

## 犬腰骶神经根慢性压迫模型的建立及分子生物学分析

史国栋<sup>1</sup>, 贾连顺<sup>1</sup>, 袁文<sup>1</sup>, 史建刚<sup>1\*</sup>, 谭俊铭<sup>1</sup>, 刘燕玲<sup>2</sup>, 刘小红<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003; 2. 第二军医大学长海医院病理学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**制作犬腰骶神经根压迫的动物模型,进一步探讨神经根压迫造成的根性疼痛及麻木的治疗方法。**方法:**18只成年杂种犬,均为雄性,随机分成3组:7 d组、14 d组和28 d组,每组6只。应用长5 mm、直径3~4 mm的硅胶管植入右侧L6、L7及S1神经根下面,造成压迫模型,左侧作为自身对照侧。**结果:**通过对压迫神经根及神经根节大体观、组织病理学和免疫组织化学的光学显微镜的动态观察,可见神经根压迫后其有髓神经纤维数目减少和超微结构的改变,如神经膜细胞胞质肿胀和细胞水肿、华勒变性、神经轴突脱髓鞘变等。**结论:**神经根超微结构的改变是神经根失功能的病理形态学基础,此模型更接近于腰椎间盘突出和椎间管狭窄对神经根的压迫,为临床神经根性疼痛及麻木治疗的研究建立了可供参考的动物模型。

**[关键词]** 神经根病;压迫;模型;动物

**[中图分类号]** R 681.53

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1205-04

### A canine model of chronic of lumbosacral nerve root compression: establishment and molecular biology analysis

SHI Guo-dong<sup>1</sup>, JIA Lian-shun<sup>1</sup>, YUAN Wen<sup>1</sup>, SHI Jian-gang<sup>1\*</sup>, TAN Jun-ming<sup>1</sup>, LIU Yan-ling<sup>2</sup>, LIU Xiao-hong<sup>2</sup> (1. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To establish a canine model of lumbosacral nerve root compression, so as to search for treatment for radicular pain and numbness caused by nerve root compression. **Methods:** Eighteen male adult mongrel dogs were evenly randomized into 3 groups: 7 days group, 14 days group and 28 days group. A 5 mm long thick silica tube (diameter 3-4 mm) were implanted under right L6, L7 and S1 nerve root to establish the compression model; the left side served as self controls. **Results:** Dynamic observation with histopathology and immunohistochemical staining showed that, after the nerve root nerve root compression, the myelinated nerve fibers decreased and there was ultrastructure changes of the nerve fibers, such as Schwann cell cytoplasm swelling and edema, Wallerian degeneration, and demyelinated degeneration of axons. **Conclusion:** The ultrastructural changes of nerve root are the pathological basis of the function loss of the nerve root. The present model is more closer to the model of lumbar intervertebral disc herniation and stenosis of nerve root compression and it provides a basis for treatment of compression-caused radicular pain and numbness in clinic.

**[KEY WORDS]** radiculopathy; compression; model, animal

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(11):1205-1208]

腰椎间盘突出和椎管的骨质增生继发的腰骶神经根的压迫所造成的下肢疼痛和麻木临床较为常见,但目前对该病发病机制的认识还不完善。通常认为,突出的椎间盘或骨赘形成等造成的机械性压迫是导致神经根疼痛及其所支配区域发生麻木的主要原因。临床上,通过口服或局部应用类固醇、非甾体类消炎镇痛药物,并不能取得满意疗效,经手术减压去除致压物后疼痛缓解较为明显,但肢体麻木症状往往恢复不够理想。因此,通过动物模型复制原发病,有利于该病发病机制的阐明,我们应用硅胶管对犬的腰骶神经根进行压迫,制作了犬腰骶神经根压迫动物模型,对神经根压迫形成下肢麻木的机制做进一步研究。

