

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.006

硬膜外腔复合液注射对实验动物影响的病理学研究

王锡三¹, 李 莉¹, 刘 诚¹, 刘 赫¹, 胡广询¹, 王尔天¹, 王 敏¹, 安 洪²

(1. 广东医学院附属南山医院骨二科, 深圳 518052; 2. 重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:通过对硬膜外腔复合液注射后实验动物硬膜外腔及神经根的病理学观察,了解硬膜外腔复合液注射是否会引起椎管内粘连以及能否产生神经根的炎症反应。方法:健康成年日本大耳白兔 24 只,单纯随机分成 A、B、C、D 4 组,每组 6 只, A 组为正常对照组,其余 3 组为给药组:B 组为激素+麻醉剂组、C 组为激素+麻醉剂+维生素 B 组、D 组为激素+麻醉剂+维生素 B+中药组。采用硬膜外腔注射的方法,将 3 种不同配方的复合液分别注射到兔的硬膜外腔。每只动物每周给药 1 次,共给药 4 次,分别于停止给药后的第 1 周、第 4 周进行取材、固定及制片,然后进行观察。结果:肉眼未见纤维组织增生及瘢痕形成,光镜下 HE 染色可见有部分标本硬膜外有炎性渗出,可见多数炎性细胞,硬膜外神经根内有炎性渗出。特殊染色未见异常;免疫组化染色,4 周时 B、C、D 3 组硬膜下及硬膜外渗出物中含有 II 型胶原纤维,8 周时 B、C、D 3 组硬脊膜厚薄不一,局部硬膜外可见有少量 II 型胶原纤维增生。电镜观察 4 周时, B 组可见 1 成纤维细胞, C 组可见 1 个巨噬细胞, D 组有髓神经纤维局部髓鞘增厚,神经内膜内可见成纤维细胞和胶原原纤维;8 周时, B、C、D 3 组主要表现为成纤维细胞增多。结论:每周 1 次、连续 4 次的硬膜外腔复合液注射,在 4 周内即可出现硬脊膜及神经根周围的轻度炎症反应及轻度的 II 型胶原纤维增生,8 周内这种变化仍然存在,但脊髓和神经根未发生器质性改变。如果穿刺部位准确,该治疗方法应该是安全可行的。

【关键词】硬膜外腔;注射;治疗;病理学**【中国图书分类法分类号】**R681.5;R614.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-03-27

Pathological effects of epidural injection of compound solution on experimental animals

WANG Xisan¹, LI Li¹, LIU Cheng¹, LIU He¹, HU Guangxun¹, WANG Ertian¹, WANG Min¹, AN Hong²

(1. Department of Orthopaedics, the Affiliated Nanshan Hospital, Guangdong Medical College;

2. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate whether epidural injection of compound solution can cause intraspinal adhesion and inflammatory reaction of nerve roots by observing the pathological condition of epidural cavity and nerve root after the injection. **Methods:** Totally 24 healthy adult white Japanese rabbits were randomly divided into four groups equally ($n=6$): control group (group A), steroid + narcotic injection group (group B), steroid + narcotic + vitamin B injection group (group C), steroid + narcotic + vitamin B + traditional Chinese medicine injection group (group D). In group B, C, D, each rabbit was given epidural injection of compound solution once a week for four weeks. The dura mater, nerve roots, and spinal cord specimens were performed for pathologic detection at the 1st, 4th and 8th week respectively after discontinuation. **Results:** Neither fibroplasia nor cicatrization was observed by visual inspection. The results of HE staining indicated the presence of hemaleucin effusion and phlogistic infiltration in the epidural cavity, thickening of the dura mater and inflammatory exudation around the nerve roots in partial specimens. No abnormality was seen in specific staining. Immunohistochemistry showed that type II collagen fiber proliferation occurred in the subdural and epidural cavity at the 4th week in group B, C and D and dura maters were slightly thicker in group B, C and D than in group A at the 8th week. Under the electron microscope, desmocyte in group B, macrophage in group C, focal thickening of the myelin sheath and endoneurial collagen fibril in group D were observed at the 4th week. Increasing number of desmocytes in group B, C, D at the 8th week were found. **Conclusions:** Mild inflammation and slight type II collagen fibers proliferation can be detected around the spinal cord and nerve roots after epidural injection of compound solution once a week for consecutive four weeks. No organ damage in spinal cord and nerve root can be found if these changes exist within eight weeks. Epidural injection of compound solution is feasible if the puncture is accurate.

