SD 大鼠钳夹脊髓损伤模型的建立

李祥炎[1],陈建梅[2a],崔晓萍[2b],徐 皓[2a] (1. 三明市第一医院骨科,福建 三明 365000;2. 南京军区福州总医院 a:骨科,b:神经内科,福建 福州 350025)

[摘要] **目的** 探讨构建一种 SD 大鼠脊髓钳夹损伤模型,用于脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)的研究。**方法** 将 36 只成年雄性 SD 大鼠随机分成 A、B、C 三组,每组 12 只。脊髓损伤组(A 组):用动脉瘤夹钳夹大鼠第 10 胸椎对应脊髓。假手术组(B 组):只打开椎板,暴露脊髓,不造成 SCI。正常对照组(C 组):正常大鼠,不做任何处理。通过行为学观察(BBB 评分)、HE 染色和神经电生理检测进行判断。**结果** HE 染色结果:A 组可见脊髓正常组织被破坏,损伤区可见血管破裂出血,有大片坏死灶,周围神经细胞肿胀变性,内有炎症细胞浸润。B、C 两组基本一致,组织结构正常。BBB 评分:B 组术后 1 周功能恢复接近正常,评分 20 分。A 组术后第 2 周开始恢复,到第 3 周基本停止,最终 BBB 评分低于 6 分,两组比较有明显差异($P<0.05$)。神经电生理(SEP)检测:A 组可以明显看到 SEP 的波峰趋于水平,且潜伏期无限延长,与 B 组相差显著($P<0.05$)。A 组内动物 BBB 评分、SEP 无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 通过动脉瘤夹钳夹 SD 大鼠 T_{10} 脊髓,能够建立良好的脊髓损伤动物模型。

[关键词] 脊髓损伤;动脉瘤夹;SD 大鼠;皮层体感诱发电位

[中图分类号] R656.6 [文章标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)06-0596-03

Establishment of spinal cord injury model with ring clamp in SD rats

LI Xiang-yan, CHEN Jan-mei, CUI Xiao-ping, XU Hao (Department of Orthopedic, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou Fujian 350025, China)

Abstract: Objective To establish spinal cord injury (SCI) model of SD rats at T_{10} with ring clamp and to provide reliable data for further study. **Methods** 36 male SD rats were randomly divided into 3 groups (12 rats per group). SCI group(group A): the spinal cord of the rats were clamped on at T_{10} by aneurysm clip. Sham group(group B): merely opened the neural scute and the spinal cord was exposed without injury. Normal controlled group(group C): normal rats without any arrangement. Ethological study (BBB scores), histological and electrophysiological tests were conducted. **Results** HE staining results in group B and group C were identical as normal. Fragmented structure and necrosis could be seen in white and grey matter, and cellular swelling was detected in injured region in group A. BBB scores between group A and group B was significantly different ($P<0.05$). Electrophysiological(SEP) demonstrated that peak-to-peak value trended horizon and latency was extended infinitly in group A, the difference between group A and group B was significant ($P<0.05$). **Conclusion** A spinal cord injury model of SD rats can be established by clamped on T_{10} with aneurysm clip.

Keywords: spinal cord injury; aneurysm clip; SD rats; electrophysiological

脊髓损伤后经过一系列复杂的病理生理改变会引起脊髓组织内神经细胞发生不可逆死亡,最终导致瘫痪。目前对其病理机制的研究还未完全阐明,建立合适的动物模型是开展研究重要前提。然而,现有的动物模型无法满足急性脊髓挤压等多种损伤类型的研究需要。本实验根据临床损伤特点,利用动脉瘤夹钳夹 SD 大鼠 T_{10} 脊髓,以建立一种与临床脊髓损伤机制相接近的动物模型,从而为进一步探讨脊髓损伤后的修复提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性清洁级 Sprague-Dawley(SD)大鼠 36 只,体质量(262.3 ±5.6)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司[合格证号:SCXK(沪)2007 - 0005],常规饲养 1 周后开始进行实验。将大鼠随机分成 3 组,每组 12 只。脊髓损伤组(A 组):用动脉瘤夹钳夹大鼠 T_{10} 脊髓;假手术组(B 组):只打开椎板,暴露 T_{10} 脊髓,不造成 SCI;正常对照组(C 组):不进行任何手术操作。术前所有实验动物双后肢 BBB 评分均为 21 分。

