



脊神经后根切断对大鼠膝关节软骨退变的影响

张 影¹, 林 毅¹, 颜 赫¹, 张才新¹, 时晓迪¹, 金利新²

(1. 青岛大学医学院临床学院, 青岛 266071; 2. 青岛大学医学院解剖学教研室, 青岛 266071)

【摘要】 目的 观察脊神经后根切断大鼠不同时期关节软骨的变化特点及规律, 进一步验证部分感觉障碍可以引起关节软骨损伤。**方法** 10 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 33 只随机分为实验组 (18 只) 和对照组 (15 只)。切断实验组大鼠右侧 L3、L4 脊神经后根。对照组只切开皮肤及椎旁肌。观察大鼠行为学改变。于术后 2 周、6 周和 10 周三个时间点取右后肢股骨下端, 制作组织石蜡切片。常规 HE 染色、番红 O/固绿染色观察关节软骨的组织学改变及特点。**结果** 术后随时间推移, 实验组大鼠右侧后肢经历一过性瘫痪、协调运动障碍及主动运动的变化过程。右后肢股骨髁面逐渐变浅变宽。关节软骨依次出现表面粗糙、细胞排列紊乱、细胞减少、潮线复制、漂移和中断等变化。实验组关节软骨 ACC/TAC 值随时间推移呈逐渐增大 ($t = 5.25 \sim 8.13, P < 0.05$)。**结论** 脊神经后根切断可引起关节软骨损伤及退行性改变。

【关键词】 脊神经后根切断; 关节软骨; 软骨损伤

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0016-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.004

Effect of dorsal rhizotomy on cartilage of degenerative changes in knee joint of rats

ZHANG Ying¹, LIN Yi¹, YAN He¹, ZHANG Cai-xin¹, SHI Xiao-di¹, JIN Li-xin²

(1. Department of Clinical Medicine, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China;

2. Department of Anatomy, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China)

【Abstract】 Objective To investigate the changing characteristics and rules of the different period of articular cartilage in rats after dorsal rhizotomy, and to verify the partial sensory disturbance can cause articular cartilage injury. **Methods** Thirty-three ten-month-old SPF male Wistar rats were randomly divided into experimental group ($n = 18$) and control group ($n = 15$). The rats in the experimental group were sectioned the L3、L4 dorsal roots in the right. The rats in the control group were only incised the skin and paravertebral muscles. To observe the behavior changes in rats. At 2, 6 and 10 weeks, the specimens of the right hind lower end of femur were drawn out to make paraffin sections, then HE staining and Safranin O/ Fast Green staining. The changes and characteristics of the morphology of the articular cartilage was observed. **Results** With the prolonging of period, the right hind limb of the experimental rats through the change process of transient paralysis, coordination of movement disorders and active movement. In the experimental group, the patellar surface of right hind femur gradually became shallow and wide. The articular cartilage underwent rough, cells disorganized, cells decreased, and duplicated drifted and interrupted tide line. The ratios of ACC/TAC of the experimental group were gradually high ($t = 5.25 \sim 8.13, P < 0.05$). **Conclusion** Dorsal rhizotomy can cause injury

[基金项目] 青岛大学医学院国家级实验教学示范中心创新实验项目。

[作者简介] 张影 (1992 -), 女, 本科生, E-mail: zhangying1611@163.com。

[通讯作者] 金利新 (1967 -), 男, 副教授, 医学硕士, 研究方向: 临床应用解剖, 运动医学, 骨关节损伤与修复, E-mail: 13061491213@126.com。

and degenerative changes in articular cartilage.

【Key words】 Dorsal rhizotomy; Articular cartilage; Cartilage injury

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以软骨退行性变和累及整个关节的慢性退行性骨关节病, 严重威胁人类的健康与生活质量。研究显示 65 岁以上人群中放射学 OA 的患病率可达 50% 以上, 而在 75 岁以上人群中, 这一数值可达到 80% 左右, 但 OA 的病因及病理机制并不明确^[1-3], 也缺乏有效的临床治疗方法与手段。有临床研究显示 OA 患者均存在不同程度的本体感觉误差, 而且对 OA 患者进行本体感觉康复训练, 患者关节周围的肌力、稳定性、反应速度等都有所提高, 临床症状得到缓解^[4-5]。提示本体感觉障碍可能参与了 OA 的形成与发展。完整的反射弧是保证骨骼肌张力及关节稳定的基本条件的前提。经典骨关节炎动物模型是通过切断关节韧带、肌腱等效应器装置导致关节不稳而引起软骨损伤。可以推测, 切断反射弧传入神经, 同样也可引起关节稳定性改变和运动障碍, 进而引起关节软骨损伤, 这可能是 OA 患者潜在的致病诱因。

