

选择性结扎节段动脉致局灶性脊髓缺血损伤动物模型的建立☆

谭美云¹, 郭杏², 王远辉¹

Segmental artery ligation for establishment of local spinal cord ischemic injury model in rabbits

Tan Mei-yun¹, Guo Xing², Wang Yuan-hui¹

Abstract

BACKGROUND: Previous studies showed that a stable model of spinal cord injury can be established using a method of lumbar arteries ligation in retroperitoneum. However, the precise ligation area is unclear.

OBJECTIVE: To establish a rabbit model of local spinal cord ischemic injury produced by segmental artery ligation.

METHODS: A total of 16 adult rabbits were randomly divided into the control and model groups, with 8 animals in each group. Rabbits in the model group experienced ligation of segment artery in retroperitoneum. There was no treatment in the control group. The nerve function of spinal cord was evaluated by modified Tarlov score and the pathological changes of lumbar segmental spinal cord were observed with the hematoxylin-eosin staining at 3 days after operation.

RESULTS AND CONCLUSIONS: Paralysis was evidenced in the model group and the Tarlov scores were smaller than that of the control group ($P < 0.05$). Acute inflammatory lesion and neuronal necrosis were observed in the model group. Results showed that a stable model of local spinal cord ischemic injury can be established via ligating L₁₋₃ lumbar arteries approach retroperitoneum.

Tan MY, Guo X, Wang YH. Segmental artery ligation for establishment of local spinal cord ischemic injury model in rabbits. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(24): 4407-4410. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 以往研究表明采用腹膜后入路结扎兔所有腰动脉的方法能够建立稳定的脊髓缺血损伤动物模型, 但动脉的具体结扎部位尚不明确。

目的: 采用选择性节段动脉结扎方法建立局灶性脊髓缺血动物模型。

方法: 将成年新西兰大白兔 16 只随机分为对照组和模型组, 8 只/组。模型组采用腹膜后入路结扎 L₁₋₃ 双侧腰动脉, 对照组不结扎血管。建模后第 3 天, 用改良 Tarlov 评分法评价两组兔神经功能, 取结扎血管所对应的脊髓组织并进行苏木精-伊红染色, 观察其组织学改变。

结果与结论: 模型组后肢出现功能障碍, Tarlov 评分低于对照组 ($P < 0.05$)。脊髓组织出现急性炎症改变及神经细胞坏死等脊髓缺血现象。实验结果表明采用腹膜后入路结扎 L₁₋₃ 双侧腰动脉能够建立较稳定的局灶性脊髓缺血损伤模型。

关键词: 节段动脉; 脊髓缺血损伤; 腰动脉; 兔; 动物模型

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.24.009

谭美云, 郭杏, 王远辉. 选择性结扎节段动脉致局灶性脊髓缺血损伤动物模型的建立[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24):4407-4410. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Bone and Joint Surgery, ²Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Tan Mei-yun☆, Doctor, Attending physician, Department of Bone and Joint Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China drtmy@126.com

Correspondence to: Guo Xing, Master, Attending physician, Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China gx412@126.com

Received: 2010-02-25 Accepted: 2010-04-09

0 引言

脊髓缺血损伤是多种疾病的并发症之一,可引起程度不同的瘫痪,甚至死亡,严重威胁着人类的生命和健康,目前其发病率逐年递增^[1-3]。因此,脊髓缺血损伤已成为脊柱外科学和神经外科学研究的热点和难点^[4-13]。建立标准的和重复性好的动物模型对进一步研究脊髓缺血性损伤的发病机制,病理生理改变以及防治至关重要。在多种动物建模方法中,李民等^[14]采用腹膜后入路结扎兔所有腰动脉的方法成功建立了稳定的脊髓缺血损伤实验模型,但采用相同的入路选择性结扎兔节段动脉建立局灶性脊髓缺血损伤动物模型至今少有报道。实验以此建立一种新的新西兰大白兔局灶性脊髓缺血损伤模型,并通过神经功能评分和病理学观察评价此模型。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2004-10/2005-03在泸州医学院动物实验中心完成。

