

## · 基础研究 ·

## 改良硬化剂注射法大鼠椎动脉颈椎病模型建立的实验研究

王怡璇<sup>1,2</sup>, 林雨康<sup>2</sup>, 彭楠<sup>1,2</sup>, 李腾龙<sup>1</sup>, 肖晶晶<sup>1,2</sup>, 李璐<sup>1,2</sup>

(1.湖南中医药大学第二附属医院,湖南 长沙 410005;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410006)

**【摘要】** 目的:对硬化剂注射法制作椎动脉颈椎病(cervical spondylosis of vertebral artery type, CSA)大鼠模型进行改良,评价改良硬化剂造模法制作大鼠 CSA 模型的有效性。方法:健康 SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,随机分为空白组 20 只,模型组 20 只。模型组采用改良硬化剂造模法造模,造模 4 周后观察大鼠的一般情况,经颅多普勒超声(transcranial Doppler, TCD)检测大鼠椎动脉血流速度、搏动指数、阻力指数,旷场试验检测大鼠精神紧张度。结果:造模后 1~2 d,模型组大鼠均出现不同程度蜷缩喜卧、颤抖、眯眼、眼分泌物增多等情况,实验过程中未出现大鼠脱落及死亡情况。模型组的平均血流速度比空白组低( $P<0.05$ ),模型组的搏动指数、阻力指数比空白组高( $P<0.05$ ),模型组大鼠精神紧张度较空白组明显增高,组间差异具有统计学意义。结论:改良硬化剂造模法可成功制备 CSA 大鼠模型,具有成功率高、稳定性高、死亡率低、操作简单等优势。

**【关键词】** 椎动脉型颈椎病; 硬化剂造模法; 动物模型; 大鼠

中图分类号:R681.5

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2023.02.018

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Experimental study of improved sclerotherapy injection in rat model of vertebral arteriocervical spondylopathy**

WANG Yi-xuan<sup>1,2</sup>, LIN Yu-kang<sup>2</sup>, PENG Nan<sup>1,2</sup>, LI Teng-long<sup>1</sup>, XIAO Jing-jing<sup>1,2</sup>, LI Lu<sup>1,2</sup> (1.The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410005, Hunan, China; 2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China)

**ABSTRACT** **Objective** To improve the rat model of cervical spondylosis of vertebral artery type (CSA) induced by injecting sclerosing agent. To evaluate the efficacy of injecting sclerosing agent to induce CSA. **Methods** Forty Health SPF SD rats (20 males and 20 females), were randomly divided into two groups: the model group (20) and the blank group (20). All the animals were followed up for 4 weeks for the observation of general situation, transcranial Doppler (TCD) detection of blood flow velocity, pulsatility index and resistive index of the vertebral artery, measurement of mental distress by open-field test. **Results** One to two days after establish the animal model, rats in the model group appeared apathetic with decreased autonomic activities, trembling, squinting, increased eye excrement, etc., and no rats died during the experiment. The mean blood flow velocity of the model group was lower than that of the blank group ( $P<0.05$ ), and the pulsatility index and resistive index of the model group were higher than that of the blank group ( $P<0.05$ ). The mental distress of the model group was significantly higher than that of the blank group. **Conclusion** The modified injection of sclerosing agent is a practical method to establish the rat model of CSA, with high success rate, high stability, low mortality and simple operation.

**KEYWORDS** Vertebral artery type cervical spondylopathy; Hardening agent modeling method; Animal model; Rat

椎动脉型颈椎病(cervical spondylosis of vertebral artery type, CSA),是指因椎-基底动脉供血不足导致局部脑血流量的改变,导致头痛、眩晕、恶心、耳鸣、视物不清等一系列临床表现的疾病。随着现代经济

与社会的发展,人们工作和生活方式的改变,近年来 CSA 呈高发病率和年轻化趋势<sup>[1]</sup>,并逐渐成为一种新型职业病<sup>[2]</sup>,严重地影响着人们的身体健康和生活质量。目前针对 CSA 的治疗以保守治疗为主,中医认为 CSA 属于眩晕范畴,对于 CSA 治疗具有独特疗效<sup>[3-4]</sup>。但是 CSA 的高复发率、慢性疼痛、长期康复等,使得 CSA 的治疗成为临床中的主要问题。CSA 的主要病因尚不确定,椎-基底动脉供血不足是椎动脉型颈椎病的主要发病机制是目前比较公认的观点。越来越多的研究证实,颈椎力学失衡是诱发 CSA 的重要原因<sup>[4-5]</sup>。许多学者认为,由于颈椎的动力性