【Key words】epidural cavity; injection; treatment; pathology**作者介绍:**王锡三(1969-),男,副主任医师,博士,

研究方向:脊椎退行性病变。

通信作者:安 洪,男,教授, Email: anhong1106@sohu.com。

硬膜外腔复合液注射现已被广泛应用到腰椎间盘突出症的临床治疗当中^[1],但由此所引起的有关硬膜外腔组织学方面改变的报道却很少。本研究是用兔来模拟临床上硬膜外腔的重复性复合液注射,然后处死,对其硬膜外腔、硬脊膜、脊髓、神经根等组织进行病理学方面的观察,以了解长期、重复性硬膜外腔注入消炎、镇痛复合液后对兔脊髓、硬脊膜、神经根等硬膜外腔各组织的影响。

1 材料和方法

1.1 设计

将实验动物随机分成 4 组,1 组为正常对照组,其他 3 组为给药组,进行随机对照研究。

1.2 地点和材料

实验动物:实验选用健康日本大耳白兔 24 只(由白求恩医科大学实验动物部提供),雌雄不拘,单体重 2.5~3.5 kg,单纯随机分为 A、B、C、D 4 组,每组 6 只,A 组为正常对照组,其余 3 组为给药组:B 组为激素+麻醉剂组、C 组为激素+麻醉剂+维生素 B 组、D 组为激素+麻醉剂+维生素 B+中药组。

1.3 干预措施

因为实验动物较小的原因,麻醉后 B、C、D 3 组均采取椎板外切开后经椎板间隙穿刺给药的方式,以确保给药的准确性及实验的真实性,每周给药 1 次,每次给予 1 ml 混合液,连续给药 4 周,4 次给药结束后满 1 周时,每组分别处死一半的动物(各 3 只)进行取材,其余的动物在满 8 周时处死取材。

1.4 病理学观察

将实验材料分别采取 HE 染色、特殊染色、免疫组织化学染色、脱髓鞘染色(固兰染色-LFB)的方法制作成光镜切片,进行光镜检查,同时取样本做成电镜切片,在 JEM-1200EX 型透射电镜下进行观察。

2 结果

2.1 肉眼观察

不同的取材时期,B、C、D 3 组各 3 只兔与 A 组相比,肉眼观察未见任何差异。

2.2 光镜观察

2.2.1 HE 染色 4 周时 B、C、D 3 组 HE 染色镜下所见基本相同,神经元细胞、神经胶质细胞基本正常。硬膜下腔局部有出血,硬膜下可见炎性细胞浸润(图 1),纤维细胞轻度增生,硬脊膜略增厚,硬膜外细胞增多,可见少量炎性细胞。8 周时脊髓后角神经元细胞、神经胶质细胞、神经根轴突形态、结构基本正常,但硬脊膜有增厚,硬脊膜外有炎性渗出,可见多数炎性细胞,硬膜外神经根内有炎性渗出(图 2)。

2.2.2 特殊染色 4 周时,B、C、D 3 组均表现为:脊髓神经元细胞、脊神经根轴突形态结构基本正常,脊髓内神经丝互相

连结成网状,脊髓内神经根形态正常。脊髓外神经根轴突粗细比较均匀,形态正常,与 A 组比较特殊染色无明显差异。8 周时 B、C、D 3 组与 A 组相比亦无差异。

2.2.3 免疫组织化学染色 4 周时,B、C、D 3 组中,脊髓后索内毛细血管内皮细胞 II 型胶原纤维染色阳性,神经元及神经胶质细胞染色阴性,与正常对照组相同。硬脊膜、蛛网膜、硬膜下神经根鞘膜 II 型胶原纤维染色亦呈阳性,硬膜下渗出物中含有 II 型胶原纤维,硬膜外有 II 型胶原纤维增生(图 3)。

