,IL-6诱发的炎症反应可能是该变化的重要机制之一。

【关键词】 糖尿病;腰椎间盘退变;放射摄影术;磁共振成像;组织学

【中图分类号】 R681.5;R445.2;R814.41 **【文献标识码】** A

【文章编号】 1000-0313(2023)05-0534-06

DOI:10.13609/j.cnki.1000-0313.2023.05.001

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on lumbar intervertebral disc degeneration in rats with diabetes mellitus based on imaging and histological methods HAN Xi-ming, WANG Chao, ZHU Bing-bing, et al. Department of Human Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

【Abstract】 Objective: The purpose of this study was to investigate the changes and mechanisms of the lumbar intervertebral disc in a diabetic rat model. **Methods:** 50 male SD rats were randomly divided into two groups. Thirty were used as model groups to establish diabetic rat models by intraperitoneal injection of streptozotocin at 50mg/kg. The height of the lumbar intervertebral disc space was measured by X-ray before and at 4, 8 and 12 weeks after modelling. The signal intensity of the intervertebral disc was analyzed with T₂WI MRI. At the same time, the lumbar intervertebral discs were histologically scored. The relationship between imaging and histology was analyzed, and the changes in serum lipids and IL-6 were further detected. **Results:** Streptozotocin intraperitoneal injection successfully established the diabetic rat model; the success rate was 60.0%. X-ray exam results: lumbar vertebra space decreased in the diabetic group 8 and 12 weeks after modelling ($P=0.002, P=0.001$). MRI results: the grade of lumbar disc degeneration was significantly increased in the diabetic group at 8 and 12 weeks after modelling ($P=0.012, P=0.011$). The tissue score of the diabetic group was significantly increased at 8 and 12 weeks after modelling ($P=0.000, P=0.000$). The histological score was negatively correlated with lumbar space height ($r=-0.818, P=0.001$) and positively associated with

作者单位:830011 乌鲁木齐,新疆医科大学基础医学院人体解剖学教研室(韩玺铭、王超、朱兵兵、刘凤霞);315000 浙江,宁波市妇女儿童医院超声科(韩玺铭)

作者简介:韩玺铭(1993-),男,黑龙江哈尔滨市人,硕士研究生,住院医师,主要从事肌骨系统影像诊断工作。

通讯作者:刘凤霞, E-mail: liufengxia555@126.com

基金项目:大学生创新训练计划项目(S202110760014)

lumbar disc degeneration ($r=0.858, P=0.000$). Serum lipid concentration increased in the diabetic group, but there was no statistical significance ($P>0.05$). Serum IL-6 content in the diabetic group increased 8 and 12 weeks after modelling ($P=0.044, P=0.013$). **Conclusion:** Lumbar intervertebral disc degeneration occurs in a diabetic rat model, and the grade of degeneration increases with the prolongation of the course of the disease, and IL-6-induced inflammatory response may be one of the crucial mechanisms of this change.

【Key words】 Diabetes mellitus; Lumbar disc degeneration; Radiography; Magnetic resonance imaging; Histology

全球约 2/3 的成年人出现过不同程度的腰腿痛^[1-2], 腰椎间盘退变 (lumbar degenerative disease, LDD) 是发生腰椎间盘突出病理基础^[3], 腰椎间盘营养供应障碍是发生 LDD 的原因之一^[4]。腰椎间盘作为一种无血管组织, 其营养输送主要依靠终板和椎间盘外毛细血管的渗透^[5]。糖尿病是常见的以血糖升高为特点的慢性代谢性疾病, 会严重破坏椎间盘周围的毛细血管网, 造成椎间盘营养缺乏, 增加 LDD 的患病率。此外, LDD 的发生常伴有邻近组织的充血、水肿等急性炎症表现, 与炎症因子 IL-6 的激活有关^[6]。因此, 本研究通过影像学和组织学方法观察糖尿病大鼠模型腰椎间盘发生退变的变化情况, 并通过检测血清中血脂、IL-6 的水平, 初步分析该病可能的发生机制。

