

应用改进封闭脊髓窗技术活体观察 脊髓损伤后脊髓微循环变化

刘 鹄, 沈慧勇, 唐 勇, 杨 睿, 黄 霖, 叶记超, 陈 铿, 尹 博, 李世渊

(中山大学附属第二医院骨科 510120 广州市)

【摘要】目的:探讨应用改进的封闭脊髓窗技术活体观察大鼠脊髓损伤后脊髓微循环变化的可行性及效果。**方法:**改进传统的脊髓窗,设计带有打击探头的脊髓窗。45 只 SD 大鼠随机分为对照组($n=20$)和实验组($n=25$)。实验组大鼠脊髓窗安装完成后进行窗内打击脊髓,然后即时观察并记录打击后 2h 内打击点周围微动脉直径的变化。对照组大鼠在脊髓窗安装完成后不进行打击,只对脊髓微动脉直径进行连续 2h 观察并记录。术后两组大鼠进行 BBB 运动功能评分,处死动物取脊髓标本切片,HE 染色,观察脊髓组织改变情况。**结果:**实验组大鼠打击点周围 2~6mm 的微动脉直径在打击后 10min、30min、1h、2h 各时间点均较打击前明显减小,术后 2d 及 7d 时 BBB 功能评分明显低于术前,病理切片可见脊髓打击区神经组织变性液化。对照组大鼠在观测开始及结束时脊髓微动脉直径无明显变化,术后 BBB 评分与术前 BBB 评分均为 21 分,病理切片未见脊髓损伤表现。**结论:**改进的封闭脊髓窗技术可以有效地实现窗内打击脊髓,并可以安全地对脊髓表面微血管进行活体观测。脊髓表面打击点周围 2~6mm 的微动脉在脊髓损伤后 10min 即发生痉挛。

【关键词】脊髓损伤;脊髓窗;脊髓微循环;微动脉痉挛

中图分类号:R683.2,R331.3 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-11-0861-06

In vivo observation of spinal cord injury microcirculation with the advanced closed spinal cord window technique/LIU Hu, SHEN Huiyong, TANG Yong, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(11):861-866

【Abstract】Objective:To explore the feasibility and efficacy of in vivo observation of spinal cord injury microcirculation with the advanced closed spinal cord window technique.**Method:**The modified spinal cord window was designed and attached with a hitting probe. 45 SD rats were randomized into experimental group ($n=25$) and control group ($n=20$). The rats in experimental group had spinal cord hit after the completion of spinal cord windows. Diameters of the microarteries around the hitting point were observed and recorded in two hours after hitting. While the rats in control group had spinal cords microarteries recorded at the same time-point without hitting at the spinal cord. The locomotion of each rat's hind limbs at 2 day and 1 week after surgery were tested using the Basso Beattie and Bresnahan (BBB) locomotor rating scale. The histomorphology of each spinal cords specimen were observed either after embedded in paraffin, serial section and stained with hematoxylin and eosin (HE) at 1 week after surgery. **Result:** The spinal cord microarteries diameters in experimental group at 10min, 30min, 1h and 2h respectively after hitting were significantly smaller than that before hitting, and the postoperative BBB locomotor rating score were significantly lower than that before surgery, which had significant difference. Spinal cord pathology revealed nerve fiber degeneration and liquefaction in the hitting area. While the spinal cord microarteries diameters in control group remained changed with the BBB score of 21 at pre-operation and post-operation duration. Spinal cord pathology were at normal. **Conclusion:** Using advanced spinal window technique, the spinal cord in the window can be hit effectively and observed safely which can be used in spinal cord injury research. Spasm is evidenced at the hit point 2-6mm around within 10 minutes after the impact.

