

• 实验研究 Experiment research •

胶原酶对大鼠脊神经背根神经节神经电位传导的影响

庄文权, 李鹤平, 杨建勇, 陈伟, 黄勇慧, 郭文波

【摘要】 目的 通过神经电位传导速度测定,研究胶原酶对大鼠脊神经背根神经节功能的影响。方法 57 只健康的 Sprague-Dawley 雄性大鼠随机分为正常组、胶原酶急性实验模型组、亚急性实验模型组和慢性实验模型组;急性假手术组、亚急性假手术组和慢性假手术组。分离、暴露实验大鼠左侧腰 5 背根神经节,并在各胶原酶实验模型组局部滴注胶原酶 1 ml(1 200 u/4 ml),各假手术组局部滴注生理盐水 1 ml。分别于注药后 1 h、1 周、30 d 行包含背根神经节的一段神经的神经电位传导速度检测。统计分析采用统计软件 SPSS11.0。结果 各组神经电位传导速度相比较差异均无显著性。结论 临床应用的胶原酶化学髓核溶解术的胶原酶治疗浓度不影响大鼠脊神经背根神经节和传导神经的神经电生理功能。

【关键词】 胶原酶;背根神经节;神经电生理

中图分类号:R688.15 文献标识码:A 文章编号:1008-794X(2006)-06-0364-03

The effect of collagenase on nerve conduction velocity of dorsal root ganglion in rats ZHUANG Wen-quan, LI He-ping, YANG Jian-yong, CHEN Wei, HUANG Yong-hui, GUO Wen-bo. Department of Radiology, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China

【Abstract】 **Objective** To study the functional effects of collagenase on dorsal root ganglion(DRG) in rats by evoked potential conduction velocity measurement. **Methods** A total of 57 male healthy Sprague-Dawley rats were randomized into 7 groups: normal group, acute collagenase group, subacute collagenase group, chronic collagenase group, acute pseudo-operation group, subacute pseudo-operation group, chronic pseudo-operation group. 1200 units of collagenase was reconstituted in 4 ml isotonic saline prior for the experimental application. The left fifth lumbar DRG was exposed in each rat and followed by 1 ml collagenase solution(300 units) dropping on the exposed DRG in collagenase groups; and similarly 1 ml isotonic saline was applied to each of the exposed DRG in pseudo-operation groups. The effects of collagenase on nerve conduction velocity (NCV) were analyzed 1 hour, 1 week or 1 month after the procedure. The statistical analysis was carried out by software SPSS11.0. **Results** The differences of NCV measured by evoked potential method between all groups including the normal group, collagenase groups, and pseudo-operation groups were not significant($P > 0.05$). **Conclusion** The Neuroelectricity physiologic function of dorsal root ganglion and nerve would not be damaged by collagenase used in therapeutic concentration. (J Intervent Radiol, 2006, 15: 364-366)

【Key words】 Collagenase;Dorsal root ganglion;Neuroelectricit physiology

目前对于胶原酶应用于治疗腰椎间盘突出症的安全性仍有不同观点,虽然有实验研究认为胶原酶常规注射剂量(600 ~ 1 200 u)对后纵韧带、硬脊膜不会造成损害^[1],但也有学者对胶原酶溶解术后无效患者进行手术治疗,发现胶原酶对后纵韧带、软骨终板及硬膜外脂肪有破坏作用,可使硬脊膜变

薄^[2,3]。临床上最关心的是胶原酶对注射部位周围的神经是否有损伤(相对而言,神经损伤比肌肉、韧带损伤带来危害更大)。本研究首先建立接近临床胶原酶化学髓核溶解术作用模式的大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)胶原酶作用模型,然后应用神经电生理方法研究胶原酶对大鼠 DRG 功能的影响,探讨胶原酶应用的安全性。

作者单位:510080 广州 中山大学附属第一医院介入放射科

通讯作者:李鹤平

1 材料与方法

57 只健康 Sprague-Dawley 雄性大鼠由中山大学医学实验动物中心提供,体重 220 ~ 260 g。胶原酶由上海乔源生物制药有限公司生产。中山大学中山医学院生理学教研室提供检测神经电生理的相关设备。

实验动物按随机分配原则进行分组。正常组 9 只;胶原酶急性实验模型组 9 只、急性假手术组 10 只;胶原酶亚急性实验模型组 7 只、亚急性假手术组 8 只;胶原酶慢性实验模型组 7 只、慢性假手术组 7 只。“急性”指术后 1 h,“亚急性”指术后 1 周,“慢性”指术后 30 d。“假手术组”指进行相同手术操作但用生理盐水取代胶原酶。

实验动物模型制备参考 Bennelt 等^[4]的方法。大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后,于大鼠背部正中腰 4 ~ 6 椎体部位切开皮肤,分离、暴露腰 5 椎体乳状突、横突和背根神经节,各实验组局部滴注胶原酶 1 ml(1 200 u/4 ml,相当于临床盘外注射法用药浓度),各假手术组局部滴注生理盐水 1 ml。最后,将亚急性组和慢性组大鼠依次缝合肌肉与皮肤。术后腹腔注射青霉素钠 8 万 u 预防感染。

实验动物模型神经传导速度 (nerve conduction velocity, NCV) 的检测(图 1)。大鼠麻醉后,剪去术野鼠毛、消毒,暴露左侧坐骨神经干,将一对刺激电极套在坐骨神经上,并在电极外包绕一层橡胶管使其与周围组织绝缘,拉起皮瓣,缝制油槽,内充以 37℃ 的液体石蜡。沿大鼠背部正中腰 4 ~ 6 椎体部位暴露脊髓,分离腰 5 神经根,将一对记录电极套在腰 5 神经根上,同样在电极外包绕 1 层橡胶管使其与周围组织绝缘,拉起皮瓣,缝制油槽,内充以 37℃ 的液体石蜡。先将刺激电极置于坐骨神经干 A 点,记录电极置于腰 5 神经根 DRG 中枢突段 B 点,刺激并记录 A-B 诱发电位(潜伏期为 L),连续记录 2 次,取其平均值。测量并记录 A 点与 B 点的距离(D),以公式 $NCV = D/L$ 求出神经电位传导速度。

