论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1296-05

小鼠Allen's脊髓损伤模型的建立及评价

赵 军,权正学,刘 渤,卢旻鹏,蒋电明,欧云生
(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立并评价不同力致伤的小鼠Allen's脊髓损伤(Spinal cord injury,SCI)模型,为进一步研究脊髓损伤机制提供实验动物参考。方法:将171只小鼠随机分为假手术组(18只)和实验组(153只),实验组按打击重量及高度分为A组(1 g×2.5 cm,18只),B组(2 g×2.5 cm,45只),C组(3 g×2.5 cm,45只),D组(3 g×5 cm,45只)。假手术组只暴露脊髓,实验组显露脊髓后采用改良Allen法致伤。伤后行运动功能BMS评分、运动诱发电位(Motor evoked potentials,MEP)电生理测定及病理切片HE染色。结果:除A组外,实验组打击后运动功能损伤均明显,但后期都有不同程度恢复,B组2周后BMS评分与对照组无显著性差异($P>0.05$);D组恢复最差,死亡率最高;C组死亡率低,恢复不完全。B、C、D组在损伤后3 d内出现MEP-N1峰潜期延长,之后逐渐降低;B组1周后MEP已与对照组无显著差异($P>0.05$);C、D组8周时MEP仍显著延长。病理切片也表现出相应改变。结论:小鼠SCI打击模型为一合理SCI模型,为SCI的理论研究奠定了基础。

【关键词】脊髓损伤;小鼠;Allen法
【中国图书分类法分类号】R541 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-07

Establishment and evaluation of a mouse model of Allen's spinal cord injury

ZHAO Jun, et al
(*Department of Orthopdics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To establish and evaluate a mouse model of graded Allen's spinal cord injury(SCI), and provide theoretical evidence for a new model of contusive SCI. *Methods*:A total of 171 mice were divided into surgical controls(n=18)that received laminectomy but did not receive a contusive injury, and experimental groups(n=153)ruined by modified Allen's method and distinguished by the amount of weight in grams dropped onto the impounder and height from the weight to the impounder: group A(1 g×2.5 cm n=18),group B(2 g×2.5 cm n=45),group C(3 g×2.5 cm n=45) and group D(3 g×5 cm n=45).All animals were assessed by electrophysiological, structural and examined using the basso mouse scale(BMS). *Results*:Axcept the group A,the BMS revealed a statistically significant difference between surgical controls and experimental groups after injury. In experimental groups, both initially and as recovery progressed over time, there was no difference in functional outcome between group B and surgical controls at 2 week;group D recovered badly with a high mortality and there was no recovery evidence in group C up to 8th week. The mean peak latency of N_1 wave in MEP prolonged within 3days and then gradually decreased in experimental groups;however,by 1 week there was no significant difference between group B and surgical controls($P>0.05$); in group C and D,there were still significant difference at 8 weeks. there were different histopathological changes in groups during the test. *Conclusion*:A mouse model of contusive spinal cord injury is a reasonable model and provides theory basis for SCI studies.

【Key words】 Spinal cord injury;Mice;Allen's

1911年,Allen[1]报道了垂直打击脊髓建立脊髓损伤(Spinal cord injury,SCI)模型的方法,因这种方法更接近于人类SCI过程,临床相关性好,已广泛用于SCI的研究、治疗。随着SCI研究的不断深入,探索某一基因或细胞因子对SCI后的影响变得越来越重要。小鼠不仅成本低、好喂养,而且在基因研究方面比大鼠更具明显优势, 其基因与人类有着高同源性,人类对小鼠遗传操作也较成熟,便于分析某一基因或细胞因子对SCI后的影响。因国内未有Allen's致伤模型建立,而国外相关动物模型又缺乏运动诱发电位等反映神经元损伤之客观评价指标。因此我们建立小鼠Allen's SCI模型,通过运动功能BMS评

作者介绍: 赵 军(1979-),男,硕士,
研究方向:柱脊髓损伤。
通讯作者:刘 渤,男,主治医师,E-mail:zhaojunmedicine@sina.com。
基金项目:国家自然科学基金(30500512)。