【Key words】 Spinal cord injury; Spinal window; Spinal cord microcirculation; Microarteries spasm

【Author's address】 Department of Orthopadics, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510120, China

第一作者简介:男(1973-),副主任医师,医学硕士,研究方向:脊柱外科(现在南方医科大学附属南海医院)

电话:(0757)86395163 E-mail:lhswan@163.com

通讯作者:沈慧勇

随着脊髓损伤研究的逐渐深入,人们越来越关注脊髓损伤后脊髓微循环的结构及其变化。目前所采用的近红外光谱技术^[1]、激光多普勒技术^[2]、氢电极技术^[3](氢清除法)等方法观察脊髓微循环得出的相对数值只能间接地反映微循环的变化,直观性不够。封闭脊髓窗技术^[4,5]可以在活体直观观察脊髓微循环,既最大程度维持了脊髓微循环外部环境的生理稳定性,又具有连续、动态监测等优点。但是传统脊髓窗封闭后因为盖玻片的封闭和观测物镜镜头的阻挡,无法实现窗内对脊髓的打击,故无法应用于脊髓损伤的研究。我们通过对传统脊髓窗的改进,引进窗内打击探头,既降低了实验和手术的难度又实现了镜下在窗内对脊髓的有效打击,为脊髓损伤后微循环变化的研究提供了新的技术平台。

1 材料及方法

1.1 主要试剂及仪器

DK-8D 型恒温水浴箱(上海森信实验仪器有限公司)、爱得生理记录仪[埃德仪器国际贸易(上海)有限公司]、大鼠椎体固定器(中山大学脊髓损伤研究所)、高速磨钻(北京北方三友医疗器械有

限公司)、丙烯酸树脂(GC Unifast)、氰基丙烯酸酯生物胶(Alon Alpha)、聚乙烯微管(美国 cole-parmer)、7mm 高分子树脂管(广州裕发医用器械有限公司)。

1.2 人工脑脊液的配制

NaCl 溶液:126mmol/L, KCl 溶液:5mmol/L, KH_2PO_4 溶液:1.3mmol/L, MgSO_4 溶液:1.3mmol/L, CaCl_2 溶液:2.4mmol/L, NaHCO_3 溶液:26mmol/L, Glucose 溶液:10mmol/L。试剂配置均用蒸馏水。

1.3 离体窗体的预制

截取约 4mm 长高分子树脂管,以高速磨钻磨出斜行穿过管壁的隧道,于隧道内置入内径 1mm、长 4mm 的弧形金属导管,导管内放置直径 1mm 打击探头,再于管壁上钻孔置入灌流管和引流管。修整打磨树脂管的底部和顶部,确认窗体形状满足以下要求:窗体高度不高于 3mm 以保证窗内足够的进光量;底部适应椎板弧形;顶部光滑平整,能与盖玻片良好粘合不渗漏。用氰基丙烯酸酯生物胶粘结 3 个导管,晾干窗体备用(图 1~4)。