材料与方法

1. 研究对象

选取健康雄性 SD 大鼠 50 只 (新疆医科大学动物实验中心提供), 体重 200~220 g。随机分为两组, 正常对照组 20 只, 糖尿病组 30 只。造模前 50 只大鼠采尾静脉血, 利用快速血糖仪检测基础血糖。

2. 模型建立

正常对照组腹腔注射 10.0% 柠檬酸钠缓冲液, 糖尿病组腹腔注射浓度为 50 mg/kg 的链脲佐菌素溶液。3 天后采尾静脉血检测大鼠随机血糖, 随机血糖大于 16.7 mmol/L 视为造模成功^[7]。为检测模型稳定性, 造模成功后第 7、14 天重复上述操作。

3. 影像学检查

造模前和造模后第 4、8、12 周分别取正常对照组和糖尿病组各 6 只大鼠, 10.0% 水合氯醛麻醉。大鼠取俯卧位, 采用数字 X 线机 (Philips) 对大鼠腰椎行正侧位扫描, 扫描参数: 77 kV, 400 mA, 136 ms。将大鼠水平放置于膝关节线圈中, 采用磁共振扫描仪 (Philips 1.5T) 行大鼠腰椎 T₂WI 序列扫描, 扫描参数: TE 80 ms, TR 2500 ms, 层厚 0.2 mm, 视野 12 cm×9 cm, 矩阵 256×256。

4. 影像学分析

将数字 X 线机扫描的图像导入处理软件 (volume

viewer) 中对大鼠的腰椎侧位进行椎间隙和椎体高度的测量, 以椎间隙指数 (disc height index, DHI) 描述椎间隙高度变化^[8]。根据大鼠腰椎间盘在磁共振 T₂WI 的信号强度进行 Pfirrmann (Pm) 分级^[9]: I 级: 腰椎间盘信号与脑脊液信号相当; II 级: 腰椎间盘信号内有水平裂; III 级: 腰椎间盘信号减低伴不均匀; IV 级: 腰椎间盘呈等低信号; V 级: 腰椎间盘呈明显低信号。

5. 组织学检查及分析

造模后第 4、8、12 周各取 6 只大鼠腹腔注射 3% 的戊巴比妥钠处死大鼠, 截取大鼠 L₄-L₆ 椎间盘组织。经 10% 福尔马林固定 48 h、10% 脱钙液脱钙 6 周后将组织包埋、切片行 HE 染色。

采用光学显微镜观察大鼠腰椎间盘正中矢状位 HE 染色图片, 根据 Wei 等^[10] 提出的标准从椎间盘髓核基质、纤维环结构、终板的形态以及终板与纤维环的关系 4 个方面评估椎间盘退变的病理变化, 每项指标对应 1~3 级, 每一级对应 1 分 (表 1)。

表 1 腰椎间盘组织学评分表

分级	髓核细胞	骨赘	纤维环	髓核与纤维环交界处
I 级	大量脊索细胞	无	同心圆排列	正常
II 级	脊索细胞减少	出现	断裂 < 30%	轻度分离
III 级	黏液样变性	过度生长	断裂 > 30%	中重度分离

6. 大鼠血清中血脂及 IL-6 的检测

经腹主动脉取血 5 mL, 4000 r/min 离心提取血清, 利用罗氏生化分析仪 (C702) 检测血清中胆固醇 (total cholesteterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 浓度; 利用电化学发光仪 (eCL-8000) 检测血清中 IL-6 的浓度。

7. 统计学处理

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。定量资料以均数±标准差表示。采用独立样本 *t* 检验比较两组大鼠在同一时间段内椎间隙高度和组织学评分的差异, 以及血糖、血脂、IL-6 的变化。等级资料的描述以频数表示, 两组间比较采用两独立样本的秩和检验。两组数据的相关性分析采用 Spearman 相关性检。以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 糖尿病大鼠模型血糖变化

