

脊髓3/4横断伤动物模型的建立及其电生理评价★

李景德¹, 卢培刚²

Establishment and electrophysiology evaluation of an animal model of 3/4 crosscut spinal cord injury

Li Jing-de¹, Lu Pei-gang²

Abstract

BACKGROUND: Establishing a stable and standard animal model of spinal cord injury is a precondition to investigate the repair of spinal cord injury.

OBJECTIVE: To establish a practical, standard and dependable model of acute spinal cord injury in rats.

METHODS: A total of 60 female Wistar rats were randomly assigned into two groups, spinal cord injury group and control group. The spinal cord corresponding to T₈ thoracic vertebrae of spinal cord injury rats were open. The dura mater was sheared opening. The posterior 3/4 of the spinal cord was cut across the spinal dorsal midline by a specially designed Venus eye scissors, 1.5 mm in depth. The sensory evoked potentials and motor evoked potentials were examined in an hour. As for the control rats, the vertebral lamina and dura mater were opened. The spinal cord was exposed for sham operation.

RESULTS AND CONCLUSION: The success rate of model construction was 100%. The function recovery of control group was close to normal in the 1st week after model establishment. The function recovery of spinal cord injury group started in the 2nd week after model establishment and virtually stopped in the 4th week. The final motor-function grades were no more than 10. There was significant difference between the two groups. The wave amplitude of sensory evoked potentials and motor evoked potentials in spinal cord injury group decreased sharply and significantly, the latency extended significantly ($P < 0.01$). These findings indicate that the establishment of rat acute spinal cord injury model of 3/4 traumatic transection is easy and reproducible. It is an ideal model for the investigation of spinal regenerative repair.

Li JD, Lu PG. Establishment and electrophysiology evaluation of an animal model of 3/4 crosscut spinal cord injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(2): 257-260. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 建立稳定、标准的脊髓损伤动物模型是研究脊髓损伤修复的前提。

目的: 建立一种实用、标准、可靠的急性大鼠脊髓损伤模型。

方法: 将 60 只成年雌性 Wistar 大鼠随机均分成两组。脊髓损伤组: 打开 T₈ 胸椎对应脊髓, 剪开硬膜, 用特殊设计的眼科维纳斯剪横跨脊髓背侧中线剪断脊髓的后 3/4, 深度 1.5 mm。1 h 后行感觉诱发电位和运动诱发电位检查。对照组: 只打开椎板, 剪开硬膜, 暴露脊髓进行假手术。

结果与结论: 造模成功率为 100%。对照组造模后 1 周功能恢复接近正常; 脊髓损伤组造模后第 2 周开始恢复, 到第 4 周基本停止, 最终运动功能评分未超过 10 分, 两组比较差异有显著性意义。脊髓损伤组可以明显看到感觉诱发电位与运动诱发电位的波幅值急剧降低, 且潜伏期明显延长, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。说明 3/4 横断伤急性大鼠脊髓损伤模型制作法操作简便、重复性好, 是研究脊髓再生修复的理想模型。

关键词: 脊髓损伤; 动物模型; 电生理; BBB 评分; 再生修复

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.02.015

李景德, 卢培刚. 脊髓 3/4 横断伤动物模型的建立及其电生理评价[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(2): 257-260. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

脊髓损伤预后难以预料, 主要是因脊髓损伤后的病理生理机制非常复杂^[1-3]。许多治疗性药物, 干细胞移植、基因修饰、外周神经移植以及组织工程材料移植等仍处在研究之中, 少部分处于临床试验阶段, 为了寻求新的、有效的治疗方法, 更透彻地阐明脊髓损伤所涉及的复杂机制, 更有效地评估脊髓损伤后临床处理手段的正确性, 建立可靠性高、重复性好的脊髓损伤动物模型成为神经学者的重要课题^[4-6]。因而复制出标准化的动物模型显得尤为重要^[7]。

目前多用 Ramberg 等^[8]和 Borgens 等^[9]建立的大鼠半横断脊髓损伤模型, 该模型只能部分损伤后索中皮质脊髓束, 神经损伤不完全是其主要缺点, 本实验主要进一步改进脊髓半横断损伤模型, 克服缺点, 使其操作简单、实用, 从而提高实验效率。

1 材料和方法

设计: 动物实验建模观察。

时间及地点: 于 2010-07/11 在解放军济南军区总医院动物实验中心完成。

材料: 健康清洁级雌性 Wistar 大鼠 60 只,

¹General Hospital of Jinan Military Area Command of Chinese PLA (Postgraduate Basis of Liaoning Medical University), Jinan 250031, Shandong Province, China; ²Department of Neurosurgery, General Hospital of Jinan Military Area Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Li Jing-de★, Studying for master's degree, Physician, General Hospital of Jinan Military Area Command of Chinese PLA (Postgraduate Basis of Liaoning Medical University), Jinan 250031, Shandong Province, China
lijingde1981@163.com