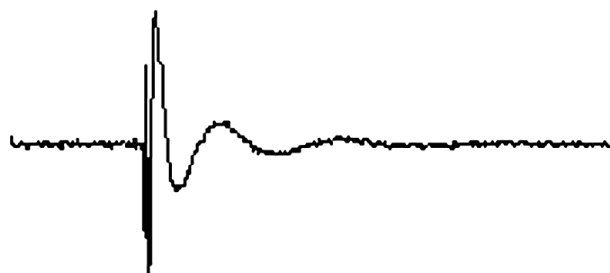


图 1 大鼠坐骨神经的神经传导速度波形图

统计分析方法采用 SPSS11.0 统计软件行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用单因素方差分析,多组均数间差别采用多重比较 Student-Newman-Keuls 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

各组 NCV 检测结果如下(单位为 m/s),正常组、急性实验组、急性假手术组、亚急性实验组、亚急性假手术组、慢性实验组和慢性假手术组分别为 (45.4 ± 10.7) 、 (43.4 ± 5.9) 、 (46.3 ± 6.5) 、 (52.4 ± 10.4) 、 (49.7 ± 8.1) 、 (46.7 ± 11.0) 和 (44.6 ± 6.5) 。经单因素方差分析和均数间差别多重比较统计分析表明,正常组、急性胶原酶实验组、亚急性胶原酶实验组、慢性胶原酶实验组、急性假手术组、亚急性假手术组、慢性假手术组 NCV 相比较差异均无显著性。单因素方差分析的 F 值 = 1.010, P 值 = 0.430, 均数间差别多重比较的 P 值 = 0.366。

3 讨论

Rydevik 等^[1]认为胶原酶对兔胫神经无明显损伤,张德仁等^[5]将胶原酶注入兔脊髓表面,结果有明显损伤,但这两者的胶原酶作用部位均与临床中实际应用作用部位不一致。临床上胶原酶注射部位主要在椎间盘外(目前多采用盘外的硬膜外腔注射胶原酶,注射部位邻近椎间孔),而邻近最重要的神经结构是富含假单极神经元的 DRG, DRG 被认为是与腰痛和根性痛有关的关键结构,有功能性脊柱单位的“大脑”之称^[6]。DRG 的位置并非恒定,它可在椎管内、椎间孔内或椎间孔外,取决于其所在节段水平,但均邻近椎间孔^[7]。许多神经多肽在 DRG 细胞内合成,如果胶原酶对 DRG 有损伤,那将是灾难性的,这有可能直接影响到该项治疗方法的前途。

本研究首先建立接近临床胶原酶化学溶解术作用模式的大鼠 DRG 胶原酶作用模型(急性、亚急性和慢性),然后应用神经电生理(NCV)方法研究胶原酶对大鼠 DRG 功能的影响,进一步探讨胶原酶应用的安全性。神经重要功用体现在传导神经冲动, NCV 正常与否,很大程度上代表了神经功能正常与否。一般而言,在一定条件下,若神经功能在一定程度上受到损害或发生病变,多表现为 NCV 减慢^[8]。所以, NCV 可用来监测 DRG 在胶原酶作用下有无功能损伤、受到损伤的程度以及损伤是否具有可恢复性。

本研究初步结果显示:无论是急性、还是亚急

性、慢性实验,DRG 在胶原酶作用下神经电位传导速度均无明显下降。正常组、急性胶原酶实验组、亚急性胶原酶实验组、慢性胶原酶实验组、急性假手术组、亚急性假手术组、慢性假手术组 NCV 相比较差异均无显著性。本研究结果提示:在胶原酶作用下,大鼠 DRG 功能(NCV)在急性、亚急性和慢性时间点上均未受到损害。这在一定程度上说明,胶原酶作用于 DRG 后未造成对其较大、较严重的有害影响,胶原酶化学溶解术这项治疗方法相对安全。

[参 考 文 献]

- [1] Rydevik B, Brown MD, Ehira T, et al. Effects of collagenase on nerve tissue. An experimental study on acute and long-term effects in rabbits[J]. Spine, 1985, 10: 562 - 566.
- [2] Artigas J. Complications following chemonucleolysis with collagenase[J]. J Neurosurg, 1994, 61: 679 - 681.
- [3] Brock M, Roggendorf W, Gorge HH, et al. Severe local tissue lesions after chemonucleolysis with collagenase[J]. Surg Neurol, 1984, 22: 124 - 131.
- [4] Bennett GL. An animal model of neuropathic pain: a review[J]. Muscle Nerve, 1993, 16: 1040-1043.
- [5] 张德仁,肖礼祖,张 敏,等. 胶原酶溶盘与并发瘫痪可能机制的实验研究[J]. 现代康复, 2001, 5: 38 - 39.
- [6] Weinstein JN. Mechanism of spinal pain. The dorsal root ganglion and its role as a mediator of low back pain [J]. Spine, 1986, 11: 999 - 1002.
- [7] Sato K, Kikuchi S. An anatomic study of foraminal nerve root lesions in the lumbar spine[J]. Spine, 1993, 18: 2246 - 2248.
- [8] Tadie M, Liu S, Robert R, et al. Partial return of motor function in paralyzed legs after surgical bypass of the lesion site by nerve autografts three years after spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2002, 19: 909 - 916.

