

# 胶原酶对大鼠脊神经背根神经节损伤的病理学研究

庄文权<sup>1</sup>, 李鹤平<sup>1</sup>, 杨建勇<sup>1</sup>, 陈伟<sup>1</sup>, 吴金浪<sup>2</sup>, 郭文波<sup>1</sup>, 黄勇慧<sup>1</sup>

(中山大学 1. 附属第一医院介入放射科; 2. 基础医学院病理学教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【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。

**关键词:** 胶原酶; 背根神经节/病理学; 大鼠

中图分类号: R362

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)04-0435-04

## Pathologic Studies of Collagenase Damage on Dorsal Root Ganglion in Rats

ZHUANG Wen-quan<sup>1</sup>, LI He-ping<sup>1</sup>, YANG Jian-yong<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>, WU Jin-lang<sup>2</sup>,  
GUO Wen-bo<sup>1</sup>, HUANG Yong-hui<sup>1</sup>

(1. Department of Radiology, The First Affiliated Hospital; 2. Department of Pathology, Preclinical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To study the morphological and pathologic effects of collagenase on dorsal root ganglion (DRG) in rats. 【Methods】 Fifty-seven male and healthy Sprague-Dawley rats were randomized into 7 groups: normal group, acute collagenase group, subacute collagenase group, chronic collagenase group, acute saline group, subacute saline group, and chronic saline group. The left fifth lumbar DRG was exposed in each rat. One milliliter of collagenase solution (300 U) was carefully applied to the exposed DRG in collagenase groups, and one milliliter of isotonic saline was applied to the exposed DRG in saline groups. The morphology of DRG under light microscope and electron microscope was analyzed 1 hour, 1 week, and 1 month after operation. 【Results】 The morphology of cells, the nucleolus, membrane and cytoplasm of neurons in DRG had not been changed under light microscope and electron microscope in all groups. The same was true of the nerve fibers and blood vessels in DRG. The differences of the ultrastructure of neurons in DRG between the collagenase groups and the normal group or the saline groups were significant. The nucleolus did not locate at the middle part of the nucleus in some cells. It had been observed in many cells with mitochondria swelling, loss of mitochondria crest, vesicle mitochondria and endoplasmic reticulum swelling. Karyotheca was rough in some cells. Cytoclasia and apoptosis of neurons had not been observed under light microscope and electron microscope. 【Conclusion】 The ultrastructure of neurons in dorsal root ganglion observed under electron microscope showed that collagenase used clinically did a certain extent damage to the neurons in DRG. So, the dosage and concentration of collagenase should be carefully applied when it is used for chemonucleolysis.

**Key words:** collagenase; dorsal root ganglion/pathology; rats

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(4):435-438]

收稿日期: 2004-12-12

基金项目: 中山医科大学科研启动基金资助项目(98021)

作者简介: 庄文权(1965-), 男, 广东海丰人, 副教授, 从事介入放射学工作. E-mail: zsyj@gzsums.edu.cn

胶原酶化学髓核溶解术是介入治疗腰椎间盘突出症的方法之一<sup>[1]</sup>。目前对于胶原酶应用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(600~1200 U)对后纵韧带、硬脊膜不会造成损害<sup>[2]</sup>,但也有学者对胶原酶溶解术后无效的患者进行手术治疗,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<sup>[3]</sup>。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,然后应用病理学的方法研究胶原酶对大鼠 DRG 的影响,探讨胶原酶应用的安全性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物模型分组和制备

实验动物是中山大学医学实验动物中心提供的健康 Sprague-Dawley 雄性大鼠 57 只(体质量 220~260 g)。胶原酶(collagenase)由上海乔源生物制药有限公司生产。

动物分为:正常对照组 9 只;急性胶原酶手术组 9 只、急性生理盐水手术组 10 只;亚急性胶原酶手术组 7 只、亚急性生理盐水手术组 8 只;慢性胶原酶手术组 7 只、慢性生理盐水手术组 7 只。“急性组”指术后 1 h 处死动物,“亚急性组”指术后 1 周处死动物,“慢性组”指术后 30 d 处死动物。