Correspondence to: Lu Pei-gang, Doctor, Associate professor, Associate chief physician, Master's supervisor, Department of Neurosurgery, General Hospital of Jinan Military Area Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China
pglu912@126.com

Received: 2011-08-25
Accepted: 2011-10-26

¹ 辽宁医学院解放军济南军区总医院研究生培养基地, 山东省济南市 250031; ² 解放军济南军区总医院神经外科, 山东省济南市 250031

李景德★, 男, 1981 年生, 山东省成武县人, 汉族, 辽宁医学院在读硕士, 医师, 主要从事神经保护的基础与临床研究。
lijingde1981@163.com

通讯作者: 卢培刚, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 解放军济南军区总医院神经外科, 山东省济南市 250031。
pglu912@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)02-00257-04

收稿日期: 2011-08-25
修回日期: 2011-10-26
(20110825009/D · LX)

体质量 250~300 g, 由山东大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK 鲁 20030004。动物分笼饲养, 每笼三四只, 自由饮食, 10~14 h 昼夜交替饲养。室内温度保持在 20 ℃ 左右。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

主要仪器: 眼科维纳斯剪, 购于江苏六六视觉科技股份有限公司, 固定切口深度为 1.5 mm。手术显微镜为上海医疗仪器厂生产。

方法:

实验动物分组: 将 60 只大鼠随机摸球法均分成脊髓损伤组和对照组。按时间点于造模前、造模后 3 d, 1, 2, 4, 6 周每组 5 只进行造模后后肢运动功能评价。

大鼠脊髓节段定位: 所有大鼠脊柱的 T_{9~11} 棘突较其他椎体棘突增生肥大明显, 接近融合为一体, 指腹沿脊柱滑行可明显感觉到 T_{9~11} 棘突, 可以此作为定位的骨性标志。

大鼠脊髓横断模型的制备: 所有器械经高压蒸汽灭菌。所有大鼠 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉 (0.4 g/kg), 俯卧位四肢外展固定于手术台上。选脊髓 T₁₀ 节段为损伤节段, 根据 T_{9~11} 骨性标志定位, 术区脱毛剂备皮、消毒, 铺无菌洞巾。沿棘突行纵行切口约 4 cm, 切开皮肤及浅筋膜, 分离软组织至椎板暴露 T_{7~T9} 椎板, 咬除 T₈ 椎板与棘突, 咬除时尽量减少对硬膜外脂肪组织的撕扯, 以免引起椎管内的静脉丛破裂而至大量出血。充分显露椎管及硬膜囊, 手术显微镜下剪开硬膜囊, 用特殊设计的眼科维纳斯剪横跨脊髓背侧中线 (以脊髓后正中动脉为标志) 剪断脊髓的后 3/4 深度 1.5 mm (250~300 g Wistar 大鼠脊髓前后径约为 2 mm), 用棉片轻压伤处止血, 采用术中分离剪切的软组织填塞创口, 尽量减少脑脊液继续外漏和隔绝外界炎性物质对脊髓的损伤, 见图 1。



Arrow represents the wound packed by soft tissue during operation

Figure 1 The posterior 3/4 of the spinal cord was exposed and cut off

图 1 暴露并剪断脊髓后 3/4 深度, 箭头所指: 术中用软组织填塞创口处

下及皮肤。对照组不剪断脊髓, 其余步骤同横断组。

模型成功标准: 造模后 1 h 行感觉诱发电位及运动诱发电位检查无诱发电位出现, 大鼠造模后 3 d BBB 评分为 0 分。

大鼠造模后体温调节功能失调体温偏低, 因此术后饲养环境的温度控制在 25~28 ℃, 并定期通风。造模后大鼠单笼饲养, 每日更换垫料, 每日 2 次青霉素 2×10⁵ U 肌注, 连续 1 周。为防止术后出现电解质紊乱每日腹腔注射生理盐水 10 mL, 连续 1 周。造模后 3 d 内除饲料外给予饼干喂食增加营养。大鼠造模后因下肢瘫痪易致下肢水肿和压疮, 因此造模后垫厚敷料, 每日按摩患肢, 清洗下肢周围皮肤, 吹风机干燥。大鼠术后出现尿潴留, 一般一两周恢复排尿功能。自主排尿恢复之前每日按摩、挤压膀胱 2 次协助排尿。大鼠造模后易出现血尿、脓尿, 因此造模后 1 周内大鼠均饮用呋喃坦啶水以减轻泌尿系统感染。

检测指标:

