



改良半椎板切除法建立大鼠腰神经根压迫模型

唐晶晶^{1,2}, 梁德², 江晓兵², 丁金勇², 杨志东², 姚珍松², 张顺聪²

(1. 广州中医药大学, 广州 410405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

【摘要】目的 探讨改良半椎板切除法建立大鼠腰神经根压迫模型的优势和特点。**方法** 选用SD大鼠40只, 随机分为实验组和对照组, 实验组采用改良半椎板切除法建立大鼠腰神经根压迫模型, 对照组则采用全椎板切除法, 通过观察两组建模手术时间、术中出血量、伤口愈合情况、死亡率、大鼠下肢神经功能、神经根组织病理改变及TNF- α 及IL-1在细胞质中灰度值表达水平评估两种方法的效果。**结果** 实验组在建模手术时间、术中出血量、伤口愈合状况、死亡率明显少于对照组($P < 0.01$), 而大鼠下肢神经功能、神经根组织病理改变及TNF- α 及IL-1在细胞质中灰度值表达水平无明显差异, 同时, 实验组所需的切口小, 脊柱后方软组织破坏少。**结论** 采用改良半椎板切除法可保证成功建立大鼠腰神经根压迫模型, 并且这一改良方法具有手术时间短, 伤口愈合快, 出血量少, 软组织破坏少, 死亡率低等优点, 这一改良方法更注重动物伦理。

【关键词】 半椎板切除法; 改良; 大鼠; 神经根压迫; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33, R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0048-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.011

Establishment of a rat model of lumbar nerve root compression via modified unilateral hemilaminectomy approach

TANG Jing-jing^{1,2}, LIANG De², JIANG Xiao-bing², DING Jing-yong², YANG Zhi-dong²,
YAO Zhen-song², ZHANG Shun-cong²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

【Abstract】Objective To explore the characteristics and advantages of the rat model of lumbar nerve root compression established via modified hemilaminectomy approach. **Methods** Forty Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into two groups (experimental group and control group) for establishing a rat model of lumbar nerve root compression. Modified hemilaminectomy approach was used in the experimental group, while total laminectomy was applied in the control group. Duration of operation, estimated blood loss, wound healing status, postoperative mortality, motor function of the lower extremities, pathological changes and the gray level of cytoplasmic TNF- α and IL-1 expression were observed to evaluate the characteristics and reliability of the two operation approaches in establishing a rat model of lumbar nerve root compression. **Results** Compared with the control group, duration of operation, estimated blood loss, wound healing status, postoperative mortality were significantly better in the experimental group ($P < 0.01$), whereas there was non-significant difference between two groups with regard to motor function of the lower extremities, pathological changes and gray level of the cytoplasmic expression of TNF- α and IL-1 between the two groups. Moreover, the soft tissue structural alterations were reduced in the experimental group, which might be helpful for the rat postoperative rehabilitation. **Conclusions** Modified hemilaminectomy approach is a reliable alternative method for establishing a rat model of lumbar nerve root compression, which is beneficial to shorten the operative time, improve wound healing status, reduce estimated blood loss and

[基金项目] 广东省科技计划项目(2009B30801299), 广东省科技计划项目(2012B31800208)。

[作者简介] 唐晶晶, 男, 博士研究生, 研究方向: 中医骨伤科学; E-mail: 249943192@qq.com。

[通讯作者] 江晓兵, 男, 主治医师, 博士, 广州中医药大学第一附属医院, Tel: 020-36591604, E-mail: tangjifeng198506@sina.cn。

damages of soft tissue, and decrease mortality rate. Moreover, this modified method is more consistent with the principles of animal ethics.

【Key words】 Unilateral hemilaminectomy; Never root compression; Model; Rat

腰椎间盘突出症是脊柱退行性疾病中常见的疾病,由于神经压迫而引发的神经根痛也是临床上最严重的症状之一,虽然导致疼痛的具体机理尚未绝对统一,但机械性压迫与压迫介导的炎症反应、神经根水肿已被认为是其主要的发病机理^[1-2]。因此,在腰椎间盘突出症的相关动物实验中,大多数学者都是通过建立神经根压迫动物模型来模拟其发病机理,其模拟效果得到了验证。根据文献描述,他们的方法多是通过全椎板切除来完成造模。我们在实践过程中,发现全椎板切除造模法导致大鼠的组织损伤及失血量较大,同时部分大鼠术后恢复情况较差,存在一定的死亡率。本研究将造模方式改变为半椎板切除法,并在研究中对比半椎板法与全椎板法在建立大鼠腰神经根压迫模型上的有效性及其他特点,以期为临床治疗腰椎间盘突出症提供科学依据。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 40 只,5~7 周龄,体重(250±20)g,雌雄各半,购于广州中医药大学动物中心【SCXK(粤)2013-0020】。无菌手术在广州中医药大学第一附属医院实验动物中心屏障动物实验设施进行【SYXK(粤)2010-0092】,饲养温度 22±3℃,湿度 55%~75%,自然光节律,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 建立大鼠腰神经根压迫模型