实验动物模型制备参考 Bennelt 等<sup>[4]</sup>的方法。大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后,剪去术野鼠毛、消毒,于大鼠背部正中腰 4~6 椎体部位切开皮肤,分离脊椎左侧肌肉,暴露腰 5 椎体乳状突与横突,分离、暴露背根神经节,各胶原酶手术组局部滴注胶原酶 1 mL(300 U/mL,相当于临床盘外注射法用药浓度),各生理盐水手术组局部滴注生理盐水 1 mL。最后,将亚急性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 万单位预防感染。

### 1.2 病理取材和观察

各组实验动物处死后切取作用部位的 DRG,将部分标本固定于甲醛溶液,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,光学显微镜下观察分析 DRG 的病理改变。另取部分标本置于 25 g/L 戊二醛溶液,进行前固定、浸洗、后固定、浸洗、脱水、浸透、包埋和聚合处理,在透射电镜下对切片进行观察。全部切片经 1 病理科教授、1 病理科主治医师同时观察,作出综合观察结论。电镜观察的主要指标<sup>[5]</sup>有:①节

细胞超微结构变化;②节内神经纤维超微结构变化;③节细胞凋亡相关表现(结合病理);④节细胞坏死相关表现(结合病理)。

## 2 结果

### 2.1 背根神经节大体、光镜病理检测

肉眼大体见正常组、生理盐水和胶原酶手术组 3 组背根神经节为米粒大小白色组织。光镜下见神经节内大量神经元细胞,神经元细胞胞体为类圆形或类椭圆形且被一层扁平的卫星细胞包裹。神经元细胞间可见较多神经纤维以及少量结缔组织和血管。1、3 组神经节细胞种类数量、形态、胞间神经纤维、血管等无明显差别。未见节细胞成群细胞坏死、细胞膜早期破裂、凋亡小体形成,未见节内神经纤维轴突肿胀、髓鞘肿胀、脱髓鞘等改变。

### 2.2 背根神经节电镜检测

2.2.1 正常对照组 ①节细胞超微结构:胞核大,核膜边界规整;核仁居中;线粒体无肿胀、无嵴断裂、无空泡样改变;内质网无肿胀。②节内神经纤维超微结构:轴突无肿胀、无线粒体堆积;髓鞘无肿胀、无板层松解、无脱髓鞘。③节细胞凋亡相关表现(结合病理):无染色质呈致密团块;无核质浓染;无凋亡小体形成。④节细胞坏死相关表现(结合病理):无成群细胞坏死;无细胞膜早期破裂。

2.2.2 生理盐水手术组 各生理盐水手术组背根神经节的显微、超微结构与正常对照组比较均无差别。无节细胞凋亡、坏死的表现。

2.2.3 胶原酶手术组 各胶原酶手术组背根神经节观测细胞种类、细胞数量、细胞大体形态、胞膜情况以及节内神经纤维情况与正常对照组、相应生理盐水手术组比较均无明显变化和差别。但是,节细胞内超微结构有如下变化(图 1):①急性胶原酶手术组节细胞超微结构出现核仁部分偏向一侧;线粒体大量肿胀,部分嵴断裂、空泡形成;内质网无肿胀。②亚急性胶原酶手术组节细胞超微结构出现核仁部分偏向一侧;线粒体大量肿胀,部分嵴断裂、空泡形成;有 1 例部分细胞核膜边界不规整;另有 1 例部分细胞内质网扩张、肿胀。③慢性胶原酶手术组节细胞超微结构出现核仁部分偏向一侧;线粒体大量肿胀,部分嵴断裂、空泡形成;内质网无肿胀;有 1 例部分细胞核缩小、核膜边界不规整、核裂形成。节细胞凋亡、坏死相关表现与正常对照组、相应生理盐水手术组比较均无差别。