造模前,糖尿病组大鼠血糖变化差异无统计学意义($P = 0.734$);造模后第3天,通过随机血糖筛选出18只糖尿病大鼠模型(60.0%),大鼠血糖为(20.26 ± 2.24) mmol/L,差异具有统计学意义($P = 0.000$);造模后第10、17天,糖尿病组大鼠血糖分别为(19.50 ± 2.09) mmol/L、(20.74 ± 2.11) mmol/L,差异均具有统计学意义($P = 0.000, 0.000$,图1)。

2. 糖尿病大鼠模型腰椎间隙高度 DHI 变化

造模前,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠腰椎间隙变化差异无统计学意义($P = 0.233$);造模后第4周,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠腰椎间隙减小,但差异无统计学意义($P = 0.170$);造模后第8、12周,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠腰椎间隙明显减小,差异均有统计学意义($P = 0.002, 0.001$,表2、图2)。

表2 两组腰椎间隙高度 DHI 变化 (mm)

时间	正常对照组 (n=6)	糖尿病组 (n=6)	t 值	P 值
造模前	0.16±0.01	0.15±0.01	1.291	0.233
造模后第4周	0.17±0.03	0.14±0.02	0.506	0.170
造模后第8周	0.16±0.01	0.12±0.01	4.529	0.002
造模后第12周	0.15±0.02	0.09±0.01	5.124	0.001

3. 糖尿病大鼠腰椎间盘 Pm 分级变化

造模前,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠 Pm 分级差异无统计学意义($P = 1.000$);造模后第4周,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠腰椎间盘退变等级增高,但差异无统计学意义($P = 0.400$);造模后第8、12周,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠腰椎间盘退变等级均增高,差异均有统计学意义($P = 0.012, 0.011$,表3、图3)。

表3 糖尿病大鼠 Pm 分级变化 (只)

时间	椎间盘退变的 Pm 分级					Z 值	P 值
	I 级	II 级	III 级	IV 级	V 级		
造模前						0.000	1.000
正常对照组	6	0	0	0	0		
糖尿病组	6	0	0	0	0		
造模后第4周						-0.841	0.400
正常对照组	5	1	0	0	0		
糖尿病组	4	0	1	1	0		
造模后第8周						-2.504	0.012
正常对照组	5	1	0	0	0		
糖尿病组	1	0	2	3	0		
造模后第12周						-2.529	0.011
正常对照组	5	1	0	0	0		
糖尿病组	1	0	4	0	1		