行为学观察: 大鼠于造模前、造模后 3 d, 1, 2, 4, 6 周, 进行后肢运动功能评价, 采用目前国际上公认的运动功能评分法^[10-11] (BBB), 实验操作者以外的双人、双盲独立观察, 最后取平均值的方法进行评分。

神经电生理检测: 大鼠于造模前、造模后 3 d、1, 2, 4, 6 周进行感觉诱发电位和运动诱发电位检测。①感觉诱发电位检测: 大鼠以 10% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉 0.4 g/kg, 采用针电极。刺激电极置于胫前肌中部, 参考电极置于远侧 1 cm 处, 刺激强度为 1.5~4.0 mA, 波宽 0.2 mA, 频率 1.9 Hz。连续方波叠加 20~40 次。记录电极置于头顶部中线与冠状缝交点处皮下, 参考电极置于其后方 0.5 cm 处, 地线紧贴于生理盐水浸湿的动物尾部。潜伏期单位为毫秒 (ms), 波幅单位为毫伏 (mV)。②运动诱发电位检查: 动物麻醉方法同前。采用针电极, 刺激电极置于顶冠状缝前 2 mm、中线旁 2 mm 处头皮下, 记录电极置于胫前肌群中部, 参考电极置于同侧记录电极远侧 1 cm 处, 地线紧贴于生理盐水浸湿的动物尾部。单次刺激强度为 1.5~4.0 mV。潜伏期单位为毫秒 (ms), 波幅单位为毫伏 (mV)。

统计学分析: 第一作者采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

创口敷洒青霉素粉剂, 逐层缝合肌肉、皮

2 结果

2.1 实验动物数量分析 60只大鼠造模均成功,造模后观察期6周内共有7只死亡,4只因体质量过轻死亡,2只因皮肤破溃感染死亡,1只因排尿时膀胱破裂死亡,死亡后及时给予补充。脊髓损伤组25只、对照组28只进入结果分析。

2.2 大鼠行为学观察 造模前所有实验动物双后肢BBB评分均为21分。造模后脊髓横断组大鼠均呈现双后肢完全瘫痪。造模后3 d~1周内横断组大鼠BBB评分均为0分,1周后BBB评分逐渐上升,至伤后4周可达9或10分,6周时评分无明显改变。对照组造模后双后肢活动正常, BBB评分21分,脊髓横断组大鼠双后肢BBB评分于造模后各时间点均较对照组明显降低,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。

表1 各组后肢运动功能的 BBB 评分比较
Table 1 BBB scores of motor function in hind limbs ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Time	Control group	Spinal cord injury group
1 wk	20.11±0.56	0.66±0.66 ^a
2 wk	21	3.72±1.06 ^a
3 wk	21	5.14±1.15 ^a
4 wk	21	9.57±1.05 ^a
5 wk	21	9.63±1.15 ^a
6 wk	21	9.38±1.21 ^a

^a $P < 0.01$, vs. control group

2.3 神经电生理检测结果 脊髓损伤组与对照组相比,感觉诱发电位和运动诱发电位潜伏期均明显延长,波幅值显著降低,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。见表2,3。

表2 造模后4周各组感觉诱发电位感觉诱发电位潜伏期与波幅值比较
Table 2 Latency and wave amplitude of sensory evoked potentials in 4 wk after model establishment ($\bar{x} \pm s$)

Group	Latency (ms)	Wave amplitude (mV)
Control	23.1±1.08	15.8±0.83
Spinal cord injury	40.6±1.96 ^a	6.54±0.42 ^a

^a $P < 0.01$, vs. control group

表3 造模后4周各组运动诱发电位运动诱发电位潜伏期与波幅值比较
Table 3 Latency and wave amplitude of motor evoked potentials in 4 wk after model establishment ($\bar{x} \pm s$)

Group	Latency (ms)	Wave amplitude (mV)
Control	16.1±0.63	4.31±0.46
Spinal cord injury	19.7±0.71 ^a	2.01±0.09 ^a

^a $P < 0.01$, vs. control group

3 讨论

建立稳定、标准的脊髓损伤动物模型是研究脊髓损伤修复的前提。理想的脊髓损伤模型应具备以下几个条件:①神经功能损害和病理生理改变同临床相似。②稳定性好,可重复性强,技术简单,便于推广应用。③可调控性好,可根据实验要求形成不同程度的损伤。④动物死亡率低。目前常用的脊髓损伤模型有锐性损伤模型(脊髓全横断、半横断、大半横断模型)、挫伤模型、钳夹压迫模型、脊髓缺血及再灌注损伤模型、光化学诱导模型等^[12]。由于临床脊髓损伤的致伤因素复杂,因此目前尚无一种模型能完全符合上述所有条件。实验模型的选择主要根据研究目的,锐性损伤模型因神经传导束损伤较为完全,是研究中枢神经纤维再生较为理想的模型。