材料: 健康五六月龄新西兰大白兔16只,雌雄不限,体质量(2.3±0.5) kg,由泸州医学院动物实验中心提供。实验兔均单笼喂养,自由进食。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[15]。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
速眠新	长春农牧大学兽医研究所
多聚甲醛	泸州医学院病理科
兔专用手术台	泸州医学院动物实验中心

泸州医学院附属医院, ¹骨与关节外科, ²整形烧伤外科, 四川省泸州市 646000

谭美云☆, 男, 1974 生, 重庆市人, 1999 年泸州医学院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事骨与关节外科的修复与重建的研究。
drtmy@126.com

通讯作者: 郭杏, 女, 硕士, 主治医师, 主要从事烧伤创面修复的基础与临床研究。泸州医学院附属医院整形烧伤科, 四川省泸州市 646000
gx412@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)24-04407-04

收稿日期: 2010-02-25
修回日期: 2010-04-09
(20100225004/WJ-Z)

分组和建模: 将16只动物随机分为对照组和模型组, 8只/组。

术前禁食禁饮 12 h, 采用速眠新(0.2~0.3 mL/kg)肌肉注射麻醉, 待动物麻醉生效后将其右侧卧位固定于兔专用手术台上, 脱毛, 常规消毒铺巾, 待兔足蹬反射消失后即可进行下一步操作。

从兔的脊柱左侧旁做纵向皮肤切口, 起自脊肋缘, 长约5.0 cm, 切开皮肤、皮下组织及深筋膜后, 向腹膜后间隙钝性分离并显露腹主动脉^[14]。通过确定左肾动脉辨认腰动脉, 其中肾动脉上方2支(由尾向头称上1腰动脉, 上2腰动脉), 肾动脉下方到髓总动脉分叉处有5支(由头向尾为下1, 下2, 下3, 下4, 下5支)^[16]。分别结扎L₁, L₂和L₃双侧腰动脉, 彻底止血, 然后逐层缝合伤口。建模后保温促进复苏, 肌注头孢唑啉钠0.25 g/d, 连续3 d。

建模3 d后模型组速眠新肌注麻醉, 开胸暴露心脏, 经左心室-主动脉先灌注生理盐水800~1 000 mL, 然后灌注用磷酸缓冲液配置的质量分数40 g/L多聚甲醛1 000~1 500 mL固定2 h^[17]。兔取右侧卧位, 按原切口逐层分离, 辨认所结扎的腰动脉及对应椎体, 切取对应脊柱, 除去后部椎板和棘突, 显露脊髓及硬膜囊, 锐性切断相连的神经根, 取出脊髓放于质量分数40 g/L多聚甲醛中固定72 h。

对照组除未进行血管结扎外, 余操作步骤均相同, 采用相同方法取材。

神经功能评价: 建模后3 d分别观察各组后肢运动情况, 并行改良的Tarlov评分^[18-19]: 0分: 完全性瘫痪。1分: 有肌肉自发性收缩。2分: 关节活动好, 但不能站立。3分: 能站立, 无法行走。4分: 可行走, 但晃摆。5分: 正常。

苏木精-伊红染色: 将已经固定好的标本进行乙醇逐级脱水, 石蜡块包埋, 切制成5 μm厚薄切片, 按常规方法进行苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察其组织形态。

主要观察指标: 建模后3 d兔脊髓病理学改变及神经功能Tarlov评分。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一作者和通讯作者, 实施为全部作者, 评估为第三作者。实验采用盲法评估。

统计学分析: 实验计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由第一作者用SPSS 13.0统计学软件对数据进行统计分析, 组间数据差异比较采用两样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入新西兰大白兔16只, 模型组和对对照组各有1只出现切口浅部感染, 均进入结果分析, 无脱落。

