

# 腰痛宁对腰椎间盘突出症模型大鼠 神经根损伤的保护作用

李晨光 崔学军 侯莉娟 王拥军

(上海中医药大学附属龙华医院脊柱病研究所, 上海市宛平南路 725 号, 200032)

**[摘要]** **目的** 探讨腰痛宁对腰椎间盘突出症模型大鼠的治疗作用及其可能机制。**方法** 36 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和腰痛宁组, 每组 12 只。利用硅胶片压迫 L<sup>5</sup> 神经根建立大鼠腰椎间盘突出症动物模型, 运用组织形态学和分子生物学技术观察腰痛宁对神经根的影响及神经生长因子 (NGF) 表达的变化。**结果** 模型组大鼠运动功能障碍, 神经根处神经纤维、卫星细胞以及神经元细胞的显微结构发生了改变; 神经根和比目鱼肌组织 NGF 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。腰痛宁组大鼠运动功能明显改善, 神经根处髓鞘和神经元细胞的显微结构完整; 与模型组比较, NGF 表达差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论** 腰痛宁可以改善腰椎间盘突出症动物模型的运动功能障碍, 其机理可能是抑制神经根损伤后局部 NGF 的高表达, 促进其支配的靶器官 NGF 表达。

**[关键词]** 腰椎间盘突出症; 神经生长因子; 组织形态学; 腰痛宁

## Protective Effect of Yaotongning on Nerve Root Injury in Lumbar Intervertebral Disc Protrusion Model Rats

LI Chenguang, CUI Xuejun, HOU Lijuan, et al.

(Longhua Hospital, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200032)

**ABSTRACT** **Objective** To study the effect and mechanism of Yaotongning (Capsule for relieving the pain in the lumbus) on lumbar intervertebral disc protrusion. **Methods** Totally 36 SD rats were randomized into sham operation group, model group and Yaotongning group with 12 in each. The silica gel film was used to press L<sup>5</sup> nerve root to establish the models. The morphological changes of the nerve roots and the expressive changes of nerve growth factor (NGF) were observed. **Results** In the model group, there appeared the dyskinesia and the structural changes of nerve fibers of nerve roots, satellite cells, and neuron cells, and the NGF expression of nerve roots and soleus muscle was significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). In the Yaotongning group, the motor function was significantly improved, the structures of medullary sheath of nerve root and neuron cells were intact, compared with the model group, the difference in NGF expression was significant ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Yaotongning relieves the motor dysfunction in rats with lumbar intervertebral disc protrusion. The mechanism may be inhibiting the NGF expression to repair the injured nerve roots. **Key Words** Lumbar intervertebral disc protrusion; Nerve growth factor (NGF); Morphology; Yaotongning (Capsule for relieving the pain in the lumbus)

腰椎间盘突出症是中医骨伤科临床最常见的病种, 约占骨伤科门诊的 10%~15%<sup>[1]</sup>。据报道, 90% 的腰椎间盘突出症伴有不同程度的神经根或支配区域周围神经的损伤, 引起腰腿痛和神经功能障碍<sup>[2]</sup>。寻找促进神经根损伤后神经修复与再生的有效治疗措施, 是当今该领域的研究热点。中药复方制剂腰痛宁具有化痰通络、消肿止痛的作用<sup>[3-4]</sup>。本研究在建立大鼠腰神经根压迫模型基础上, 运用组织形态学和分子生物学等技术方法, 研究腰痛宁对腰神经根压迫性损伤后神经修复、再生的作用机制, 为中医药治疗腰椎间盘突出症损伤提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物与分组

选择 3 月龄 SD 大鼠 (SPF 级, SCXK 沪 2007-0005, 上海斯莱克实验动物有限公司) 36 只, 雌雄各半, 体重 (250±20) g, 随机区组法分为 3 组, 即假手术组、模型组和腰痛宁组, 每组 12 只。

