



持续动态机械加压诱导腰椎关节突关节源性腰痛大鼠模型的建立和观察 *

吕 游^{1△} 王祖强¹ 侯树勋²

(¹解放军总医院第六医学中心骨科, 北京 100048; ²解放军总医院第四医学中心骨科, 北京 100048)

摘 要 目的: 尝试通过棘突间持续动态机械加压, 诱导建立腰椎关节突关节源性腰痛大鼠模型, 探讨关节突关节源性腰痛的发病机制。**方法:** 通过棘突间置入加压弹簧, 在实验组大鼠中构建腰椎关节突关节持续动态加压模型, 并与对照组大鼠和空白组大鼠进行对照, 从大鼠疼痛相关行为学和关节突关节滑膜 TNF- α 和 IL-1 β 表达量两方面进行评估。疼痛行为学的评价方法包括 von Frey 机械刺激缩足反射阈值测量、热缩足反射潜伏期测量、步态分析, 从而建立大鼠关节突关节源性腰痛模型。**结果:** 实验组大鼠疼痛相关行为学与对照组和空白组比较, 均发生明显改变, 包括 von Frey 机械刺激缩足反射阈值降低、热刺激阈值降低、足印面积减小、支撑相缩短、摆动相延长、摆动速度降低, 同时实验组大鼠关节突关节滑膜 TNF- α 和 IL-1 β 含量均较对照组和空白组明显升高。**结论:** 通过向大鼠活体内植入棘突间加压弹簧, 实现大鼠腰椎关节突关节持续机械动态加压, 能够成功构建机械诱导型大鼠腰椎关节突关节源性腰痛动物模型, 可为关节突关节源性腰痛的发病机制和治疗研究提供研究思路和素材。

关键词 腰椎关节突关节; 关节突关节源性腰痛; 动物模型; 疼痛相关行为学; 机械加压

Establishment and observation of a rat model of lumbar facet joint-derived low back pain induced by intraspinal persistent compressive injury *

LYU You^{1△}, WANG Zuqiang¹, HOU Shuxun²

(¹Department of Orthopaedics, Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China; ²Department of Orthopaedics, Fourth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

Abstract Objective: To study the pathogenesis of lumbar facet joint-derived low back pain, by developing a novel animal model of facet joint related low back pain by intraspinal persistent compressive injury. **Methods:** Intraspinal compressive springs were implanted into SD rats as experimental group to induce persisting compressive injury to lumbar facet joint. Facet-derived low back pain animal models were measured by detecting pain behaviors (including paw withdrawal threshold, thermal withdrawal latency and gait analysis) and TNF- α and IL-1 β levels in the synovium. **Results:** Compared with control group and naive group, the pain-related behaviors of the rats in the experimental group changed significantly. The thresholds of mechanical pain and thermal pain were decreased obviously in experimental group. The experimental group rats presented smaller print area, shorter stance phase, longer swing phase, and lower swing speed. The concentrations of TNF- α and IL-1 β in experimental group were increased compared with control group. **Conclusion:** The rat model of lumbar facet joint-derived low back pain was established successfully by implanting a compression spring between the spinous processes to produce the continuous mechanical dynamic compression for the lumbar facet joints, which could provide research ideas and materials for the pathogenesis and treatment of facet joint-derived low back pain.

Keywords lumbar facet joint; facet joint-derived low back pain; animal models; pain-related behavior; mechanically compressive injury

* 基金项目: 国家自然科学基金 (82102594)

[△] 通信作者 吕游 travelyou@sdu.edu.cn

腰痛 (low back pain, LBP) 在全球范围内是最重要的健康问题之一, 超过 80% 的成年人在一生之中会受到腰痛困扰, 并导致日常活动的限制和生活质量的下降, 而随着全球老龄化的进展, 腰痛的发生率还会逐年上升^[1-4]。多项研究证实^[5,6], 症状性退行性病变 (symptomatic degenerative defects, SDD) 是引起腰痛的最主要病因, 而疼痛的来源可来自一个或多个结构, 包括椎间盘、关节突关节、后方韧带复合体、肌肉和筋膜组织等^[7,8]。由椎间盘和两侧腰椎关节突关节组成的三关节复合体 (three-joint complex, TJC) 是腰椎十分重要的解剖结构和功能单元, 而椎间盘退变和腰椎关节突关节骨关节炎同样也是腰椎退行性改变最重要的病理基础。病理动物模型的制备对于认识疾病的发病机制具有十分重要的作用, 所以有必要制备腰痛动物模型来了解腰痛的发病机制。既往已有大量研究成功建立椎间盘源性腰痛动物模型^[9], 对了解发病机制和探讨治疗方法起到重要作用, 而关节突关节源性腰痛动物模型研究相对较少^[10], 其中多数模型是借鉴椎间盘源性腰痛的制模方法, 通过向关节突关节腔内注射致炎物质或针刺损伤关节突关节构建模型。腰椎关节突关节与椎间盘解剖结构和生理特点不同, 引起腰痛的致病机制也差异很大, 所以此类制模方法不能很好地模拟人体发病过程, 因而十分有必要摸索发现新的关节突关节源性腰痛制模方法, 以便更好地进行病因研究, 并为后续的治疗研究提供素材。本研究通过腰椎关节突关节持续动态机械加压, 构建腰椎关节突关节源性腰痛大鼠模型, 借此探讨腰椎关节突关节源性腰痛的发病机制。