### 1 材料和方法

1.1 实验动物 18只成年杂种犬,均为雄性(体质量为10~15 kg),随机分成3组:7 d组、14 d组和28 d组,每组6只。3组均用长5 mm、直径3~4 mm硅胶管行右侧L6、L7及S1神经根压迫模型,左侧做为自身对照侧。

动物在饲养房单个饲养,随意喝水且经检验合格的干食喂养。控制动物房的温度(18℃~25℃)和

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30300359)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30300359)。

**[作者简介]** 史国栋, 博士生。E-mail: shgd008@163.com

\* Corresponding author. E-mail: shijiangang616@tom.com

光照周期(24 h 中,12 h 为光照期,12 h 为黑暗状态),实验前予以犬至少 7 d 的环境适应时间。

1.2 手术操作 动物术前均行普鲁卡因青霉素(20 000 U/kg)和阿托品(0.04 mg/kg)肌注。将犬行速眠新 II 注射液(0.08~0.10 ml/kg,军事医学科学院军事兽医研究所研制,上海交通大学动物实验中心提供)肌注麻醉,气管内插管,行氟烷(1%~2%)混合氧气和一氧化二氮(1:1)的面罩人工通气。常规行腰椎板切除减压、暴露双侧 L6、L7 及 S1 神经根,用长 5 mm、直径 3~4 mm 的硅胶管放置在右侧 L6、L7 及 S1 神经根下面造成压迫,用 1 号丝线贯穿固定,同时硬膜内放置软的脑室引流管穿过皮肤固定缝合牢固以备抽取脑脊液测定其中脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的含量。其中 1~3,7~9,13~15 号犬经软脑膜管鞘内注射长效可吸收纳米微球 BDNF(作为本课题的一部分,由第二军医大学药学院制备)。

术后 1 周、2 周和 4 周,每组拟各取 6 只动物再次行速眠新 II 注射液(0.08~0.10 ml/kg)肌注麻醉,均经颈动脉灌注肝素化生理盐水(2 000 ml)后随之再灌注 4% 多聚甲醛 PBS 液 2 000 ml (pH 7.4)。每只动物均截取同双侧 L6、L7、S1 神经根及背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)并制成横形石蜡切片(5 μm)行组织学研究。

1.3 组织学观察 对每只动物的相应神经根及 DRG 采用 BDNF 表达的免疫组织化学及 H-E 染色分析。

1.3.1 H-E 染色 切片行 H-E 染色,观察相应压迫及对照处的神经根和 DRG 神经元的病理变化。为了观察神经元且无重复、被忽略,选择了一块厚为 5 μm 且间隔>8 μm 的切片光学显微镜下进行观察。

1.3.2 免疫组织化学染色 标本浸于含 30% 蔗糖、4℃ 的 PBS 液中行冰冻保护 24 h。常规行石蜡切片并脱蜡、脱水,蒸馏水和 PBS 洗后用柠檬酸缓冲液(pH 6.0)微波修复 3.5 min。经含 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 PBS 液处理 10 min,以封闭内源性过氧化物酶,经 PBS 洗后加低密度脂蛋白的兔一抗(效价为 1:50,购自博士德公司)37℃ 湿盒中孵育 1 h。PBS 液漂洗后,在室温下加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠/兔二抗孵育 1 h。BDNF 的免疫染色采用 EnVision 法(DAKO)。经 PBS 洗后用 0.05% DAB 和 0.006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 PBS 液着色 10 min。蒸馏水终止染色反应,苏木精衬染 10 min,75% 盐酸-乙醇分化 30 s,冲洗切片并干燥、脱水、中性树脂封片。

## 2 结果

18 只犬均存活,观察 3 组动物 BDNF 在 L6、L7、S1 神经根及 DRG 内神经元、神经胶质和神经纤维的表达分布情况。

2.1 大体形态 见犬行神经根压迫后呼吸平稳,未见呼吸困难,术后第 1 周内表现为行走时右侧下肢活动受限明显,力量减弱,行走缓慢,但第 2 周后 7~9 号及 13~15 号犬较 10~12 号及 16~18 号犬有显著改善。