1.2 方法

1.2.1 脊髓损伤的制备 A 组:将大鼠用 10% 水合氯醛(0.3 mL/100g)腹腔注射麻醉,俯卧位固定于手术台上。常规消毒铺单,以 T_{10} 棘突为中心行后背正中切口,长约 3 cm。逐层

[基金项目] 福建省青年人才基金资助(2007F3079)

[通讯作者] 陈建梅,E-mail: tmmu2001@yahoo.com.cn

[收稿日期] 2012-07-25 [修回日期] 2012-08-14

切开皮肤、皮下组织,剥离竖棘肌并向两侧牵开,显露 T_9 ~ T_{11} 棘突及椎板,切断 T_{10} ~ T_{11} 棘间韧带,并去除 T_{11} 部分棘突,用有齿镊夹持 T_{10} 棘突并稍向上提起,使 T_{10} ~ T_{11} 关节突关节分离,小心咬除 T_{11} 上关节突外侧缘部分骨质,使 T_{10} 下关节突下缘出现空隙,以此为突破口向上咬除 T_{10} 椎板,使 T_{10} 脊髓充分暴露,可见脊髓背侧正中有一粗大静脉。然后用动脉瘤夹夹持脊髓至其直径的 1/2,时间 30 s。可见大鼠脊髓后正中的静脉变细,尾巴逐渐卷曲翘起,双后肢出现抽搐,随后双后肢及尾巴松弛瘫软。用生理盐水冲洗伤口,逐层缝合。术后每日观察双后肢及尾巴活动情况,并予以人工膀胱挤尿 2 ~ 3 次,双后肢被动屈伸活动及按摩 2 ~ 3 次,并保持毛发干燥。B 组:暴露 T_{10} 脊髓后不进行钳夹,生理盐水冲洗伤口后缝合,其他处理同 A 组。C 组:麻醉后不进行手术处理。

1.2.2 行为学评分 在损伤后第 1 周、第 2 周、第 3 周、第 4 周,分别采用双人双盲法进行 BBB 功能评分[1]。方法简述如下:将造模后大鼠放置于平台上,观察记录其后肢行走及肢体活动能力。评分共三部分:第一部分为 0 ~ 7 分,评判动物后肢各关节活动;第二部分为 8 ~ 13 分,评判后肢的步态及协调功能;第三部分为 14 ~ 21 分,评判运动中爪的精细动作,三项满分为 21 分。

1.2.3 组织病理学检测 造模后 3 d 各组分别取动物 3 只,以 10% 水合氯醛(0.3 mL/100g)腹腔注射麻醉。仰卧位固定在灌注台上,剪开胸骨,暴露双肺和心脏,经左心室灌注 37 ℃ 生理盐水 250 mL,先快后慢,硬、肝脏触之坚韧后停止。然后将大鼠移至解剖台上,暴露原损伤脊髓处,将包括损伤部位上下各 5 mm 的脊髓取出,置于 4% 多聚甲醛溶液中继续后固定冲出体内血液,直至右心耳流出清亮的液体。然后继续灌注 4% 多聚甲醛 300 mL ,前 100 mL 快速灌注,当出现肌颤后改为缓慢灌注,直至大鼠四肢僵 6 h。然后将脊髓组织经冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、制成 5 μm 厚切片,每 10 张切片取 1 张进行常规 HE 染色。