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(编号:19C1409);长沙市科技局科技计划项目(编号:kh2201056);湖南中医药大学 2022 年度校级科研项目(编号:2022XYLH040)

Fund program:Scientific Research Project of Hunan Provincial Department of Education(No.19C1409)

通讯作者:李腾龙 E-mail:2005225@hnuem.edu.cn

Corresponding author:LI Teng-long E-mail:2005225@hnuem.edu.cn

及静力性平衡失调,椎旁肌肉受力失衡,使颈椎曲度改变,进一步导致椎动脉扭曲变细,从而引起椎动脉供血减少<sup>[6-8]</sup>。硬化剂造模法是目前常用的 CSA 动物模型造模方法,通过在动物颈椎局部注射硬化剂造成颈椎力学失衡、椎动脉受压,从而制造椎动脉颈椎病模型<sup>[9]</sup>。消痔灵注射液是常用的硬化剂类型,其主要成分为五倍子、明矾,通过黏膜下注射使局部组织纤维化,促进小动脉内血栓形成,达到闭塞血管、使局部组织挛缩的目的<sup>[10]</sup>。常规的大鼠 CSA 硬化剂造模法操作方法为麻醉成功后,取消痔灵注射液 2 ml 注射于左侧 C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> 横突间及周围组织,并于第 2 周重复 1 次<sup>[9]</sup>。但是团队在前期实验中发现,此类造模方法死亡率高、操作复杂,为实验研究带来不便。因此,为了制备更加稳定可行 CSA 大鼠模型,对传统的硬化剂造模法进行了改良。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康 SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,雄性体重(200±10) g,雌性体重(150±10) g,购自湖南中医药大学实验动物中心。动物许可证号:430727221100472812。购入本实验室的动物适应性喂养 1 周,然后进行造模实验。

### 1.2 实验试剂与设备仪器

水合氯醛(100 g,国药集团化学试剂有限公司);消痔灵注射液(吉林省集安益盛药业股份有限公司,批号:Z22026175);0.9% NaCl(100 ml,国药准字 H43020456)。全自动血流变测试仪(北京众驰),彩色多普勒超声诊断仪(飞依诺科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

所有大鼠在 SPF 级实验室进行标准化喂养(室温 20~24 ℃,相对湿度 40%~60%),24 h 光照明暗各半。每日给予新鲜水、SPF 级实验室专用灭菌饲料喂养,每笼饲养 3 只,2 d 更换 1 次垫料。

40 只随机分为空白组 20 只,模型组 20 只。改良硬化剂造模法进行 CSA 大鼠模型制备。方法:将模型组大鼠进行称重,使用 10% 水合氯醛按照 0.3 ml/100 g 的用量对大鼠进行腹腔注射麻醉。麻醉成功后,将大鼠放置成右侧卧位,取消痔灵注射液,从左侧肋骨头上缘,垂直颈椎进针,注射于大鼠左侧 C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> 横突孔周围肌肉,用量 1 ml/100 g。1 周后重复注射 1 次,用量 1 ml/100 g。

### 1.4 观察项目与方法

(1)大鼠一般情况。对大鼠一般情况进行观察,包括大鼠体重、行为、进食量、粪便量、颈部情况、死亡率等。(2)经颅多普勒超声(transcranial Doppler, TCD)检测。TCD 检测包括平均血流速度(mean ve-

locity, Vm)、搏动指数(pulsatility index, Pi)、阻力指数(resistance index, Ri),用剃须刀将大鼠颈部及枕后体毛刮尽,在剔尽体毛的皮肤上涂上均匀的介质,以 TCD 探头分别对准大鼠颈椎侧面横突或者枕外隆突后的枕窗,TCD 探头超声探照方向与椎动脉血流方向呈 30°~40° 夹角,聚焦以能清楚探测血流为准,一般聚焦深度为 20~30 mm,分别测定椎动脉或者基底动脉平均血流速度、搏动指数、阻力指数。(3)神经精神紧张度检测。采用旷场试验进行检测,大鼠旷场反应箱高 40 cm,底边长 100 cm,内壁涂黑,底面平均分为 25 个 4 cm×4 cm 小方格,正上方 2 m 处架一数码摄像头,其视野覆盖整个旷场内部。光照为全人工照明,实验人员和计算机等设备位于另一房间以减小对动物的干扰,实验室背景噪音控制在 65 dB 以下。将动物放入箱内底面中心,开始摄像,记录时间 5 min。记录指标包括中央格停留时间、肢体越过的格子总数、总运动距离、沿边运动距离、中央运动距离、大便次数等,每只大鼠检测后,彻底清洁旷场反应箱内部,防止对 2 次试验产生干扰。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 26.0 统计软件对实验数据进行分析,符合正态分布的定量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,TCD 检测及旷场试验结果数据首先进行正态性检验和方差齐性检验,两组间比较采用成组设计定量资料的 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠的一般情况

