DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.017

缺血再灌流对大鼠脊髓神经元放电的影响*

伍亚民 廖维宏 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室) 重庆, 630042

提 要 成年 Wistar大鼠 86只,于左肾动脉上 1 cm处阻断腹主动脉(AA)血流以模拟腰段脊髓局部缺血和再灌流,其中 36只大鼠随机均分为 AA血流阻断和再灌流 2、5、10 min三组,用氢清除法测定 AA阻断前、阻断时和再灌流时 L_2节段灰质脊髓血流量(gSCBF);另 50只大鼠用玻璃微电极记录 L_2节段脊髓单位放电(SCUDs),并观测 SCUDs在 AA血流阻断和再灌流 2、5、10 min时的变化,以探讨脊髓缺血再灌流对 SCUDs的影响。结果表明:大鼠脊髓神经元对缺血十分敏感,即使 gSCBF轻微下降,也可引起神经元的放电频率明显增加,神经元兴奋性增强; AA再灌流缺血程度加重时则其放电频率逐渐减少,神经元兴奋性降低,耐受力减弱。

关键词 脊髓单位放电;脊髓血流量;缺血;再灌流;大鼠
中图法分类号 R651.2

脊髓缺血在创伤性脊髓继发损伤中起着关键作用[1],临床上主动脉手术致脊髓缺血的截瘫发生率高达 11%~40%,部分病人在麻醉清醒后 1~5 d才发生截瘫[2],因此,已有不少对其病理和生化代谢改变的研究报道[3],但尚有待研究。本实验通过阻断腹主动脉(AA)血流及再灌而模拟局部脊髓组织缺血再灌流损伤,观察在 AA血流阻断和再灌时灰质脊髓血流量(gSCBF)和脊髓单位放电(SCUDs)的变化,以探讨大鼠脊髓缺血再灌流对脊髓神经元放电的影响。

1 材料与方法

1.1 模型制备

Wistar大鼠 86只,雌雄不拘,体重 200~260 g,用 20%氨基甲酸乙酯(1 g/kg, ip)和 1%氯醛糖(50 mg/kg, ip)混合液麻醉,气管插管,分离 AA,在左肾动脉分支点以上 1 cm处套引一根 Teflon橡胶线,将该线穿出一内径为 3 mm的中空硅胶管,通过橡胶线拉闭和放开 AA而模拟腰段脊髓局部缺血和再灌流损伤。切除 T_{13}~L_1椎板,暴露 L_2节段脊髓,剥离硬脊膜和蛛网膜,用温热石蜡油覆盖。

1.2 灰质脊髓血流量的测定

大鼠脊柱用 ST-7型立体定位仪(日本 NARISHIGE)水平固定,将记录电极Ⅰ、Ⅱ推进 L_2节段脊髓同一横断面的左右两侧的灰质(L, R 750 μm, H 1500 μm),采用氢清除法测定 gSCBF。具体步骤为,先测定每只大鼠正常 L_2节段 gSCBF,然后分别阻断 AA血流 2、5、10 min时开始测定缺血时同一位点的 gSCBF(测定过程中橡胶线处于拉闭状态),待测完即放开 AA,使其血流再灌 2、5、10 min时测定同一位点 AA再灌时的 gSCBF。

1.3 脊髓单位放电的记录

大鼠脊髓固定同前,保持呼吸通畅,肛温 38℃。根据 George Paxions和 Charles Wstson的大鼠脑立体定位图谱,用灌有 0.5 mol/L醋酸钠配制的 2%旁胺天蓝的玻璃微电极(4~10 MΩ)记录 SCUDs,并连续观察 AA血流阻断及再灌时 SCUDs的变化。尔后将放电信号经 MEZ-8300微电极放大器(日本光电)放大后,输出到 RS-B608R录音机(日本 Technics)进行磁带记录和声音监听,同时输出到本室研制的计算机信号处理系统进行序列密度直方图处理(图 1)。