分、运动诱发电位(Motor evoeked potentials,MEP)电生理测定及病理切片HE染色,观察不同力致伤后小鼠脊髓功能的变化情况,为进一步研究SCI机制提供实验动物参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

成年雌性昆明小鼠171只,体重18~23 g,随机分为假手术组(18只)和实验组(153只)。实验组按打击重量及高度分为A组(1 g×2.5 cm,18只),B组(2 g×2.5 cm,45只),C组(3 g×2.5 cm,45只),D组(3 g×5 cm,45只)。每组分别在脊髓损伤后即刻、6 h、12 h、1 d、3 d、1周、2周、4周、8周进行电生理测定、HE染色,小鼠麻醉清醒后行双后肢运动功能评分,手术对照组和A组每时相点各2只动物,其它组每时相点各5只动物。

1.2 手术步骤及损伤模型制备

将实验动物用10%水合氯醛5 ml/kg腹腔麻醉后置于俯卧位,以胸椎弯曲最大处为中心,用剪刀剪去该区毛发。常规消毒,剪开皮肤,显露颈后脂肪垫,于后缘逐层切开,分离肌肉,暴露脊突。根据T9棘突斜向尾侧,T_{11}斜向头侧,T_{10}中立稍斜向后,确定T_{10-11}椎体位置。咬去T_{10-11}棘突及相应椎板,充分暴露脊髓背面及两侧。实验组采用Impactor Model—2改良Allen's打击设备(由美国W.M.Keck Center for Collaborative NeuroscienceRutgers,Wise Young教授惠赠),分别以1 g×2.5 cm,2 g×2.5 cm,3 g×2.5 cm,3 g×5 cm力致伤,打击完毕后,无菌缝合伤口。假手术组除不损伤脊髓外,其余同实验组。术后常规人工排尿2~3 次/d,直至恢复自主膀胱。

1.3 术后动物行为学观察

各组小鼠分别在损伤后12 h、1 d、3 d、1周、2周、4周、8周进行运动功能评分(BMS评分,表1、2)。由于SCI后小鼠运动功能恢复与大鼠不同,BMS评分系统是通过观察小鼠SCI后运动功能的变化而专为小鼠制定。该评分包括其主、副评分系统,主要是观察SCI后后肢踝关节活动度、脚掌脚背触地情况、躯干稳定性及尾部位置。

1.4 MEP测定

动物麻醉后固定在立体定位仪上,头部、左股部剪毛。切开头皮暴露颅骨,在冠状缝下1 mm、矢状缝右旁开1 mm处,用牙科钻钻一直径2 mm小孔暴露硬脑膜,将银球刺激电极固定在定位仪上,缓慢推进贴至硬脑膜。切开左股部皮肤,分离出坐骨神经,将双银丝记录电极挂在坐骨神经上,参考电极置头皮下。应用Powerlab/16SP型诱发电位仪,刺激频率4 Hz,波宽0.2 ms,强度3 mA,信号经前置放大器放大10万倍,计算机叠加256次,各组分别在术后即刻、6 h、12 h、1 d、3 d、1周、2周、4周、8周进行MEP检测。

表 1 BMS 主评分系统

分级	评分标准
0	无踝关节运动
1	踝关节轻微运动
2	踝关节广泛活动
3	无负重或有负重情况下脚掌着地或偶然、频繁、持续脚背站立但没有脚掌站立
4	偶然脚掌站立
5	频繁、持续脚掌站立,但不协调或频繁、持续脚掌站立,有些协调,但脚爪在触地和抬起时旋转
6	频繁、持续脚掌站立,有些协调,脚爪触地时平稳;或频繁、持续脚掌站立,很协调,但脚爪在触地和抬起时旋转
7	频繁、持续脚掌站立,很协调,脚爪触地时平稳但抬起时旋转;或频繁、持续脚掌站立,很协调,脚爪在触地和抬起时平稳,但有严重躯干不稳
8	频繁、持续脚掌站立,很协调,脚爪在触地和抬起时平稳,轻微躯干不稳;或频繁、持续脚掌站立,很协调,脚爪在触地和抬起时平稳,躯干稳定但尾巴下垂或翘起又下垂
9	频繁、持续脚掌站立,很协调,脚爪在触地和抬起时平稳,躯干稳定,尾巴翘起