在制作神经根压迫模型前,先行犬椎管造影术,观察犬正常椎管形态(图 1A、1B),见造影剂在椎管内充盈良好,椎管通畅;模型制作完成后见神经根明显受压(图 2);椎管造影显示犬 L6、L7、S1 右侧神经根充盈缺损(图 1C);1 周后将犬行多聚甲醛 PBS 液灌注后切取受压神经根标本前(图 3)见致压物位置良好,无移位,受压神经根水肿明显。4 周后切取受压迫神经根标本见神经根肿胀消退,颜色苍白(图 4)。

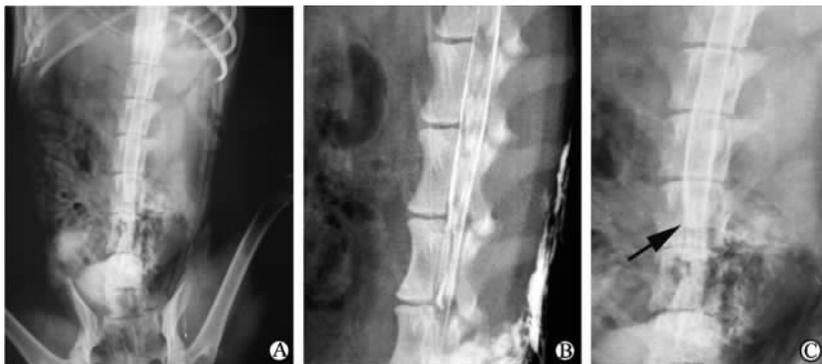


图 1 正常犬(A、B)和 L6、7 及 S1 压迫造模(C)后椎管造影正侧位 X 线成像

Fig 1 X-ray imaging of normal canine spinal angiography(A,B) and after compression(C)

A: Canine spinal canal stenosis; B: Obstruction of patency; C: Arrows showing filling of defect of nerve root after compression



图 2 犬 L6、L7 及 S1 右侧神经根压迫造模后形态观察见神经根受压变细、出现切迹  
Fig 2 L6, L7 and the right S1 nerve root compression modulus with thin nerve root and a notch



图 3 1 周后致压物位置良好, 受压神经根水肿明显  
Fig 3 A week later the position pressure was satisfactory and there was nerve root compression edema



图 4 4 周后受压迫神经根标本, 见神经根肿胀消退, 颜色苍白  
Fig 4 Four weeks later the nerve root had relieved nerve root swelling and a pale color

## 2.2 组织学结果

2.2.1 H-E 染色 图 5A 示 DRG 内感觉神经元有中央性 Nissl 小体溶解, 胞核变形、移向细胞边缘且胞质内的 Nissl 小体数量减少, 有广泛的淋巴细胞浸润, 与对照组 (图 5B) 相比神经元细胞核变性, 核周 Nissl 小体部分丢失, 广泛淋巴细胞浸润及出现血管套。

2.2.2 免疫组化染色 阳性信号定位于胞质, 为棕黄色颗粒 (图 6)。L7 压迫侧与正常侧神经根节组的胞质之间, 可见不同程度的 BDNF 表达, 但压迫侧

(图 6A) 表达更为广泛且明显; 两组的 DRG 内神经胶质和神经纤维中 BDNF 免疫反应性均呈强阳性。

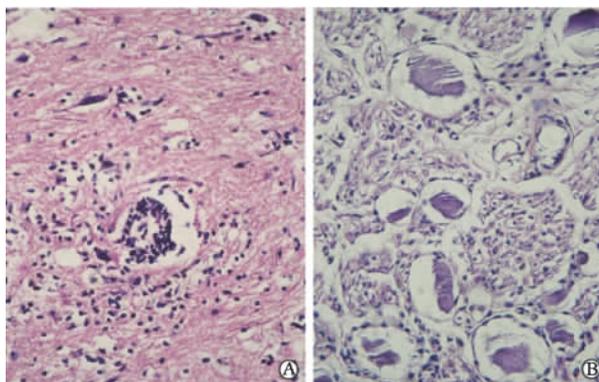


图 5 光镜下犬 L7 压迫侧神经根节 (A) 和正常侧神经根节 (B)  
Fig 5 Light microscope shows L7 nerve root compression (A) and normal nerve root ganglion (B) (H-E, ×40)