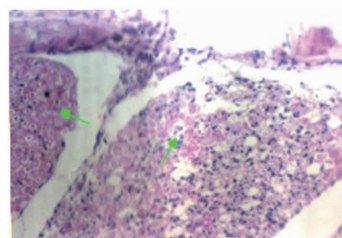


图 1 4 周神经根 HE 染色结果 (200 ×)

Fig.1 Nerve root HE staining results after 4 weeks (200 ×)

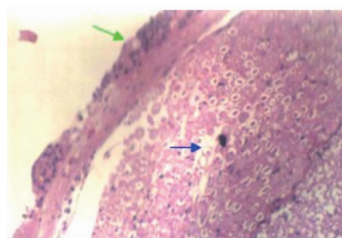


图 2 8 周神经根 HE 染色结果 (200 ×)

Fig.2 Nerve root HE staining results after 8 weeks (200 ×)

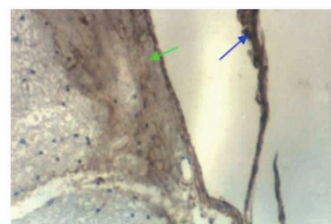


图 3 8 周硬膜外腔免疫组化染色 (200 ×)

Fig.3 Epidural immunohistochemistry staining after 8 weeks (200 ×)

2.2.4 髓鞘染色(固兰染色) 正常对照组,硬膜内外脊神经根固兰染色正常,未见脱髓鞘改变。4 周时,B、C、D 3 组固兰染色显示脊神经根髓鞘正常,无脱髓鞘改变,8 周时亦未见异常,同 A 组相比较无差异。

2.3 电镜观察

4 周时,B 组有髓神经纤维髓鞘结构正常,无板层分离,神经丝轻度增生,线粒体增多,个别线粒体空泡化(可能由于取材时缺血缺氧造成,在 A 组也有同样现象)。无髓神经纤维增生、粗大,神经膜细胞也增生,可见成纤维细胞(图 4);C 组有髓神经纤维厚薄不一,形态不规则,轴膜与髓鞘局部分离,并可见 1 巨噬细胞。局部神经丝轻度增多,可见 1 板层小体。D 组有髓神经纤维和无髓神经纤维结构基本正常,有髓神经纤维局部髓鞘有增厚,神经内膜内可见成纤维细胞和胶原原

纤维(图 5)。8 周时,B 组粗大的有髓神经纤维改变明显,髓鞘厚薄不一,轴突内神经丝增多。无髓神经纤维基本正常,神经膜内线粒体增生,局部可见板层小体,并可见成纤维细胞,粗面内质网扩张,神经丝增多,间质增生,成纤维细胞增多;C 组有髓神经纤维髓鞘厚薄不一,无髓神经纤维基本正常,神经膜细胞胞质内粗面内质网高度扩张,线粒体增生;D 组大部分有髓神经纤维和无髓神经纤维基本正常,个别髓鞘板层松散排列,局部增厚,局部可见成纤维细胞和胶原原纤维。神经内膜中可见有巨噬细胞的突起,并可见成纤维细胞,周围有胶原原纤维。无髓神经纤维的雪旺氏细胞增生,周围神经内膜中胶原原纤维增生,排列紊乱(图 6)。

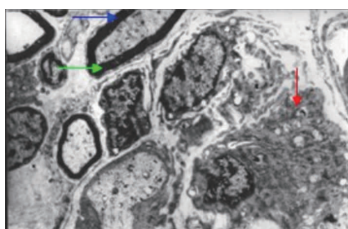


图 4 B 组 4 周神经根电镜下表现 (6 000 ×)

Fig.4 Manifestation of nerve root in group B under electron microscope after 4 weeks (6 000 ×)

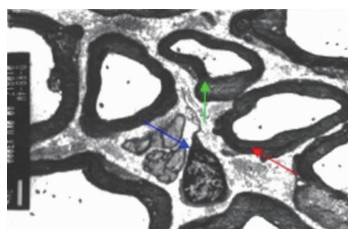


图 5 D 组 4 周神经根电镜下表现 (6 000 ×)

Fig.5 Manifestation of nerve root in group D under electron microscope after 4 weeks (6 000 ×)

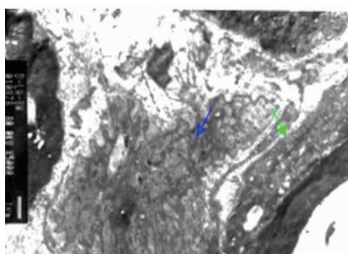


图 6 D 组 8 周神经根电镜下表现 (12 000 ×)