4. 糖尿病大鼠模型腰椎间盘组织评分变化

造模后第4周,腰椎间盘组织形态未见明显异常,髓核中脊索细胞含量丰富,软骨终板与纤维环界清。

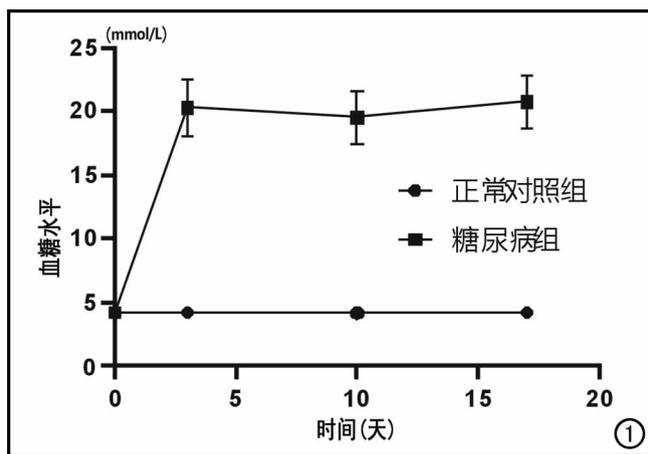


图1 糖尿病大鼠模型血糖变化。

与正常对照组相比,糖尿病组大鼠腰椎间盘组织评分差异无统计学意义($P = 0.454$)。造模后第4周,椎间盘组织形态未见明显异常,髓核中脊索细胞含量丰富,软骨终板与纤维界清,纤维环结构致密。造模后第8、12周,腰椎间盘组织体积减小,髓核中脊索细胞含量下降,可见少量软骨细胞,纤维环与终板断裂,纤维环结构紊乱;与正常对照组相比,糖尿病组大鼠腰椎间盘组织评分明显增高,差异有统计学意义($P = 0.000, 0.000$,图4、5)。

5. 影像学和组织学评分的相关性

组织学评分与腰椎间隙高度(DHI)呈负相关性($r = -0.818, P = 0.001$),与腰椎间盘退变等级(Pm)呈正相关性($r = 0.818, P = 0.001$,图6)。

6. 糖尿病大鼠模型血脂变化

造模后第4、8、12周,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠血清中甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(H-LDL)、低密度脂蛋白浓度增高(L-LDL)水平均增高,但差异无统计学意义($P > 0.05$,图7)。

7. 糖尿病大鼠血清 IL-6 变化

造模后第4周,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠血清中 IL-6 浓度增高,但差异无统计学意义($P = 0.728$);造模后第8、12周,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠血清中 IL-6 浓度均明显增高,差异均有统计学意义($P = 0.044, 0.013$,表4)。

表4 两组大鼠造模后血清中 IL-6 值变化情况 (pg/mL)

时间	正常对照组 (n=6)	糖尿病组 (n=6)	t 值	P 值
造模后第4周	1.54±0.09	1.57±0.16	-0.360	0.728
造模后第8周	1.58±0.13	2.08±0.45	-2.383	0.044
造模后第12周	1.60±0.17	2.21±0.31	-3.200	0.013