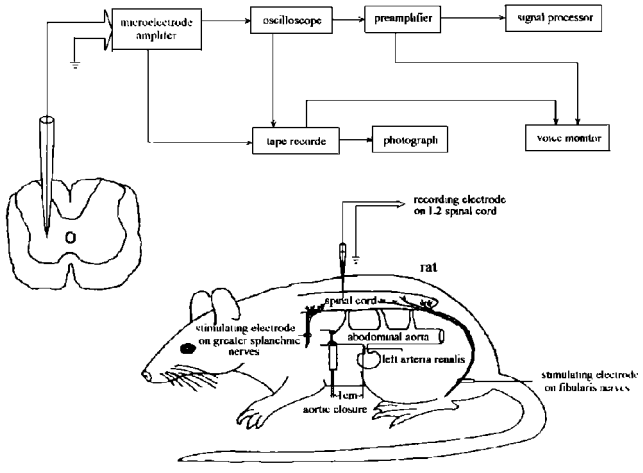


图 1 大鼠腹主动脉阻断和脊髓单位放电记录示意图
Fig 1 Diagrams of abdominal aorta occlusion and spinal cord unit discharges recording in rat

2 实验结果

2.1 灰质脊髓血流量的改变

36只大鼠随机均分为 AA血流阻断及再灌 2、5、10 min组,测得 2 min组 AA阻断时 L_2脊髓左侧的 gSCBF平均为 40.16±15.30 ml·min^{-1}·100 g^{-1},较其相应的正常对照组的 40.99±9.68 ml·min^{-1}·100 g^{-1}下降了 2.02%,相差不显著($P>0.05$),而其后血流再灌 2 min时则降到 23.20±9.36 ml·min^{-1}·100 g^{-1},较对照降低了 43.40%,相差显著($P<0.05$)。右侧结果类似。5 min组 gSCBF下降更明显,10 min组时又有所恢复,只是降低的程度有所不同,具体结果见表 1。

* 全军"八五"攻关项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　阻断 AA血流和再灌流时脊髓 L_2节段 gSCBF的变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Tab 1　Changes of gSCBF at L_2 spinal cord after AA occlusion and reperfusion ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Time (min)	Site	Absoluted value of gSCBF (ml·min^{-1}·100 g^{-1})			Percentage decreased (%)		
		Control	Occluded	Reperfused	Control	Occluded	Reperfused
2	left	40.99±9.68	40.16±15.30	23.20±9.36*	0	2.02	43.40*
	right	46.18±9.22	43.86±15.42	26.47±6.30*	0	5.02	42.68*
5	left	49.64±4.07	39.58±3.85	29.22±3.43*	0	20.26	41.14*
	right	49.83±13.06	41.25±8.76	27.45±11.82*	0	17.22	44.91*
10	left	45.31±4.75	44.56±4.37	34.68±7.18*	0	1.66	23.46*
	right	47.58±7.11	43.88±4.57	32.25±5.83*	0	7.78	32.22*

*: $P<0.05$ *vs* control or ischemia

2.2　缺血再灌流对脊髓单位放电的影响

50只大鼠共记录到放电平稳、信噪比好的自发放电单位 86个,在缺血再灌流状态下,均可见到兴奋 (Excitation)、抑制 (Inhibition)、无反应 (Non-response)三种改变 (图 2)。在缺血时有 22个单位放电消失,其余 64个单位中,兴奋的有 33个单位 (51.56%),抑制的有 17个单位 (26.56%),无反应的有 14个单位 (21.88%);但不同缺血时间组 SCUDs的反应不一,组间比较相差明显 ($P<0.05$),阻断 AA血流 5 min以内以兴奋性反应为主 (2 min组 51.22%, 5 min组 73.33%, $P<0.01$),而 10 min却表现为抑制性反应的单位占多数 (50%, $P<0.05$),结果见表 2