造模前,两组大鼠在活动度、进食量、体重、大便、毛量等方面未见明显差异。造模后第 1~2 天,模型组大鼠重量较造模前明显减轻、大便量减少,考虑进食量减少引起,平均 3~4 d 后体重逐渐增加、大便量逐渐增加。造模后模型组大鼠较空白组活动量、进食量、大便量明显减少,造模后 1~2 d 造模组大鼠均出现不同程度蜷缩喜卧、颤抖、眯眼、眼分泌物增多等情况。4 周后模型组大鼠左侧颈部肌肉均出现大小不等结节。实验过程中未出现大鼠脱落及死亡情况。

### 2.2 TCD 检测颈椎结果

TCD 清晰探测大鼠颈部椎动脉血流(图 1)。与空白组比较,模型组 Vm 较低(*P*<0.05),Pi、Ri 明显升高(*P*<0.05),见表 1。

### 2.3 神经精神紧张度检测

旷场试验结果显示,模型组大鼠中央格停留时间及大便次数较空白组明显增多(*P*<0.05);模型组大鼠肢体越过的格子总数、总运动距离、沿边运动距离、中央运动距离较空白组减少(*P*<0.05,见表 2)。

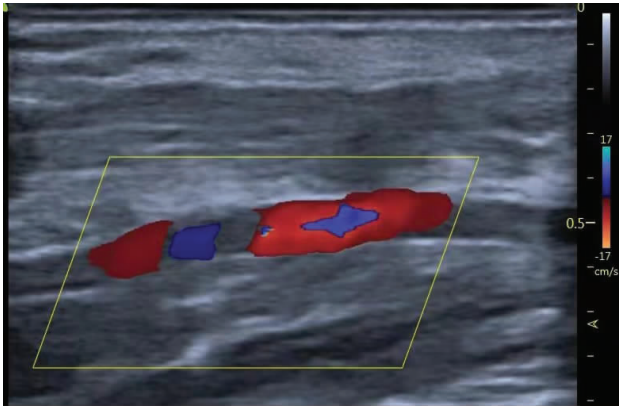


图 1 大鼠颈部椎动脉血流

Fig.1 Blood flow of cervical vertebral artery in rats

表 1 造模 4 周后空白组与模型组 TCD 检测结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Comparison of TCD results between the blank group and the model group 4 weeks after modeling ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数/只	Vm/(mm·s <sup>-1</sup> )	Pi	Ri
空白组	20	20.32±0.78	1.04±0.17	0.57±0.63
模型组	20	14.84±0.79	1.82±0.18	0.89±0.11
t 值		18.146	-8.148	-8.512
P 值		0.00	0.00	0.00

注:Vm 为平均血流速度,Pi 为搏动指数,Ri 为阻力指数

### 3 讨论

CSA 的主要症状包括肩颈部疼痛、眩晕、头痛等,可能还伴有恶心、突发性失明、耳聋、肢体麻木及感觉异常等,治疗主要以保守治疗为主<sup>[11]</sup>。少数考虑手术治疗,但是手术同样为患者带来手术后遗症等问题<sup>[12]</sup>,极大地影响了患者的生活状态,针对 CSA 的相关研究是临床工作中亟待解决的困难。因此,找到一种更加贴合临床情况、成功率高的 CSA 造模方法是研究的重要基础。

目前 CSA 造模法采用的实验动物通常为兔、大鼠、小鼠等<sup>[13-15]</sup>。朱明双等<sup>[16]</sup>研究发现,兔的颅底血管及颈椎上段与人高度相似,兔具有完整的大脑动脉环,但其颈椎只有横突切迹没有横突孔。张成英等<sup>[14]</sup>的研究表明,大鼠颈椎横突具有横突孔,与人颈

椎解剖高度相似。大鼠价格低廉,所需造模试剂少,容易饲养,灌胃容易等,更适合成为椎动脉颈椎病造模的实验动物。

硬化剂注射的剂量和周期是本造模方法的关键。目前尚未发现论文针对 CSA 的大鼠模型进行硬化剂注射法的剂量对比,尚未有文献报道稳定的 CSA 大鼠模型造模法,不同文献<sup>[17-19]</sup>中对于硬化剂造模法制作的 CSA 大鼠模型中硬化剂注射的剂量和周期存在较大差异。笔者经过反复尝试发现根据大鼠的体重,以 1 ml/100 g 的水平为大鼠注射硬化剂,首次注射 1 周后按照相同的剂量和位置再次注射,4 周后造模成功。按此剂量和周期对大鼠进行硬化剂注射,可以保证 CSA 大鼠模型的高成功率,模型稳定性强,死亡率小。