(收稿日期:2005-09-19)

胶原酶对大鼠脊神经背根神经节神经电位传导的影响

作者: [庄文权](#), [李鹤平](#), [杨建勇](#), [陈伟](#), [黄勇慧](#), [郭文波](#), [ZHUANG Wen-quan](#), [LI He-ping](#), [YANG Jian-yong](#), [CHEN Wei](#), [HUANG Yong-hui](#), [GUO Wen-bo](#)
作者单位: 510080, 广州, 中山大学附属第一医院介入放射科
刊名: [介入放射学杂志](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名: [JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY](#)
年, 卷(期): 2006, 15(6)
被引用次数: 0次

参考文献(8条)

1. Rydevik B, Brown MD, Ehira T Effects of collagenase on nerve tissue. An experimental study on acute and long-term effects in rabbits 1985(10)
2. Artigas J Complications following chemonucleolysis with collagenase 1994
3. Brock M, Roggendorf W, Gorge HH Severe local tissue lesions after chemonucleolysis with collagenase 1984
4. Bennelt GL An animal model of neuropathic pain: a review 1993
5. 张德仁, 肖礼祖, 张敏 胶原酶溶盘与并发瘫痪可能机制的实验研究[期刊论文]-现代康复 2001(05)
6. Weinstein JN Mechanism of spinal pain. The dorsal root ganglion and its role as a mediator of low back pain 1986
7. Sato K, Kikuchi S An anatomic study of foraminal nerve root lesions in the lumbar spine 1993
8. Tadie M, Liu S, Robert R Partial return of motor function in paralyzed legs after surgical bypass of the lesion site by nerve autografts three years after spinal cord injury 2002

相似文献(10条)

1. 期刊论文 [庄文权](#), [李鹤平](#), [杨建勇](#), [陈伟](#), [吴金浪](#), [郭文波](#), [黄勇慧](#), [ZHUANG Wen-quan](#), [LI He-ping](#), [YANG Jian-yong](#), [CHEN Wei](#), [WU Jin-lang](#), [GUO Wen-bo](#), [HUANG Yong-hui](#) 胶原酶对大鼠脊神经背根神经节损伤的病理学研究 - 中山大学学报(医学科学版) 2005, 26(4)

[目的]通过病理学方法研究胶原酶对大鼠脊神经背根神经节的损伤情况。[方法]57只健康的Sprague-Dawley雄性大鼠分为正常对照组;急性胶原酶手术组、亚急性胶原酶手术组和慢性胶原酶手术组;急性生理盐水手术组、亚急性生理盐水手术组和慢性生理盐水手术组。暴露大鼠左侧腰5背根神经节,并在各胶原酶手术组局部滴注胶原酶1 mL(300 U),各生理盐水手术组局部滴注生理盐水1 mL。分别于注药后1 h、1周、30 d处死动物并取包含背根神经节的一段神经做病理学检测。[结果]光镜下各组背根神经节的细胞数、胞膜、胞浆、胞核形态和细胞间神经纤维、血管相比较均无明显变化和差别。透射电镜下各组背根神经节的细胞数、细胞大体形态、胞膜和节内神经纤维相比较均无明显变化和差别,但胶原酶手术组背根神经节细胞胞内细胞器超微结构与正常对照组和相应生理盐水手术组比较有差别,表现为核仁部分偏向一侧、线粒体大量肿胀,部分嵴断裂和空泡形成。光镜病理和透射电镜均未见节细胞成群细胞坏死、细胞膜早期破裂和凋亡小体形成。[结论]临床应用的胶原酶化学髓核溶解术的胶原酶治疗浓度对大鼠脊神经背根神经节细胞有损伤作用。在临床工作中一定要慎重使用胶原酶的用药剂量和浓度,才能提高胶原酶应用的安全性。

2. 学位论文 [李鹤平](#) 诱发电位在腰椎间盘突出症介入治疗中应用的基础及临床研究 2003

目的:1、研究胶原酶对大鼠脊神经背根神经节(Dorsal Root Ganglion, DRG)功能和形态(宏观和微观)的影响(包括急性、亚急性和慢性的影响),以期探讨胶原酶应用的安全性,进一步论证经皮椎间盘胶原酶化学髓核溶解术(Percutaneous Collagenase Chemonucleolysis, PCCN)这项治疗方法的安全性。2、研究腰椎间盘突出症(Lumbosacral disc herniation, LDH)患者行PCCN前后L5和S1的皮节体感诱发电位(Dermatome Somatosensory Evoked Potential, DSEP)的改变,初步探讨DSEP在PCCN术前判断神经根功能受损程度和术后神经根功能改善程度及协助判断PCCN疗效中的作用,并研究经皮椎间盘胶原酶化学髓核溶解术对人体神经系统、主要是对脊神经根的安全性。3、研究LDH患者行经皮椎间盘髓核切除术(Percutaneous Lumbar Discectomy, PLD)前后L5和S1的DSEP的变化,初步探讨DSEP在PLD术前判断神经根功能受损程度和术后神经根功能改善程度及协助判断PLD疗效的作用。结论:PLD术后多数患者临床症状体征好转,但1个月后复查MRI或CT表现无明显改变,而DSEP提示神经根功能受损情况大部分获得明显好转,由此可以推断,PLD治疗腰椎间盘突出症的机理可能主要是降低椎间盘内的压力,而非使突出的髓核得到回纳。

3. 期刊论文 [郭文波](#), [黄勇慧](#), [杨建勇](#), [GUO Wen-bo](#), [HUANG Yong-hui](#), [YANG Jian-yong](#) 治疗浓度和剂量胶原酶对大鼠脊神经背根神经节安全性的病理研究 - 中华神经医学杂志 2008, 7(11)