本实验旨在制作关节周围感觉缺失动物模型, 通过观察实验动物行为学变化及关节软骨的形态学改变, 探讨感觉缺失可能引起的关节软骨损伤及变化特点, 可为 OA 病因及发病机制提供新的模型和思路, 为 OA 的预防治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 动物分组及造模

10 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 33 只, 体重 268.2 ± 23.5 g, 来源于青岛市实验动物和动物实验中心【SCXK(鲁) 2014-0001】, 随机分为实验组 (18 只) 和对照组 (15 只)。无菌手术在青岛大学医学院动物实验中心【SYXK(鲁) 2003-0008】进行。实验组大鼠用 10% 水合氯醛进行腹腔注射麻醉, 行脊正中线偏右侧切口, 钝性分离椎旁肌, 从椎间孔入路切断右侧 L3、L4 脊神经后根。生理盐水冲洗手术视野, 依次缝合消毒。对照组只切开椎旁肌, 不损伤脊神经。术后每天肌肉注射青霉素 4 万 U/只, 连续注射 3 d。正常饮食, 自然光照。每天强制大鼠活动 30 min, 观察记录模型大鼠右后肢恢复情况, 采用 Tarlov 评分标准进行运动功能评分。

1.2 标本采集与处理

术后 2 周、6 周和 10 周 3 个时间点处死大鼠 (实验组 6 只, 对照组 5 只), 取右后肢股骨下端 1

cm, 置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h ~ 48 h, 15% EDTA-2Na 微波脱钙, 石蜡包埋, 切片。HE 染色、番红 O/固绿染色, 光学显微镜下观察关节软骨的组织学改变, 并参考改良的 Mankin 评分标准对关节软骨进行评分, 应用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件测量软骨钙化层、软骨全层厚度, 计算软骨钙化层 / 软骨全层比值 (articular calcified cartilage/total articular cartilage, ACC/TAC)。

1.3 主要试剂

EDTA-2Na (北京索莱宝科技有限公司), 番红 O (北京索莱宝科技有限公司), 固绿 (北京华迈科生物技术有限公司)。

1.4 统计学分析

运用 SPSS18.0 统计软件包对数据进行分析。Mankin 评分采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同实验组之间采用单因素方差分析, 相邻两组之间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠行为学改变

实验组大鼠术后第 2 天, 右后肢不能正常活动, 静止时呈足背翻转向下姿势 (持续至第 2 周末), 在运动过程中不能配合其它肢体协同运动、呈被动拖动、瘫痪状态; 针刺右侧大腿前外侧无躲避反应, 针刺右侧足背及左侧下肢有躲避反应。术后第 4 天, 模型大鼠运动时右后肢呈外展、被动划步姿势。1 周后模型大鼠运动时右后肢呈外展位划步姿势、足背翻转与复位相交替 (彩插 2 图 1)。第 2 周后, 模型大鼠静止时右足背正常姿势, 运动时呈外展位划步姿势、偶然出现足背翻转。第 6 周后模型大鼠右后肢活动仍呈划步姿势, 但足背恢复正常位置。第 9 周后, 模型大鼠右后肢活动基本恢复正常姿势。此过程中, 右后肢大腿前外侧始终针刺无躲避反应。

术后 1 周末, 实验组大鼠运动功能 Tarlov 评分达到 4 分的有 10 只 (55.6%), 术后第 2 周末所有大鼠运动功能达到 4 分 (100%)。

对照组大鼠术后活动正常。

2.2 股骨下端大体形态变化

实验组大鼠术后第 2 周末右后肢股骨下端关节面较为光滑, 髌面较窄、髌面中间凹陷较深; 术后第 6 周末右后肢股骨下端关节面欠光滑, 髌面开始变宽, 髌面中间凹陷开始变浅, 失去正常光泽, 色泽不

均;术后第 10 周末右后肢股骨下端关节面不光滑,髌面变宽,髌面中间凹陷变浅,色泽不均,透亮度下降(彩插 2 图 2)。

2.3 组织形态学观察

光学显微镜下,对照组 HE 染色,关节软骨表面光滑,软骨细胞排列整齐,结构层次清晰,着色均匀,潮线完整。番红 O/固绿染色,软骨着色为红色,着色均匀。

实验组 HE 染色,关节软骨面粗糙,软骨着色不均匀;软骨细胞减少、排列紊乱(15 例,83.3%);出现潮线复制、漂移和中断的现象(10 例,55.6%)。番红 O/固绿染色,软骨层着色不均匀,着色变浅(17 例,94.4%),在高倍镜下观察潮线复制、漂移和中断现象比 HE 染色观察更为明显(12 例,66.7%)。上述变化随时间推移呈加重趋势。各时间点 Mankin 评分结果(见表 1)。