1.2.4 皮层体感诱发电位 分别于术后第 1 周、第 4 周,检测大鼠皮层体感诱发电位(cortical somato-sensory evoked potential,CSEP)(Keypoint-4 肌电图/诱发电位仪,Medtronic 公司,美国)。方法简述如下:用 8% 硫化钠溶液将大鼠双后肢退毛,10% 水合氯醛(0.3 mL/100g)腹腔麻醉,再用 0.5 寸的针灸针于大鼠双眼外眦连线的中点向后 5 mm 处穿刺颅骨作为记录电极;左耳另穿一针灸针作为参考电极;接地电极置于对侧后肢;用同心圆针电极于大鼠坐骨神经处作为刺激极。给予直流方波电脉冲刺激,以 2 Hz,0.2 ms 方波刺激,叠加 100 ~ 200 次进行皮层体感诱发电位检测。多道记录对比,至少 3 道以上重复性好方可作为记录保存。

1.2.5 数据分析和处理 数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。BBB 评分结果采用完全随机设计资料的方差分析,CSEP 潜伏期及峰值 A、B、C 组间比较采用 SNK-q 检验。以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 BBB 评分

B 组术后第 1 天后肢出现短暂性活动迟缓,第 2 天功能明显恢复,1 周后功能恢复正常,评分 20 分。A 组在造模后第 1 天出现精神轻度萎靡,腹壁贴地,双后肢处于完全伸直位,无活动迹象,出现尿潴留,BBB 评分为 0。术后第 1 周内未见明显功能恢复,2 周排尿反射逐渐恢复,双后肢功能开始缓慢恢复,第 4 周时评分为 5 分,与假手术组、正常对照组相差显著($P < 0.05$),假手术组与正常对照组 1 周后对比未见差异。A 组内动物之间 BBB 评分无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 神经电生理检测

CSEP 检测过程中,刺激大鼠一侧坐骨神经,在对侧相当于后肢皮层感觉区可记录到稳定的 CSEP 波形。常见的 CSEP 波形是由正向-负向-正向即 P1、N1、P2 波形组成,部分大鼠可记录另一负向波 N2 波(图 1a)。检测结果显示:A 组损伤后第一周大鼠的潜伏期无限延长,基本无法引出 CSEP 波(图 1b),组内动物的 CSEP 具有相同的表现特点。而 B、C 组无明显差异,表现为正常的 CSEP。A、B组内CSEP 有显著性差异($P < 0.05$),A 组内动物之间 CSEP 无显者差异($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组 CSEP 检测结果($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	潜伏期(ms)	峰值(μV)
A 组	-	-
B 组	6.48 ± 1.31 *	21.60 ± 3.93 *
C 组	6.30 ± 1.20 * #	21.95 ± 3.80 * #

*:与 A 组比较,$P < 0.05$;#:与 B 组比较,$P > 0.05$

a:正常大鼠 CSEP 波形;b:脊髓损伤后 CSEP 潜伏期无限延长,无法引出波峰(绿色图为脊髓横断对照)

图 1 大鼠 CSEP 图

2.3 脊髓组织病理学检测

大体观察:原钳夹部位脊髓周径较头尾两端小,中央静脉可见血栓。倒置显微镜下观察:B、C 组大鼠脊髓灰白质组织结构完整,神经细胞形态正常、尼氏体清晰及细胞膜完整,白质内神经纤维排列整齐,细胞间基质均匀(图 2a、b)。A 组动物的脊髓组织学表现一致,损伤区灰白质界限不清,中央灰质出现大面积出血,尼氏体消失,白质周围细胞肿胀、空泡变性,部分细

胞胞核固缩,并有大量炎性细胞和巨噬细胞浸润(图 2c)。

a、b:正常大鼠脊髓,脊髓灰白质组织结构完整,在灰质中神经细胞分布均匀、形态正常、尼氏体清晰及细胞膜完整,白质内神经纤维排列整齐,细胞间基质均匀;c:大鼠损伤脊髓,可见损伤区灰白质界限不清,中央灰质出现大面积出血,尼氏体消失,白质周围细胞肿胀、空泡变性,部分细胞胞核固缩