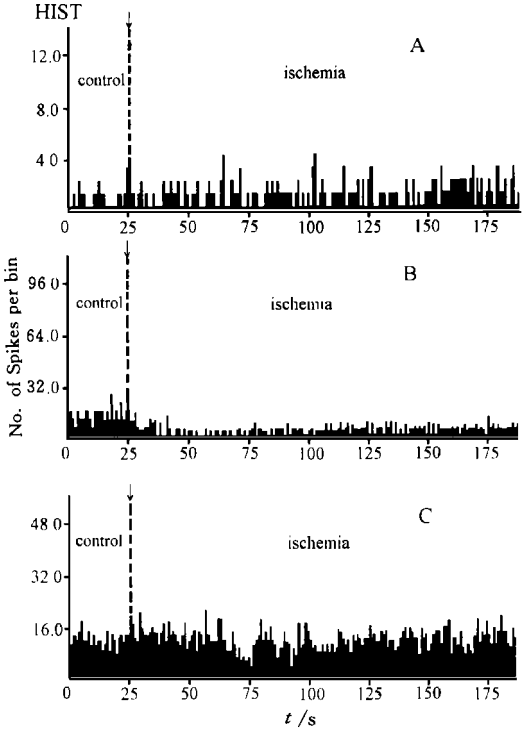


图 2　缺血损伤对大鼠 L_2脊髓神经元电活动作用的序列密度直方图

A)兴奋性效应; B)抑制性效应; C)无作用

注: ↓示腹主动脉血流阻断;横坐标: 时间 (秒);纵坐标: 脉冲数/秒

Fig 2　Histograms of the effects of ischemia on L_2 spinal cord neuronal activities in rat

A) excitatory effect; B) inhibitory effect; C) no effect

Note: The beginning of abdominal aorta occlusion is indicated by the vertical line with the arrows (↓); abscissa: Time (s); ordinate: spikes per bin

表 2　脊髓缺血对 SCUDs的影响

Tab 2　Effects of spinal cord ischemia on SCUDs

Time (min)	Total No. neurons	No. of various responsive neurons (%)		
		Excitation	Inhibition	Non-response
2	41	21 (51.22)*	9 (21.95)	11 (26.83)
5	15	11 (73.33)*	4 (26.67)	0 (0.00)
10	8	1 (12.50)	4 (50.00)*	3 (37.50)
Total	64	33 (51.56)*	17 (26.56)	14 (21.88)

*: $P<0.05$ *vs* excitation, inhibition and non-response

在 AA血流再灌过程中,上述 64个单位中又有 8个单位放电消失;在进行统计的 56个单位中,有 19个单位 (33.93%) 兴奋,29个单位 (51.97%) 抑制,8个单位无反应。说明血流再灌后,L_2节段脊髓神经元主要为抑制性反应,且不同组间的反应情况差别显著 ($P<0.05$),具体结果见表 3

表 3　脊髓再灌流对 SCUDs的影响

Tab 3　Effect of spinal cord reperfusion on SCUDs

Time (min)	Total No. neurons	No. of various responsive neurons (%)		
		Excitation	Inhibition	Non-response
2	37	11 (29.73)	18 (48.65)	8 (21.26)
5	9	7 (77.78)**	2 (22.22)	0 (0.00)
10	10	1 (10.00)	9 (90.00)**	0 (0.00)
Total	56	19 (33.93)	29 (51.79)*	8 (14.28)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* excitation, inhibition and non-response