方 法

1. 特制加压弹簧装置的制备

根据成年大鼠腰椎解剖特点, 设计专用棘突间加压弹簧, 作为关节突关节持续加压装置 (见图 1)。

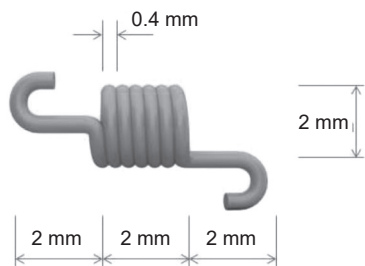


图 1 腰椎棘突间加压弹簧专用装置

Fig. 1 A modified intraspinal compression spring

弹簧由浙江温州永兴康力弹簧厂制造, 采用 316L 不锈钢材料制成, 线径 0.4 mm。弹簧外径 2 mm, 初始长度 2 mm, 挂耳长度 2 mm。根据人体生物力学测定结果, 人类腰椎关节突关节在直立状态下承受的纵向压力是人体体重的 20%^[11]。成年大鼠的体重为 250 g, 模拟人体直立状态, 关节突关节纵向受力应设定为 50 g。大鼠在麻醉状态下棘突间宽度为 2 mm, 腰椎后凸状态下棘突间宽度可增加至 4 mm。按此标准调整弹簧拉力并通过生物力学测试验证, 弹簧初始长度 2 mm, 当弹簧被拉长至 4 mm 时, 可提供 50 g 拉力。

2. 实验动物及分组

健康成年雄性 SD 大鼠 66 只, 由解放军总医院第六医学中心动物实验中心提供, 体重在 250~300 g 之间。所有动物置于自然光照条件饲养室, 室内温度维持在 20~25℃, 摄食、饮水、活动自由, 专人定期清洁消毒。所有操作及动物处理均严格遵守相关动物保护及使用规定 (伦理审批号: SYXK (京) 2017-0023)。

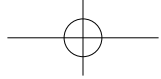
采用随机数字表法将 66 只大鼠随机分为 3 组: 实验组 (30 只大鼠)、对照组 (30 只大鼠)、空白组 (6 只大鼠)。其中, 实验组和对照组再随机分为 5 个亚组, 每组 6 只, 分别标记为 3 天组、7 天组、14 天组、28 天组、42 天组。空白组 6 只大鼠不再分组。

3. 动物模型制备

本研究采取腰椎关节突关节持续动态机械加压方法制备腰椎关节突关节源性腰痛大鼠模型。对于实验组大鼠, 对 L₅₋₆ 节段采用外科方法进行腰椎关节突关节持续动态机械加压干预措施, 具体操作方法如下: 以 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠 (剂量为 40 mg/kg), 背部皮肤常规去毛备皮, 碘伏消毒铺巾。以 L₅ 棘突为中心取腰椎后正中切口, 长约 3 cm。剥离椎旁肌, 显露上位和下位棘突。在棘突上打孔, 将特制弹簧固定于上位和下位棘突之间 (见图 2), 确定弹簧固定可靠后, 逐层缝合切口。术后肌肉注射青霉素 3 天预防感染。对照组大鼠, 对 L₅₋₆ 节段行同一外科切口切开, 显露棘突后在棘突上打孔但不固定弹簧, 然后关闭切口。空白组大鼠, 不进行任何外科手术干预, 在相同时间内进行自然饲养。

4. 观测方法和测量指标

(1) 机械刺激缩足反射阈值测量: 分别于术前和术后 3 天、7 天、14 天、28 天、42 天进行机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 测量。通过系列压力 von Frey 纤毛机械刺激测试针



(上海玉研科学仪器有限公司) 测量 MWT, 以此反映实验大鼠的机械痛觉超敏反应。测试前 3 天, 每日将大鼠单独置于实验观察箱内 30 分钟, 使大鼠适应测量环境。测试环境为室温 22~26℃ 的安静实验室环境, 测试时间为上午 8 时至 12 时。将大鼠置于均匀网格的铁丝网盖上, 并以透明有机玻璃盒覆盖。选取一套标准化系列压力的 von Frey 纤毛机械刺激针, 从最小压力值 (1.0 g) 的 von Frey 纤毛机械刺激针开始, 依次选取不同压力的 von Frey 纤毛机械刺激针从铁丝网底部由下向上, 垂直刺向大鼠后肢足底中央部, 使 von Frey 纤毛机械刺激针弯曲变形, 成为 S 形, 持续 5~8 秒, 观察大鼠是否出现缩足反应。如果大鼠在刺激时间内或移开 von Frey 纤毛机械刺激针时出现快速缩足反应, 则标记为阳性。在其他时间出现的缩足反应或非缩足样反应, 均标记为阴性。两次测试的间隔时间至少为 5 分钟, 当测试缩足反应由阳性转为阴性后, 采用上一级 von Frey 纤毛机械刺激针再次进行测试。根据 Dixon 等^[12]推荐的方法, 出现 50% MWT (即测量 10 次至少连续出现 5 次缩足反应) 的 von Frey 纤毛机械刺激针的压力值, 即为该大鼠的 MWT 阈值。

(2) 热缩足反射潜伏期测量: 分别于术前和术后 3 天、7 天、14 天、28 天、42 天进行热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 测量。通过使用 BW-PLantar-400 热刺激痛觉测试仪 (上海软隆科技发展有限公司), 采用热辐射法测量 TWL, 以此反映实验大鼠的热痛觉超敏反应。测试前 3 天, 每日将大鼠单独置于实验观察箱内 30 分钟, 使大鼠适应测量环境。测试环境为室温 22~26℃ 的安静实验室环境, 测试时间为上午 8 时至 12 时。将大鼠置于恒温的有机玻璃板上, 可在一定范围内自由活动, 大鼠在测量环境中适应 15 分钟, 使用 BW-PLantar-400 热刺激痛觉测试仪从有机玻璃板底面垂直照射大鼠后足中后部, 此部位在大鼠静立时与有机玻璃板紧密接触。从热测痛仪开始照射, 至大鼠出现缩足反射, 记录时长。间隔 10 分钟进行重复测量 3 次, 取平均值, 即为 TWL。