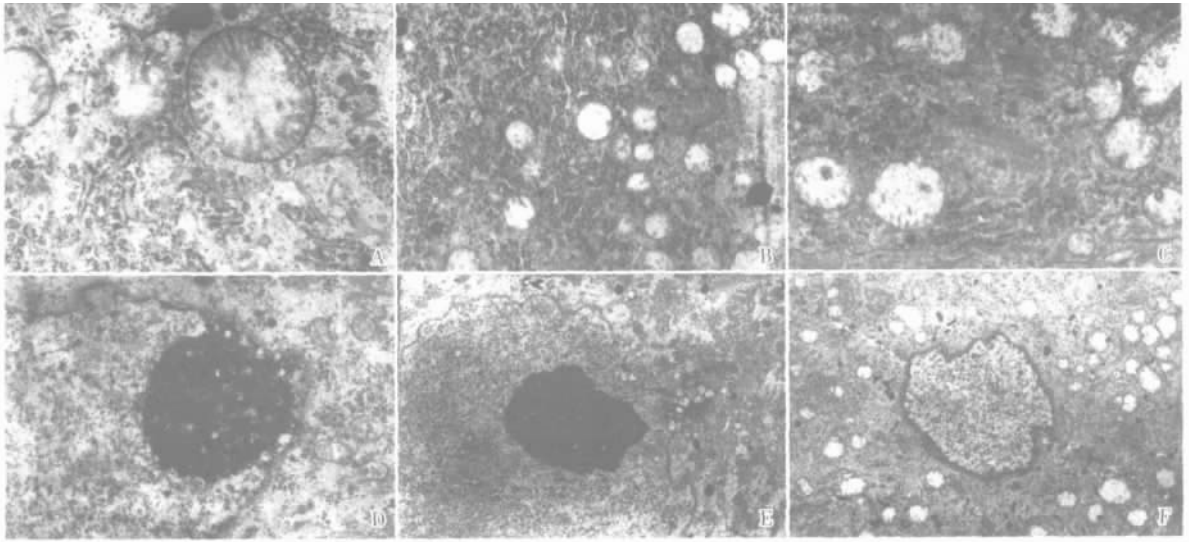


图1 胶原酶手术组背根神经节电镜表现

Fig.1 The morphology of some DRG cells under electron microscope in collagenase group

A: Mitochondria swelling was observed in some DRG cells at acute collagenase group ( $\times 56\ 000$ ); B: Mitochondria swelling and loss of mitochondria crest was observed in some DRG cells at subacute collagenase group ( $\times 224\ 000$ ); C: Mitochondria swelling and loss of mitochondria crest was observed in some DRG cells at chronic collagenase group ( $\times 33\ 600$ ); D: The nucleolus did not located at the middle part of the nucleus in some DRG cells at acute collagenase group ( $\times 28\ 000$ ); E: Karyotheca was shrunken in some DRG cells at subacute collagenase group ( $\times 14\ 000$ ); F: Shrunken karyotheca and decreased nuclear size was observed in some DRG cells at chronic collagenase group ( $\times 112\ 000$ )

### 3 讨论

#### 3.1 选择胶原酶对大鼠背根神经节损伤的病理学研究理论依据

Rydevik<sup>[2]</sup>的实验研究认为胶原酶对兔胫神经无明显损伤。张德仁等<sup>[6]</sup>将胶原酶注入兔的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的作用部位不一致。临床上胶原酶注射的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背根神经节(DRG);DRG被认为是与腰背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<sup>[7]</sup>。DRG的位置并非恒定,它可在椎管内、椎间孔内或椎间孔外,取决于其所在的节段水平,但均邻近椎间孔。从微观的角度看,背根神经节细胞的直径从15~100  $\mu\text{m}$ 不等,神经细胞体约占DRG的30%,许多神经多肽在DRG细胞内合成,如果胶原酶对DRG有严重的损伤,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,而目前国内外尚未见相关研究。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),利用透射电镜和光镜方法可以观测DRG在胶原酶

作用下有无形态学上的损伤、受到何种程度的损伤以及损伤是否具有可恢复性。

#### 3.2 病理学研究结果提示的意义

在胶原酶作用下DRG的HE染色病理切片观测到各胶原酶模型组背根神经节细胞种类、细胞数量、细胞形态、胞膜情况、胞浆情况、胞核形态、细胞间神经纤维、血管等情况与正常对照组、相应生理盐水手术组比较均无明显变化和差别。另外,病理切片观测到各胶原酶手术组未见节细胞成群细胞坏死、细胞膜早期破裂、凋亡小体形成等与细胞凋亡或细胞坏死相关的改变。以上结果提示:在胶原酶作用下,大鼠DRG形态(大体、光镜病理水平)在急性、亚急性和慢性时间点上均未受到损害的表现。