采用 10% 水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔注射麻醉,麻醉满意后,剪毛、固定、消毒、铺巾。实验组以 L4/5 椎体间隙为中心,取后背正中切口偏左,长约 3~4 cm,钝性剥离背伸肌达椎板,暴露大鼠左侧脊柱椎板结构,不损伤棘突及对侧组织,随后切除左侧关节突和椎板,暴露硬膜囊及左侧 L5 神经根,将(32±1.5)mg 的硅胶管片置于 L5 神经根与硬膜囊交界处的腋部(见图 1)。对照组则以 L4/5 椎体间隙为中心,取后背正中切口,长约 3~4 cm,钝性剥离背伸肌达两侧椎板,剪除 L4、5 棘突,咬除全部椎板,充分暴露硬膜囊及左侧 L5 神经根,将(32±1.5)mg 的硅胶管片置于 L5 神经根与硬膜囊交界处的腋部。两组局部固定后,逐层缝合(见图 2)。术后待动物苏醒后,放入笼中观察。(图 1,2 见彩插 5。)

1.3 观察指标

1.3.1 建模手术时间

在手术过程中详细记录了每一只动物模型所需的操作时间,并进行比较。

1.3.2 伤口愈合状态

观察并记录两组腰神经根压迫模型大鼠在第 6 天伤口愈合的状态,运用以下评分标准,进行统计学比较。0 分:伤口无红肿,色泽正常,血性渗出物不明显,创面瘢痕纤细,基本无挛缩,愈合良好。1 分:伤口略红肿或肿胀,有少量血腥渗出液,创面瘢痕纤细,基本无挛缩,愈合良好。2 分:伤口发红,血性渗出物多,血痂明显,瘢痕明显,愈合差。3 分:伤口感染,瘢痕较重,延期愈合。

1.3.3 建模术中出血量

采用无菌医用棉签进行止血,并通过计算棉签的数量来估算建模手术中的出血量,并进行组间比较。

1.3.4 大鼠死亡率

观察并记录造模后 2 周内两组腰神经根压迫模型大鼠每天的死亡数量,计算每天的死亡率,进行统计学比较。

1.3.5 左下肢神经功能

为确定造模是否成功,评估大鼠左下肢的神经功能变化,采用 Siegal^[3]推荐的神经功能判断六级分法:0 级,正常;1 级,尾无力;2 级:后肢无力,行走具有轻度困难;3 级:后肢无力,行走具有明显不稳定性;4 级:站立不稳,后肢能够移动;5 级:瘫痪,后肢无自主移动。每日观察 2 次。采用神经功能分值进行统计分析(*t* 检验),0 级:2 分;1 级:4 分;2 级:6 分;3 级:8 分;4 级:10 分;5 级:12 分。

1.3.6 病理组织观察

采用日本 Olympus 显微镜观察神经根组织的病理改变并摄影,采用免疫组化法测定 TNF-α 及 IL-1 在细胞质中灰度值表达水平。

1.4 数据处理与统计

采用 SPSS 13.0 数据处理软件进行数据统计与分析,数据结果采用均数±标准差表示。组间数据比较采用 *t* 检验或者 One-WAY 分析,以 $P < 0.05$ 为有显著性统计学差异,以 $P < 0.01$ 为有极显著性差异。

2 实验结果

2.1 建模手术操作时间

通过统计学(*t* 检验)分析,两组建模手术的耗时存在明显的差异,差异有显著性($P < 0.01$),实验组的耗时明显短于对照组(表 1)。

2.2 伤口愈合状态

通过统计学计算对比评分值,发现两组评分差异有显著性($P < 0.01$),可以判定实验组大鼠在第 3 天伤口愈合的状态优于对照组(见表 1)。

2.3 建模术中出血量

采用无菌医用棉签(生产厂家:佛山市顺德区康正卫生材料有限公司)压迫止血,并通过计算使用的棉签数量,评估每只大鼠的出血量,通过统计学分

表 1 不同观察指标结果($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Tab.1 Results of measurement of some parameters in the rats

组别 Groups	操作时间 Operation time	伤口愈合评分 Healing scores	棉签数量 No. of swabs	神经功能 Neural function	死亡率 Mortality rate
实验组 Experimental	9.70 ± 1.129 ^a	0.55 ± 0.686 ^a	3.9 ± 0.641 ^a	7 ± 2.2 ^b	0.05 ± 0.224 ^a
对照组 Control	16.95 ± 1.905	1.55 ± 1.146	7.6 ± 1.314	7.7 ± 2.346	0.25 ± 0.444

注: a: 代表与对照组相比较, $P < 0.05$; b: 代表与对照组相比较, $P > 0.05$
Note: a: vs. control group, $P < 0.05$; b: vs. control group, $P > 0.05$.