讨论

腰椎间盘退变的发生与多种因素相关,如年龄、腰椎机械负荷增加、基质金属蛋白酶的过表达、营养代谢

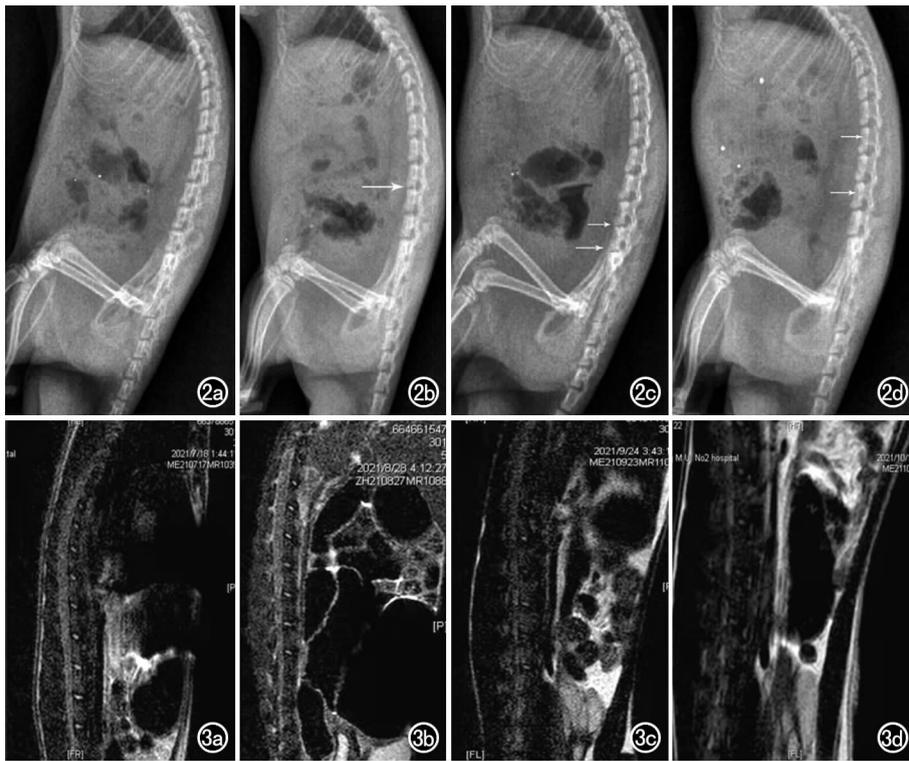


图2 糖尿病组大鼠不同时间点的X线侧位片。a) 造模前大鼠腰椎序列稳定,椎间隙未见狭窄;b) 造模后第4周发现部分椎间隙狭窄,椎间隙高度为1.33mm;c) 造模后第8周上述影像学表现加重,部分椎体上下缘可见楔形改变;d) 造模后第12周,椎体周缘可见骨赘形成,可见椎间隙明显狭窄。

图3 糖尿病大鼠模型不同时间点磁共振T₂WI矢位面图像。a) 造模前大鼠椎间盘呈高信号,等同于脑脊液信号;b) 造模后第4周,大鼠L₄-L₆椎间盘信号强度明显降低,低于脑脊液信号,L₁-L₃椎间盘仍可见高信号影;c) 造模后第8周,大鼠L₄-L₆椎间盘信号进一步降低,L₁-L₃椎间盘信号也开始降低;d) 造模后第12周,大鼠L₁-L₆椎间盘信号显示不清,呈“黑间盘”。

紊乱等^[11],其中营养供应障碍是发生腰椎间盘突出变的重要危险因素之一。腰椎间盘的营养供应主要依赖周围的毛细血管网,因此任何不利于毛细血管的因素都

将影响腰椎间盘的营养供应,导致髓核内脊索细胞代谢降低,引起细胞功能障碍,诱发LDD的发生。潘福敏等^[12]在研究糖尿病与腰椎间盘突出退变中发现,腰椎间盘突出退变与糖尿病病程呈正相关,糖尿病通过提高髓核组织中凋亡和自噬水平加速大鼠腰椎间盘突出退变,还有研究发现,糖尿病是发生多节段腰椎间盘突出的危险因素。本研究同样发现糖尿病大鼠出现LDD,且随病程延长,LDD程度逐渐增高,其机制可能是高糖状态下改变椎间盘细胞的外环境,不能及时排出代谢产物,进一步加剧椎间盘的退变;另一方面是高糖环境将产生自噬作用或醛糖还原酶的异常代谢加速椎间盘内细胞的凋亡,最终导致腰椎间盘突出变的发生。

本研究进一步利用影像学和组织学方法评价大鼠腰椎间盘突出退变情况。X线具有良好的空间分辨率和对骨组织的高敏感性等特点,可以清晰显示钙化增生、椎间隙高度、骨赘等LDD的影像学改变。在糖尿病大鼠造模第12周时,由于腰椎软骨细胞代偿性增生造成椎体骨赘形成。MRI作为目前描述椎间盘退变最精准的影像学检查手段,因为T₂WI序列可以客观反映椎间盘髓核中含水的含量,当LDD等级增加时髓核中含水量降低,T₂WI序列的信号强度也随之降低。本研究结果发现,糖尿病组大鼠随着病程的进