(3) 步态分析: 分别于术前和术后 3 天、7 天、14 天、28 天、42 天进行步态分析。借助于 CatWalk XT 步态分析系统 (noldus information technology), 通过计算机辅助分析, 可以分析大鼠的步态特点, 由此反映大鼠的疼痛行为学改变。进行正式实验测试前, 大鼠先期进行适应性测试训练, 在没有食物、饮水、气味等外部刺激和任何强迫措施的条件下, 不停顿连续通过 CatWalk 步行台, 从而获取大鼠的自然步态。

正式实验时, 每只大鼠至少记录 3 次顺利通过步行台的过程, 每次至少记录到 10 个步态。所有步态细节由高速摄像机捕获记录并传输至计算机。本实验采用 CatWalk XT 10.6 步态分析系统进行数据处理, 获取大量步态参数, 选取以下 4 个指标进行比较分析: 足印面积 (print area)、支撑相 (stand phase)、摆动相 (swing phase)、摆动速度 (swing speed)。

(4) 滑膜炎性因子含量测定: 分别于术后 3 天、7 天、14 天、28 天、42 天各时间点, 将实验组和对照组完成以上疼痛行为学测量的大鼠, 经 1.5% 戊巴比妥腹腔注射麻醉处死。对于实验组大鼠, 在处死前拍摄正侧位 X 光片, 确认弹簧位置良好, 无脱落。处死后外科显露并于体视镜下完整切取 L₅₋₆ 节段关节突关节滑膜。空白组完成所有时间点疼痛行为学测量的大鼠于术后 42 天经腹腔麻醉处死, 外科显露并于体视镜下完整切取 L₅₋₆ 节段关节突关节滑膜。采用酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISAs) 的方法, 对关节突关节滑膜中的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的含量进行测定。

(5) 组织形态学观察: 将实验组和对照组大鼠以上各时间点切取的腰椎 L₅₋₆ 节段组织标本置于 4% 多聚甲醛溶液中, 固定 48~72 小时后, 用混合酸溶液脱钙 4~8 周, 采用针刺法确定脱钙终点。截取 L₅₋₆ 节段关节突关节, 脱水后行石蜡包埋。采取垂直关节突关节间隙方向切片, 行甲苯胺蓝 (toluidine blue, TB) 染色, 进行关节突关节组织形态学观察。

5. 统计学分析

使用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析, 计量数据采取均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 多组之间均数比较使用方差分析和多个均数之间两两比较的 SNK-*q* 检验方法, 两组之间均数比较使用 *t* 检验方法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

1. 机械刺激缩足反射阈值测量

实验组大鼠在处死前行全身正侧位 X 光片检查, 影像结果显示所有实验组大鼠体内加压弹簧均稳定固定于加压节段棘突之间, 位置良好, 未见任何脱落、移位现象 (见图 3)。

MWT 测量通过标准化的系列压力 von Frey 机械刺激测试针测定, 测试时间分别为术前和术后 3 天、7 天、14 天、28 天、42 天, 各组各时间点的测量结果见图 4。

组间比较：手术前三组之间比较差异无统计学意义，说明手术前所有大鼠的 MWT 处于同一基线。术后 3 天，实验组、对照组与空白组比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，而实验组与对照组之间差异无统计学意义。术后 7 天、术后 14 天，实验组与对照组、空白组比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，对照组和空白组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。术后 28 天、术后 42 天，三组之间比较差异无统计学意义。

组内比较：实验组术后各时间点与术前 MWT 比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；术后 3 天与术后 7 天比较，差异无统计学意义，与术后 14 天、28 天、42 天比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；术后 7 天与术后 14 天、28 天、42 天比较，差异有

统计学意义 ($P < 0.05$)；术后 14 天与术后 28 天、42 天比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；术后 28 天与术后 42 天比较，差异无统计学意义。对照组术后 3 天、7 天、14 天与术前 MWT 比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，术后 28 天、42 天与术前 MWT 比较，差异无统计学意义。空白组术前与术后各时间点 MWT 比较，差异均无统计学意义。

2. 热缩足反射潜伏期测量

TWL 测量通过 BW-PLantar-400 热刺激痛觉测试仪测定，测试时间分别为术前和术后 3 天、7 天、14 天、28 天、42 天，各组各时间点的测量结果见图 5。

组间比较：手术前三组之间比较差异无统计学意义，说明手术前所有大鼠的 TWL 处于同一基线。术后 3 天，实验组、对照组与空白组比较，差异均

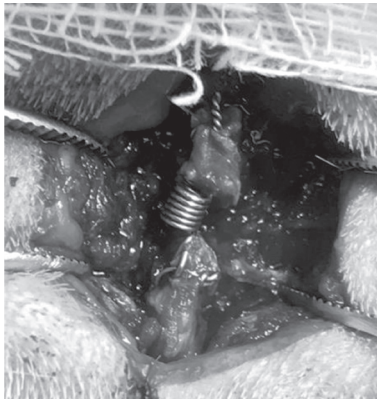


图 2 特制加压弹簧固定于大鼠腰椎棘突之间
Fig. 2 The modified intraspinal compression springs was fixed between the two spinous processes of the lumbar vertebrae in rat

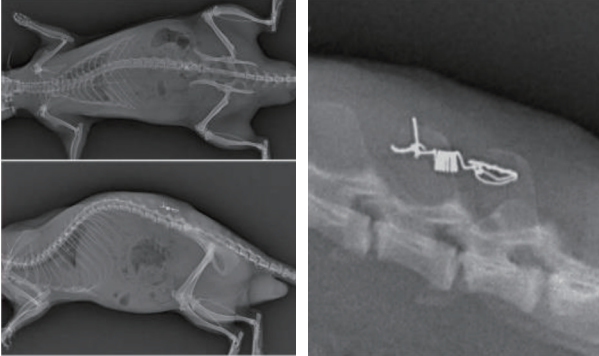


图 3 X 光片检查提示弹簧固定于棘突之间，未见弹簧脱落移位
Fig. 3 Representative X-ray images confirming that the compression spring was fixed between the two spinous processes without dislocations