2.2 一般情况 对照组新西兰大白兔一般情况较好, 饮食和活动正常。模型组新西兰大白兔精神萎靡, 食量减少, 后肢瘫痪症状逐渐加重。

2.3 神经功能评价 建模后3 d分别观察各组后肢运动情况, 采用改良的Tarlov评分。对照组新西兰兔后肢功能正常, Tarlov评分: 5分($n=8$); 模型组新西兰兔后肢出现瘫痪, Tarlov评分: (1.25±0.71)分($n=8$), 两组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 脊髓组织形态变化 对照组L₁, L₂和L₃双侧腰动脉对应脊髓内灰白质交界清楚, 神经细胞丰富, 胞体大, 核仁明显, 神经纤维排列整齐, 形态规则。

模型组出现急性炎性改变及神经细胞坏死。见图1。

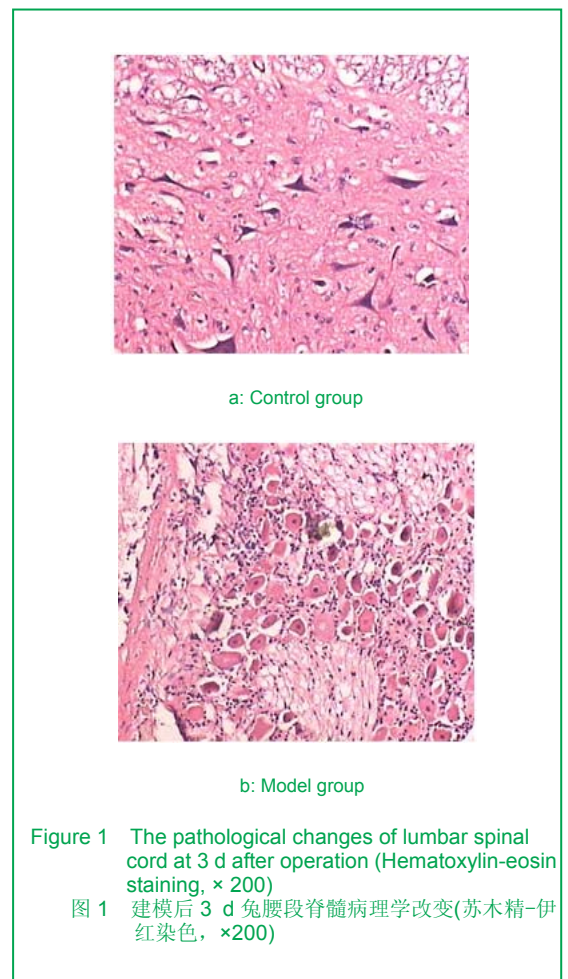


Figure 1 The pathological changes of lumbar spinal cord at 3 d after operation (Hematoxylin-eosin staining, × 200)
图1 建模后3 d兔腰段脊髓病理学改变(苏木精-伊红染色, ×200)

3 讨论

目前, 一些稳定而重复性好的脊髓缺血损伤动物模型已被广泛应用, 这些模型中常选择的动物有家犬、猪和兔等^[20-22]。这些动物的高级神经系统较发达, 满足实验动物应遵循的基本原则, 即相似性、差异性和可获得性^[23]。脊髓缺血实验主要以腰段脊髓为研究对象, 且多选择兔构建动物模型^[24]。

脊髓动脉血供分为7级^[25], 其中任何一级血管被阻断均会造成脊髓缺血。目前常用的方法是第一级血管阻断法即主动脉阻断法和第二级血管阻断法即节段性椎间动脉阻断法^[25-29]。主动脉阻断法最大的缺点是: 在造成脊髓缺血再灌注损伤的同时, 也导致了腹腔、盆腔、下肢肌肉和神经等组织器官的缺血再灌注损伤, 由此影响了行为功能学评估, 进而影响脊髓损伤机制及防治的研究^[17]。节段性椎间动脉阻断法是一种选择性较高的阻断方法, 克服了上述缺点成为目前最常用的脊髓缺血损伤模型。