1.4 动物与分组

18 月龄 Sprague-Dawley 雌性大鼠(中山大学实验动物中心提供)45 只,体重 300~350g。随机分

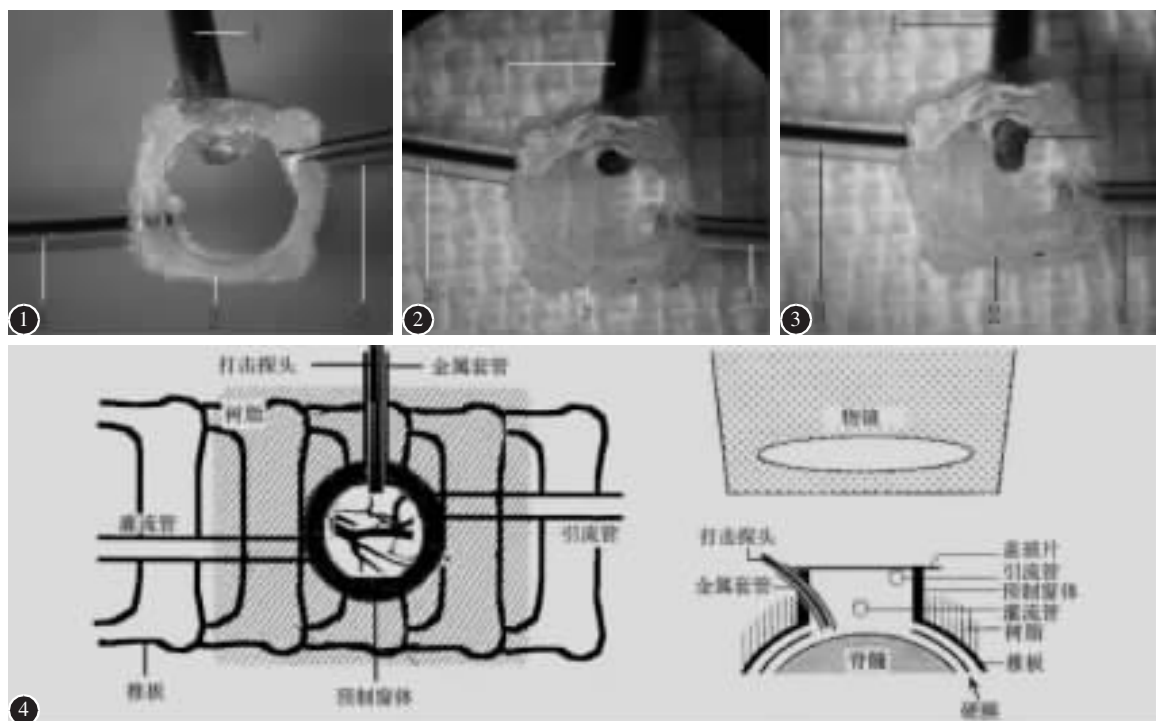


图 1 脊髓窗上面观($\times 10$) 图 2 脊髓窗底面观($\times 10$) 图 3 插入打击探头后脊髓窗底面观($\times 10$)(1.金属导管 内径 1mm 2.高分子窗体 直径 6mm 3.引流管 聚乙烯微管 4.灌流管 聚乙烯微管 5.金属打击探头 直径 1mm 窗体高度 3mm,内径 7mm) 图 4 改进后带有打击装置的脊髓窗结构示意图

为对照组 20 只,实验组 25 只。

1.5 动物麻醉及模型制作

10%水合氯醛(3~4ml/kg)腹腔注射,5~10min 后动物进入麻醉状态。双侧腹股沟及背部术野剃毛。常规碘伏消毒腹股沟术野皮肤,做斜切口,长约 1cm,钝性分离显露股动脉,取直径 2mm 聚乙烯微管插管,微管内预先充满肝素盐水,连接压力血压转换器和生理监测仪 (MLT1050 precision BP transducer, AD Instruments) 监测血压。缝合腹股沟切口。

大鼠俯卧置于操作台上,常规碘伏消毒背部术野皮肤,定位 T10 棘突。取背部正中切口,长约 3cm,依次切开皮肤、皮下,紧贴椎板剥离竖棘肌并向两边剥离至横突外侧,显露第 10~11 胸椎的椎板。大鼠椎体固定器固定 T10、T11 椎体。用显微手术器械在 T10、T11 椎板间开窗,高速磨钻打磨椎板开窗边缘及椎板表面,使骨窗呈适合预制窗体的直径为 7mm 的圆形。

准确放置预制窗体正对椎板开窗,在窗体周围涂抹半凝固丙烯酸树脂,维持窗体位置直至树脂凝固(开椎板及粘结窗体过程中小心操作,不要损伤脊髓或刺激硬膜)。手术显微镜下操作切开脊髓窗范围内硬膜,恒温水浴箱加热人工脑脊液至 37℃,连接灌流管,进行脑脊液表面灌流,调节灌流及引流速度,使液体充填整个窗体内,在窗体上缘表面涂生物胶,粘结盖玻片,封闭脊髓窗。恒温脑脊液表面灌流。

实验组大鼠以 12.5mm×20g 撞击力撞击探头尾部,对脊髓进行隔窗打击(直接打击区域因打击前后神经束翻滚位移严重,无法完成对同一血管的打击前后数据采集)。所观察的血管均为距离直接打击区 2~6mm 范围内、直径介于 20~60 μ m 的微动脉。记录打击前、打击后 10min、30min、1h、2h

时动脉直径数值。

对照组大鼠仅对脊髓表面微动脉进行持续观测 2h,每只大鼠选取 1~2 条微动脉(血管直径 14~61 μ m)进行观测,记录观测开始时血管直径和 2h 后观测结束时血管直径。

1.6 术后运动功能评分和组织观察

分别于术前、术后 2d、7d 对大鼠行 BBB 运动功能评分,评分前进行膀胱按摩排空尿液,以防膀胱充盈影响大鼠运动。3 人同时参照 BBB 评分标准评分,取平均值。