目的 从病理学角度阐述胶原酶化学髓核溶解术中治疗浓度和剂量胶原酶对大鼠脊神经背根神经节的安全性。方法 对57只Sprague-Dawley雄性大鼠按随机配伍原则进行分组,分别为正常对照组(n=9);胶原酶手术急性损伤组(n=9)、亚急性损伤组(m=10)和慢性损伤组(n=7);生理盐水手术急性损伤组(n=7)、亚急性损伤组(n=8)和慢性损伤组(n=7)。手术暴露大鼠左侧腰5背根神经节,分别在胶原酶手术各组局部滴注胶原酶1 mL(1200 U/4 mL),生理盐水手术各组局部滴注生理盐水1 mL。分别于注药后1 h、7 d、30 d取包含背根神经节的一段神经做病理光镜和透射电子显微镜检测,比较各组的病理改变。结果 光镜下各组背根神经节的细胞数、胞膜、胞浆、胞核形态和细胞间神经纤维、血管均无明显变化和差别。透射电镜下各组背根神经节的细胞数、细胞大体形态、胞膜和节内神经纤维亦无明显变化和差别,但胶原酶手术各组背根神经节细胞胞内细胞器超微结构与正常对照组和相应生理盐水手术各组比较有差别,表现为核仁部分偏向一侧、大量线粒体肿胀、部分嵴断裂和空泡形成。病理光镜和透射电镜均未见节细胞成群细胞坏死、细胞膜早期破裂和凋亡小体形成。结论 胶原酶化学髓核溶解术中治疗浓度和剂量胶原酶对大鼠脊神经背根神经节细胞有一定的损伤,应慎重选择胶原酶的用药剂量和浓度,提高胶原酶临床应用的安全性。

4. 学位论文 [张挺杰](#) 椎间盘源性疼痛的机制研究;曲马多应用于CCI大鼠的基础研究 2006

本研究分为五部分:

第一部分硬膜外腔植入异体髓核和纤维环对大鼠痛阈的影响

目的:观察硬膜外腔注入异体髓核和纤维环对大鼠痛阈的影响,以期对椎间盘源性疼痛提供理论依据。

方法:选择SD雄性大鼠24只,随机分为4组,假手术组、脂肪组、髓核组和纤维环组,每组6只。另外9只雄性SD大鼠用来提供异体脂肪、髓核和纤维环。假手术组硬膜外腔无植入脂肪,脂肪组植入异体大鼠腹膜外脂肪(约4mg),髓核组硬膜外腔植入尾椎髓核(约3.0~4.0mg),纤维环组硬膜外腔植入尾椎纤维环(约3.0~4.0mg)。在术前、术后3、7、15、30d分别测定鼠尾对经皮电刺激(观察引起大鼠甩尾时的电流大小,即电刺激甩尾阈值)、温度刺激(观察自浸入至出现甩尾的同期,即温度刺激甩尾潜伏期)及机械刺激(观察引起甩尾时的砝码重量总和,即机械刺激甩尾阈值)的反应。

结果:术后假手术组和脂肪组大鼠对经皮电刺激、温度刺激及机械刺激的痛阈与术前比较差异无显著性(P>0.05);而髓核组和纤维环组在硬膜外腔植入异体髓核7天后对经皮电刺激、机械刺激和温度刺激均表现为痛觉过敏(P<0.05)。

结论:大鼠硬膜外腔注入异体髓核和纤维环组织可造成大鼠痛觉过敏,这可能是椎间盘突出引起根性神经痛的原因之一。

第二部分胶原酶对大鼠硬膜外腔植入髓核所致痛觉过敏的影响

目的:观察胶原酶对硬膜外腔髓核植入引起大鼠痛觉过敏的影响,为胶原酶治疗椎间盘源性疼痛提供依据。

方法:18只雄性SD大鼠(体重260~280g)随机分为脂肪+胶原酶(FE)组、髓核+生理盐水(NS)组和髓核+胶原酶(NE)组(每组n=6)。

所有大鼠在水合氯醛腹腔注射麻醉下于L6-S1间隙手术暴露硬膜外腔,FE组植入异体脂肪(约3~4mg)+胶原酶(20 μL, 125万u/ml),NS组植入异体髓核(约3~4mg)+生理盐水(20 μL),NE组植入异体髓核(约3~4mg)+胶原酶(20 μL, 125万u/ml)。异体脂肪和髓核由另外9只雄性SD大鼠获得。

在手术前、术后第7天、术后第15天及术后第30天分别测定鼠尾对伤害性电刺激、温度刺激及机械刺激的反应。

结果:FE组和NE组大鼠术后不同时间对各种伤害性刺激的反应与术前相比没有显著性差异(p>0.05),而NS组大鼠术后7天至30天对各种伤害性刺激的反应与术前相比显著增强

($p < 0.05$)。

结论: 胶原酶可以消除硬膜外腔植入髓核诱发的痛觉过敏。

第三部分硬膜外腔植入髓核对大鼠脊髓背根神经节SP和ICGRP表达的影响

目的: 观察硬膜外腔植入异体髓核对大鼠L6-S1脊髓背根神经节细胞SP和ICGRP表达的影响, 以期为椎间盘源性疼痛发病机制提供细胞生物学基础。

方法: 24只雄性SD大鼠(体重260-280g)随机分为四组: 脂肪+生理盐水组(FS组)、脂肪+胶原酶组(FE)、髓核+生理盐水组(NS)、髓核+胶原酶组(NE组), 每组n=6。术后第30天取L6-S1脊髓背根神经节, 采用免疫组织化学染色方法观察髓核对背根神经节细胞肽类神经递质SP和ICGRP表达的影响。

结果: 术后30天FE组大鼠与FS组相比, 背根神经节细胞SP和ICGRP表达没有显著性差异($p > 0.05$); NS组与FE组相比背根神经节细胞SP和ICGRP表达显著增加($p < 0.05$); NE组与NS组相比背根神经节细胞SP和ICGRP表达显著降低($p < 0.05$), 接近于NS组水平($p > 0.05$)。

结论: 硬膜外腔植入异体髓核可引起背根神经节细胞SP和ICGRP表达增加。

第四部分硬膜外腔植入髓核对大鼠脊髓背根神经节TNF- α 和IL-1表达的影响

目的: 观察硬膜外腔植入异体髓核对大鼠L6-S1脊髓背根神经节细胞TNF- α 和IL-1表达的影响, 以期为椎间盘源性疼痛发病机制提供细胞生物学基础。

方法: 24只雄性SD大鼠(体重260-280g)随机分为四组: 脂肪+生理盐水组(FS组)、脂肪+胶原酶组(FE)、髓核+生理盐水组(NS)、髓核+胶原酶组(NE组), 每组n=6。术后第30天取L6-S1脊髓背根神经节, 采用免疫组织化学染色方法观察髓核对背根神经节细胞炎性介质TNF- α 和IL-1表达的影响。