李民等^[14]采用腹膜后人路结扎所有腰动脉的方法建立稳定的兔脊髓缺血损伤实验模型, 并通过行为学和病理学方法验证了其科学性和稳定性。实验在该模型的基础上加以改进, 选择新西兰大白兔, 采用腹膜后人路选择性结扎L₁, L₂和L₃双侧腰动脉建立局灶性脊髓缺血损伤模型。其结果显示: 建模后3 d, 对照组新西兰兔后肢功能正常, 模型组新西兰兔后肢出现瘫痪; 其病理学观察发现对照组脊髓内灰白质交界清楚, 神经元丰富, 胞体大, 核仁明显, 神经纤维排列整齐, 形态规则; 模型组脊髓组织出现急性炎性改变及神经细胞坏死等脊髓缺血现象。上述神经功能评分和病理组织改变表明采用腹膜后人路结扎L₁, L₂和L₃双侧腰动脉能够建立较稳定的局灶性脊髓缺血损伤模型。该模型手术切口较小, 剥离范围小, 创伤小, 目标血管明确, 手术时间短, 术后动物恢复较快, 且死亡率低。由于高选择性阻断血管, 不影响其他供应区的血流, 可控制性及可重复性较好, 适于较长期的或反复性研究, 并且可以通过后肢功能和脊髓病理学的改变较准确地评估其形态功能状态。特别适合于神经化学、神经病理学和神经生理学的研究, 对精确判断损伤阈值和药物实际疗效具有重要意义^[30]。但此模型观察的时间较短, 脊髓缺血后在无任何干扰措施下如何转归, 尚有待进一步研究。

模型制作中的注意事项: ①术前一定要禁食禁饮12 h, 否则会影响腹膜后的显露和操作。②由于术中要推移腹部脏器, 不建议使用腹腔麻醉。③通过确定左肾动脉辨认腰动脉。④由于腰动脉较细小, 丝线结扎难度较大, 往往容易将血管撕断, 出血较剧, 采用电凝较为方便。⑤建模后加强护理, 保温促进复苏, 必要时应给予静脉补液。