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

3.1 缺血再灌流时脊髓灰质血流量的改变

从上述结果可以看出，AA血流阻断时 L_2节段gSCBF与相应的正常对照相差不明显（$P > 0.05$），这可能与本实验的记录部位偏高，阻断时间较短及椎动脉系统和腹主动脉侧支（尤其是 Adamkiewicz侧支）等形成的脊髓血管网的代偿有关。血流再灌时 gSCBF与其正常对照和缺血时 gSCBF相比明显降低（$P < 0.05$），其原因可能为本实验的具体方法所致，放开后短时间内 gSCBF恢复到正常时的水平，这与脊髓创伤时灰质血流下降持续长达 24 h之久相似；AA放开后由于血流大量流入腹腔脏器，致使 Adamkiewicz′s动脉环的脊髓分支血流减少，gSCBF明显降低；AA血流再灌与脊髓组织血流再灌之间可能存在一定的时间差，或者存在“无复流现象”（No reflow phenomenon）[4]；脊髓微循环调节功能紊乱，在缺血期间，脊髓微血管内皮受损，导致脊髓组织微循环障碍和 TXA_2–PGI平衡失调，TXA_2增加使微血管痉挛及血小板聚集有关；组织水肿，组织内压增加致脊髓血流不畅等。本实验结果表明脊髓灰质对缺血十分敏感，AA血流再灌后虽然存在不同程度的血流再灌，其微循环状态未能及时得到改善，gSCBF明显减少。

3.2 脊髓缺血再灌流对脊髓神经元放电的影响

单位放电是神经元活动的客观反应，根据其放电频率和形式可在细胞水平分析神经系统的功能状态。本实验观察到 AA血流阻断时，不同实验组间 SCUDs的反应差别明显（$P < 0.05$），其中2.5 min组主要是兴奋反应，而10 min组则主要是抑制反应，结合相应的血流量改变，2 min时血流量较正常对照组降低了约2%，5 min时下降了约5%，可以看出，脊髓神经元对缺血十分敏感，即使是轻微的局部缺血，神经元的兴奋性即明显升高。而血流阻断10min组的 gSCBF下降并不明显，可能是侧支循环代偿所致。此时相应的SCUDs的改变主要以抑制反应的单位占多数，这或许是脊髓血流的升高而致神经元去极化状态相对降低所致。

根据血流量测定的结果，放开 AA后10 min内gSCBF并未恢复，缺血较正常更明显，但还有一定程度的血流再灌，所以这时 SCUDs虽有兴奋、抑制和无反应三种改变，但主要以抑制的单位占多数（57.79%）。AA血流再灌10 min时，gSCBF下降程度低于5 min时，相应 SCUDs改变是5 min时主要表现为放电频率增加的兴奋性反应为主，10 min时则表现为抑制性反应为主，由此可见，随着 L_2节段血流恢复，其神经元兴奋性逐渐向正常恢复。总之，在脊髓缺血再灌流过程中，脊髓神经元的兴奋性变化规律是先高后低，且随脊髓缺血程度加重，相应脊髓神经元对缺血缺氧的耐受力减弱，放电消失增多，神经元兴奋性亦逐渐下降。其原因可能与脊髓组织微循环障碍、缺血缺氧致神经元代谢失常、离子及兴奋性与抑制性神经递质功能平衡失调等因素有关[5~7]。

（本文中 gSCBF检测得到本单位杨恒文高级实验师指导；SCUDs记录得到陈恒胜实验师的协助；文中示意图承肖剑工程师协助绘制。特此致谢！）

参考文献

1 Tator CH, Fehlings MG. Review of secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. J Neurosurg, 1991; 75(7): 15

2 Crawford ES, Crawford JL, Safi HJ *et al*. Thoracoabdominal aortic aneurysms: preoperative and intraoperative factors determining immediate and long-term results of operations in 605 patients. J Vasc Surg, 1986; 3: 389

3 胡文辉，廖维宏. 脊髓缺血性继发损伤研究进展. 国外医学：神经病学神经外科学分册，1992; 19(5): 241

4 邢 新，郭恩覃. 无复流现象. 中华显微外科杂志，1994; 17(4): 303

5 Hayes RL, Jenkins LW, Lyeth BG. Neurotransmitter-mediated mechanisms of traumatic brain injury: acetylcholine and excitatory amino acids. J Neurotrauma, 1992; 9(suppl 1): 173

6 Obrenovitch T. P, Scheller D, Matsumoto T *et al*. A rapid redistribution of hydrogen ions is associated with depolarization and repolarization subsequent to cerebral ischemia reperfusion. J Neurophysiol, 1990; 64(4): 1125