图 2 大鼠脊髓 HE 染色

3 讨论

合理的 SCI 模型是开展研究的前提,理想的动物模型制作方法应具有以下特点[2]:①制作的 SCI 模型与临床相近;②对 SCI 模型制作的各关键步骤客观化、定量化;③制作的动物模型结果一致性高;④压迫力度、压迫时间可自行控制,用同一方法不同的压迫作用于动物脊髓同一部位产生不同程度的脊髓损伤,压迫程度大小与脊髓损伤程度成线性关系,以便进一步施加处理因素;⑤操作简单,即所用设备要求不高,操作不繁琐,便于快速大批制作;⑥经济实用。

目前常见的有脊髓撞击损伤、脊髓缺血再灌注损伤、脊髓切割及吸除损伤、静压脊髓挫伤、气囊压迫、光化学诱导、牵拉等模型。各种模型各有其优缺点,适用的研究方向也各不相同,如:脊髓撞击损伤模型通过调整重物的质量和高度来复制不同程度、不同类型的脊髓损伤模型[3];脊髓缺血再灌注损伤模型用于脊髓继发损伤程度和损伤机制的研究;切割模型及吸除模型将脊髓全部或部分切断,可用于解剖学评价是否有轴突再生[4-5];牵拉性 SCI 通过暴露脊髓,用特殊牵拉装置牵拉脊髓而造成损伤,多用于医源性 SCI 的致伤条件和受伤机制的研究[6];光化学诱导 SCI 是通过注射光增敏剂,然后以激光照射脊髓拟损伤部位,从而造成脊髓损伤,该模型可继发脊髓空洞,从而模拟外伤后脊髓空洞症[7]等。但这些动物模型仍无法模拟临床上脊柱损伤后骨折碎片急性移位对脊髓挤压造成的损伤,因而本课题组对此开展研究。

本实验利用动脉瘤夹钳夹 SD 大鼠 T_{10} 脊髓,通过 BBB 评分、皮层体感诱发电位(CSEP)及组织学检测表明,建立的动物模型能保持硬脊膜的完整性,且脊髓损伤后的解剖结构与神经功能的变化与挫伤型非常相似,接近于日常生活中人体脊髓损伤的类型。SCI 组与假手术组、正常对照组均有明显差异,组内动物无显著性差异,表明本动物模型具有良好的可行性及重复性好,且经济实用,可用于脊髓损伤的研究。

[参考文献]

[1] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection[J]. Exp Neurol, 1996, 139(2): 244 – 256.

[2] 纪江峰,冯世庆. 脊髓损伤动物模型研究进展[J]. 中华实验外科杂志,2006,23(9):1151 – 1152.

[3] Allen AR, Marcy GE, Yu JK. The continuous and concurrent use of streptomycin, para-aminosalicylic acid, isoniazid plus early surgery in the treatment of tuberculosis[J]. Dis Chest, 1954, 26(1): 41 – 46.

[4] Pu Y, Guo QS, Wang AM, et al. Repair of acutely injured spinal cord through constructing tissue-engineered neural complex in adult rats[J]. Chin J Traumatol, 2007, 10(3): 171 – 176.

[5] 田代实,王 伟,徐运兰,等. 细胞周期素依赖性激酶抑制剂 olomoucine 对大鼠脊髓损伤后轴突再生微环境的影响及其意义[J]. 中华医学杂志,2006,86(13):901 – 905.

[6] Dolan EJ, Transfeldt EE, Tator CH, et al. The effect of spinal distraction on regional spinal cord blood flow in cats[J]. J Neurosurg, 1980, 53(6): 756 – 764.

[7] Bunge MB, Holets VR, Bates ML, et al. Characterization of photochemically induced spinal cord injury in the rat by light and electron microscopy[J]. Exp Neurol, 1994, 127(1): 76 – 93.

(编辑:魏 源)