结果: 术后30天FE组大鼠与FS组相比, 背根神经节细胞TNF- α 表达没有显著性差异($p > 0.05$); NS组与FE组相比背根神经节细胞TNF- α 表达显著增加($p < 0.05$); NE组与NS组相比背根神经节细胞TNF- α 表达显著降低($p < 0.05$), 接近于FS组水平($p > 0.05$)。IL-1在各组大鼠背根神经节中未染色。

结论: 硬膜外腔植入异体髓核可引起背根神经节细胞TNF- α 表达增加。

第五部分: 曲马多应用于CCI大鼠的基础研究

目的: 观察不同剂量曲马多灌胃对坐骨神经结扎(CCI)大鼠机械性痛敏、背根神经节细胞SP和ICGRP表达以及胃酸PH和胃窦部粘膜结构的影响。

方法: 22只雄性SD大鼠(weigh240-260g), 参照Bennett和Xie方法结扎右侧坐骨神经主干建立CCI(Thechronicconstrictioninjuryofthesciaticnerve)模型, 随机分为生理盐水组(n=6)、曲马多1mg/kg组(n=8)和曲马多4mg/kg组(n=8)。自术后第8天分别给予曲马多1mg/kg、4mg/kg和生理盐水灌胃, 每日两次, 共7天。采用VonFrey触针观察灌胃前后大鼠后肢足底对机械性刺激的反应、免疫组化法测定L4-5脊髓背根神经节细胞SP和ICGRP表达, 并观察胃酸PH值和胃窦部粘膜结构变化。

结果: 1. 曲马多对大鼠后肢足底VonFrey触针机械性刺激反应的影响灌胃前、灌胃第3天和第7天, 三组大鼠右后肢足底对VonFrey触针诱发的回缩阈值(PawWithdrawlMechanicalThreshold, PWMT)与左侧相比显著降低($p < 0.05$); 在灌胃第3天和第7天, 曲马多1mg/kg组和曲马多4mg/kg组右后肢PWMT与生理盐水组相比显著增加, 且呈现剂量依赖效应($p < 0.05$)。

2. 曲马多对背根神经节细胞SP和ICGRP表达的影响灌胃第7天, 三组大鼠右侧L4-5背根神经节细胞SP和ICGRP表达与左侧相比显著增加($p < 0.05$); 曲马多1mg/kg组和曲马多4mg/kg组右侧L4-5背根神经节细胞SP和ICGRP表达与生理盐水组相比显著降低, 且以曲马多4mg/kg组降低为著, 呈现明显的剂量依赖效应($p < 0.05$)。

3. 曲马多对背根神经节细胞尼氏小体的影响灌胃第7天生理盐水组右侧L4-5脊髓背根神经节尼氏小体与左侧相比显著减少($p < 0.05$); 曲马多1mg/kg组右侧L4-5脊髓背根神经节尼氏小体与生理盐水组相比显著增加($p < 0.05$), 但与左侧相比仍存在显著性差异($p < 0.05$); 曲马多4mg/kg组右侧L4-5背根神经节尼氏小体与曲马多1mg/kg组相比显著增加($p < 0.05$), 达到左侧水平($p > 0.05$)。

4. 曲马多对胃酸PH值和胃窦部粘膜结构的影响各组灌胃前和灌胃后第3天和第7天胃酸PH值与灌胃前相比显著升高($p < 0.05$)。灌胃第7天, 肉眼观三组大鼠胃窦部粘膜未见溃疡和出血, 病理切片观胃窦粘膜结构完整, 粘膜腺体排列整齐, 未见明显的炎性细胞浸润。

结论: 曲马多灌胃给药能够显著降低CCI大鼠机械性痛敏, 减少L4-5脊髓背根神经节SP和ICGRP表达, 且具有剂量依赖效应; 曲马多灌胃给药提高胃酸PH值, 而对胃窦部粘膜形态无明显影响。

5. 期刊论文 李鹤平. 庄文权. 杨建勇. 陈伟. 胶原酶对大鼠背根神经节亚急性损伤的病理研究 -影像诊断与介入放射学2005, 14 (3)

目的: 研究胶原酶对大鼠脊神经背根神经节(DRG)超微结构亚急性损伤的影响, 以期探讨胶原酶应用的安全性, 进一步论证经皮椎间盘胶原酶化学髓核溶解术(PCCN)这项治疗方法的安全性。方法: SD健康雄性大鼠27只, 按随机配伍原则进行分组: 正常组9只; DRG胶原酶亚急性实验模型组9只、亚急性假手术组9只。各组大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后, 分离并辨认DRG, 实验组局部滴注胶原酶1ml(1200单位/4 ml), 假手术组局部滴注生理盐水1 ml。于给药后7~9 d行DRG超微结构的电镜检测。结果: 实验组背根神经节观测细胞种类、细胞数量、细胞大体形态、胞膜情况、节内神经纤维情况(有髓神经纤维有肿胀、脱髓鞘、髓鞘松散等改变)、血管等情况与正常组、假手术组比较均无明显变化和差别。实验组背根神经节超微结构与正常组、相应假手术组比较均有明显变化和差别: ①核仁部分偏向一侧; ②线粒体大量肿胀, 部分嵴断裂、空泡形成。各组均未见节细胞成群细胞坏死、细胞膜早期破裂、凋亡小体形成等节细胞凋亡相关表现和节细胞坏死相关表现。结论: 临床应用于PCCN治疗浓度的胶原酶对背根神经节细胞是有损伤的。要慎用胶原酶的用量和浓度, 使胶原酶作用于精确合适的部位, 提高胶原酶应用安全性。

6. 期刊论文 李鹤平. 庄文权. 杨建勇. 陈伟. Li He-ping. Zhuang Wen-quan. Yang Jian-yong. Chen Wei 胶原蛋白水解酶对背根神经节细胞亚细胞结构急性损伤的实验 -中国临床康复2005, 9 (38)