表 2 BMS 副评分系统

评分标准	评分
脚掌着地:偶尔,频繁=0;持续=1	左+右=
双后肢着地时协调:不协调=0;有些协调=1;非常协调=2	左+右=
脚爪触地:始终旋转=0;平稳伴有旋转=1;始终平稳=2	左+右=
躯干稳定性:严重不稳=0;轻度不稳=1;稳定=2	
尾巴:下垂,翘起又下垂=0;翘起=1	
	总评分(11)

1.5 组织切片观测

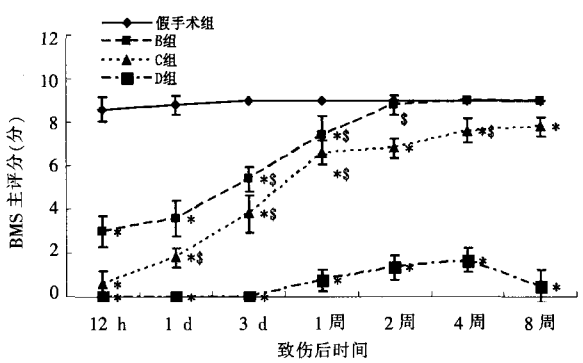
MEP测定后,左心室插管,剪开右心耳,先用50 ml生理盐水灌洗,再用40 g/L甲醛50 ml灌注,然后以伤段为中心切取约10 mm的脊髓,中性福尔马林固定48~72 h,取直接打击部位,常规石蜡包埋,连续切片,片厚4 μm,HE染色。

1.6 统计学分析

本研究各组小鼠数据以($\bar{x}\pm s$)表示,运用SPSSl2.0版统计软件包进行分析,选用SNK-q检验及Dunnet-t检验进行组间数据比较,单因素方差分析进行不同时相点间比较。

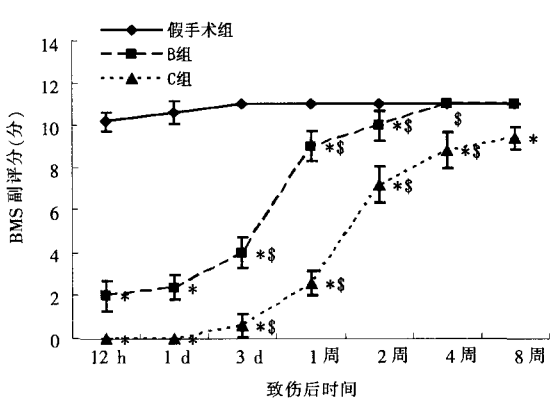
2 结 果

本实验暴露脊髓时出血约0.2~0.3 ml,给予腹腔注射生理盐水0.1~0.2 ml补充血容量。整个实验中小鼠死亡17只,其中B组1只,C组3只,D组13只。因尿路感染死亡3只,术后出现血尿2只,其它死因不明,可能与脊髓损伤太重有关。A组因运动功能评分、组织病理切片及电生理均为发现明显脊髓损伤的改变,未参与最后结果统计分析。



注:* 各组与假手术组对应时间点比较,$P<0.05$;$各组内后一时间点与其前一相邻时间点比较,$P<0.05$

图 1 各组 BMS 主评分值



注:* 各组与假手术组对应时间点比较,$P<0.05$;$各组内后一时间点与其前一相邻时间点比较,$P<0.05$

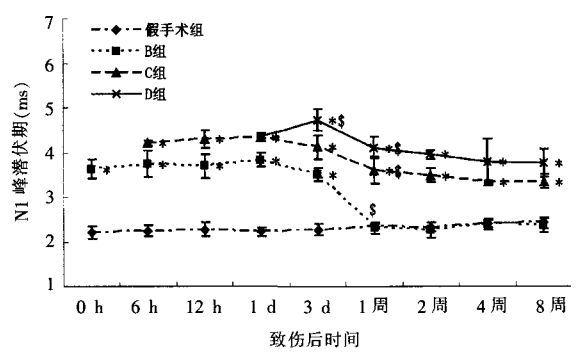
图 2 BMS 副评分值

2.1 术后BMS评分比较(图1、图2)