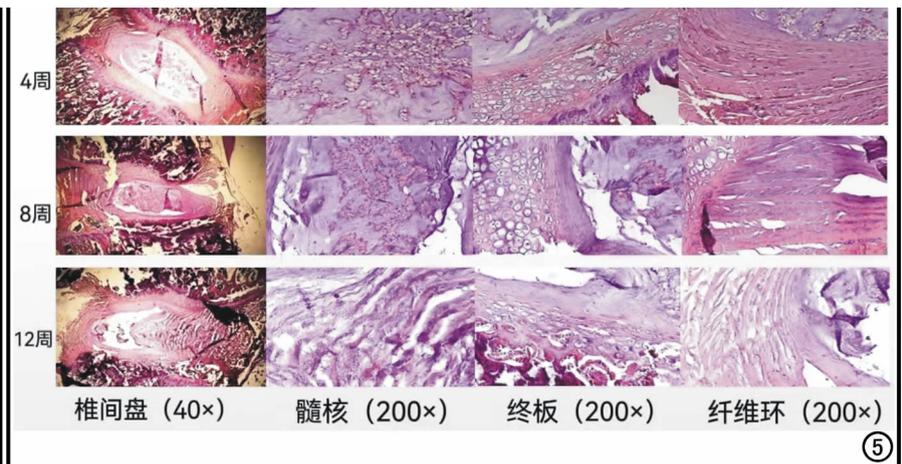
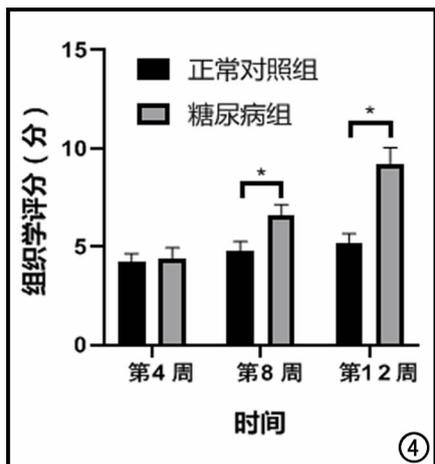