### 1.2 造模方法

参照文献<sup>[5]</sup>, 采用氯胺酮腹腔注射麻醉 (0.1 g/kg 体重), 以 L<sup>5</sup> 和 L<sup>6</sup> 棘突间隙为中心, 取后背正中切口长约 4 cm。钝性分离椎旁肌, 自动拉钩牵开, 咬除 L<sup>5</sup>、L<sup>6</sup> 左侧椎板和部分上下关节突, 充分暴露马尾神经和左侧 L<sup>5</sup> 神经根, 将特制的硅胶片 [2 mm × 2 mm × 1 mm、重 (20±1) mg] 置于左侧 L<sup>5</sup> 神经根出硬膜囊的交界处, 部分塞进椎间孔, 局部固定牢固, 逐层缝合, 无

菌纱布覆盖。假手术组仅切开后暴露神经根,逐层缝合。

### 1.3 给药方法

腰痛宁组予腰痛宁胶囊,主要由马钱子、土鳖虫、全蝎、僵蚕、乳香、没药、麻黄、苍术、牛膝、甘草等中药组成(承德中药集团有限公司提供,国药准字 Z13020898),规格:每粒 0.3g。大鼠用药剂量按照人与动物体表换算关系确定,相当于 60kg 体重患者临床等效剂量<sup>[6]</sup>,配成药物浓度为  $1.8 \times 10^{-4}$  g/ml 的混悬液。造模 30 天后给药,灌胃量 1ml/100g,每天 1 次,持续 1 个月。

### 1.4 观察指标及方法

腰痛宁治疗 30 天后,过量麻醉处死动物,取左侧 L5 神经根和比目鱼肌固定备用。

1.4.1 神经根组织光镜观察 采用 HE 染色,常规脱蜡至水,自来水冲洗 5min,苏木素染液 2min,自来水冲洗,盐酸乙醇分化,氨水蓝化,伊红染液 1min,乙醇分化,二甲苯透明,中性树胶封固,×200 倍镜下观察。

1.4.2 神经根组织透射电镜观察 将每组神经根组织标本戊二醛固定 24h,二甲砷酸缓冲液充分洗涤,1%的锇酸溶液作后固定 2h,梯度乙醇脱水,环氧树脂浸泡包埋,超薄切片机切片,厚 500~600Å,枸橼酸铅-枸橼酸铀双染色,H-600 型透射电镜观察并拍照。

1.4.3 神经生长因子(NGF)的测定 ①采用免疫组织化学 SABC 法<sup>[7]</sup>,取出神经根组织冰冻切片,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>灭活内源性酶,蛋白酶消化,BSA 封闭,NGF 一抗(稀释度 1:200),滴加生物素二抗,滴加 SABC,DAB 显色。②采用 Western blot 法<sup>[7]</sup>,取出比目鱼肌组织,约 100mg。加入清理液,研磨成粉末,装入管中。加入裂解液和活性液,取上清 DU 800 测定总蛋白浓度。1:1 加入 loading buffer 变性后保存备用。聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白上样量为 10μl,100V,电泳 1h。电泳结束后 PVDF 膜转膜,封闭。1:500 稀释 NGF 一抗,孵育 4h。加入 1:5000 稀释荧光二抗,冰上水平摇床振荡,避光孵育 1h,弃二抗液,扫膜红外荧光扫描成像系统(Odyssey Infrared Imaging System)扫描,结果转换成灰度值。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包,计量资料用均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 一般行为观察

假手术组大鼠的行为未见异常。造模大鼠左侧 L5 神经根压迫后,由于远侧肢体肌肉失神经支配,产生一

定程度的运动功能缺陷,造模损伤过重,双后肢瘫痪,拖拽后肢运动而不能抬起。造模术后第 1 天即出现一定程度的跛行步态,患侧后爪屈曲、握紧或见足下垂。在休息位,所有模型大鼠出现经常性舔拭神经根损伤侧的后爪,或伴轻轻咬拽趾甲,无趾甲脱落现象,手术侧后爪或保持在空中呈保护性姿势,30 天后大多数模型鼠可见趾甲过度生长现象。造模动物在实验过程中保持健康存活,手术创口愈合良好,无明显炎症反应,无明显瘢痕组织。腰痛宁组大鼠双后肢运动功能明显改善,跛行步态已不明显,后爪无屈曲和下垂。