2.6 病理改变及 TNF- α 及 IL-1 灰度值表达

2.6.1 病理组织观察

光镜显示造模后,硅胶管片压迫的两组大鼠的脊髓膜、神经根组织及其小血管扩张充血明显,神经根外形改变并偏移、形态扭曲甚至压缩,周围结缔组织增生明显,与神经根粘连明显,同时还表现出出血、细胞肿胀、氏体消失及大量炎性细胞浸润,囊性变,空洞形成,神经元数量减少,两组大鼠神经根组织病理改变无明显差异(图 3 见彩插 5)。

2.6.2 神经根组织 TNF- α 及 IL-1 在细胞质中灰度值表达水平

通过统计学分析,两组神经根组织在 TNF- α 细胞质灰度值的比较上差异无显著性($P > 0.05$),在 IL-1 细胞质灰度值的比较上差异无显著性($P > 0.05$)。(见表 2、图 4 见彩插 5。)

表 2 两组大鼠神经根组织的灰度值表达结果($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Tab.2 Results of gray scales in nerve root tissues of the rats in tow groups

组别 Groups	TNF- α 灰度值 TNF- α grey scales	IL-1 灰度值 IL-1 grey scales
实验组 Experimental	0.4612 ± 0.1235 ^a	0.3524 ± 0.0631 ^a
对照组 Control	0.4586 ± 0.0856	0.338 ± 0.062

注: a: 代表与对照组相比较, $P > 0.05$ 。
Note: a: vs. control group, $P > 0.05$.

析(*t* 检验),两组在出血量的比较上存在明显差异,且差异具有显著性($P < 0.01$),实验组大鼠手术过程中出血量明显少于对照组(见表 1)。

2.4 左下肢神经功能

术后两组大鼠都出现左下肢下垂,右下肢收缩,伴跛行步态。左下肢神经功能异常均在 2 级以上,并在术后 14 天内呈现进行性加重的倾向。根据神经功能六级分法测定每只大鼠神经功能分值,并进行统计学分析。分析结果表明,建模术后,实验组和对照组大鼠左下肢神经功能无明显差异,差异无显著性($P > 0.01$)(见表 1)。

2.5 大鼠死亡率

观察并记录两组腰神经根压迫模型大鼠的死亡数量,进行统计学比较(见表 1)。

3 讨论

由腰椎椎间盘突出所致的神经根压迫症是临床常见病、多发病。目前,国内外学者正从已建立的动物模型^[4-5] 身上来研究神经根受压后形态学方面的改变,对神经根压迫症的发病机理进行了较多研究。如王拥军等^[6] 用硅胶片压迫大鼠 L5 神经根,并在不同时间段观察到神经根纤维组织出现不同的病理改变。然而,大多数的文献研究都是针对神经根压迫症的病因病理、发病机制或药物干预等方面,而对于原有的建立神经根压迫动物模型方法进行改良的研究却鲜见报道。本研究旨在探讨改良半椎板切除法在建立大鼠腰神经根压迫模型中的特点和优势,通过观察建模手术时间、术中出血量、伤口愈合状态、死亡率等动物伦理学相关指标以及大鼠下肢神经功能、神经根组织病理改变、TNF- α 与 IL-1 在细胞质中灰度值表达水平等验证造模成功的相关指标来对比改良方法与传统方法的异同。

依据统计学分析,改良半椎板切除法在建立大鼠腰神经根压迫模型在建模时间、出血量、伤口的红肿、血痂、挛缩及瘢痕等症状愈合状态及死亡率上明显优于全椎板切除法,建模手术时间缩短,能加快建模操作速度,有利于增加大鼠模型的数量,提高工作

效率。同时,手术创口小,建模术中出血少,伤口的红肿、血痂、挛缩及瘢痕等症状愈合快,组织破坏少,则可以明显提高大鼠的生存率,同时能够减低建模术后大鼠感染的概率,降低死亡率,提高了实验的效率,从动物伦理层面,实验组采用单侧皮肤小切口,对动物的组织结构破坏少,减低动物在实验中遭受过多的痛苦,更好地关注了动物伦理因素。