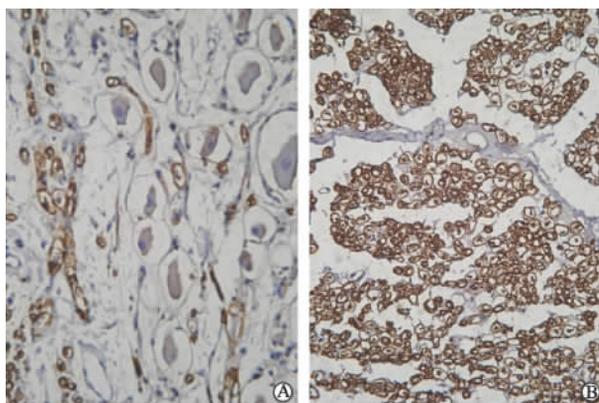


图 6 L7 神经根节压迫侧 (A) 与正常侧 (B) 的 BDNF 表达  
Fig 6 L7 nerve root compression side (A) and normal side (B) and BDNF expression (×100)

电镜扫描显示压迫侧较正常侧神经元病理改变严重, 胞体固缩, 胞核固缩, 核偏移甚至见神经元结构模糊, 仅余裸核, 线粒体肿胀严重, 出现较大空泡化, 粗面内质网扩张溶解, 甚至胞质溶解, 可见神经元凋亡, 血管外周水肿 (图 7)。

## 3 讨论

神经根在不同的部位被脊膜包绕的方式不同, 在椎间孔, 运动和感觉神经根被坚韧的根袖紧密包绕, 这种结构使其形成水肿后更容易受损。脊神经根出椎管时, 被硬脊膜及蛛网膜囊突出的鞘所包被, 称为脊膜套袖, 此鞘延伸并包被后根的脊神经节。脊神经前后根在脊神经节远侧会合, 硬脊膜鞘成为脊神经外膜。脊神经节位于椎间孔水平, 因此椎间

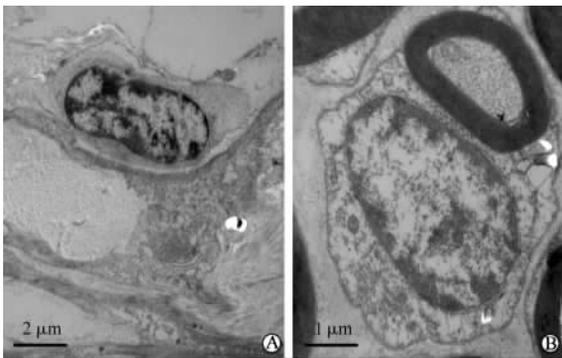


图7 神经根压迫侧(A)和正常侧(B)神经元胞体电镜扫描

Fig 7 Nerve root compression side (A) and normal side (B) neuron cells by scanning electron microscope (×15 000)

The oppression lateral side had more serious pathological changes, with the cell body pyknosis, nuclear condensation, and nuclear migration

孔处的神经根水肿还会涉及到背侧神经节,后根的神神经细胞位于脊神经节内,神经根受压后背根节内的感觉神经元极敏感,出现大量的细胞死亡<sup>[4-5]</sup>。这是临床中腰椎间盘突出和椎管的骨质增生继发的腰骶神经根的压迫所造成的下肢疼痛和麻木,经手术减压去除致压物后疼痛缓解较为明显,但肢体麻木症状往往恢复不够理想的原因。Naito等<sup>[6]</sup>用氢清除法研究了猪的腰神经根通道内神经根的血流动力学,发现压迫腰神经根通道的近侧部导致神经根血流减少69%,而压迫远侧部则减少37%。此实验说明了压迫越靠神经根的远侧局部缺血就越严重。这就提示手术应注意向远侧方的充分减压,以利神经功能的恢复。