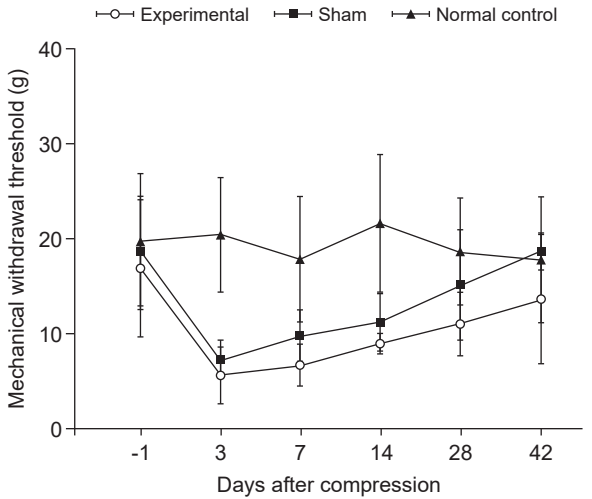


图 4 各时间点机械刺激缩足反射阈值测量结果
Fig. 4 Comparison of mechanical withdrawal thresholds in the three groups in different time points

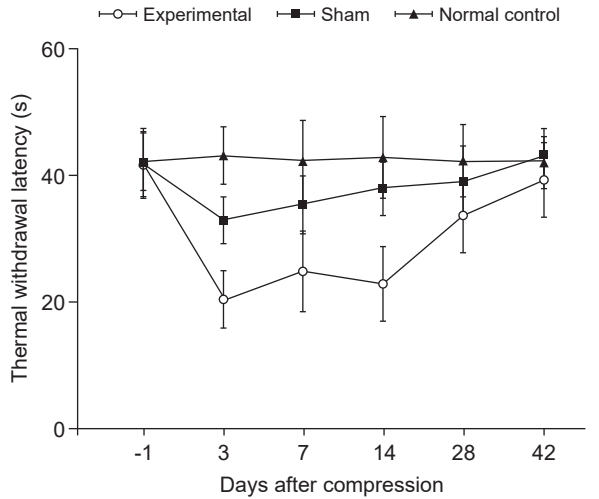


图 5 各时间点热缩足反射潜伏期测量结果
Fig. 5 Comparison of thermal withdrawal latencies in the three groups in different time points



有统计学意义 ($P < 0.05$), 实验组与对照组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。术后 7 天、术后 14 天、28 天, 实验组与对照组、空白组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组和空白组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。术后 42 天, 实验组与对照组、空白组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组和空白组之间比较, 差异无统计学意义。

组内比较: 实验组术后各时间点与术前 TWL 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 3 天与术后 14 天比较, 差异无统计学意义, 与术后 7 天、28 天、42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 7 天与术后 14 天、28 天、42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 14 天与术后 28 天、42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 28 天与术后 42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组术后 3 天、7 天、14 天、28 天与术前 TWL 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 术后 42 天与术前 TWL 比较, 差异无统计学意义。空白组术前与术后各时间点 TWL 比较, 差异均无统计学意义。

3. 步态分析

(1) 足印面积 (print area)

组间比较: 手术前三组之间比较差异无统计学意义, 说明手术前所有大鼠的足印面积处于同一基线。术后 3 天, 实验组、对照组与空白组比较, 差异无统计学意义 ($P < 0.05$), 实验组与对照组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。术后 7 天、术后 14 天、28 天, 实验组与对照组、空白组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组和空白组之间差异无统计学意义。术后 42 天, 三组之间比较差异无统计学意义 (见图 6)。

组内比较: 实验组术后各时间点与术前足印面积比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 3 天与术后 7 天、14 天、28 天、42 天比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 7 天与术后 14 天、28 天、42 天比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 14 天与术后 28 天、42 天比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 28 天与术后 42 天比较, 差异无统计学意义。对照组术后 3 天、7 天与术前足印面积比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 术后 14 天、28 天、42 天与术前足印面积比较, 差异无统计学意义。空白组术前与术后各时间点足印面积比较, 差异均无统计学意义 (见图 6)。

(2) 支撑相 (stand phase)

组间比较: 手术前三组之间比较差异无统计学意义, 说明手术前所有大鼠的支撑相处于同一基线。

术后 3 天、7 天, 实验组与对照组、空白组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组和空白组之间比较, 差异无统计学意义。术后 14 天、28 天, 实验组与对照组、空白组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组和空白组之间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。术后 42 天, 实验组与对照组、空白组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组和空白组之间比较, 差异无统计学意义 (见图 7)。

组内比较: 实验组术后各时间点与术前支撑相比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 3 天与术后 28 天比较, 差异无统计学意义, 与术后 7 天、14 天、42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 7 天与术后 14 天、28 天、42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 14 天与术后 28 天、42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 28 天与术后 42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组术后 7 天、14 天、28 天与术前支撑相比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 术后 3 天、42 天与术前支撑相比较, 差异无统计学意义。空白组术前与术后各时间点支撑相比较, 差异均无统计学意义 (见图 7)。

(3) 摆动相 (swing phase)

组间比较: 手术前三组之间比较差异无统计学意义, 说明手术前所有大鼠的摆动相处于同一基线。术后 3 天, 实验组与对照组、空白组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组和空白组之间比较, 差异无统计学意义。术后 7 天、14 天、28 天, 实验组与对照组、空白组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组和空白组之间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。术后 42 天, 实验组与对照组、空白组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组和空白组之间比较, 差异无统计学意义 (见图 8)。