图4 两组大鼠造模后腰椎间盘突出组织评分的变化。

图5 糖尿病大鼠模型腰椎间盘突出组织变化。

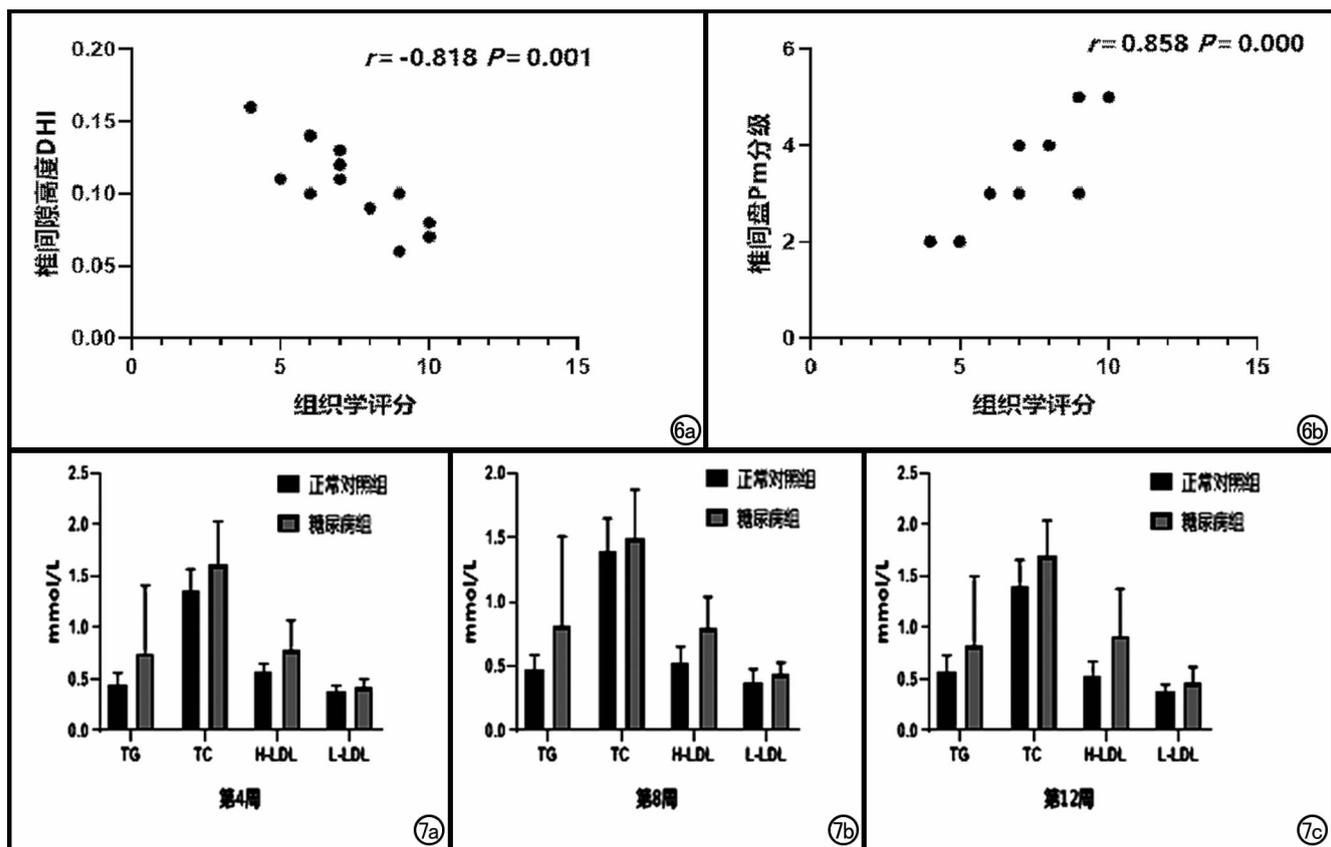


图6 影像学和组织学评分的相关性分析。a)组织学评分与腰椎间隙高度(DHI)呈负相关性;b)组织学评分与腰椎间盘退变等级(Pm)呈正相关性。图7 两组大鼠血脂变化情况比较。a)造模后第4周两组血脂情况对比;b)造模后第8周两组血脂情况对比;c)造模后第12周两组血脂情况对比。

展腰椎间盘退变等级增加,这与杜等采用3.0T MRI评价糖尿病兔子腰椎间盘退变程度的结果趋势相同。Ma等^[13]通过对离体动物椎间盘组织的 T_2 WI信号强度和水含量的相关分析中发现,腰椎间盘退变Pm分级与 T_2 WI信号强度呈正相关。糖尿病组大鼠腰椎间盘 T_2 WI信号强度随造模时间的延长而降低,主要原因是糖尿病自身的微血管病变引起椎间盘内水和蛋白多糖的快速流失而造成 T_2 WI的弛豫时间延长,腰椎间盘干瘪,导致 T_2 WI信号降低。另外,腰椎间盘退变后可有气体进入,这也是 T_2 WI信号降低的原因。脊索细胞在胚胎发育过程中维持基质稳定性和椎间盘完整性方面发挥重要作用^[14]。本研究发现糖尿病大鼠在造模后第8周开始,髓核内的脊索细胞大量减少,在造模后第12周时髓核发生黏液样变性,而且随着造模时间的延长,软骨终板周围有骨赘形成,纤维环结构疏松,部分发生中断,这与Won等通过对OLETF大鼠的观察发现高糖环境中将加速椎间盘髓核向软骨终板转变的结果吻合。本研究将组织学评分与影像学方法进行相关性分析,结果显示两者存在相关性,且相关系数均大于0.7,表明腰椎间隙高度(DHI)和腰椎间盘退变等级(Pm)的变化可以反映糖尿病大鼠腰椎间盘