### 2.2 光镜观察结果

假手术组神经元细胞结构完整,胞核大而圆,核仁清楚,神经纤维大小一致,轴突位于中央,无脱髓鞘改变。模型组神经元细胞明显肿胀,细胞界限不清楚,胞浆空泡样改变,核仁变淡或消失。神经纤维有崩溃及脱髓鞘改变,轴突部分消失。腰痛宁组经药物腰痛宁干预 30 天后,神经元细胞肿胀和胞浆空泡样改变明显减轻,神经纤维脱髓鞘改变减轻、无崩溃,轴突无变形。

### 2.3 电镜观察结果

假手术组神经元细胞形态结构完整,胞浆内细胞器丰富,周围有卫星细胞(雪旺细胞)的支持,各种神经纤维髓质均匀,鞘膜光滑。模型组可见到坏死的神经元细胞残体,雪旺细胞稀少,胞核浓缩、胞浆肿胀,细髓神经纤维的髓质欠均匀,鞘膜水肿内凹,粗髓神经纤维的板层结构紊乱,鞘膜水肿断裂,炎性细胞浸润。腰痛宁组神经元细胞核仁清晰,核膜完整,周围有卫星细胞支持,胞质内细胞器丰富,神经纤维和细胞间的连接结构都接近假手术组。

### 2.4 免疫组织化学法检测 NGF 蛋白结果

表 1 各组大鼠神经根组织中 NGF 蛋白表达比较(个,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 样本数 | 阳性细胞数        |
|------|-----|--------------|
| 假手术组 | 5   | 16.80±4.44   |
| 模型组  | 5   | 37.60±6.35*  |
| 腰痛宁组 | 5   | 29.80±3.19*△ |

注:与假手术组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,△ $P<0.05$

神经根组织中 NGF 阳性呈棕黄色,假手术组大鼠可见少量点状黄色的阳性免疫反应物,模型组大鼠见大量点、片状黄色或棕黄色阳性免疫反应物,腰痛宁组见大量点、片状黄色或棕黄色阳性免疫反应物,表 1 示,阳性细胞数与假手术组相比均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。

### 2.5 Western blot 法检测 NGF 蛋白表达

表 2 示,假手术组大鼠的 NGF 蛋白有一定的表达,模型组大鼠的 NGF 蛋白表达量升高( $P<0.05$ ),

腰痛宁组 NGF 表达量比模型大鼠明显升高 ( $P < 0.01$ )。

表 2 各组大鼠比目鱼肌中 NGF 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 样本数 | 灰度值                        |
|------|-----|----------------------------|
| 假手术组 | 3   | $4.43 \pm 0.60$            |
| 模型组  | 3   | $6.50 \pm 0.56^*$          |
| 腰痛宁组 | 3   | $8.20 \pm 0.70^{**\Delta}$ |

注:与假手术组比较,  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ ;与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$

3 讨论

一般研究认为,腰椎间盘突出对神经根的机械性压迫是诱发疼痛的重要原因,腰椎间盘突出症的动物模型设计大多采用外源压迫模拟突出椎间盘。本研究所借鉴文献经验改进模型<sup>[8]</sup>,将特制的硅胶片置于左侧 L5 神经根出硬膜囊的交界处,从而造成对神经根单纯的机械性压迫,该模型操作简便易行,成功率高。

