

大鼠脊髓损伤椎管内蛛网膜下腔持续给药模型的建立^{*}

刘德华¹, 王 建², 高志强¹, 邹连生¹, 张功亮² (1. 赣南医学院第一附属医院神经外科, 江西赣州 341000; 2. 江西省赣州市人民医院病理科 341000)

【摘要】 目的 建立一种脊髓损伤椎管内蛛网膜下腔持续给药的动物模型。**方法** 参照 Allen 重物坠落法制备急性脊髓挫伤动物模型, 模拟临床上外伤所致的脊髓损伤, 并在损伤灶安装蛛网膜下腔持续给药装置, 观察大鼠的行为表现, 并通过检测给药装置内葡萄糖含量判断该装置效果。**结果** 脊髓损伤实验组大鼠麻醉清醒后均表现为双后肢截瘫, 损伤平面以下肌张力降低, 肌力 0 级, 对针刺亦无反应, 并明显尿潴留; 对照组大鼠四肢活动正常。30 只大鼠中, 1 只在术后 2 d 死亡, 2 只大鼠表现为痉挛性瘫痪, 2 只大鼠导管脱落或堵塞, 6 只大鼠表现出不同程度的自残现象。**结论** 按照 Allen 重物坠落法制备急性脊髓挫伤并在损伤灶安装蛛网膜下腔持续给药装置的动物模型, 重复性较好, 获得稳定的伤动物模型。

【关键词】 脊髓损伤; 蛛网膜下腔用药; 大鼠; 动物模型

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 24. 009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)24-3413-02

Establishment of spinal cord injury rat model of continuous infusion inside subarachnoid space of spinal canal^{*} LIU De-hua¹, WANG Jian², GAO Zhi-qiang¹, ZOU Lian-sheng¹, ZHANG Gong-liang² (1. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical College, Ganzhou, Jiangxi 341000, China; 2. Department of Pathology, Peoples Hospital of Ganzhou City, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

【Abstract】 Objective To establish spinal cord injury rat model of continuous infusion inside subarachnoid space of spinal canal. **Methods** By using Allen's method as a reference, rat models of acute spinal canal injury was prepared to simulate spinal cord injuries similar to clinical trauma. Continuous infusion device was installed inside subarachnoid space in the lesion. The behaviors of rat models were observed and the effects of this device was evaluated by measuring the level of glucose in the drug delivery device. **Results** Rats in the experimental group suffered from paraplegia in double hindlimb, and the tension of muscle below the level of spinal injury was decreased, with myodynamia level of 0 grade, without reaction to acupuncture, and with apparent urine retention. The four limbs of rats in the control group functioned normally. Among all of the 30 rats, 1 rat died in 2 days, 2 rats suffered from spastic paralysis, catheter of 2 rats were lost or blocked, and 6 rats showed various degree of self mutilation after surgery. **Conclusion** The rat model of acute spinal canal injury, prepared in reference to Allen's method and installed with continuous infusion device inside subarachnoid space in the lesion, might be with fine repeatability and could provide stable injured rat model.

【Key words】 spinal cord injury; continuous infusion inside subarachnoid space; rat; animal model

脊髓损伤患者常遗留严重伤残, 导致日常生活困难, 给家庭和社会造成极大负担, 而且发病率在全球呈现逐渐上升的趋势。因此, 脊髓损伤后的治疗研究已成为全球共同关注的课题。有必要建立一种稳定且重复性好、与临床脊髓损伤类型相似的动物模型, 为后期的脊髓损伤治疗提供实验基础。本实验利用 Allen 法制备急性挫伤型动物模型, 模拟临床上外伤所致的脊髓损伤, 并在损伤灶安装蛛网膜下腔持续给药装置, 观察大鼠的行为表现及给药装置的效果, 为进一步治疗研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 选取健康 Wistar 大鼠 30 只, 清洁级, 体质量 250~316 g, 平均 (280.1±15.17)g, 由赣南医学院实验动物中心提供, 雌雄不限。动物按体质量从小到大编号, 按随机数字法将这些动物等分为实验组和对照组。注药导管取自一次性使用静脉输液针 (江西洪达), 穿刺囊取自一次性使用无菌注射