表 1 大鼠膝关节软骨 Mankin 评分结果比较
Tab. 1 Comparison of Mankin score in knee articular cartilage in rats

组别 Groups	只数 Cases	2 周 2 Weeks	6 周 6 Weeks	10 周 10 Weeks
对照组 Control group	15	—	—	—
实验组 Experimental group	18	2.57 ± 0.73	4.26 ± 0.81 **	5.89 ± 0.75 **

注:实验组各时间段间比较, $F = 29.31, P < 0.01$; 相邻时间段间比较, $t = 3.69 \sim 3.96, ** P < 0.01$ 。

Note: Comparison of different period in the experimental group, $F = 29.31, P < 0.01$; Comparison between adjacent period, $t = 3.69 \sim 3.96, ** P < 0.01$.

对照组于术后第 2 周、6 周、10 周关节软骨 ACC/TAC 值分别为 37.96 ± 3.92 、 40.04 ± 4.65 、 40.82 ± 5.39 , 实验组于术后第 2 周、6 周、10 周关节软骨 ACC/TAC 值依次为 36.58 ± 5.41 、 50.39 ± 6.55 、 57.97 ± 5.36 。实验组 6 周与 10 周大鼠关节软骨 ACC/TAC 值较实验组 2 周及对照各组均显著升高 ($F = 20.49, P < 0.01, t = 3.64 \sim 8.13, P < 0.01$)。实验组关节软骨 ACC/TAC 值随时间推移呈逐渐增大($t = 5.25 \sim 8.13, P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 感觉缺失与关节软骨损伤

骨关节炎可以涉及到全身多个关节,其中以膝关节、髌关节、脊柱(如颈椎和腰椎)等承重关节最为常见^[6]。虽然骨关节炎的病因尚不是很清楚,但其主要的危险因素已经得到流行病学确认,如年龄、性别、遗传、职业、肥胖、运动及生物力学异常等^[1-3]。骨关节炎的核心病理改变是软骨的损伤。各种危险因素通过不同方式作用于关节软骨,引起软骨细胞凋亡、细胞外基质分解代谢、自身免疫等病理改变,最终导致软骨的损伤^[7]。关节不稳可能在软骨损伤中扮演着重要角色。

反射弧的完整是保证骨骼肌及关节正常运动的基本条件和前提,也是维持关节应力平衡的基础。传入神经损伤引起的传入信息的缺失、特别是本体感觉功能的丧失,会导致骨骼肌肌张力、协同运动、关节初始状态及应力紊乱,引起关节功能紊乱,进而可引起软骨损伤。有临床资料显示,OA 患

者均存在不同程度的本体感觉误差与功能障碍;而且对 OA 患者进行本体感觉康复训练,患者关节周围的肌力、稳定性、反应速度等都有所提高,临床症状得到缓解^[4-5]。间接证实上述传入神经损伤引起关节功能紊乱及关节软骨损伤的推断。提示本体感觉障碍可能参与了 OA 的形成与发展。研究探讨本体感觉功能障碍对关节软骨的影响,可有助于进一步认识 OA 的病理机制,对 OA 的防治具有积极意义。

本实验研究结果显示,实验动物关节软骨出现不同程度损伤,并随时间推移呈进行性加重趋势,表现为软骨着色不均匀、软骨细胞减少、细胞排列紊乱,潮线复制、漂移和中断等现象,与经典 OA 的病理改变一致^[8-9],也与感觉障碍可引起关节软骨炎性反应的观点一致^[10-11]。脊神经后根切断可以造成关节应力平衡失调,进而引起关节软骨损伤。各种原因引起的感觉障碍、特别是本体感觉功能障碍,可能是 OA 的始发或伴发因素。

3.2 感觉部分障碍动物模型的设计及特点

经典 OA 动物模型大多通过效应器损伤引起关节不稳,进而引起关节高应力或低应力变化,导致关节软骨损伤。但是,通过损伤效应器诱发骨关节炎的造模方法不可避免地会引起关节的出血、直接损伤以及炎症,影响骨关节炎早期软骨、滑膜的生化代谢,干扰骨关节炎的病理变化^[12]。大鼠 L3、L4 脊神经后根参与了股神经(L2 ~ L5)与坐骨神经(L3、L6)^[13-14]的形成。基于反射弧及本体感觉在骨骼肌运动中的调节作用,我们设计了 L3、L4 脊神