制造腰椎管狭窄模型常用的动物是猪和犬。犬的脊髓终于L6~L7椎体水平,猪的脊髓终于第2尾椎水平,它们的马尾神经浸泡在脑脊液中,微血管供应和人类相似<sup>[7]</sup>。Cornefjord等<sup>[4]</sup>用一帶有缺口的套管套在猪的腰神经根上做了慢性压迫模型,该套管的外层为一金属壳,而内层材料吸收水分后可膨胀,致管的内径逐渐缩小达到缓慢压迫神经根的目的。Olmaker等<sup>[8]</sup>利用可充气的微气球造成马尾神经根的急性与慢性压迫,证实了急性压迫较慢性压迫更易导致神经根水肿形成,同时证明压迫伤后神经根比周围神经更易发生神经内水肿。Yoshizawa等<sup>[9]</sup>用硅胶管套在狗的第7腰神经根上

作为慢性压迫模型,在硬膜囊返折部和神经节之间压迫犬的腰神经根,发现压迫去除后,压迫点近侧的血流几乎完全恢复,而压迫点远侧血流仍处于低水平。

本研究证实,神经根超微结构的改变是神经根失功能的病理形态学基础。我们应用的硅胶管自神经根的侧后方造成压迫,而且硅胶管的直径可以自由选择,此模型更接近于腰椎间盘突出和椎间管狭窄对神经根的压迫,因此,本模型较忠实地模拟了脊柱退行性变过程中出现的神经根压迫的发病机制,为进一步探讨神经根受压后发生麻木的机制及改进防治措施,建立了可供参考的动物模型。

[参考文献]

- [1] Kobayashi S, Kokubo Y, Uchida K, et al. Effect of lumbar nerve root compression on primary sensory neurons and their central branches: changes in the nociceptive neuropeptides substance P and somatostatin [J]. *Spine*, 2005,30:276-282.
- [2] Castellanos J E, Martinez M, Acosta O, et al. Nerve growth factor and neurotrophin-3 modulate the rabies infection of adult sensory neurons in primary cultures[J]. *Brain Res*, 2000,871:120-126.
- [3] Kerekes N, Landry M, Rydh-Rinder M, et al. The effect of NGF, BDNF and bFGF on expression of galanin in cultured rat dorsal root ganglia[J]. *Brain Res*, 1997,754:131-141.
- [4] Cornefjord M, Sato K, Olmarker K, et al. A model for chronic nerve root compression studies. Presentation of a porcine model for controlled, slow-onset compression with analyses of anatomic aspects, compression onset rate, and morphologic and neurophysiologic effects[J]. *Spine*, 1997,22:946-957.
- [5] Shapiro S. Medical realities of cauda equina syndrome secondary to lumbar disc herniation[J]. *Spine*, 2000,25:348-352.
- [6] Naito M, Owen J H, Bridwell K H, et al. Blood flow direction in the lumbar nerve root[J]. *Spine*, 1990,15:966-968.
- [7] Delamarter R B, Bohlman H H, Dodge L D, et al. Experimental lumbar spinal stenosis. Analysis of the cortical evoked potentials, microvasculature, and histopathology [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1990,72:110-120.
- [8] Olmarker K, Rydevik B, Holm S. Edema formation in spinal nerve roots induced by experimental, graded compression. An experimental study on the pig cauda equina with special reference to differences in effects between rapid and slow onset of compression[J]. *Spine*, 1989,14:569-573.
- [9] Yoshizawa H, Kobayashi S, Kubota K. Effects of compression on intraradicular blood flow in dogs[J]. *Spine*, 1989,14:1220-1225.

[收稿日期] 2007-08-05

[修回日期] 2007-09-29

[本文编辑] 尹 茶