器 (1 mL, 江西三鑫)。

1.2 方法 大鼠用 0.15% 水合氯醛腹腔注射 (按 300 mg/kg 计算), 麻醉成功后, 将大鼠俯卧位固定于手术台上。消毒术区皮肤, 取 T8~T12 节段腰背部正中入路, 逐层切开皮肤、皮下组织至脊柱, 暴露 T9~T11 节段, 用手外科持针器咬开 T9~T11 节段椎板至两侧关节突, 充分暴露脊髓。采用 Allen 重物坠落法, 将 10 g 砝码由 25 mm 高度沿玻璃管坠落打击大鼠开放的 T10 节段脊髓^[1-2]; 大鼠出现摆尾反射、双后肢及躯体回缩扑动后双后肢瘫痪。显微镜下, 将大鼠 T10 节段脊髓损伤处的硬脊膜及蛛网膜剪开, 将导管头端剪成 30° 角斜面, 10 倍显微镜下与硬脊膜行端侧吻合 (导管与椎管纵轴相一致)。参考杜世伟等^[3] 的方法, 取 1 mL 注射器的筒状橡胶塞 (长 5.0 mm) 作为穿刺囊 (经实验其底面可反复穿刺而不出现液体渗漏), 将导管末端插入穿刺囊内 (两者管径接合紧密, 为防止术后脱落用医用胶水粘合固定), 形成一末端保护装置缝合于背

^{*} 基金项目: 江西省赣州市科技局项目 (201107)。

作者简介: 刘德华, 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事脊髓肿瘤、脊髓外伤以及神经内镜基础与临床的研究。

部皮下筋膜上。彻底止血后逐层缝合肌肉、皮肤。对照组同法暴露脊髓,植入注药装置,但不损伤脊髓。各组于术后 1 h 经腹腔给予每千克 2 万单位青霉素,每日 2 次,连续 3 d。均自由饮食。每日膀胱区按压排尿 3 次至大鼠反射性膀胱形成。

1.3 截瘫动物的饲养及护理 截瘫大鼠术后颈部佩戴硬塑料颈套以防自残,分笼饲养于配有空调(室温 21~24 ℃,湿度 55%~65%)、环境安静的专用饲养室,配备充足的饲料、水分,及时更换垫料,保持笼内清洁。每天按时行 2 次人工排尿,排尿前先清理尿道口,保持外尿道通畅,排尿时手指轻按充盈的膀胱,逐渐加压,见有尿排出后保持压力,排出大部分尿液即可(无需完全排尽尿液,以免挤破膀胱)。排尿后可适当挤压直肠帮助排便;排便排尿后要及时清理,保持大鼠会阴部干燥,被尿液浸湿的肢体用温肥皂水清洗,吹干;常改变体位,适当牵拉双下肢,帮助运动。

1.4 大鼠后肢运动功能评分 采用后肢运动功能评分法(BBB)^[3-4],将大鼠后肢运动分为 22 个等级。后肢全瘫为 0 分,完全正常为 21 分,两者之间根据功能分别定为 1~20 分,其基本内容为:关节活动的数目和范围,负重程度及前后肢协调性,前、后爪和尾部的活动情况。BBB 评分观察期 4 min,动物应尽量保持在活动范围的中心区域活动,分别对大鼠术后 24 h、3 d、1 周、2 周、4 周进行评分。评分采用双人双盲法,取两人评分均值作为每次记录值。BBB 评分小于或等于 7 分定义为运动功能严重损伤;大于或等于 15 分定义为运动功能基本恢复;2 次 BBB 评分增长大于或等于 5 分定义为运动功能恢复显著。麻醉苏醒后 BBB 评分 0 分则表明脊髓损伤模型造模成功。