目的: 观察胶原蛋白水解酶(胶原酶)对大鼠脊神经背根神经节细胞亚细胞结构急性损伤的影响, 以期探讨胶原酶应用的安全性, 并进一步论证经皮椎间盘胶原蛋白水解酶化学髓核溶解术(胶原酶髓核溶解术)治疗方法的安全性。方法: 实验于2002-07/09在中山大学基础医学院完成。SD健康雄性大鼠28只, 随机分为3组: 正常组9只; 胶原酶急性实验组9只、急性假手术组10只。急性实验组和急性假手术组大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后, 分离并辨认大鼠背根神经节, 实验组局部滴注胶原酶1 mL(4 mL含1200 U), 急性假手术组局部滴注生理盐水1mL。于给药后1 h行各组大鼠背根神经节细胞亚细胞结构的电镜检测。结果: 各组大鼠背根神经节的神经元胞体、节内神经纤维检测结果: 急性实验组背根神经节观测细胞种类、细胞数量、细胞大体形态、胞膜情况、节内神经纤维情况(有髓神经纤维有肿胀、脱髓鞘、髓鞘松散等改变)、血管等情况与正常组、急性假手术组比较均无明显变化和差别。急性实验组背根神经节细胞亚细胞结构与正常组和急性假手术组比较均有明显变化和差别: ①核仁部分偏向一侧。②线粒体大量肿胀, 部分嵴断裂、空泡形成。各组均未见节细胞成群细胞坏死、细胞膜早期破裂、凋亡小体形成等节细胞凋亡相关表现和节细胞坏死相关表现。结论: 临床应用于胶原酶髓核溶解术治疗浓度的胶原酶对背根神经节细胞是有损伤的。掌握胶原酶的用量和浓度, 使胶原酶作用于精确合适的部位, 才能提高胶原酶应用的安全性。

7. 学位论文 左娟 胶原酶对椎间盘源性神经根慢性损伤后nNOS基因表达的影响 2008

目的: 研究椎间盘源性神经根慢性损伤后, 椎管内应用胶原酶对腰神经根细胞nNOS基因表达的影响, 完善神经微创介入治疗机理, 为临床微创介入治疗提供指导依据。

方法: 雌性新西兰大白兔24只(体重2.5~3kg), 按照随机原则分为四组: 正常组(n=6), A对照组(n=6), B胶原酶组(n=6), C胶原酶及糖皮质激素组(n=6)。A、B、C三组各六只家兔人工建立椎间盘源性神经根慢性损伤模型, 取尾髓内自体髓核组织溶于生理盐水中制成悬液备用; L5-L7水平硬膜外腔置入硬膜外导管, 将溶于髓核组织的生理盐水悬液缓慢注入硬膜外腔。一周后仍沿原入路暴露出留置的硬膜外导管, B组硬膜外腔给与生理盐水溶解的胶原酶150U, C组硬膜外腔给与糖皮质激素(地塞米松5mg)及胶原酶150U, A组硬膜外腔给与生理盐水做对照。治疗一周取L5背根神经节及部分脊髓分别进行免疫组织化学染色, 镜检并进行图像分析。各组随机抽取一只家兔行电镜检查, 观察组织微观变化。

结果:

(1) 胶原酶对家兔脊髓背角nNOS表达的影响对照组、胶原酶地塞米松组的nNOS表达的平均光密度值(OD)均明显低于正常组($P < 0.01$)。胶原酶组nNOS表达的平均光密度值(OD)与正常组的差异无统计学意义。胶原酶组的nNOS表达的平均光密度值(OD)明显高于对照组($P < 0.01$)。胶原酶地塞米松组平均光密度值(OD)与对照组的差异无统计学意义。

(2) 家兔背根神经节和脊髓背角电镜超微结构变化: 对照组背根神经节细胞内可见胞浆溶酶体轻度增多, 线粒体肿胀, 线粒体嵴断裂, 髓鞘板层松散; 脊髓可见星形细胞局灶性增多, 髓鞘板层松散、轴索空化, 溶酶体轻度增多。胶原酶组和胶原酶地塞米松组髓鞘板层轻微松散, 未见明显的溶酶体增多现象。脊髓星形细胞基本正常, 可见部分局灶性增多。

结论: 1、椎间盘源性神经根慢性损伤时, 脊髓背角nNOS表达减少。

2、硬膜外腔应用注射用胶原酶可以使家兔神经根慢性损伤后脊髓背角降低的nNOS基因表达升高。

3、硬膜外腔应用注射用胶原酶时脊髓背角nNOS表达向正常水平方向改变。

4、硬膜外腔应用注射用胶原酶和地塞米松混合液对脊髓背角nNOS表达无明显影响。

5、上调椎间盘源性神经根慢性损伤后nNOS表达水平可能是家兔硬膜外腔应用胶原酶治疗椎间盘源性神经痛的又一作用机制。

8. 期刊论文 李鹤平. 庄文权. 杨建勇. 陈伟. Li He-ping. Zhuang Wen-quan. Yang Jian-yong. Chen Wei 应用诱发电位测定胶原酶对大鼠脊神经传导速度的影响 -中国临床康复2006, 10 (21)