但是,胶原酶手术组的节细胞超微结构的观察却发现:①各期胶原酶手术组都有线粒体大量肿胀,部分嵴断裂、空泡形成;②各期胶原酶手术组都有核仁部分偏向一侧;③亚急性胶原酶手术组有1例细胞核膜部分边界不规整;④亚急性胶原酶手术组有1例细胞内部分内质网扩张、肿胀;⑤慢性胶原酶手术组有1例细胞核缩小、核膜部分边界不规整、核裂形成。以上细胞器的各种病理改变都是神经元细胞受到外来因素(如神经毒性药物、神经外伤)损伤后的典型变化<sup>[8,9]</sup>。透射电镜观察到的病理改变清楚地表明:临床上化学髓核

溶解术所用的胶原酶治疗浓度对背根神经节细胞有损伤作用。1 次用药后,损伤作用立即产生(1 h 后就有损伤的改变),而且,这一损伤的持续时间较长,30 d 后仍然存在。

由于透射电镜观察到胶原酶对背根神经节细胞有损伤的病理改变,故此作者提出,在临床开展胶原酶化学髓核溶解术的时候,一定要慎重使用胶原酶的用药剂量和浓度,尽量做到依椎间盘突出、变性程度个体化用药,并准确施药于靶部位。

#### 参考文献:

- [1] 庄文权,陈伟,杨建勇,等. 化学髓核溶解术治疗腰椎间盘突出症[J]. 中山医科大学学报, 2000,21(1):60-2.
- [2] 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(6): 562-6.
- [3] Artigas J, Brook M, Mayer HM. Complications following chemonucleolysis with collagenase [J]. J Neurosurg, 1984, 61(4): 679-85.

- [4] Bennelt GL. An animal model of neuropathic pain: a review[J]. Muscle Nerve, 1993, 16(8):1040-3.
- [5] Hernadi L, Erdelyi L, Parducz A, *et al.* *In vitro* capsaicin-induced cytological changes and alteration in calcium distribution in giant serotonergic neurons of the snail helix pomatia: a light and electron microscopic study[J]. Cell Tissue Res, 1995, 282(3):445-53.
- [6] 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(8):38-9.
- [7] Miranda-saksena M, Boadle RA, Armati P, *et al.* In rat dorsal root ganglion neurons, herpes simplex virus type 1 tegument forms in the cytoplasm of the cell body [J]. J Virol, 2002, 76(5):9934-51.
- [8] 韩漫夫,赫秋月,大西晃生. 阿霉素中毒大鼠背根神经节神经元及细胞核孔的改变[J]. 中华神经科杂志, 2000,33(3):156-8.
- [9] 谢富康,郑敏. 坐骨神经源性因子对培养中成年青蛙背根神经节神经元的作用[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 92-5.

(编辑 张恩健)

(上接第 434 页 from page 434)

mRNA 水平还是其活性表达都增强,至 96 h 时则降低,这一变化与凋亡率的变化是一致的。

总之,大蒜素可以抑制膀胱癌细胞株 BIU87 的生长,诱导细胞凋亡可能是其重要机制之一,而细胞周期阻滞以及 bcl-2 和 caspase-3 基因表达及活性变化可能发挥了重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] 高艳景,袁孟彪,辛华. 大蒜素抑制人肝癌细胞中 VEGF mRNA 表达的研究[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(5):531-3.
- [2] 王安训,黄洪章. 腺病毒介导 HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌机制的研究[J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(1):53-55,59.
- [3] Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, *et al.* Induction of apoptosis by diallyldisulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(1): 41-7.
- [4] Dirsch VM, Gerbes AL, Vollmar AM. Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor kappa B[J]. Mol Pharmacol, 1998, 53(3):402-7.

- [5] Sigounas G, Hooker J, Anagnostou A, *et al.* S-allylmercaptocysteine inhibits cell proliferation and reduces the viability of erythroleukemia, breast, and prostate cancer cell lines[J]. Nutr Cancer, 1997, 27(1): 186-91.
- [6] Sung-Jen W, Yee C, Yi-Mei H, *et al.* S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase [J]. Experimental Cell Res, 1998, 241(1):66-75.
- [7] O'Connor PM, Jackman J, Bae J, *et al.* Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the national cancer institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents[J]. Cancer Res, 1997, 57(19):4285-300.
- [8] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74(4): 609-19.
- [9] Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, *et al.* Identification and inhibition of the ICE/ CED23 protease necessary for mammalian apoptosis[J]. Nature, 1995, 376(6535):37-43.

(编辑 张恩健)