组内比较: 实验组术后各时间点与术前摆动相比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 3 天与术后 7 天、14 天、28 天、42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 7 天与术后 14 天、28 天、42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 14 天与术后 28 天、42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 28 天与术后 42 天比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组术后 7 天、14 天、28 天与术前摆动相比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 术后 3 天、42 天与术前摆动相比较, 差异无统计学意义。空白组术前与术后各时间点摆动相比较, 差异均无统计学意义 (见图 8)。

(4) 摆动速度 (swing speed)

组间比较：手术前三组之间比较差异无统计学意义，说明手术前所有大鼠的摆动速度处于同一基线。术后3天、7天、14天、28天、42天，实验组与对照组、空白组比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，对照组和空白组之间比较差异无统计学意义 (见图9)。

组内比较：实验组术后各时间点与术前摆动速度比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；术后3天与术后7天、14天、28天、42天比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；术后7天与术后14天、28天、42天比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；术后14天与术后28天、42天比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；术后28天与术后42天比较，差异有

统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组除术后3天与其他时间点差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，其余术前与术后各时间点摆动速度比较，差异均无统计学意义。空白组术前与术后各时间点摆动速度比较，差异均无统计学意义 (见图9)。

4. 关节突关节滑膜炎性因子含量测定结果

(1) 关节突关节滑膜 TNF- α 含量测定

实验组术后42天所测定的关节突关节滑膜 TNF- α 含量，与空白组42天关节突关节滑膜 TNF- α 含量进行组间比较，差异有统计学意义 (t 值为2.112, $P < 0.05$)。实验组与对照组术后3天、7天、14天、28天、42天各时间点所测定的关节突关节滑膜 TNF- α 含量进行比较，术后3天、7天、14天、28天差异有统计学意义 (t 值分别为2.285、6.824、