背景: 目前对于胶原酶应用的安全性仍有不同观点, 有学者认为胶原酶可能会对周围组织产生损伤。临床最关心的是胶原酶对注射部位周围的神经是否有损伤。目的: 应用诱发电位方法观察胶原酶对大鼠脊神经传导速度的影响, 以期评估胶原酶应用的安全性, 进一步论证经皮椎间盘胶原酶化学髓核溶解术这项治疗方法的安全性。设计: 随机分组设计、动物实验。单位: 中山大学附属第一医院介入放射科。材料: 实验于2002-07/09在中山大学基础医学院完成。选择SD雄性大鼠57只, 随机分为正常组9只、急性假手术组10只、亚急性假手术组8只、慢性假手术组7只、急性实验模型组9只、亚急性实验模型组7只、慢性实验模型组7只。方法: 各组大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后, 分离并辨认大鼠背根神经节, 实验组局部滴注胶原酶1 mL(300 U/mL), 假手术组局部滴注生理盐水1 mL。将刺激电极置于坐骨神经干A点, 记录电极置于L5神经根背根神经节中极突段B点, 刺激并记录诱发电位A、B(潜伏期), 连续记录2次, 取其平均值; 测量并记录A点与B点的距离。神经电位传导速度=A点与B点距离/潜伏期。急性组给药后1 h、亚急性组给药后1周、慢性组给药后1个月行包含背根神经节的一段神经的诱发电位检测。主要观察指标: 各组神经电位传导速度。结果: 纳入动物57只, 均进入结果分析。正常组、急性实验组、急性假手术组、亚急性实验组、亚急性假手术组、慢性实验组、慢性假手术组神经电位传导速度分别为(45.4 \pm 10.7), (43.4 \pm 5.9), (46.3 \pm 6.5), (52.4 \pm 10.4), (49.7 \pm 8.1), (46.7 \pm 11.0), (44.6 \pm 6.5)m/s。经单因素方差分析, 各组的神经电位传导速度整体比较差异无显著性($F=1.010$, $P=0.430$); 经两两间差别多重比较, 各组的神经电位传导速度两两比较差异无显著性($P=0.366$)。结论: 临床应用于经皮椎间盘胶原酶化学髓核溶解术治疗浓度的胶原酶对大鼠脊神经传导速度未产生明显的影响, 经皮椎间盘胶原酶化学髓核溶解术这项治疗方法在一定程度上有着相对的安全性。

9. 期刊论文 张挺杰. 倪家骧. 张春雷. 李娟红. 于翠萍 硬膜外腔植入髓核对大鼠脊髓背根神经节TNF- α 和IL-1表达的影响 -中国康复医学杂志2007, 22 (10)

目的:观察硬膜外腔植入异体髓核对大鼠L6-S1脊髓背根神经节细胞TNF- α 和IL-1表达的影响,以期为椎间盘源性疼痛发病机制提供细胞生物学基础。方法:雄性SD大鼠(体重260-280g)随机分为4组:脂肪+生理盐水组(FS组)、脂肪+胶原酶组(FE)、髓核+生理盐水组(NS)、髓核+胶原酶组(NE组),每组6只。术后第15天取L6-S1脊髓背根神经节,采用免疫组织化学染色方法观察髓核对背根神经节细胞炎性介质TNF- α 和IL-1表达的影响。结果:术后15天FE组大鼠与FS组相比,背根神经节细胞TNF- α 表达差异没有显著性意义($P>0.05$);NS组与FE组相比背根神经节细胞TNF- α 表达显著增加($P<0.05$);NE组与NS组相比背根神经节细胞TNF- α 表达显著降低($P<0.05$),接近于FS组水平($P>0.05$)。IL-1在各组大鼠背根神经节中未染色。结论:硬膜外腔植入异体髓核可引起背根神经节细胞TNF- α 表达增加。

10. 学位论文 [马雪莲 CRD诱发大鼠DRG神经元高敏感性的发生机制及乳酸杆菌的干预作用](#) 2009

内脏痛是许多胃肠道疾病最常见的症状之一,但其发生机制还不清楚。目前认为,内脏异常疼痛的产生主要归结为外周敏感化和中枢敏化。各种原因引起的内脏组织和初级传入神经元的敏化可以诱导和易化中枢敏化,所以了解初级神经元敏化的机制,探索降低其兴奋性的方法对于预痛觉信号的传导、控制疼痛具有重要意义。

内脏感觉主要通过结状神经节与脊髓背根神经节(dorsal root ganlia, DRG)传入到次级感觉神经元,其中一般的内脏感觉主要通过结状神经节传导,而痛觉主要通过DRG神经元传导。按其直径不同,DRG神经元可以分为大型神经元(39-50 μ m)、中型神经元(33-38 μ m)和小型神经元(19-27 μ m)三类。其中,中、小型神经元主要发出细髓的A δ 纤维和无髓的C类纤维,传递伤害性感觉,与痛觉产生密切相关。因此,DRG中的中小神经元是内脏痛觉信号传导与调控的初级靶点。

电压依赖性钠通道决定神经细胞动作电位的产生和传导,它的改变对于神经元的兴奋性具有重要的影响。钠通道由一个 α 亚单位和两个 β 亚单位组成。目前已经克隆出九种 α 亚单位,并据此将电压依赖性钠通道分为9种类型,即Nav1.1-Nav1.9。根据其对河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)的敏感性又可分为河豚毒素敏感(TTX-sensitive, TTX-S)和河豚毒素不敏感(TTX-resistant, TTX-R)两种类型。其中,Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.6和Nav1.7属于TTX-S钠通道,而Nav1.5、Nav1.8和Nav1.9属于TTX-R钠通道。Nav1.3、Nav1.7、Nav1.8和Nav1.9参与痛觉信号的调控。一些诱发疼痛的病理性因素影响DRG细胞中钠通道的表达和功能,改变DRG细胞的兴奋性。

BDNF(brain-derived neurotrophic factor)是一种神经营养因子,广泛存在于中枢与外周神经系统中。以往的研究认为,BDNF的主要作用是调节突触的可塑性和神经递质的释放,参与学习和记忆过程。但近来越来越多研究发现,BDNF也参与对痛觉传导的调控。在脊髓中,BDNF由DRG细胞合成后被运输到中枢端,在脊髓后角释放,与第二级感觉神经元上的Trk B受体结合,调节突触传递和脊髓痛觉的传导,导致中枢神经元兴奋性的改变。BDNF还可以通过自分泌和旁分泌的方式调节DRG神经元的兴奋性。

肠道益生菌是与人类共生的、具有治疗或保健作用的细菌,主要包括乳酸杆菌(Lactobacillus reuteri)和双歧杆菌。它们能够调节炎症引起的肠道敏感性的改变,调节肠道内在感觉神经元的兴奋性,对一些肠道疾病包括肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)和炎症性肠道疾病等所引起的腹部不适症状具有明显的改善作用。