术后12 h,所有小鼠都完全清醒。假手术组与实验组BMS评分差异明显($P<0.05$)。随着时间的延长,脊髓功能都有所恢复,以损伤后1周恢复最明显。实验各组间BMS评分均有显著性差异($P<0.05$)其中B组损伤后恢复较快,2周后与假手术组BMS评分无显著性差异($P>0.05$);C组次之,但未完全恢复,4周时评分趋于稳定,8周时BMS主评分(7.8±0.45),副评分(9.4±0.55);D组损伤最重,运动恢复最差,4周时BMS主评分(1.67±0.58),到8周时也未见改善。D组在1月时后部躯体出现明显萎缩,并且由于长期会阴部触地、摩擦,尿道口伴不同程度糜烂、溃疡。

2.2 术后MEP检测比较

术后各时间点MEP-N_1峰潜伏期测定见图3、表3。各实验组峰潜伏期都有不同程度恢复。1周时,B组MEP峰潜伏期与对照组无显著差异($P>0.05$),但C、D组8周时MEP峰潜伏期与对照组相比差别仍显著($P<0.05$)。D组比C组MEP 峰潜伏期延长,C组在损伤后即刻,D组在损伤后1d前均未测出MEP。在损伤后3 d内实验组均出现MEP延长, 之后逐渐恢复。



注:* 各组与假手术组对应时间点比较,$P<0.05$;$各组内后一时间点与其前一相邻时间点比较,$P<0.05$

图 3 MEP-N1 峰潜伏期时间

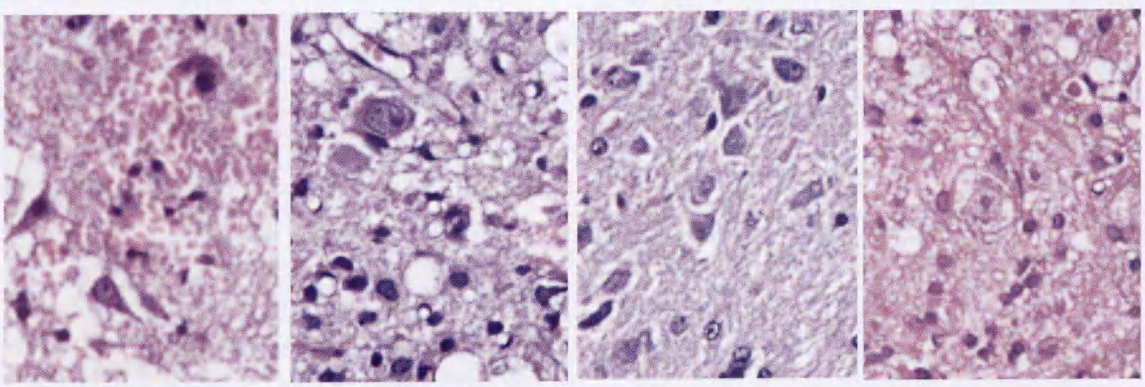
2.3 术后组织病理学改变

脊髓打击后都出现明显瘀血,HE染色观察,损伤区主要位于脊髓灰质侧索和前索深层区域(图4)。损伤早期灰质内出血、水肿,部分神经元溶解。1周时血肿消退,淋巴细胞、胶质细胞增多,大量毛细血管增生,可见到神经元卫星现象。到第4周时增生的炎性细胞和毛细血管逐渐恢复正常,并见部分神经元固缩坏死。第8周时可见嗜酸性小体(图5)。实验组都有不同程度损伤,以D组损伤最重,出血面积最大,几乎占据整个脊髓灰质区。