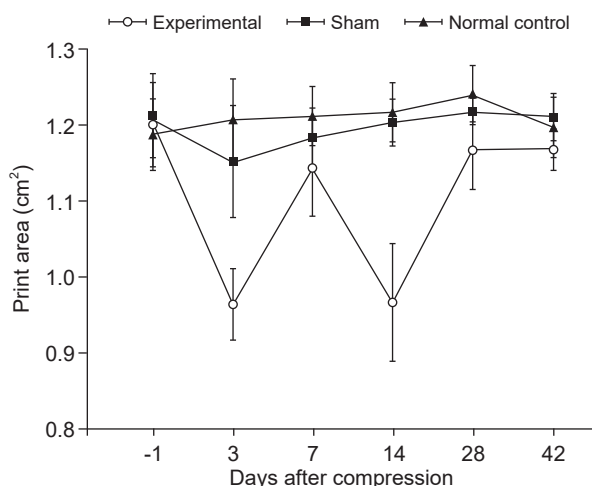


图6 各时间点足印面积测量结果

Fig. 6 Comparison of print area in the three groups in different time points

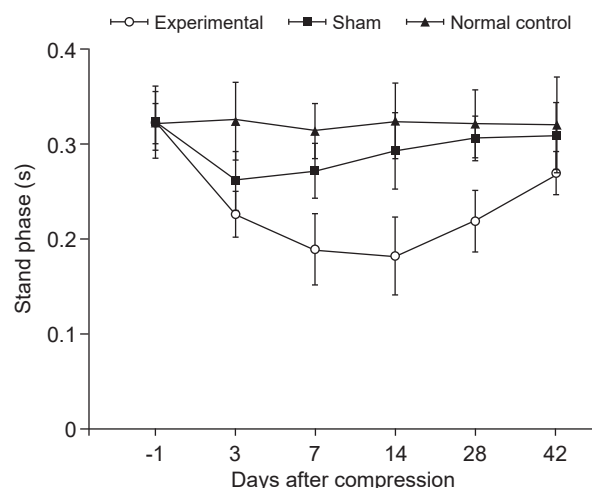


图7 各时间点支撑相测量结果

Fig. 7 Comparison of stand phase in the three groups in different time points

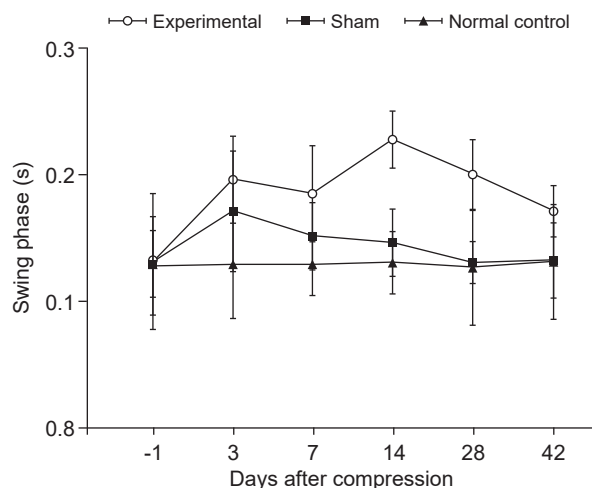


图8 各时间点摆动相测量结果

Fig. 8 Comparison of swing phase in the three groups in different time points

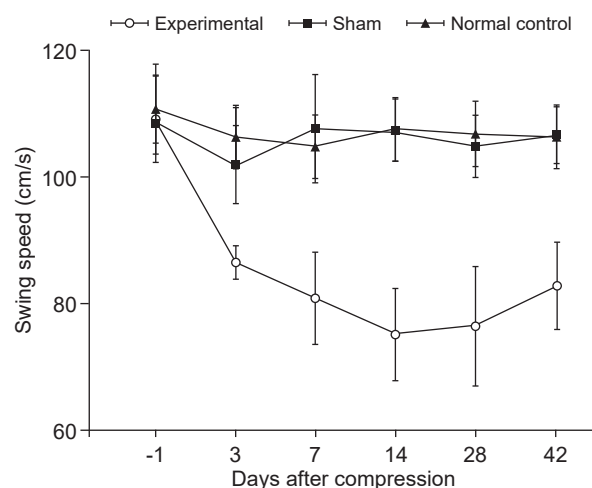


图9 各时间点摆动速度测量结果

Fig. 9 Comparison of swing speed in the three groups in different time points

5.753、3.114, $P < 0.05$), 术后 42 天差异无统计学意义 (t 值为 1.638, $P > 0.05$, 见表 1)。

(2) 关节突关节滑膜 IL-1 β 含量测定

实验组术后 42 天所测定的关节突关节滑膜 IL-1 β 含量, 与空白组 42 天关节突关节滑膜 IL-1 β 含量进行组间比较, 差异有统计学意义 (t 值为 2.864, $P < 0.05$)。实验组与对照组于术后 3 天、7 天、14 天、28 天、42 天各时间点所测定的关节突关节滑膜 IL-1 β 含量进行比较, 术后 3 天、7 天、14 天差异有统计学意义 (t 值分别为 10.567、7.563、5.259, $P < 0.05$), 于术后 28 天、42 天差异无统计学意义 (t 值分别为 1.985、1.732, $P > 0.05$, 见表 2)。

5. 关节突关节组织形态学观察

对照组关节突关节标本经甲苯胺蓝染色后, 各时间点组织学观察未见明显差异, 均表现为软骨表面光滑, 软骨厚度正常, 软骨细胞排列整齐 (见图 10A-E)。实验组关节突关节标本经甲苯胺蓝染色后, 随时间延长, 组织学表现出明显变化, 术后 3 天可见关节突关节间隙变狭窄, 术后 7 天可见软骨下基质染色变浅, 术后 14 天可见软骨细胞减少, 软骨表面变粗糙, 软骨厚度变薄, 术后 28 天可见软骨细胞进一步减少, 软骨厚度进一步降低, 术后 42 天可见软骨表面不平整, 出现细小裂纹 (见图 10F-J)。

讨 论

腰痛在世界范围内是十分普遍的医疗和社会问题^[1-4], 有研究指出, 高达 84% 以上的成年人在一生之中曾经受过腰痛的困扰^[2]。然而对于腰痛的发病机制, 目前仍有诸多不明之处^[13], 腰痛的诊断和治疗仍然是世界级的医学难题。目前已知有多种因素参与这一病理变化, 包括椎间盘退变、椎间关节损伤、肌肉筋膜炎症等^[14]。虽然多数研究均认为, 腰痛与椎间盘退变存在十分密切的关联^[7], 但也应看到, 并非所有椎间盘退变均会引起疼痛这一临床症状。与椎间盘退变相似, 腰椎关节突关节损伤与腰痛之间的关系同样密切而存有大量未知之处。一方面, 有研究^[15,16]认为 15%~45% 的腰痛是由腰椎关节突关节因素产生, 另一方面, 也有研究^[17,18]认为并非所有腰椎关节突关节骨关节炎病人均合并有腰痛症状。

众所周知, 制备动物模型是了解发病机制的重要途径, 虽然目前已有大量公认的椎间盘退变制模方法^[19]和数量相对较少的关节突关节损伤制模方法, 但椎间盘退变相关的疼痛模型和关节突关节损伤相关的疼痛模型均较少见。究其原因, 与疼痛的评估方法困难有很大关系。疼痛既可产生于神经末梢, 也可产生于传导通路^[20]。疼痛作为一种主观感受, 不同人的感受程度差异很大^[21], 但均可表现出

表 1 术后各时间点关节突关节滑膜 TNF- α 含量测定结果 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SD$, pg/g)

Table 1 Concentrations of TNF- α in the synovium of each group in different time points ($n = 6$, $\bar{x} \pm SD$, pg/g)

组别 Group	3 天 3 days	7 天 7 days	14 天 14 days	28 天 28 days	42 天 42 days
实验组 Experimental group	28.28 $\pm$ 3.59 [#]	65.15 $\pm$ 6.77 [#]	58.14 $\pm$ 5.65 [#]	31.74 $\pm$ 4.78 [#]	19.51 $\pm$ 2.11 [*]
对照组 Control group	19.98 $\pm$ 1.59	25.32 $\pm$ 1.46	23.73 $\pm$ 1.98	19.31 $\pm$ 2.12	18.17 $\pm$ 1.23
空白组 Blank group					17.51 $\pm$ 1.19
t	2.285	6.824	5.753	3.114	1.638
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.817

* $P < 0.05$, 与空白组相比; [#] $P < 0.05$, 与对照组相比

* $P < 0.05$, compared with group blank; [#] $P < 0.05$, compared with group control.

表 2 术后各时间点关节突关节滑膜 IL-1 β 含量测定结果 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SD$, pg/g)

Table 2 Concentrations of IL-1 β in the synovium of each group in different time points ($n = 6$, $\bar{x} \pm SD$, pg/g)

组别 Group	3 天 3 days	7 天 7 days	14 天 14 days	28 天 28 days	42 天 42 days
实验组 Experimental group	128.35 $\pm$ 23.14 [#]	93.56 $\pm$ 15.38 [#]	77.35 $\pm$ 9.39 [#]	35.15 $\pm$ 4.78	30.19 $\pm$ 3.96 [*]
对照组 Control group	35.26 $\pm$ 4.86	39.56 $\pm$ 5.15	36.26 $\pm$ 5.22	32.35 $\pm$ 4.13	29.53 $\pm$ 3.21
空白组 Blank group					28.26 $\pm$ 2.91
t	10.567	7.563	5.259	1.985	1.732
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.028	0.437

* $P < 0.05$, 与空白组相比; [#] $P < 0.05$, 与对照组相比

* $P < 0.05$, compared with group blank; [#] $P < 0.05$, compared with group control.