术后 1 周,所有大鼠均以 10%水合氯醛腹腔麻醉,开胸,暴露心脏,经左心室向主动脉插管,剪开右心房。快速灌注生理盐水 1min,随后用 4%多聚甲醛固定液灌注 4min,直至右心房流出清澈的无血性液体。取出手术段脊髓,长约 1.5cm,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,以打击点为中心间隔 1mm 切片,切 6 个层面,每层取 3 张切片行 HE 染色,光镜下观察脊髓组织学变化。

1.7 统计学处理

所有数据采用 SAS 8.1 软件包处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,采用配对样本 t 检验。 P 值 <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

对照组大鼠手术失败 2 例,18 只完成手术。实验组大鼠手术失败 2 例,死亡 1 例,打击后渗漏 1 例,21 只大鼠完成实验观测。对照组大鼠实验过程中动脉血压平稳,无明显波动(图 5);实验组大鼠在打击瞬间因为刺激突然升高,随后逐渐降低至正常范围(图 6),没有发生低血压或高血压而影响组织灌注(表 1)。

2.1 脊髓动脉直径的变化

18 只完成手术的对照组大鼠开始时血管直

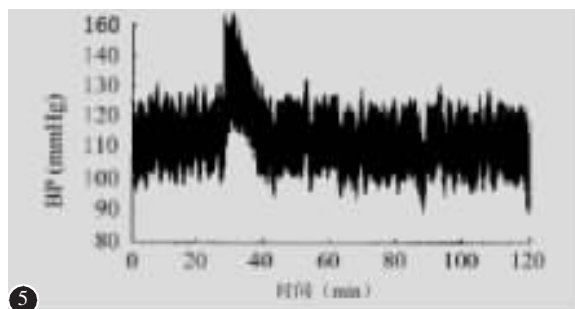


图 5 实验组血压监测记录显示打击瞬间大鼠血压升高随后逐渐下降至正常范围

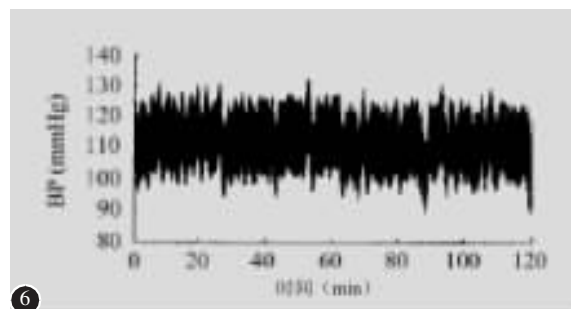


图 6 对照组大鼠血压监测记录显示实验过程中大鼠血压平稳

表 1 两组大鼠股动脉血压不同时间点测量结果

($\bar{x} \pm s$, mmHg)		
时间 (对照组/实验组)	对照组	实验组
0h/实验开始时	105.6±12.7	104.8±14.9
1h/打击时	103.1±10.6	132.6±20.1
2h/打击后 2h	104.5±14.3	106.3±17.2

径为 $33.47 \pm 2.58 \mu\text{m}$, 观察结束血管直径为 $33.20 \pm 2.51 \mu\text{m}$ 。两组数据差异没有统计学意义 ($t = 1.2156, P = 0.2339$)。完成实验观测的 21 只实验组大鼠的 28 条微动脉直径发生明显变化 (图 7、8, 后插页 II), 打击前至打击后 2h 五个时间点微动脉直径数值依次减小, 打击前与打击后 10min 之间、10min 与 30min 之间、30min 与 1h 之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 1h 与 2h 之间差异没有统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。说明打击后 10min 即发生痉挛, 1h 内血管直径在逐渐变小, 1~2h 没有变化。

以打击后 4 个时间点微动脉数值与打击前数值比值反映同一血管直径数值变化。4 个比值依

次减小, 10min 比值与 30min 比值之间、30min 比值与 1h 比值之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 1h 比值与 2h 比值之间差异没有统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。也说明了打击后 10min 脊髓表面微动脉即发生痉挛, 1h 内血管直径逐渐变小, 1~2h 变化不明显。