由于重复的结肠扩张刺激(colorectal distention, CRD)能够诱导内脏高敏感性,本课题研究该模型大鼠DRG神经元兴奋性的改变及其机制,探讨钠通道和BDNF在DRG兴奋性改变中所起的作用,并进一步研究乳酸杆菌对DRG兴奋性改变的调节作用及其相关机制。本课题将揭示DRG神经元兴奋性的改变在内脏高敏感性发生中的作用,并为寻找新的镇痛药物提供依据。

[研究目的]

- 1探讨CRD对大鼠远端结肠DRG神经元兴奋性的影响。
- 2探讨CRD后大鼠DRG神经元电压依赖性钠通道表达和功能是否发生改变。
- 3研究CRD对大鼠DRG神经元BDNF表达的影响及外源性BDNF在CRD致大鼠DRG神经元敏化过程中所起的作用。
- 4探讨乳酸杆菌对CRD后大鼠DRG神经元敏感性的影响及其机制。

[研究方法和结果]

1结直肠扩张内脏痛模型的建立

1.1 DRG神经元的逆行标记

健康雄性SD大鼠,腹腔注射麻醉,打开腹腔,找到结肠远端,向结肠壁注射1, 1-diiododecyl-3-3-3-tetramethylindocarbocyanine(DiI, 5mg/ml),注射6到10个点(1.0 μ l/injection),缝合腹壁。

1.2 CRD内脏痛模型的建立

注射DiI两周后,大鼠腹腔内注射氯胺酮(75mg/kg)与甲苯噻嗪(10mg/g)

麻醉,利用Barostat system(Distender, G & J Electronic Inc)给予1小时重复的CRD刺激(80 mm Hg, 30s on, 30 s off),对照组只给予氯胺酮与甲苯噻嗪腹腔注射麻醉,不给予CRD刺激。

2扩张肠段MPO活性检测

大鼠处死后,取扩张的远端结肠段,根据试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书检测单位结肠重量中MPO的活性。结果显示,同no CRD组相比,在分别给予CRD后1h、3h、6h、12h、24h,其MPO活性未见明显增加。

3 RT-PCR检测CRD后不同时间段DRG中BDNF mRNA含量的表达

提取DRG中mRNA,检测发现在CRD后3h、6h、12h、24h,DRG中的BDNF mRNA含量明显增高。

4 ELISA检测CRD后不同时间段DRG中BDNF蛋白含量的变化

提取DRG中蛋白,检测发现同正常DRG相比,CRD后1h、3h、6h、12h、24h,DRG中BDNF蛋白含量明显增高。

5 DRG细胞的培养

给予CRD刺激之后,立刻颈椎脱臼牺牲大鼠,取出腰骶段脊柱,取出两边的DRG;置于Krebs溶液;加入胶原酶I(1mg/ml)和胰酶(0.25%),37℃消化50min,接种于包被了PLL的35mm培养皿中,37℃,5%CO₂,95%O₂培养过夜。

6膜片钳记录

6.1 CRD细胞自发放电

在电流钳模式下,I=0,记录细胞自发放电的情况。结果发现,no CRD组,自发放电的细胞占7.3%;CRD组自发放电细胞数量有所增加占9.4%,两者未见显著性差异。

6.2 CRD刺激之后动作电位的产生和各项指标的检测

记录刺激动作电位产生所需要的基强度和2倍、3倍基强度刺激产生动作电位的数量。结果显示,在给予1h重复CRD刺激后,DRG神经元产生动作电位基强度降低,2倍、3倍基强度刺激诱发DRG神经元产生动作电位的数量增多,说明CRD后DRG神经元的兴奋性明显增高。

6.3 CRD对大鼠DRG神经元钠电流的影响

电极电阻控制在2~4 M Ω ，所有的钠电流在细胞成为全细胞之后5分钟进行记录，串联电阻被补偿85~90%。分别记录no CRD组和CRD组大鼠DRG细胞钠通道的激活、失活及复活电流的变化。结果发现，在CRD后，大鼠DRG细胞上TTX-S和slow TTX-R钠通道的激活和复活过程没有发生明显的改变，而其失活曲线向去极化方向移动，表明其失活电压依赖性发生改变。

6.4 BDNF对正常及CRD大鼠DRG神经元兴奋性的影响

研究发现，no CRD组在加入5ng/ml BDNF 5min后，DRG动作电位阈值及动作电位的产生频率都未见变化，而幅值、去极化的速率明显下降；在CRD组中神经元加入同样剂量的BDNF后，DRG神经元动作电位的阈值明显升高，给予3倍基强度刺激诱发DRG神经元产生动作电位的数量减少。说明BDNF下调CRD后DRG神经元的敏感性。

6.5 乳酸杆菌对正常及CRD大鼠DRG神经元敏感性的影响。

用乳酸杆菌(5 \times 10⁹CFU/ml)连续灌胃对正常大鼠DRG神经元的电生理特性没有影响，但明显升高CRD后DRG神经元动作电位产生的基强度，降低动作电位的去极化速率及产生频率，说明乳酸杆菌下调CRD后DRG神经元的兴奋性。

[结论]

1远端结肠受到80mmHg的CRD刺激1h后，可以引起相应节段DRG细胞兴奋性明显增加。

2 CRD后DRG神经元电压依赖性钠通道失活动力学发生改变，这可能是CRD导致DRG细胞高敏感性的发生的原因之一。

3内源性BDNF可能下调CRD后DRG神经元的兴奋性。

4乳酸杆菌抑制CRD引起的DRG神经元的敏感化，对内脏痛具有潜在的治疗作用。

关键词：BDNF；乳酸杆菌；电压依赖性钠通道；内脏痛；脊髓背根神经节

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200606014.aspx

授权使用：qkxb11(qkxb11)，授权号：bc750ba8-6b0c-4098-b4ba-9e1f00078031

下载时间：2010年10月30日