此外,从建模术后神经功能的观察上发现两组大鼠都出现明显的单侧下肢神经功能障碍,如单侧下肢下垂,行走不稳伴跛行步态等^[7],并在术后短期内呈现进行性加重,统计结果表明两组神经功能分值无明显差异,可证实两组大鼠建模术后的神经功能变化具有明显的相似性。在建模后的病理学改变上,相关研究证实^[8],神经根也存在血-神经屏障,受压后可造成神经根血-神经屏障的破坏和神经内水肿。本研究中,病理组织学观察发现:建模术后两组大鼠的神经根组织及其小血管扩张充血、水肿明显,神经根外形改变并偏移、形态扭曲甚至压缩,周围结缔组织增生明显,与神经根粘连明显。在建模术后神经根组织病理组织学的变化上,改良法与传统法无明显差异,两组大鼠在病理组织学上具有相似的表现。另外,神经根受压后,神经血管通透性增高、血-神经屏障破坏,血管血流量下降,炎症细胞游出释放炎症介质如白介素-1(IL-1),肿瘤坏死因子(TNF- α)等。这些炎症介质能促进细胞浸润引起炎症和组织损伤,特别是 IL-1 能增加 PGE2(前列腺素 E2)的产生^[9]。这些炎症介质的表达水平在神经根受压的情况下都会上升,明显高于正常水平,可使组织对其他致痛物质的敏感性增加^[10-11]。因此,本研究也通过免疫组化法来分析两组大鼠受压神经结构白介素-1(IL-1)及肿瘤坏死因子(TNF- α)在细胞质中灰度值的表达水平,研究发现两组中 IL-1 及 TNF- α 都要明显高于正常水平,而且两组的神经根组织细胞质中 TNF- α 及 IL-1 灰度值表达无明显差异。这更说明两组的神经根压迫模型建造效果相似,两种建模方法都能够取得理想的实验结局。

综上所述,通过实验表明,改良半椎板切除法与全椎板切除法在建立大鼠神经根压迫模型都能够取得良好的效果,运用两种方法建模后,大鼠的下肢神经功能出现明显减低,病理组织学都显示神经根组织出现不同的病理改变,TNF- α 及 IL-1 的表达都明显高于正常水平,以上相关指标都是评估大鼠神经根压迫模型的重要标准,通过免疫组化检测及统

计学分析,两组指标无明显统计学差异,表明两种建模方法都能取得理想的建模效果。然而,统计学分析表明,在建模的操作时间、动物出血量、伤口愈合情况、组织破坏程度上、动物死亡率及动物伦理方面,实验组明显优于对照组,这表明改良半椎板切除法在建立大鼠神经根压迫模型中具有手术时间短,出血量少,伤口的红肿、血痂、挛缩及瘢痕等症状愈合快,组织结构破坏少,死亡率低等优势,同时,小切口操作,组织结构破坏少,减少动物在建模手术过程中遭受不必要的痛苦。

(本文图 1~4 见彩插 5。)

参 考 文 献

- [1] Yoshizawa H, Kabayashi S, Hachiya Y. Blood supply of nerve roots and dorsal root ganglia [J]. *Orthop Clin North Am*, 1991, 22:195 - 211.
- [2] 沈霖. 骨伤科实验研究[M]. 北京: 科学技术出版社, 2005: 444.
- [3] Siegal T, Shohami E, Shapira Y, et al. Indomethacin and dexamethasone treatment in experimental neoplastic spinal cord compression; Part 2. Effect on edema and prostaglandin synthesis. [J]. *Neurosurgery*, 1988, 22(2):334 - 339.
- [4] 吴靖平, 陈统一, 陈中伟, 等. 双后肢大鼠椎间盘退变动物模型的建立 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(1):105 - 107.
- [5] 张劲军, 徐康清, 孙来保, 等. 改良非压迫性腰椎间盘突出大鼠模型的建立 [J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(11): 1495.
- [6] 王拥军, 万超, 沈培芝, 等. 实验性腰神经根压迫模型的建立 [J]. *中国中医骨伤科杂志* 1999, 7(1):9.
- [7] Ikawa M, Atsuta Y, Tsunekawa H. Ectopic firing due to artificial venous stasis in rat lumbar spinal canal stenosis model; a possible pathogenesis of neurogenic intermittent claudication [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005, 30(21):2393 - 2397.
- [8] Kobayashi S, Yoshizawa H, Hachiya Y, et al. Vasogenic edema induced by compression injury to the spinal nerve root; distribution of intravenously injected protein tracers and gadolinium-enhanced magnetic imaging [J]. *Spine*. 1993, 18(11):1410 - 1424.
- [9] Hiroshi T, Toru S, Yukikazu O, et al. Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine [J]. *Spine*, 1996, 21: 218 - 224.
- [10] Yanagisawa M, Otsuka M, Garcia-Arrias JE. E-type prostaglandins depolarize primary afferent neurons of the lumbar spine [J]. *Spine*. 1996, 21:218 - 224.
- [11] Lipson SJ, Muir H. Experimental intervertebral disc degeneration. Morphologic and proteoglycan changes over time [J]. *Arthritis Rheum*, 1981, 24:12 - 16.