腰椎间盘突出后产生压迫,导致神经根微循环障碍,组织水肿、毛细血管通透性增高,神经内轴浆流动改变,造成神经细胞缺血、缺氧、营养输送及代谢物排泄途径受阻,使神经根产生实质性损伤。继而出现一系列神经根失功能的症状和体征,诸如感觉异常、运动功能减弱等。神经根组织超微结构的改变以及神经纤维的变性是其病理形态学基础。神经根组织的病理变化,脊神经节神经元细胞膜水肿,内膜间隙明显充血、水肿,出现变性、坏死;胞质内粗面内质网及线粒体等细胞器含量减少,粗面内质网核糖体脱落,线粒体肿胀嵴消失,核膜皱缩<sup>[9]</sup>。本实验光镜观察压迫损伤 30 天神经元细胞肿胀,胞浆空泡样改变,神经纤维脱髓鞘改变。透射电镜观察,损伤神经元结构破坏,无完整的胞膜和核膜,细胞质裂解成颗粒状。神经根纤维明显脱髓鞘变,髓鞘板层结构松散、扭曲、紊乱,轴突萎缩变细,甚至纤维变性消失,轴突与髓鞘间出现空隙,雪旺细胞

核浓缩,胞浆肿胀。

腰痛宁方中以马钱子通络散结,消肿止痛为君;配以全蝎、僵蚕熄风通络;土鳖虫、乳香、没药活血化瘀、通经舒络为臣;苍术、麻黄温经通络以除湿邪为佐;牛膝引药下行,甘草调和诸药并制马钱子之烈性为使。全方具有化瘀通络、消肿止痛的作用。本实验利用免疫组化和 Western blot 方法观察到腰痛宁对模型大鼠神经根损伤后局部和靶器官处 NGF 表达的作用,抑制神经根损伤后局部 NGF 的高表达,促进其支配的靶器官 NGF 表达。

参考文献

[1] 朱盛修. 现代骨科手术学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 1619.  
[2] 杨毓华. 腰腿痛的椎管外因素[J]. 中国骨伤, 1991, 4(4): 46.  
[3] 李兰芳, 李国风, 解丽君, 等. 腰痛宁的毒理学研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(11): 102-106.  
[4] 计福全. 腰痛宁临床疗效及特点[J]. 中草药, 1997, 28(2): 125.  
[5] 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): 9-12.  
[6] 方喜业主编. 医学实验动物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 220-223.  
[7] Zhang M, Zhou Q, Liang QQ, et al. IGF-1 regulation of type II collagen and MMP-13 expression in rat endplate chondrocytes via distinct signaling pathways[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2009, 17(1): 100-106.  
[8] Yoshizawa H, Kobayashi S, Morita T. Chronic nerve root compression. Pathophysiologic mechanism of nerve root dysfunction[J]. Spine, 1995, 20(4): 397-407.  
[9] 岳寿伟, 张纓, 吴宗耀. 兔腰神经慢性压迫和炎症刺激后背根神经节的形态学变化研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25(10): 577-580.

(收稿日期: 2008-12-16; 修回日期: 2009-03-15)

[编辑: 邓媛]

(上接第 1025 页)

[2] 胡孔友, 余林中, 陈育尧, 等. 凉膈散对内毒素致大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(5): 3-5.  
[3] Barbarin V, Xing Z, Delos M, et al. P Hmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(5): 841-848.  
[4] 尹红军, 曹书颖. Th1/Th2 型细胞因子与肺纤维化[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2005, 25(5): 352-357.  
[5] Misson P, Brombacher F, Delos M, et al. Type 2 immune response associated with silicosis is not instrumental in the de-

velopment of the disease[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(1): 107-113.  
[6] 陈天琪, 葛正行. 浅谈中医对急性肺损伤的认识[J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(5): 7-8.  
[7] 余林中. 中药解毒新机制——对细胞信号转导调控作用研究[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2002, 18(1): 8-10.  
[8] 林慧, 余林中, 秦清和. 凉膈散对内毒素肺损伤小鼠肺组织核因子- $\kappa$ B 活性的影响[J]. 四川中医, 2004, 22(7): 16-18.

(收稿日期: 2008-12-31; 修回日期: 2009-03-30)

[编辑: 邓媛]