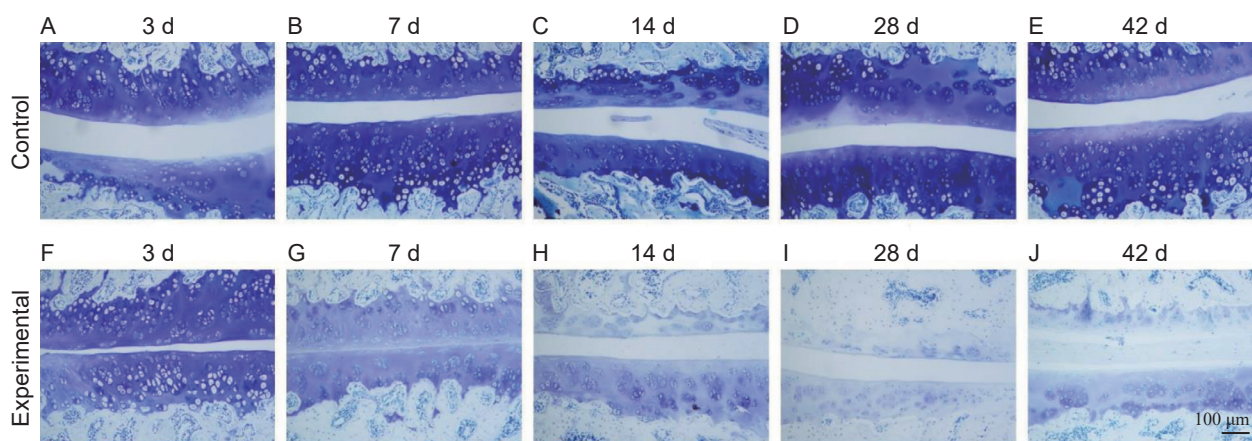


图 10 对照组和实验组术后各时间点关节突关节软骨甲苯胺蓝染色 (标尺 = 100 μm)

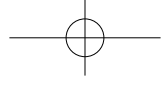
Fig. 10 Photomicrographs of facet joint cartilage stained with toluidine blue after operation in the control group and the experimental group (Bar scale = 100 μm)

疼痛敏感性的提高和疼痛阈值的降低^[22,23]。另一方面,疼痛的评估方法也存在一定主观性因素,现有的评估方法也存在一定误差。

目前,对于动物疼痛模型的评估方法主要分两类:一是诱发动物避退行为,测量相应刺激阈值的方法;二是观察评价动物行为学改变的方法。虽然疼痛评估方法很多,但不同于人类疼痛能够通过语言进行表述、动物疼痛的轻重程度难以准确测量。所以如何在活体动物上复制疼痛并评估疼痛,即建立疼痛动物模型,较在较大困难^[24]。本研究中,空白组大鼠在术前和术后各时间点的 MWT、TWL、步态分析各个指标均无明显差异,说明在各时间点空白组大鼠的疼痛行为学特征处于同一基线。对照组大鼠在术后 3~7 天出现 MWT 降低、TWL 减小、足印面积减小、支撑相缩短、摆动相延长,以及摆动速度降低的表现,这些疼痛行为学改变与实验大鼠经受外科手术导致手术切口相关疼痛有关。这一点在术后切口观察中有所表现,术后 3 天通过对大鼠背部手术切口的观察,可以发现切口周围有明显炎症反应表现(如皮缘发红、局部肿胀)。在术后 14 至 28 天以后,各个指标回归到术前基线水平,并与空白组实验动物无明显差异,提示外科手术创伤期已经结束,不再对疼痛行为学产生影响。实验组大鼠在置入棘突间加压弹簧后,弹簧的加压作用从置入时刻一直持续到大鼠处死,腰椎关节突关节受到持续动态机械加压作用,由此产生的损伤因子也是持续存在并发挥作用的,这导致疼痛相关行为学在术后 3 天至 42 天范围内持续发生改变,具体表现为: MWT 降低、TWL 减小、足印面积减小、支撑相缩短、摆动相延长,以及摆动速度降低。但这种变化趋势并不是均匀的。术后 10 至 14 天内,疼

痛行为学指标发生急剧变化,并达到高峰。这是由于在这一阶段,关节突关节加压产生的作用与外科手术创伤引起的疼痛作用叠加。之后变化曲线趋于平缓,并有轻度向正常回归的趋势。这种变化首先说明弹簧加压的作用是持续的,同时弹簧的拉力并不是完全固定的,会随着弹簧的长度动态变化,随着时间延长,痛阈发生变化,并逐渐适应弹簧的加压作用,所以会出现轻度回归的变化趋势。

为了进一步证实关节突关节源性疼痛在动物模型中的复制,本研究对腰椎关节突关节滑膜炎性因子进行测定和关节软骨形态学评价。TNF- α 和 IL-1 β 都是炎症发生发展过程中起到重要作用的细胞因子,在关节突关节源性疼痛中同样发挥着重要的作用。Henry 等^[25]在腰椎关节突关节短时加压模型导致关节突关节源性疼痛动物模型中发现,造模大鼠在关节突关节受到异常机械加压应力的 28 天后,检测到关节突关节滑膜中 TNF- α 和 IL-1 β 均有高表达。Xu 等^[26]在腰椎管狭窄症的病人中,发现腰椎关节突关节滑膜中的 IL-1 β 显著升高,同时发现 IL-1 β 的表达量与关节突关节退变的严重程度呈正相关。以上研究均证实 TNF- α 和 IL-1 β 在关节突关节源性腰痛,特别是早期病程中的重要作用。本研究结果同样证实,当大鼠腰椎关节突关节受到持续机械加压应力损伤后,会产生能够导致大鼠疼痛相关行为学改变的疼痛作用。与此同时,关节突关节滑膜中的疼痛相关炎症因子,主要是 TNF- α 和 IL-1 β 的表达量也发生相同趋势的升高。这种改变在病程早期,同时也是疼痛相关行为学改变最明显的阶段,最为明显。同样,在关节突关节持续加压过程中,腰椎关节突关节组织形态学也同步展现出骨关节炎的病理改变,如关节间隙变窄、软骨细胞减少、软骨厚