表 3 MEP-N1 峰潜伏期时间

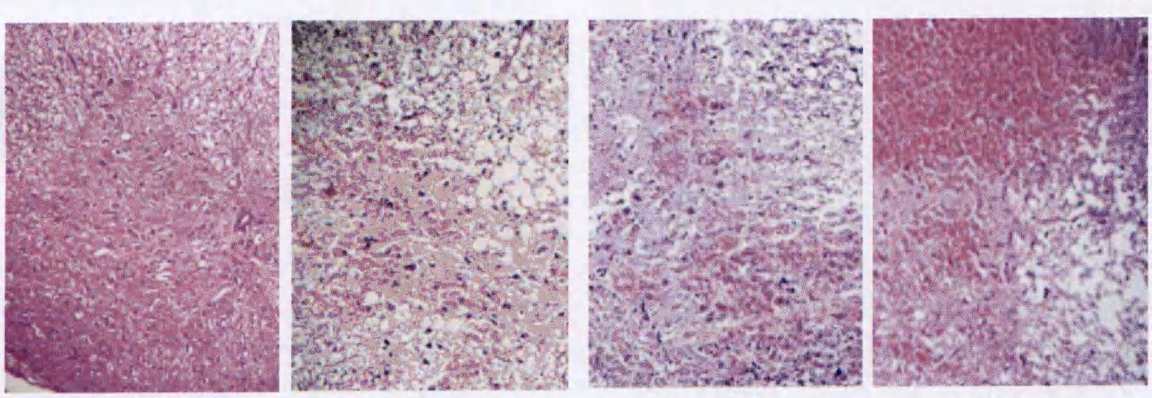
	0 h	6 h	12 h	1 d	3 d	1 周	2 周	4 周	8 周
假手术组	2.21±0.13	2.25±0.15	2.28±0.15	2.23±0.1	2.28±0.13	2.35±0.06	2.33±0.10	2.40±0.08	2.43±0.13
B 组	3.63±0.21*	3.74±0.29*	3.70±0.27*	3.83±0.15*	3.50±0.14*	2.32±0.13$	2.27±0.16	2.40±0.12	2.37±0.16
C 组	–	4.27±0.06*	4.30±0.20*	4.33±0.10*	4.12±0.27*	3.64±0.29*$	3.49±0.16*	3.34±0.04*	3.38±0.15*
D 组	–	–	–	4.34±0.05*	4.73±0.23*$	4.10±0.24*$	3.95±0.10*	3.79±0.51*	3.76±0.31*

注:* 各组与假手术组对应时间点比较,$P<0.05$;$各组内后一时间点与其前一相邻时间点比较,$P<0.05$



1 d×40(HE) 1 周×40(HE) 4 周×40(HE) 8 周×40(HE)

图 4 C 组 HE 染色可见 1 d 时脊髓内出血、水肿;1 周时血肿消褪,淋巴细胞、胶质细胞增多,大量毛细血管增生,可见到神经元卫星现象;4 周时增生的毛细血管和炎性细胞逐渐恢复正常;8 周时,可见嗜酸性小体



假手术组×10 B 组×10 C 组×10 D 组×10

图 5 HE 染色低倍镜可见:术后 1 d 时除假手术组外,实验组各组脊髓内多灶性出血、水肿,打击越重,出血、水肿越明显

3 讨 论

用小鼠作为SCI模型具有经济、易于喂养、便于观察研究的优点,同时可充分利用小鼠基因变异的多样性研究某一基因或细胞因子对SCI后的影响。本实验采用Impactor Model-2改良Allen's打击设备,通过电磁控制重物下落,保证脊髓只受一次撞击;通过对脊柱损伤段两端的夹持,稳定脊柱,显著减低了动物呼吸对打击精确度的影响,从而提高了小鼠脊髓损伤模型的标准化和可重复性[2]。

实验中对小鼠SCI后运动功能的观察通过运动功能评分、电生理测定及病理组织切片,从主观、客观两方面评价不同力致伤脊髓对小鼠运动功能的影响。小鼠运动功能评分采用国际最新的BMS评分法,该评分根据SCI小鼠运动功能改变的特点而制

定的,已被证明是一敏感、可靠、有效的小鼠运动评分方法[3]。特别是其副评分系统考虑到脊髓打击后可能造成双下肢功能的不一致,使BMS评分系统更加完善。该实验中也发现BMS评分简单易行,小鼠运动功能的改变也能通过BMS评分具体体现,脊髓不同损伤的小鼠,BMS评分存在显著性差异。在SCI早期,BMS评分降低除因脊髓受损使神经元发生原发性及继发性死亡外,还与局部出血、水肿及血管痉挛等急性炎症致动物疼痛及限制其活动有关。随着急性炎症的逐渐减轻以及胶质细胞的增生和分泌一些神经营养因子促进了神经的修复与再生[4],BMS评分相应增高。