Fig.6 Manifestation of nerve root in group D under electron microscope after 8 weeks (12 000 ×)

3 讨论

腰椎间盘突出症是骨科的常见病及多发病,临床上,多种药物混合后的抗炎镇痛复合液连续、重复性地注入到硬膜外腔已被国内外医生广泛地应用到由腰椎间盘突出所引起的腰腿痛的治疗当中。复合液中,糖皮质激素具有抗炎、膜稳定作用,抑制

炎症介质的合成及活性^[2],抑制局部血管扩张,降低毛细血管通透性,减弱白细胞浸润和吞噬,从而改善和消除神经根炎症、充血、水肿及化学分离神经根粘连。维生素 B₁₂ 具有抗炎、镇痛、保持有鞘神经纤维功能的完整性、调节神经机能、修复神经髓鞘及促进再生等作用^[3],注射后可直接作用于局部而发挥作用;局麻药能阻断疼痛的传导通路和疼痛的恶性循环,缓解疼痛局部肌紧张及肌痉挛,从而改善血液循环、氧供和组织代谢^[4]。此外,有学者报道,维生素 B₁、维生素 B₁₂ 可能通过与中枢和外周存在的阿片受体的结合而起到镇痛作用;中药丹参具有活血化瘀、抗凝并促进纤维蛋白溶解、抑制血小板聚集及解聚作用,进而提高组织对缺氧的耐受性,抗脂质过氧化,清除自由基及抗炎作用。

目前有关重复性复合液注射后硬膜外腔局部的病理学观察方面的研究比较少,Kitsou 等^[5]通过实验观察到,在猪的硬膜外腔注射甲强龙和罗哌卡因后没有出现蛛网膜炎或纤维化的表现,反而是对比组使用造影剂后,穿刺局部出现粘连。Ture 等^[6]对硬膜外药物通过间歇快速或连续输液导管注射对硬膜外组织的组织病理学方面的影响进行了评估,发现间歇给药组及连续注射组均发生轻至中度炎症的变化,与对照组相比无明显统计学意义,实验结果表明药物及注射的方式并不会给局部组织带来明显的炎症反应,但导管本身对局部组织带来的炎症性反应较明显。但 Lima 等^[7]在甲强龙鞘内注射的临床及病理学影响的研究中发现,生理盐水对照组中实验动物无明显的临床表现及组织病理学改变,而用药组虽无明显临床表现但组织病理学却发生了脑膜增厚及淋巴细胞浸润。Abram 等^[8]将含有醋酸甲基泼尼松龙的聚乙二醇注入鼠的硬膜外腔,也没有发现神经根的炎症性改变。

在实验中,每周 1 次、连续 4 次的硬膜外腔 3 种配方的复合液注射后可引起硬膜外腔的轻度炎症性反应,考虑为机体对异物的一种排斥反应。在停药后 1 周和 4 周时这种炎症反应仍然存在,并可导致局部硬脊膜增厚及成纤维细胞、胶原原纤维数量增多,可使神经细胞线粒体增生、功能活跃、硬膜周围和神经根外膜周围产生炎症反应。注射后的 4 周内,神经根内可见成纤维细胞和巨噬细胞,并有胶原原纤维增生。该治疗方法对硬膜外神经根内有髓神经纤维的影响较大,而对无髓神经纤维几乎没有影响;停药 4 周后,上述改变仍然存在,B、C 2 组停药 4 周与停药 1 周时相比差别不大,但 D 组较停药 1 周时略有好转。这些变化都仅限于组织病理学方