经后根切断大鼠动物模型,并观察发现关节软骨损伤退变特点及规律。将 L3、L4 脊神经后根切断,可使大鼠手术侧后肢局部传入神经阻断,改变了膝关节周围骨骼肌肌张力及协同运动,造成关节不稳与关节应力平衡失调,进而引起关节软骨损伤。其核心在于本体感觉功能的缺失。而一般痛温觉障碍引起的关节软骨损伤称为夏科氏关节病,是由脊髓空洞症、脊髓脊膜膨出、脊柱脊髓损伤、糖尿病等疾病造成的神经系统病变而引起的无痛性关节病。主要表现为受累关节无痛性的肿胀,活动时伴有骨摩擦音,患肢痛温觉障碍,但触觉和深感觉正常^[15-16]。由于夏科氏关节病患者早期症状不明显,故很少在发病早期得到治疗,多以关节炎就诊于骨科、风湿科^[17]。不具有 OA 患者早期间断性隐痛及关节僵硬的体征及特点。无痛觉保护是夏科氏关节病的主要特征。

本实验动物模型与夏科氏关节病的最大差别在于,前者是关节周围部分感觉的缺失、特别是本体感觉功能缺失;后者是某一局部的痛觉整体缺失。L3、L4 脊神经后根切断后,其前根所支配的大腿肌肌张力及协调运动发生障碍,但关节周围的其余部分感觉仍然可以通过邻近脊神经后根传入,通过脊髓固有束间接完成脊髓反射,通过功能锻炼可以起到一定的代偿作用。虽然这两种感觉障碍均引起关节软骨的退变,但应该是两种不同的病理机制及变化。本体感觉缺失可能是 OA 与夏科氏关节病的重要差别之一。

本实验是在 OA 患者存在本体感觉误差及前期预实验的基础上为进一步验证本体感觉障碍影响关节软骨代谢而设计进行的。由于在脊髓后根中存在多种感觉神经纤维,分离区分脊神经后根纤维成分并选择切断本体感觉纤维存在较高技术困难,也无法避免浅感觉神经纤维的损伤,所以尚不能确定本体感觉在软骨损伤中所承担的比重。通过延长实验时间、运动康复及本体感觉训练,结合损伤侧肌电图及关节软骨变化特点及规律,将有助于对本体感觉在软骨损伤中的作用、关节软骨损伤的病因及机制作出合理的阐述,也会为临床 OA 的预防治疗提供参考和指导。

参考文献:

- [1] Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis[J]. Clin Geriatr Med, 2010, 26(3):355-369.
- [2] Du H, Chen SL, Bao CD, et al. Prevalence and risk factors of knee osteoarthritis in Huang-Pu District, Shanghai, China[J]. Rheumatol Int, 2005, 25(8):585-590.
- [3] 李儒军,林剑浩. 骨关节炎流行病学研究进展[J]. 中国临床医生, 2010, 38(7):6-10.
- [4] Bennell KL, Hinman RS, Metcalf BR, et al. Relationship of knee joint proprioception to pain and disability in individuals with knee osteoarthritis[J]. J Orthop Res, 2003, 21(5):792-797.
- [5] 白海军. 平衡垫训练对女性膝骨关节炎患者膝关节本体感觉影响的研究[J]. 成都体育学院学报, 2012, 38(5):91-94.
- [6] 李宁华. 中老年人群骨关节炎的流行病学特征[J]. 中国临床康复, 2005, 9(38):133-135.
- [7] Aigner T, Söder S, Gebhard PM, et al. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007, 3(7):391-399.
- [8] 王昱. 人原发性膝骨关节炎关节不同部位软骨形态学及组织学的比较研究[D]. 大连医科大学, 2012.
- [9] 陈喜德,魏波,谭宏昌. 骨关节炎关节软骨的代谢及调节的研究现状[J]. 广东医学院学报, 2010, 28(6):691-693.
- [10] Kobayashi M1, Squires GR, Mousa A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(1):128-135.
- [11] 焦士浩,孙康,韩昆,等. 感觉障碍对膝关节软骨退变的影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2014, 50(1):29-30.
- [12] 欧云生,安洪. 鼠骨关节炎动物模型建立的现状[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(1):41-44.
- [13] 曹学成. 大鼠坐骨神经的解剖学研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(4):213-214.
- [14] 钟贵彬,李伟,刘祖德,等. SD 大鼠腰神经根的解剖学观察[J]. 中国临床解剖学杂志, 2011, 29(6):695-697.
- [15] Zwipp H, Rammelt S, Dahlen C, et al. The Charcot joint[J]. Orthopade, 1999, 28(6):550-558.
- [16] 母春华,母光锐. 脊髓空洞症伴夏科氏关节病 3 例[J]. 现代中西医结合杂志, 2000, 9(8):751-752.
- [17] 罗永春,沈春森,秦家振,等. 脊髓空洞—Chiari 复合征致上肢夏科氏关节病诊治体会[J]. 中华神经医学杂志, 2009, 8(7):747-748.

[修回日期]2015-06-12