度变薄、软骨表面不平整等。由此提示, 腰椎关节突关节退变的各个阶段, 细胞因子起着十分重要的作用。可以展望, 如果将这些细胞因子的受体阻滞剂注入相应靶点, 有可能逆转腰椎关节突关节的退变过程。Fernandes 等^[27]曾在动物研究中, 将重组 IL-1 受体阻滞剂注射入兔膝关节腔内, 发现能够显著改善关节软骨的退变。腰椎关节突关节作为一种真正的滑膜关节, 也有理由相信, 应用特异性单克隆抗体对关节突关节退变进行靶向治疗, 阻断相应信号通路, 能够获得有效而准确的治疗效果。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Balague F, Mannion AF, Pellise F, *et al.* Non-specific low back pain[J]. *Lancet*, 2012, 379:482-491.
- [2] Deyo RA, Weinstein JN. Low back pain[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344:363-370.
- [3] Hartvigsen J, Hancock MJ, Kongsted A, *et al.* What low back pain is and why we need to pay attention[J]. *Lancet*, 2018, 391(10137):2356-2367.
- [4] Langevin HM, Sherman KJ. Pathophysiological model for chronic low back pain integrating connective tissue and nervous system mechanisms[J]. *Medical Hypotheses*, 2007, 68(1):74-80.
- [5] Martin BI, Deyo RA, Mirza SK, *et al.* Expenditures and health status among adults with back and neck problems[J]. *JAMA*, 2008, 299(6):656-664.
- [6] Nguyen C, Poiraudau S, Rannou F. From Modic 1 vertebral-endplate subchondral bone signal changes detected by MRI to the concept of 'active discopathy'[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(8):1488-1494.
- [7] Luoma K, Riihimäki H, Luukkainen R, *et al.* Low back pain in relation to lumbar disc degeneration[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2000, 25(4):487-492.
- [8] Manchikanti L, Pampati V, Beyer C, *et al.* Evaluation of psychological status in chronic low back pain: comparison with general population[J]. *Pain Physician*, 2002, 5(2):149-155.
- [9] 吕游, 陈辉, 郑召民. 椎间盘退变实验动物模型的研究进展 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2006, 16(1):68-71.
- [10] 吕游, 侯树勋. 腰痛动物模型研究进展 [J]. *中国骨与关节杂志*, 2018, 7(2):146-149.
- [11] Sawa AG, Crawford NR. The use of surface strain data and a neural networks solution method to determine lumbar facet joint loads during in vitro spine testing[J]. *J Biomech*, 2008, 41(12):2647-2653.
- [12] Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1980, 20:441-462.
- [13] Jensen MC, Brant-Zawadzki MN, Obuchowski N, *et al.* Magnetic resonance imaging of the lumbar spine in people without back pain[J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(2):69-73.
- [14] Manchikanti L, Pampati V, Damron K, *et al.* Evaluation of psychological status in chronic low back pain: comparison with general population[J]. *Pain Physician*, 2002, 5(2):149-155.
- [15] Boswell MV, Singh V, Staats PS, *et al.* Accuracy of precision diagnostic blocks in the diagnosis of chronic spinal pain of facet or zygapophysial joint origin: a systematic review[J]. *Pain Physician*, 2003, 6:449-456.
- [16] Pampati S, Cash KA, Manchikanti L. Accuracy of diagnostic lumbar facet joint nerve blocks: a 2-year follow-up of 152 patients diagnosed with controlled diagnostic blocks[J]. *Pain Physician*, 2009, 12(5):855-866.
- [17] Kim CK, Park KW. Characteristic appearance of facet osteoarthritis of the lower lumbar spine on planar bone scintigraphy with a high negative predictive value for metastasis[J]. *Clin Nucl Med*, 2008, 33(4):251-254.
- [18] Kalichman L, Li L, Kim DH, *et al.* Facet joint osteoarthritis and low back pain in the community-based population[J]. *Spine*, 2008, 33(23):2560-2565.
- [19] 李慧莹, 单志婧, 翟志超, 等. 腰椎间盘突出症动物模型的研究进展 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2015, 21(1):64-66, 68.
- [20] Cavanaugh JM. Neural mechanisms of lumbar pain[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1995, 20(16):1804-1809.
- [21] Hopkin K. Show me where it hurts: tracing the pathway of pain[J]. *J NIH Res*, 1997, 9:37-43.
- [22] Wilder-Smith OHG, Tassonyi E, Arendt-Nielsen L. Preoperative back pain is associated with diverse manifestations of central neuroplasticity[J]. *Pain*, 2002, 97(3):189-194.
- [23] Flor H, Diers M, Birbaumer N. Peripheral and electrocortical responses to painful and non-painful stimulation in chronic pain patients, tension headache patients and healthy controls[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 361(1-3):147-150.
- [24] 邵芳冰, 房军帆, 王思思, 等. 慢性痛诱发痛焦虑抑郁样情绪动物模型及其行为学评价概述 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2020, 26(10):763-768.
- [25] Henry JL, Yashpal K, Vernon H, *et al.* Lumbar facet joint compressive injury induces lasting changes in local structure, nociceptive scores, and inflammatory mediators in a novel rat model[J]. *Pain Res Treat*, 2012, 2012:127637.
- [26] Xu D, Sun Y, Bao G, *et al.* MMP-1 overexpression induced by IL-1 β : possible mechanism for inflammation in degenerative lumbar facet joint[J]. *J Orthop Sci*, 2013, 18(6):1012-1019.
- [27] Fernandes J, Tardif G, Martel-Pelletier J, *et al.* In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: prevention of osteoarthritis progression[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(4):1159-1169.