1.5 导管性能检测 在术后第 1、3、7、14、28 天分别进行脑脊液置换术,检测导管性能。在体外触摸注射囊位置,用 1 mL 注射器经皮穿刺刺囊底,有明显落空感后,抽出 0.1 mL 脑脊液检测脑脊液中葡萄糖水平,随后注入 0.1 mL 无菌生理盐水置换,1 h 后再抽出 0.1 mL 脑脊液检测脑脊液中葡萄糖水平^[5]。抽液及注液均流畅以及两次抽取液中含有葡萄糖接近脑脊液中水平则证明导管通畅性能正常;如果两次抽取液葡萄糖水平明显减少或两次检测结果相差悬殊,说明导管脱落或堵塞。

1.6 统计学处理 采取 SPSS 12.0 统计学软件进行数据分析;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验;以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 术后一般情况观察 30 只大鼠均造模成功,脊髓损伤实验组大鼠麻醉清醒后均表现为双后肢截瘫,损伤平面以下肌张力降低,肌力 0 级,对针刺亦无反应,并明显尿潴留。对照组大鼠四肢活动正常。术后前 3 d,大鼠活动较少,进食少,体质量有所下降,尿潴留现象比较严重,常伴有轻微血尿及腹部胀气,部分大鼠有大便困难伴硬结。第 4 天后,饮食逐渐增加,体质量增加,部分大鼠恢复自动排便,尿潴留现象有所改善,但仍需挤压膀胱帮助排尿。经过精心护理,所有大鼠均未出现切口感染现象。1 只大鼠在术后 2 d 死亡,2 只大鼠表现为痉挛性瘫痪,2 只大鼠导管脱落或堵塞(植入装置穿刺抽取液中葡萄糖含量极低),6 只大鼠表现出不同程度的自残现象。

2.2 BBB 运动功能评分及抽取液葡萄糖含量检测结果 实验组各时间段 BBB 评分均明显低于对照组,比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。实验组与对照组各时间段抽取液葡萄糖含量检测结果,24 h 为 (2.33 ± 0.29) mmol/L、3 d 为

(2.05 ± 0.24) mmol/L、1 周为 (2.27 ± 0.26) mmol/L、2 周为 (2.43 ± 0.37) mmol/L、4 周为 (2.47 ± 0.41) mmol/L。

表 1 两组各时间段 BBB 运动功能评分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	伤后时间				
	24 h	3 d	1 周	2 周	4 周
实验组	0.48±0.68	0.85±0.71	7.72±0.83	8.66±0.92	9.92±1.12
对照组	17.06±0.67	18.19±0.73	18.52±0.79	18.65±0.89	18.78±0.93

3 讨 论

随着人类社会现代化的进程,脊髓损伤的发病率在全球呈现出逐渐上升的趋势。脊髓损伤者常遗留严重伤残,引起损伤段以下感觉运动功能丧失,出现截瘫或四肢瘫,导致日常生活困难,给家庭和社会造成极大负担^[6]。因此,脊髓损伤后的康复治疗是医患双方迫切需要解决的问题。为寻求治疗脊髓损伤的有效方法,需要建立与临床脊髓损伤类型极为相似的动物模型,评估脊髓损伤严重程度及有效治疗的方法,为进一步脊髓损伤的治疗提供实验依据。

脊髓损伤阶段性越高,实验大鼠病死率及并发症越高,目前广泛使用脊髓 T8~T12 阶段为实验损伤部位,而且胸段脊髓椎板咬处相对方便^[1]。因此,本实验参照 Allen 重物坠落法制作大鼠 T10 节段脊髓损伤模型,总体实验数据比较稳定,重复性较高。伤后 3 d 至 1 周之间 BBB 评分明显升高,运动功能恢复显著,1 周后运动功能恢复不明显,说明大鼠损伤 1 周内自我修复能力,1 周后渐趋稳定^[7-8]。本研究脊髓损伤模型术后表现为痉挛性瘫痪 2 只,2 d 后死亡 1 只,说明这种实验方式仍存在着一定缺陷,比如外力作用时间不恒定、脊髓损伤不对称、损伤范围不恒定等。在无脊髓损伤的对照组 BBB 评分仍未达到正常,主要原因考虑为:(1)手术咬除椎板或剪开硬膜时有可能损伤脊髓;(2)植入注药装置后,导管对脊髓的影响作用^[9]。轻柔细致的显微手术操作,以及选取更为柔软的导管可能会改善实验结果,待进一步实验证实和改进。