4 参考文献

- Iwamoto S, Higashi A, Ueno T, et al. Protective effect of sivelestat sodium hydrate (ONO-5046) on ischemic spinal cord injury. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2009;8(6):606-609.
- Ye XJ, Cai XH, Mao XY, et al. *Guangdong Yixue*. 2007; 28(29): 1422-1424.
叶西就, 蔡肖衡, 毛小燕, 等. 腹主动脉转流对阻断所致脊髓缺血损伤的保护作用[J]. *广东医学*, 2007, 28(29):1422-1424.
- Etz CD, Homann TM, Luehr M, et al. Spinal cord blood flow and ischemic injury after experimental sacrifice of thoracic and abdominal segmental arteries. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008; 33(6):1030-1038.
- Kanellopoulos GK, Kato H, Hsu CY, et al. Spinal cord ischemic injury development of a new model in the rat. *Stroke*. 1997;28(12): 2532-2538.
- Follis FM, Blisard KS, Varvitsiotis PS, et al. Selective protection of gray and white matter during spinal cord ischemic injury. *Ann Thorac Surg*. 1999;67(5):1362-1369.
- Lang-Lazdunski L, Matsushita K, Hirt L, et al. Spinal cord ischemia. Development of a model in the mouse. *Stroke*. 2000; 31(1):208-213.
- Kanellopoulos GK, Xu XM, Hsu CY, et al. White matter injury in spinal cord ischemia: protection by AMPA/kainate glutamate receptor antagonism. *Stroke*. 2000;31(8):1945-1952.
- Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Mignon A, et al. Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000;18(2):174-181.
- Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Dupont H, et al. The effects of FK506 on neurologic and histopathologic outcome after transient spinal cord ischemia induced by aortic cross-clamping in rats. *Anesth Analg*. 2001;92(5):1237-1244.
- Sang HF, Zhang YM, Xu LX, et al. *Zhongguo Lingchuang Kangfu*. 2003;7(29):3952-3953.
桑韩飞, 张英民, 徐礼鲜, 等. 缺血预处理对兔脊髓缺血损伤后的保护作用及其机制[J]. *中国临床康复*, 2003, 7(29):3952-3953.
- Zhu ZH, Xiong LZ, Dong HL, et al. *Zhonghua Mazuixue Zazhi*. 2000;20(11):664-668.
朱正华, 熊利泽, 董海龙, 等. 附注射液对兔脊髓缺血损伤保护作用的量效关系研究[J]. *中华麻醉学杂志*, 2000, 20(11):664-668.
- Xiao RD, Xie WQ, Weng GX, et al. *Zhongguo Xiongxin Xueguan Waike Lingchuang Zazhi*. 2001;8(1):36-39.
肖荣冬, 谢维泉, 翁国星, 等. 低温生理盐水与腺苷局部灌注对脊髓缺血损伤的保护作用[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2001, 8(1):36-39.
- Zhu XF, Zou ZT. *Heilongjiang Yiyao Kexue*. 2005;28(4):42-43.
朱晓峰, 邹志田. 中度低温下犬主动脉阻断不同时间脊髓缺血损伤观察[J]. *黑龙江医药科学*, 2005, 28(4):42-43.
- Li M, Li Q, Wu YM. *Zhongguo Lingchuang Kangfu*. 2004;8(17): 3280-3281.
李民, 李强, 伍亚民. 持续性兔脊髓缺血损伤的病理与行为功能变化规律[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(17):3280-3281.
- The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals*. 2006-09-30.
- Qu J, Zhang HT, Yang HL. *Zhongguo Lingchuang Kangfu*. 2004; 8(20):4006-4007.
曲静, 张洪涛, 杨惠林. 兔腰动脉阻断建立脊髓缺血再灌注动物模型的实验研究[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(20):4006-4007.
- Wu YM, Wang ZG, Zhu PF, et al. *Zhonghua Chuangshang Zazhi*. 2000;16(3): 157-159.
伍亚民, 王正国, 朱佩芳, 等. 脊髓缺血损伤模型及行为学的实验研究[J]. *中华创伤杂志*, 2000, 16(3):157-159.
- Xiao BH, Chen Q, Yang DX, et al. *Zhongguo Shiyan Zhenduanxue*. 2009;13(6):747-749.
肖博晗, 陈强, 杨东旭, 等. 脊髓缺血再灌注损伤模型改进的研究[J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13(6):747-749.
- Kesslak JP, Keirstead HS. Assessment of behavior in animal models of spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2003;26(4): 323-328.
- Xiao H, Zhang L, Wang QY, et al. *Sichuan Yixue*. 2007;28(12): 1309-1311.
肖红, 张兰, 王泉云, 等. 经腹主动脉阻断致犬脊髓缺血再灌注损伤实验模型的探讨[J]. *四川医学*, 2007, 28(12):1309-1311.
- Guan YL, Liu F, Dong PQ, et al. *Zhongguo Tiwai Xunhuang Zazhi*. 2006, 4(1):46-48.
管玉龙, 刘锋, 董培青, 等. 脊髓缺血损伤动物模型的建立[J]. *中国体外循环杂志*, 2006, 4(1):46-48.
- Yu QJ, Zhou QS, Huang HB. *Yiyao Daobao*. 2009;28(2):185-188.
余奇劲, 周青山, 黄海波. 依托咪酯对兔主动脉阻断脊髓缺血性损伤的保护作用[J]. *医药导报*, 2009, 28(2):185-188.
- Wu RS. Beijing: Chemical Industry Publisher. 2007.
吴端生. 现代实验动物学技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- Schreiberova A, Lackova M, Kolesar D, et al. Neuronal nitric oxide synthase immunopositivity in motoneurons of the rabbit's spinal cord after transient ischemia/reperfusion injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2006;26(7-8):1483-1492.