诱发电位是目前评价脊髓电生理功能较为客观的指标。实验中刺激电极直接与硬脑膜接触,记录电极置于对侧坐骨神经,避免了诱发电位从头皮和外周测量时因自发脑电[5]和外周肢体肌电[6]的干扰。MEP是通过电或磁刺激运动皮层产生兴奋,经下行传导通路,在相应肌肉或神经表面记录到电位[7]。MEP较躯体感觉诱发电位更直接、客观地反映运动传导束的机能状态[8,9]。本实验中MEP最终恢复程度与脊髓打击损伤程度相一致。实验中发现小鼠脊髓损伤后3 d内出现一过性MEP值增高, 之后逐渐下降,而这一时期,病理HE染色切片发现正是脊髓损伤出血、水肿最严重的时候,到1周时出血、水肿逐渐被淋巴细胞、胶质细胞代替,炎症趋于稳定,MEP也下降到低值。这种变化可能与外力造成脊髓本身损伤,同时也与损伤后出血、水肿、变性坏死物质所引起神经细胞内外微环境改变而导致快K^+通道的失活有关[10-12]。1周后MEP已趋于稳定,但BMS运动功能评分仍有变化,这说明在SCI急性期后,运动功能的最终恢复可通过MEP提前预测。但在损伤重的C、D组早期都没测到MEP,随着时间的延长,MEP逐渐出现,这表明在SCI早期,并不能单纯根据MEP存在与否而推断运动通路是否存在,运动功能观察也证实了这点。

实验经过长期观察,实验组与假手术组对照,实验组都有不同程度损伤,B组最终恢复同假手组;D组恢复最差,死亡率最高;C组死亡率低,恢复不完全。说明打击是成功的,不同致伤力对模型影响不一样,为SCI的理论研究奠定了基础。同时该模型改良了Allen法,提高了可靠性及可重复性,是一合理的SCI模型。

参 考 文 献

[1] Allen A R.Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocaion of spinal colum[J]. JAMA, 1911,57(4):878-880.

[2] Gruner J A.A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat[J]. J Neurotrauma,1992,9(3):123-126

[3] Basso D M, Fisher L C. The Basso mouse scale for locomotion(BMS) is a more sensitive indicator of recovery than the BBB scale in mice with spinal cord injury[J]. Society for Neuroscience Abstract Viewer & Itinerary Planner,2003,Abstract.

[4] Gimenez Ribotta M,Menet V,Privat A,et al. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS[J]. Pros Brain Res,2001,132(3):587-610.

[5] 余科炜,李家顺,徐龙江,等.诱发电位对急性颈髓损伤后神经功能状态的诊断价值[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2000,10(2):69.

[6] 赵学仁.脊髓诱发电位检查[J]. 国外医学.神经病学神经外科分册,1995,22(6):289.

[7] Fehlings M G,Tator C H,Linden R D,et al.Motor and somatosensory evoked potentials recorded from the rat[J]. Electroenceph Clin Neurophysical,1988,69(1):65-78.

[8] 胥少汀,郭世绂.脊髓损伤基础与临床[M]. 第2版.北京:人民卫生出版社,2002.512-550.

[9] Shiau J S,Zappulla R A,Nieces J.The effect of graded spinal cord injury on the extrapyram-idal and pyramidal motor evoked potentials of the rat[J]. Neurosurgery,1992,30(1):76-84.

[10] Fehlings M G,Nashmi R.Changes in pharmacological sensitivity of the spinal cord to potas-sium channel blockers following acute spinal cord injury.Brain Research,1996,736(1-2):135-145.

[11] 陈礼刚,高立达,曾凡俊。pSVPMcat 微基因修饰雪旺细胞脊髓内移植对损伤脊髓细胞的保护作用[J]. 第三军医大学学报,1999,21(11):843-845.

[12] 蒋 涛,任 军,欧阳忠.GM-1·PLGA微球对大鼠脊髓损伤后神经功能的保护作用[J]. 重庆医学,2007,36(17):1736-1738,封2.

(责任编辑:冉明会)