本实验采用了锐性损伤模型中的3/4横断模型,从背侧切断脊髓前后径的3/4。由于大鼠皮质脊髓束在脊髓中的走行与人体有很大的区别,经延髓进行锥体交叉后,交叉的皮质脊髓束主要在后索而不是侧索中下行(占全部皮质脊髓束的99%),少量未交叉的皮质脊髓束纤维在前索靠近前正中间裂处下行^[13](占1%),因此只要经背侧切除脊髓的后2/3以上,即可全部切断后索中的皮质脊髓束。本实验中损伤动物的后肢部分功能能够恢复,皮质脊髓束前束未被完全切断可能是其原因之一。该模型相对于半横断模型其对皮质脊髓束的损伤更完全,相对于全横断模型又保留了部分皮质脊髓束前束,减轻了膀胱功能障碍等并发症,明显降低了死亡率,脊髓全横断模型死亡率可达60%~70%,其中泌尿系统并发症是其主要死亡原因。本实验发现3/4横断模型大鼠排尿功能恢复较早,一般为一二周,而全横断模型为二四周,泌尿系统感染仅占26.7%,全横断模型可达50%以上。同时因为采用了雌性大鼠,其尿道短,尿道感染、水肿发生概率较雄性大鼠低,不易形成尿道阻塞,泌尿系统并发症也大大减少,该模型死亡率仅为11.7%。该模型另一优点为操作简单,断端整齐,出血少,模型成功率高,存活大鼠成模率为100%。因此3/4横断模型是研究脊髓再生修复的理想模型,国外许多脊髓再生修复的实验研究也均采用了此类模型^[14-15]。

致谢: 感谢解放军济南军区总医院神经内科肌电图室在体感和运动诱发电位检测上的帮助。感谢解放军济南军区总医院神经外科辛国强医师在动物造模上提供帮助。

4 参考文献

- [1] DeVivo MJ. Causes and costs of spinal cord injury in the United States. *Spinal Cord*. 1997;35(12):809-813.

- [2] Qiu J. China spinal cord injury network: Changes from within. *Lancet Neurol.* 2009;8(7):606-607.
- [3] Baptiste DC, Fehlings MG. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J Neurotrauma.* 2006;23(3-4):318-334.
- [4] Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg.* 1992;76(1):13-22.
- [5] Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.* 2004;4(4):451-464.
- [6] Lammertse DP. Update on pharmaceutical trials in acute spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2004;27(4):319-325.
- [7] Rossignol S, Schwab M, Schwartz M, et al. Spinal cord injury: time to move? *J Neurosci.* 2007;27(44):11782-11792.
- [8] Ramberg DA, Yaksh TL. Effects of cervical spinal hemisection on dihydromorphine binding in brainstem and spinal cord in cat. *Brain Res.* 1989;483(1):61-67.
- [9] Borgens RB, Blight AR, McGinnis ME. Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: the effects of applied electric fields. *J Comp Neurol.* 1990;296(4):634-653.
- [10] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995;12(1):1.
- [11] Engesser C, Cesar C, Anderson AJ, Basso DM, et al. Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2005;22(1):157.
- [12] Talac R, Friedman JA, Moore MJ, et al. Animal spinal cord injury for evaluation of tissue engineering strategies. *Biomaterials.* 2004;25(9):1505-1510.
- [13] Brosamle C, Schwab ME. Cell of origin, course, and termination patterns of the ventral uncrossed component of the mature rat corticospinal tract. *J Comparative Neurol.* 1997;386(2):293-303.
- [14] GrandPré T, Li S, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature.* 2002;417(6888):547-551.
- [15] Tanaka H, Yamashita T, Yachi K, et al. Cytoplasmic p21^{Cip1}/WAF1 enhances axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neuroscience.* 2004;127(1):55-164.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 第一作者进行实验设计、实施、资料收集、成文, 第二作者审校, 第一、二作者对文章负责。

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。

伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

本文创新性: 检索中国知网, PubMed 数据库, 检索时间 1985/2010-06, 检索关键词设定为动物模型; 脊髓损伤; 电生理; 再生修复; Animal model; Spinal cord injury; Electrophysiology; regeneration. 检索结果表明, 国内外多集中于脊髓牵拉伤、打击伤、压迫伤、缺血伤、光化学伤、半横断伤及全横断伤模型研究, 其研究结果均不十分理想。本实验行脊髓后 3/4 横断伤, 造模过程中用分离软组织填塞创口并行电生理检查, 国内尚少见报道, 认为建立了较为理想的模型。