退变的组织病理变化。此外与X线相比,MRI的相关系数较高,也说明MRI对发生腰椎间盘退变的影像表现更敏感。

血脂对血管平滑肌细胞和内皮细胞有很强的毒性,可阻断血管营养物质运输,引起椎间盘营养缺乏。有研究发现血脂与LDD存在相关性^[15]。本研究结果表明糖尿病组大鼠血脂浓度有增高的趋势,可能与大鼠体内胰岛素分泌不足,引起脂肪合成代谢降低有关。IL-6是炎症因子,本研究结果显示,糖尿病大鼠血清中IL-6水平显著增高,IL-6可加快软骨细胞凋亡,促进LDD的发生;IL-6还可引起髓核细胞内蛋白多糖含量的降低,抑制胶原蛋白的合成,引起椎间盘功能受损^[16]。椎间盘组织中炎症因子IL-6的表达是否可以通过影像学方法准确判断还未明确,这也是本研究的不足之处,后续工作会深入研究。

参考文献:

- [1] 李丽,周治国,王敏,等. ADC值评估腰椎间盘退变程度的研究[J]. 放射学实践, 2013, 28(12): 1279-1282.
- [2] 彭新,李俐依,俞华. 浮针联合腰突颗粒治疗腰椎间盘突出症气滞血瘀证的疗效研究[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(6): 796-799.
- [3] Rastogi A, Kim H, Twomey JD, et al. MMP-2 mediates local degradation and remodeling of collagen by annulus fibrosus cells of

- the intervertebral disc[J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(2):R57-R57.
- [4] Merico V, Imberti JF, Zanoni M, et al. Inhibition of lysyl oxidase stimulates TGF- β signaling and metalloproteinases-2 and -9 expression and contributes to the disruption of ascending aorta in rats: protection by propylthiouracil[J]. *Heart Vessels*, 2021, 36(5):738-747.
- [5] Lacheta L, Chamberlain A, Gabriel S, et al. Biomechanische auswirkung von deaktivierung versus resektion der posterosuperioren rotatorenmanschette auf die abduktion in einem dynamischen schulter-modell[J]. *Sport-Orthopdie-Sport-Traumatologie*, 2021, 37(2):174-175.
- [6] 李育刚. 腰椎间盘突出患者血清疼痛物质及炎症应激指标的变化研究[J]. *中国骨与关节外科*, 2014, 7(6):472-474.
- [7] Niccoli G, Milardi D, D'Amario D, et al. Hypotestosteronemia is frequent in ST-elevation myocardial infarction patients and is associated with coronary microvascular obstruction[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2015, 22(7):855-863.
- [8] Sen D, Gulati Y, Malik V, et al. MRI and MR tractography in bilateral hypertrophic olivary degeneration[J]. *Indian J Radiol Imaging*, 2014, 24(4):401-405.
- [9] 黄耀渠, 赵晓梅, 伍琼慧, 等. 磁共振 T2 弛豫时间和 ADC 评估腰椎间盘突出退变的对比研究[J]. *放射学实践*, 2016, 31(8):773-777.
- [10] Wei F, Zhong R, Wang L, et al. Relationship between bone mineral density and lumbar intervertebral disc degeneration in rhesus macaques[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2014, 28(6):718-722.
- [11] Buse JB, Wexler DJ, Tsapas A, et al. 2019 update to: Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)[J]. *Diabetologia*, 2020, 63(2):221-228.
- [12] 潘福敏, 王善金, 麻彬, 等. II 型糖尿病与腰椎间盘突出退变的相关性[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2015, 25(12):1079-1082.
- [13] Ma J, Xiang X, Yu Z, et al. Hybrid graphene/silicon integrated optical isolators with photonic spin-orbit interaction[J]. *Appl Phys Lett*, 2016, 108(15):579-582.
- [14] 李季霖, 周红海, 余进爵, 等. 髓核细胞凋亡相关信号通路研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2021, 31(2):178-182.
- [15] 李祖新. 血脂代谢异常与腰椎间盘突出退变的相关性研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(22):2825-2827.
- [16] 张开放, 刘涛, 姚永锋, 等. 链脲佐菌素型糖尿病模型大鼠股骨头坏死的血脂、凝血代谢及组织病理学变化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(50):9897-9902.

(收稿日期:2022-03-06 修回日期:2022-07-05)