检测植入注药装置通畅性,通常是向蛛网膜下腔注射利多卡因后观察大鼠双下肢麻痹、瘫痪症状^[10];以及一定时间内能否恢复下肢活动能力,以此判定位于蛛网膜下腔内的导管是否通畅,而对于脊髓损伤已经有下肢活动障碍的实验动物显然是不合适的。本实验采取检测注药装置球囊内液体的含糖量来判断导管是否与蛛网膜下腔相通,获得了成功,而且检测方便可靠。通过此方法判断 2 只大鼠导管脱落或堵塞,后经解剖证实导管与硬脊膜吻合口撕裂脱落,与蛛网膜下腔不通。

总之,动物模型对促进实验干预治疗的发展必不可少,并将继续在脊髓损伤治疗研究中起到十分重要的作用。探索一种全新的、更加合理有效、稳定性好、可重复性强、性状稳定、便于护理的脊髓损伤持续椎管内注药模型,为脊髓损伤的理论研究奠定了基础。

参考文献

[1] 王保金,刘长江. 脊髓损伤模型的建立与应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,3(2):380-383.
[2] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1):1-12.
[3] 杜世伟,包新杰,冯铭,等. 导管体外端(下转第 3417 页)

TNF- α 水平仍明显高于 MAP 组和健康对照组,提示病情仍未得到完全控制,全身性炎症反应仍未完全缓解。上述实验结果表明,动态检测血清 IL-1、IL-6 及 TNF- α 水平可以进行有效的病情观察,有利于判断预后。

目前,对 AP 的诊断及病情评估方法较多。因 CT 检查比较简单,成为确诊 AP 和判断预后的首选检查方法,在临床上应用甚广。但需要注意的是,AP 的影像学表现与临床表现相比,存在一定的时间滞后性,而且对 SAP 组的检查也不方便^[9]。APACHE II 评分标准根据临床表现来预测 AP 的严重程度,不受患者入院后的时间限制,可重复检测评分,连续观察,是目前仍然公认的 AP 严重度的评估指标之一,但临床上收集完整指标比较困难^[10]。检测患者血清 IL-1、IL-6 及 TNF- α 水平不受时间、病情的限制,可以进行动态观察,具有方便快捷的特点。本研究显示,患者入院第 3 天,血清中 IL-1、IL-6 及 TNF- α 水平与 APACHE II 评分及 CTSI 呈正相关,提示血清中 IL-1、IL-6 及 TNF- α 水平与病情严重程度、胰腺病变之间存在密切联系。SAP 组患者血清 IL-1、IL-6 及 TNF- α 水平与 APACHE II 评分及 CTSI 高度相关,提示血清中细胞因子检测对 SAP 患者的病情评估具有参考价值。APACHE II 评分及 CTSI 在 MAP 与 SAP 组具有明显差异,考虑由于两型 AP 的病因、病理过程不尽相同,其后期对机体的全身及局部影响差别依然显著,也提示检测细胞因子水平有助于诊断及病情评估。

有研究认为,促炎-抗炎细胞因子二者之间存在动态平衡,二者的作用结果决定了胰腺炎的转归^[11]。治疗 SAP 的重点在于快速使二者达到低水平的动态平衡。目前,对于 AP 的发病机制,细胞因子网络是如何互相作用并推动胰腺炎临床病程演进的详细机制尚未完全阐明。细胞因子在胰腺组织损伤,远隔器官并发症产生中的详尽作用也不十分清楚。对胰腺微循环障碍、炎性介质和细胞因子作用等发病机制进行深入研究,能够尽早阻断全身炎症反应综合征的发展,预防多器官功能衰竭综合征的发生,并为免疫调节治疗奠定基础。