严格按照大鼠体重控制注射剂量是改良的关键。这可能因为大鼠体型相对较小,硬化剂的剂量能够极大程度影响大鼠颈部肌肉的挛缩程度,当体重与剂量不匹配时,大鼠极易出现过度挛缩、血管受压等问题,从而导致大鼠死亡。

改良硬化剂注射法通过将硬化剂注射至大鼠颈椎横突间,广泛浸润大鼠颈椎局部肌肉及血管,导致颈椎间隙狭窄、椎动脉受压<sup>[14-15]</sup>,从而制作 CSA 大鼠模型。目前临床中,椎动脉型颈椎病依然以症状学分类为主的分类方法。除椎动脉直接受压外,脊髓受压、神经根受压等均可能出现椎动脉颈椎病症状。TCD 结果显示本造模方法可以导致椎动脉血流速度减小、阻力指数增高,是椎动脉直接遭受机械压迫所致。因此本造模方法更符合临床椎动脉直接受压所导致的椎动脉型颈椎病,其他 CSA 可能出现的临床类型应根据临床需要选择相应造模方法。

综上所述,改良硬化剂造模法可以制作稳定性高、成功率高、死亡率低的 CSA 大鼠模型,同时兼具降低成本、提升成功率、操作方便等优势,可以为 CSA 动物模型的制作提供参考和借鉴。

#### 参考文献

- [1] LV Y W, TIAN W, CHEN D F, et al. The prevalence and associated factors of symptomatic cervical spondylosis in Chinese adults: a community-based cross-sectional study [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2018, 19(1): 325.

表 2 造模 4 周后空白组与模型组神经精神紧张度检测 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Test of neuromental tension in blank group and model group after 4 weeks of modeling ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数/只	停留时间/min	越格总数/个	总运动距离/m	沿边运动距离/m	中央运动距离/m	大便次数/次
空白组	20	0.45±0.18	52.41±10.82	15.57±6.86	10.13±6.77	11.98±3.60	23.54±4.29
模型组	20	0.77±0.11	47.36±9.37	13.89±6.17	8.92±4.98	9.21±2.37	27.08±6.55
t 值		-8.044	3.424	3.318	2.122	5.697	-5.088
P 值		0.000	0.008	0.000	0.048	0.000	0.000