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.007

BMP-2联合温热化疗对 SW480 中 GDF15 和 TFF3 表达的影响

毕德利,王亚旭,舒宁波,谢 凯

(重庆医科大学附属第二医院胃肠外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨骨形态发生蛋白-2(Bone morphogenetic protein-2,BMP-2)联合温热化疗对 SW480 中 GDF15 和 TFF3 表达的影响。方法:BMP-2 作用于大肠癌 SW480 细胞系,置于 43 ℃温热化疗 30 min,培养 6 h。(1)流式细胞法检测 SW480 细胞的凋亡;(2)Western blot 法检测 GDF15 和 TFF3 蛋白表达情况;(3)RT-PCR 半定量检测 GDF15 和 TFF3 的 mRNA 表达。结果:BMP-2 联合 43 ℃温热化疗后 SW480 细胞凋亡增加,GDF15 和 TFF3 蛋白表达水平下降,GDF15 和 TFF3 的 mRNA 表达亦下调。结论:BMP-2 联合温热化疗通过抑制大肠癌 SW480 的 GDF15 和 TFF3 蛋白及其相关基因表达,增强抑制 SW480 的增殖及转移复发的作用;温热疗法联合化疗对 GDF15 和 TFF3 表达抑制有协同作用。

【关键词】骨形态发生蛋白-2;温热化疗;GDF15;TFF3

【中国图书分类法分类号】R285

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-25

Effect of bone morphogenetic protein-2 combined with hyperthermic chemotherapy on GDF15 and TFF3 expression in SW480

BI Deli,WANG Yaxu,SHU Ningbo,XIE Kai

(Department of Gastrointestinal Surgery,the Second Affiliated Hospital,Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective:To explore the effect of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) combined with hyperthermic chemotherapy on GDF15 and TFF3 expression in SW480. Methods:BMP-2 was acted on SW480 colorectal cancer cell lines,placed in 43 ℃ hyperthermic chemotherapy for 30 min and cultured for 6 h. (1)Apoptosis of SW480 cells was detected by flow cytometry assay;(2)GDF15

作者介绍:毕德利(1982-),男,硕士,

研究方向:结直肠癌的治疗。

通信作者:王亚旭,男,副教授,Email:wangyaxu1967@sina.com.cn。

面的细微改变,并无明显的瘢痕组织增生。

4 结 论

综上所述,每周 1 次、连续 4 次的硬膜外腔复合液注射,在 4 周内即可出现硬脊膜及神经根周围的轻度炎症反应及轻度的 II 型胶原纤维增生,8 周内这种变化虽然存在,但脊髓和神经根未发生器质性改变,其中中药组的炎症反应略轻于其他 2 组。因此,如果穿刺部位准确,无穿刺并发症(脊髓神经物理损伤),该治疗方法是安全可行的。

参 考 文 献

- [1] 张坤全,胡亚明,胡伟民.硬膜外用加手法推拿治疗腰椎间盘突出 50 例[J].中国临床康复,2003,7(11):1710.
Zhang K Q,Hu Y M,Hu W M.The treatment of lumbar disc herniation with epidural block and infusion medicine and massage with 50 cases [J].Chinese Journal of Clinical Rehabilitation,2003,7(11):1710.

- [2] Korovessis P G.The role of steroid and their effects on phospholipase A2[J].Spine(Phila Pa 1976),2000,25(15):2004-2005.
[3] 史可任.颈腰痛注射疗法[J].颈腰痛杂志,1997,18(62):128,200.
Shi K R.Injection method in treating the cervicodynia and lumbodynia [J].The Journal of Cervicodynia & Lumbodynia,1997,18(62):128,200.
[4] Buttemann G R.Lumbar disc herniation regression after successful epidural steroid injection[J].Journal of Spinal Disorders&Techniques,2002,15(6):469-476.
[5] Kitsou M C,Kostopanagiotou G,Kalimeris K,et al.Histopathological alterations after single epidural injection of ropivacaine,methylprednisolone acetate,or contrast material in swine[J].Methylprednisolone Acetate or Contrast Material in Swine,2011,34(6):1288-1295.
[6] Ture H,Eti Z,Gogus F Y,et al.Histopathological effects on epidural tissue of bolus or continuous infusions through an epidural catheter in ewes[J].Anaesthesia,2010,65(4):473-477.
[7] Lima R M,Navarro L H,Carness J M,et al.Clinical and histological effects of the intrathecal administration of methylprednisolone in dogs[J].Pain Physician,2010,13(5):493-501.
[8] Abram S E,Marsala M,Yaksh T L.Analgesic and neuroxic effects of intrathecal corticosteroids in rats[J].Anesthesiology,1994,81(5):1198-1205.

(责任编辑:冉明会)