综上所述,AP 病情变化迅速,及时、准确的判断病情和合理的治疗是改善预后的关键。检测 AP 患者血清细胞因子水平,有助于从 AP 的发病机制入手,具有一定的前瞻性。而 APACHE II 评分及 CTSI 可以动态观察患者病情及其在治疗过程中的变化。联合检测可更有效地确定和判断 AP 的炎症程度及治疗方法的有效性,从而更好地对 AP 患者进行病情风险预测,为各病理时期的相应“个体化”治疗提供指导性的帮助,

提高患者的生存率。

参考文献

- [1] 王春亭,曲鑫.重症急性胰腺炎的诊治进展[J].中华急诊医学杂志,2012,21(10):1080-1083.
- [2] Hong W,Dong L,Huang Q,et al. Prediction of severe acute pancreatitis using classification and regression tree analysis[J]. Dig Dis Sci,2011,56(12):3664-3671.
- [3] 中华医学会消化病学学会胰腺疾病学组.重症急性胰腺炎内科规范治疗建议[J].中华消化杂志,2009,29(2):75-78.
- [4] Koussoulas V,Tzivras M,Karaqianni V,et al. Monocytes in systematic inflammatory response syndrome: differences between sepsis and acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol,2006,12(41):6711-6714.
- [5] Mori T,Miyamoto T,Yoshida H,et al. IL-1 β and TNF- α -initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis[J]. Int Immunol,2011,23(11):701-712.
- [6] 孟杰,张静静.白细胞介素-6、白细胞介素-10、肿瘤坏死因子- α 在不同时期胰腺炎的表达和临床意义[J].中国医药导报,2013,10(19):71-75.
- [7] 王要军,葛文松. TNF- α 、IL-6、TPA 与急性胰腺炎严重程度的相关性[J]. 国医论学杂志,2009,9(6):1261-1262.
- [8] Gunjaca I,Zunic J,Gunjaca M,et al. Circulating Cytokine Levels in Acute Pancreatitis-Model of SIRS/CARS Can Help in the Clinical Assessment of Disease Severity[J]. Inflammation,2012,35(2):758-763.
- [9] 曹友红,孔文涛,王小平,等.降钙素原、CRP 联合 Balthazar 分级对急性胰腺炎患者临床风险预测的意义[J].新医学,2013,44(9):626-628.
- [10] 邹金艳,林军,易三凤,等. BISAP、Ranson's、APACHE II 和 CTSI 评分系统在急性胰腺炎评估中的价值[J]. 中华消化外科杂志,2014,13(1):39-43.
- [11] 杨健鹰,方茂勇,徐周纬,等.血清 IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 对急性胰腺炎预后判断的研究[J].安徽医药杂志,2013,17(7):1185-1187.

(收稿日期:2014-02-10 修回日期:2014-06-23)

(上接第 3414 页)

- 保护装置在大鼠长期腰蛛网膜下腔置管模型中的应用[J].中国比较医学杂志,2011,21(3):52-55.
- [4] Basso DM,Beattie MS,Bresnahan JC,et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study[J]. J Neurotrauma,1996,13(7):343-59.
 - [5] 任长虹,高明清,曹金强,等.大鼠脑脊液抽取的新方法[J].实验动物科学,2012,29(1):61-62.
 - [6] 王菊惠.瘫痪患者生命质量研究进展[J].中国煤炭工业医学杂志,2007,10(10):1142-1144.
 - [7] Shibuya S,Miyamoto O,Itano T,et al. Temporal progressive antigen expression in radial glia after contusive spinal

cord injury in adult rats[J]. Glia,2003,42(2):172-183.

- [8] Yamamoto S,Yamamoto N,Kitamura T,et al. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord[J]. Exp Neurol,2001,172(1):115-127.
- [9] Caban AJ,Hama AT, Lee JW, et al. Enhanced antinociception by nicotinic receptor agonist epibatidine and adrenal medullary transplants in the spinal subarachnoid space[J]. Neuropharmacology,2004,47(1):106-116.
- [10] 张磊,张阳,罗超,等.大鼠蛛网膜下腔置管方法的改进[J].广西医学,2013,35(2):174-175.

(收稿日期:2014-04-20 修回日期:2014-07-04)