2.2 BBB 运动功能评分

实验组大鼠 BBB 运动功能评分术前为 21 分; 术后第 2 天为 13.10 ± 0.41 分; 术后第 7 天为 16.57 ± 0.44 分。术后第 2 天评分最低, 术后第 7 天评分较第 2 天有所升高, 但是仍明显低于术前评分, 不同时间点间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组大鼠术前、后均没有出现运动功能障碍, BBB 功能评分均为 21 分。

2.3 组织学检查

对照组及实验组大鼠脊髓组织外形均无改变, 灰质及白质结构清晰。实验组损伤震中位于脊髓背侧两后角之间, 损伤区可见神经组织液化坏死而形成的囊腔; 对照组无囊腔形成 (图 9、10, 后插页 II)。

表 2 实验组大鼠各时间点 28 条微动脉直径变化情况

($\bar{x} \pm s$)					
时间点	打击前	10min	30min	1h	2h
微动脉直径 (μm)	36.93 ± 2.88	32.18 ± 2.87 ^①	28.32 ± 2.71 ^②	27.57 ± 2.69 ^③	27.43 ± 2.71 ^④
与打击前直径的比值	1	0.85 ± 0.017 ^①	0.73 ± 0.019 ^②	0.71 ± 0.021 ^③	0.71 ± 0.023 ^④

注: ①与打击前比较 $P < 0.05$, ②与 10min 时比较 $P < 0.05$, ③与 30min 时比较 $P < 0.05$, ④与 1h 时比较 $P > 0.05$

3 讨论

目前学术界认为脊髓损伤可分为原发性损伤和继发性损伤两个阶段。原发性损伤指由外界致伤因素在受伤当时所造成, 是治疗手段无法预防和影响的。继发性损伤是指在致伤作用停止后, 因机体自身的一系列生化机制引起, 使最初病灶周围原来完整的神经组织发生自身破坏性病变, 导致损伤进一步加重^[6]。继发性损伤发生于损伤后的几小时至几天之内, 是急性期治疗手段可以干预的。继发性损伤的机理也是脊髓损伤急性期治疗的理论基础。正因为这个原因, 目前针对脊髓损伤急性期治疗的研究主要都集中在针对继发性损伤机理的研究。

导致继发性脊髓损伤的机理主要有: 钙离子代谢异常学说、自由基学说、创伤后炎症反应学说、神经元凋亡学说、血管源性的缺血学说等等^[7,8]。这些因素在脊髓的继发性损伤过程中存在复杂的

相互作用, 其中缺血是研究的焦点之一。

虽然针对血管继发性痉挛的治疗在脑组织损伤领域已经临床应用多年, 与其相似的脊髓损伤治疗领域却没有相对应的治疗措施。事实上, 目前脊髓损伤的急性期治疗只有针对继发炎症反应的甲基强的松龙冲击治疗得到了开展。原因在于很多在脑组织损伤方面的治疗在脊髓损伤领域因缺乏相应的实验基础而无法开展临床上的研究。在脑组织损伤领域, Duff 等^[9]在 1988 年应用乳胶微球标记, 配合组织切片观察从形态学角度证实了红细胞及其组成成分可能是引起脑血管痉挛的关键性因素。随后 Nozaki 等^[10]在 1990 应用狗进行活体的动物实验, 他通过对狗进行椎动脉造影, 活体观察到在脑室内注射红细胞和血红蛋白引起的脑血管痉挛。与 Duff 等所做的形态学方面的研究相对应, Daneyemez 等^[11]在 1999 年用硅胶微血管铸型的方法从形态学角度, 在大鼠的脊髓损伤模型

证明了损伤后血管痉挛的存在。而目前脊髓损伤研究领域所缺乏的是与 Nozaki 等所做的研究相对应的,在活体中证实脊髓损伤后发生脊髓血管痉挛的直接证据。

缺乏此类研究的原因在于,对脊髓活体微循环监测的难度很大。与脊髓组织相比较,脑组织的体积与血流量都明显大于其周围的颅骨骨板,同时颅骨骨板的形状为规则的薄板。而脊髓的体积与其前方的椎骨相比较就显得很小了,而且构成椎管的椎体形状极不规则。另一方面脊髓动脉细小,各级血管管径差很小,造影剂充盈效果远远不如脑动脉造影。同时,因为脊髓周围复杂的解剖环境,骨、脂肪、脑脊液所产生的伪影以及脊髓的直径很小,而脑脊液波动导致的脊髓的波动就显得相对较大。导致了有些可以应用于脑的检测技术(如磁共振灌注成像, MRI PI; 磁共振血管成像, MRA)无法应用于脊髓^[12]。