7 Martin RL, Lloyd HGE, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? TINS, 1994; 17(6): 251

（收稿：1995-11-02；修回：1996-06-12）

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Effects of ischemia and reperfusion on spinal cord unit discharges in rats

Wu Yamin, Liao Weihong (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract After of the abdominal aorta (AA) 1 cm above the left renal artery were occluded and reperfused in 86 rats, the gray matter spinal cord blood flow (gSCBF) in the L_2 region was measured with the hydrogen clearance method and the spinal cord unit discharges (SCUDs) were recorded extracellularly with the glass microelectrode to investigate the effects of ischemia and reperfusion on SCUDs. Of the animals, 36 were randomized into three experimental groups according to the time of reperfusion after ischemia, namely, 2 min in group Ⅰ, 5 min in group Ⅱ and 10 min in group Ⅲ. Other 50 without the reperfusion served as the control. It was found that gSCBF in L_2 region in the three experimental groups were decreased to various degrees immediately after the AA was occluded and significantly decreased before the reperfusion started. Of the 86 SCUDs recorded in the 50 animals, 22 (25.58%) disappeared and 33 were significantly increased ($P < 0.05$) after AA occlusion and 30 (34.88%) disappeared and 29 were significantly decreased ($P < 0.05$) after reperfusion. There were different reactions of SCUDs to ischemia and reperfusion in the three groups reperfused at different time. Our findings suggest that neurons in the spinal cord of rats are remarkably sensitive to ischemia, and even one slight decrease of gSCBF in the L_2 region can cause the remarkable increase of SCUDs of the neurons. When the reperfusion starts, SCUDs of the neurons are gradually decreased with a decrease of their excitability and tolerance.

Key words spinal cord discharge; spinal cord blood flow; ischemia; reperfusion; rat

Wistar大鼠多发性原发性恶性肿瘤模型建立

科研简报

Establishment of the model of multiple primary maligant tumors in Wistar rat

姜 军 詹新恩 陈意生 马宏敏 柳凤轩 (第三军医大学附属西南医院普通外科) 重庆, 630038

实验性动物多发性原发性恶性肿瘤模型尚少见文献报道。本实验用出生 40~ 60 d的健康 Wistar大鼠 90只,雌、雄各半,以大腿外侧皮下注射化学致癌剂二甲基苯蒽 (DMBA) 10 mg/100 g动物体重,经 24周诱发建立大鼠实验性多发性乳腺癌和纤维肉瘤模型。结果: 给予致癌剂后 13周,致癌组雌性大鼠可扪及 0.3~ 0.5 cm的乳腺内结节,至第 24周 14/20只 (70%)发生乳腺癌,其中 45%为多发性原发性乳腺癌,肿瘤最大径 4 cm。参照人体乳腺癌的组织学分类,为乳腺浸润性导管癌、乳腺腺癌和乳腺乳头状腺癌,癌组织呈浸润性生长。有 40%发生注射致癌剂部位皮下肿瘤,组织学观察: 参照人体肿瘤分类标准,与人体纤维内瘤的组织结构相似。其中 35%在实验期间同时发生乳腺癌和注射部位纤维肉瘤。给致癌剂第 24周,致癌组雄性大鼠有 33.3%发生注射部位纤维肉瘤而大体和显微镜下均未发现乳腺肿瘤。雌、雄性对照组均未见发生肿瘤。该模型的建立对于深入研究恶性肿瘤发生的过程,研究在同一个体相同致癌剂所致组织学完全不同的癌和肉瘤的基因变化,不同癌发生的促进因素对组织学相同和不同的肿瘤发生的影响差异,以及不同肿瘤对某些治疗反应的差别等均有重要的理论和实用意义。

关键词 疾病模型,动物;肿瘤,多发性原发性

中图法分类号 R730.2; R363

(收稿: 1996-07-04;修回: 1996-07-11)

(编辑 王 红、沈锡庚)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net