- [25] Xu M, Yang HL, Ni CF, et al. Zhonghuang Chuangshang Zazi. 2000;16(2):88-90.
徐明,杨惠林,倪才方,等.经椎间动脉栓塞法建立急性脊髓缺血损伤模型[J].中华创伤杂志,2000,16(2):88-90.
- [26] Zivin JA, DegJrolami U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model. Stroke. 1980;11(2):200-202.
- [27] Kwun BD, Vaeanti FX. Mild hypothermia protects against irreversible damage during prolonged spinal cord ischemia. J Surg Res. 1995;59(6):780-782.
- [28] Yao JY, Weng H, Zhang L, et al. Sichuan Daxue Xuebao. 2007; 38(3):497-450.
姚俊岩,翁浩,张兰,等.脊髓缺血再灌注损伤模型的改进及脊髓耐受缺血时限的研究[J].四川大学学报:医学版.2007,38(3):497-450.
- [29] Zhang JS, Sun LJ, Huan Y, et al. Zhonghua Fangshexue Zazhi. 2006;40(4):541-544.
张劲松,孙立军,宦怡,等.DSA引导下肋间动脉栓塞法分度建立犬脊髓缺血模型及扩散加权成像初步研究[J].中华放射学杂志,2006, 40(4):541-544.
- [30] Gu B, Zhang Z, Li HN, et al. Zhongguo Yaolixue Tongbao. 2009;25(12):1559-1563.
顾兵,张政,李华南,等.脊髓损伤动物模型的复制及其实验治疗学应用[J].中国药理学通报,2009,25(12):1559-1563.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突:课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点:实验采用腹膜后入路,高选择性阻断脊髓局部供血,成功建立控制性及可重复性较好的局灶性脊髓缺血损伤模型,属方法创新。

设计或课题的倚倚与不足:此模型观察的时间较短,脊髓缺血后如何转归,尚待进一步研究证实。脊髓圆锥功能、腰骶神经根的根性缺血症状的评价也是下一步工作的重点。

提供临床借鉴的价值:实验为脊髓缺血损伤的研究提供了一个较理想的动物模型。


近期关于组织工程研究有价值的学科新闻回顾：本刊学术部

内容简介	网站点击更多
<p>经卫生部门批准,浙江大学干细胞与组织工程中心负责人欧阳宏伟教授带领团队,成功研究治疗软骨损伤的一项新技术组织工程化软骨移植,率先在浙江进入临床,患者可以到浙大医学院附属邵逸夫医院、浙大医学院附属二院等5家医院接受这样的软骨移植治疗。据了解,采用该技术治疗的医疗费用在美国大约为3万美元,中国的费用将在四分之一到三分之一。</p>	<p>cn.zglckf.com/Html/2010_05_08/2_63204_2010_05_08_108850.html</p>
<p>加拿大不列颠哥伦比亚大学的研究人员应用人工蛋白质成功研制出一种新型固态生物材料,这种材料可以非常逼真地模拟肌肉的弹性性质。该项成果标志着加拿大科学家在使用人工蛋白质构造固态生物材料方面找到了一条全新的途径,在材料科学和人体组织工程上极具应用前景。</p>	<p>cn.zglckf.com/Html/2010_05_08/2_63204_2010_05_08_108860.html</p>
<p>来自俄亥俄州立大学 William G. Lowrie 化学与生物膜工程研究院的研究人员在三维细胞培养技术方面又获得了新成果,他们提出了一种新的培养细胞接种的方式,这将有助于3D细胞培养技术在实践中的更多应用,也有助于3D细胞培养技术往高通量筛选方面发展,这一研究成果公布在《Biotechnol Prog》杂志上。领导这一研究的是华人科学家杨尚天教授,其长期从事生物工程和生物加工的研究和开发,特别是新型生物反应器的研发、生物催化、发酵、细胞培养、组织工程、生物芯片、生物传感器等方面具有很深的造诣。</p>	<p>cn.zglckf.com/Html/2010_05_08/2_63204_2010_05_08_108874.html</p>
<p>英国医师在人体器官再生移植手术上获得了突破性进展,他们成功地使用一位10岁儿童患者的自身干细胞重新培育出气管,手术持续了近4h,是在英国伦敦儿童医院进行的,医生们从男孩患者骨髓中提取干细胞,然后植入一个纤维胶原蛋白“气管支架”上,这种新培育的生长细胞并不会出现免疫系统问题。</p>	<p>cn.zglckf.com/Html/2010_04_12/2_63204_2010_04_12_101893.html</p>