为了能够应用脊髓窗观察脊髓损伤后的微动脉变化,本研究改进脊髓窗窗体,设计了隔窗打击的探头。探头为具有一定弹性的直径为 1mm 的金属导丝,该导丝的弹性使得它可以穿行于斜穿窗体的弧形金属套管,于套管内转变方向后实现对脊髓的打击。通过固定质量的砝码从固定高度落下撞击导丝尾端,实现每次打击的同质性。打击后大鼠 BBB 功能评分较术前有下降,差异具有统计学意义。病理切片也可以见到打击范围脊髓组织的变性液化。证明脊髓窗的打击是有效的。

改进后的封闭脊髓窗与原来的脊髓窗相比较,操作难度明显降低,成功率显著提高,但动物手术操作部分仍然需要精细的操作技巧,而且在应用可见光的情况下只能对脊髓表面的血管进行观测。

本研究发现打击点周围 2~6mm 范围内,尽管不是直接致伤点,但伤后 10min 即发生了微动脉的痉挛。这证实了 Mautes 等^[13]提出的脊髓损伤后脊髓微血管继发性痉挛的理论。直径 20~60 μm 的微动脉即使没有受到直接的打击,在脊髓损伤后 10min 亦可发生不同程度的痉挛,而且在伤后 1h 内痉挛有继续加重的倾向,2h 内痉挛没有缓解的趋势。这与临床上所见到的脊髓损伤患者伤后

损伤平面上升的表现是相符合的。

4 参考文献

1. Germon T. Intraoperative monitoring with near-infrared spectroscopy (NIRS)[J]. *Spine*, 2002, 27(24):2850-2852.
2. Kristensen JD, Karlsten R, Gordh T. Laser-Doppler evaluation of spinal cord blood flow after intrathecal administration of an N-methyl-D-aspartate antagonist in rats [J]. *Anesth Analg*, 1994, 78(5):925-931.
3. Fan T, Wang C, Wang F, et al. The influence of impaired microvasculature on regional blood flow of the spinal cord after microsurgery[J]. *Chin Med J (Engl)*, 1998, 111(6):488-491.
4. Ishikawa M, Sekizuka E, Sato S, et al. In vivo rat closed spinal window for spinal microcirculation: observation of pial vessels, leukocyte adhesion, and red blood cell velocity [J]. *Neurosurgery*, 1999, 44(1):156-161.
5. Bertalanffy H, Yamaguchi N, Ishikawa M, et al. A new model for in vivo observation of the feline spinal microcirculation: the closed spinal window [J]. *Neurosurgery*, 1994, 34(2):316-321.
6. 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. 298.
7. 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. 306.
8. Ambrozaitis KV, Kontautas E, Spakauskas B, et al. Pathophysiology of acute spinal cord injury[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2006, 42(3):255-261.
9. Duff TA, Louie J, Feilbach JA, et al. Erythrocytes are essential for development of cerebral vasculopathy resulting from subarachnoid hemorrhage in cats[J]. *Stroke*, 1988, 19(1):68-72.
10. Nozaki K, Okamoto S, Yanamoto H, et al. Red blood cells are essential for late vasospasm following experimentally induced subarachnoid hemorrhage in dogs[J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1990, 30(1):10-15.
11. Daneyemez M. Silicone rubber microangiography of injured acute spinal cord after treatment with methylprednisolone and vitamin E in rats[J]. *Spine*, 1999, 24(21):2201-2205.
12. Bammer R, Fazekas F. Diffusion imaging of the human spinal cord and the vertebral column [J]. *Top Magn Reson Imaging*, 2003, 14(6):461-476.
13. Mautes AE, Weinzierl MR, Donovan F, et al. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis[J]. *Phys Ther*, 2000, 80(7):673-687.

(收稿日期: 2008-04-15 修回日期: 2008-09-23)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)