- [2] SJÖLIE A. Psychosocial correlates of low-back pain in adolescents [J]. *Eur Spine J*, 2002, 11(6):582-588.
- [3] 宋敏,董平,巩彦龙,等.活血定眩胶囊对椎动脉型颈椎病大鼠椎动脉自噬相关蛋白表达的影响[J].*中国临床药理学杂志*, 2021, 37(21):2938-2940, 2945.  
SONG M, DONG P, GONG Y L, et al. Effect of Huoxue Dingxuan Capsule on expression of autophagy-associated protein in vertebral artery of cervical spondylosis of vertebral artery type rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, 37(21):2938-2940, 2945. Chinese.
- [4] 周翔,罗华送,何嘉莹,等.正骨手法治疗颈源性突发性耳聋的随机对照试验[J].*中国骨伤*, 2015, 28(1):62-65.  
ZHOU X, LUO H S, HE J Y, et al. A randomized controlled trials on treatment of cervicogenic sudden hearing loss with chiropractic[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2015, 28(1):62-65. Chinese.
- [5] 张丽瑾,朱中书,孙钦然,等.针刀治疗颈椎病的临床应用概况[J].*长春中医药大学学报*, 2015, 31(5):1087-1091.  
ZHANG L J, ZHU Z S, SUN Q R, et al. Acupotomy treatment of cervical spondylosis[J]. *J Changchun Univ Chin Med*, 2015, 31(5):1087-1091. Chinese.
- [6] 畅亚鑫,李文雄,杨彬.中医整脊法治疗椎动脉型颈椎病研究进展[J].*陕西中医*, 2017, 38(9):1315-1316.  
CHANG Y X, LI W X, YANG F. Research progress in treating cervical spondylosis of vertebral artery type with chiropractic method of traditional Chinese medicine[J]. *Shanxi J Tradit Chin Med*, 2017, 38(9):1315-1316. Chinese.
- [7] 王善金,潘福敏,麻彬,等.对颈椎病性眩晕的临床认识[J].*中国矫形外科杂志*, 2016, 24(17):1587-1589.  
WANG S J, PAN F M, MA B, et al. Clinical progress of cervical spondylosis with vertigo[J]. *Orthop J China*, 2016, 24(17):1587-1589. Chinese.
- [8] 冯敏山,高景华,朱立国,等.椎动脉型颈椎病与神经根型颈椎病 X 线片表现的比较分析[J].*中国骨伤*, 2015, 28(4):330-334.  
FENG M S, GAO J H, ZHU L G, et al. Analysis of X-ray signs of cervical spondylosis between vertebral artery type and radiculopathy[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2015, 28(4):330-334. Chinese.
- [9] 陆永雷,陈朝晖,程露露,等.三种椎动脉型颈椎病动物模型比较研究[J].*中医临床杂志*, 2016, 28(9):1266-1268.  
LU Y L, CHEN Z H, CHENG L L, et al. Comparative study on three kinds of animal models of vertebral artery type of cervical spondylosis[J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2016, 28(9):1266-1268. Chinese.
- [10] 张双喜.痔疮的中医硬化注射疗法现状分析[J].*中国中医药现代远程教育*, 2012, 10(7):146-147.  
ZHANG S X. Analysis on the present situation of sclerotherapy of hemorrhoids with traditional Chinese medicine[J]. *Chin Med Mod Distance Educ China*, 2012, 10(7):146-147. Chinese.
- [11] 何升华.针刺疗法在骨科的应用进展[J].*中国骨伤*, 2019, 32(6):489-492.  
HE S H. Advances on the application of acupuncture therapy for orthopaedics[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2019, 32(6):489-492. Chinese.
- [12] 陈超,柳根哲,尹辛成,等.颈椎前路 Hybrid 手术的短期临床疗效观察[J].*中国骨伤*, 2022, 35(8):740-746.  
CHEN C, LIU G Z, YIN X C, et al. Short term clinical observation of cervical anterior Hybrid surgery[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2022, 35(8):740-746. Chinese.
- [13] 张翔,钱宇章,谢林,等.椎动脉型颈椎病动物造模的技术方法与结果评价[J].*中国组织工程研究*, 2019, 23(15):2427-2435.  
ZHANG X, QIAN Y Z, XIE L, et al. Technological methods and result evaluation of establishing the animal models of vertebral artery type of cervical spondylosis[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2019, 23(15):2427-2435. Chinese.
- [14] 张成英,陈前芬,田鹤村.大鼠及家兔脑动脉的比较及其在脑缺血模型中的应用[J].*解剖学研究*, 2000, 22(1):37-39, 21.  
ZHANG C Y, CHEN Q F, TIAN H C. Comparison on the brain artery of rat and rabbit for the model of cerebral ischemia[J]. *Anat Res*, 2000, 22(1):37-39, 21. Chinese.
- [15] 王超,朱俊琛,熊应宗,等.推拿改善兔椎动脉型颈椎病血供时效性的实验研究[J].*中国骨伤*, 2018, 31(8):769-774.  
WANG C, ZHU J C, XIONG Y Z, et al. Experimental study on improvement of blood supply timeliness of rabbits with vertebral artery type of cervical spondylosis by massage[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2018, 31(8):769-774. Chinese.
- [16] 朱明双,郑重,黄勇,等.注射硬化剂法制作家兔椎动脉型颈椎病动物模型[J].*中医正骨*, 2000, 12(12):11-13, 63.  
ZHU M S, ZHENG Z, HUANG Y, et al. Using sclerosing agent injection method to make rabbit model of vertebral artery type of cervical spondylosis[J]. *J Tradit Chin Orthop Traumatol*, 2000, 12(12):11-13, 63. Chinese.
- [17] 寿折星.复方川脊方治疗椎动脉型颈椎病兔动物模型作用及机制研究[D].武汉:华中科技大学, 2010.  
SHOU Z X. Effect and mechanism of compound chuanji formula in treatment of vertebral artery type of cervical spondylosis in rabbit model[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2010. Chinese.
- [18] 张昭.电针对椎动脉型颈椎病模型兔血浆内皮素、血清超氧化物歧化酶影响的研究[D].成都:成都中医药大学, 2008.  
ZHANG Z. Study on the effect of plasma endothelin and serum superoxide dismutase in rabbits with cervical spondylosis of vertebral artery type[D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2008. Chinese.
- [19] 明瑞蕊,徐腾腾,王金霞,等.盘龙七片对椎动脉型颈椎病大鼠的干预作用[J].*中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(22):51-58.  
MING R R, XU T T, WANG J X, et al. Effect of Panlongqi Tablet on cervical spondylosis of vertebral artery type in rats[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2021, 27(22):51-58. Chinese.

(收稿日期:2022-09-16 本文编辑:连智华)