

短篇论著

一种新型兔慢性脊髓压迫模型的初探

Primary exploration of a novel spinal cord compression model in rabbit

张 玮, 赵必增, 杜胜超

(上海交通大学附属第六人民医院骨科 200233 上海市徐汇区宜山路 600 号)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.12.14

中图分类号: R683.2 文献标识码: B 文章编号: 1004-406X(2013)-12-1126-03

慢性脊髓压迫是临床常见病,其病理机制仍不清楚,关键在于缺乏具有临床相似性的动物模型。以往建立的慢性压迫模型,如常见的螺钉法、球囊法、双套管法等^[1-3]其实是多次急性压迫的集合。为解决这一问题,我们研发了一种新型的微型智能化且可调节的脊髓压迫器,并建立了动物模型,通过行为学、电生理学、病理生理学等方面对该模型进行了评价。

实验材料 8 只新西兰兔(平均体重为 3.1kg,由上海市第六人民医院实验动物中心提供)分为压迫组和对照组分别饲养在 18~22℃的环境中,每日 12h 光照时间,提供动物房常规的水和饲料。实验过程严格按照相关的实验动物法规进行操作。

我们自主研发的压迫器如图 1~3 所示,由外接电池、时序驱动电路板、工作指示灯、推进器等组成。其中时序驱动电路板是制作的关键点,它在外接电池供电下,每 2h 发出一次指令,使推进器的压迫端(A)前进 0.02mm(前进速度和间隔时间均可根据需要进行设定)。此外在设备不工作时也可手动拧转 B 调节 A 进出。体外实验中我们得出一节 9v、250mAh 可充电镍氢电池可维持设备正常工作 5 周左右。推进器 A 端直径为 2mm,由于工艺所限,目前采用的是带有螺纹的金属棒,考虑到在实验过程中可能对脊髓造成压迫以外的机械损伤,我们在 A 端涂抹化学胶,相对于生物胶它在凝固后不易被机体降解,而能长时间保持原状。

造模方法 用 3%戊巴比妥钠溶液(45mg/kg)麻醉大兔,俯卧位置于固定板。定位 L1~2 棘突,在无菌操作下沿背部正中中线切开皮肤,显露 L2 节段,小心切除 L2 椎板,显露黄韧带及硬脊膜。对照组清理关闭切口(体内未置入压迫器)。试验组兔继续用直径小于螺钉的锥子在椎弓根开口开路,外翻约 30°。压迫器经紫外线消毒后,手动调节 B 端,使 A 端回缩,将压迫器两个螺钉孔对准椎弓根开口处,用注射器针头模拟螺钉测试开口位置并作进一步调整,最后用螺钉将压迫器固定于椎体上(图 4)。连接一节外接电池,指示灯闪烁一次,表明已通电。调节细铁棒 B 端,直至

A 端接触脊髓硬膜表面,再反向旋转 3 圈,使 A 端离开硬膜。将外接电池至于骺窝,关闭切口。术后注射头孢拉定(0.5g/d,连续 3d)预防感染。6 周后,按原切口取出压迫器,并切开左侧大腿皮肤,沿肌间隙找到坐骨神经分叉处,将神经固定于钩状的双极电极。双头银丝电极至于黄韧带和硬膜之间,参考电极与椎旁肌相连。电极通过 POWERLAB(埃德仪器国际贸易有限公司)与计算机相连接,进行脊髓体感诱发电位(SCEP)测量,其波形为完整的 P1-N1-P2 和随后的负-正复合电位^[4],测量每个有效波形 N1 和 P1 之间的波幅差值^[5],通过软件 Lab Chart Reader V7.3 对实验数据进行读取和处理,并对两组间测量结果通过 SPSS 18.0 进行统计学分析(*t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异)。完成电生理实验并处死后,剪下兔子 L1~L3 段脊柱,立即放入福尔马林中固定 5h,用小剪刀仔细除去骨头剩下脊髓,用梯度酒精脱水后,放入-80℃冰箱暂时保存。标本采用石蜡切片,进行 HE 染色,观察脊髓形态学和细胞学上的改变。

本次实验对 4 只兔子置入了压迫器,实验期间压迫器均固定在位,没有脱落,且在置入压迫器 1 周内所有动物均未出现下肢症状。置入压迫器后,观察两只实验兔的运动功能并根据改良 Tarlov's 评分法^[4-5]进行评分(由 A、B 两人分别独立进行观察和评分):0 分,后肢运动功能完全丧失;1 分,关节活动能力差;2 分,关节能较好活动,但后肢不能直立;3 分,能站立但不能奔跑;4 分,后置运动功能完全正常。实验后第 1 周每天观察评分一次以排除手术损伤脊髓引起后肢功能障碍的可能,1 周后每周评分一次,直至第 6 周实验结束。

实验结果 术前和术后第 1 周所有兔子运动功能评分均为 4 分,后肢运动功能完好;11d 起压迫组兔出现后肢运动功能异常,对照组至实验终结后肢功能完好。对评分进行秩和检验,得分差别有统计学意义($P < 0.05$)。

试验组测得的 SCEP 波幅差为 $474.59 \pm 39.79 \mu V$,对照组测得的为 $722.97 \pm 58.02 \mu V$,两组间差异显著($P < 0.05$),说明两组间波幅下降程度有统计学意义。

肉眼观察切片,发现压迫组在脊髓压迫区域有明显凹陷,相应节段失去脊髓原有轮廓,脊髓背侧面灰质和白质分界线较腹侧模糊,蝴蝶型灰质发生改变。正常组则轮廓分界清晰。压迫组 HE 染色低倍镜下压迫区肿胀变形,

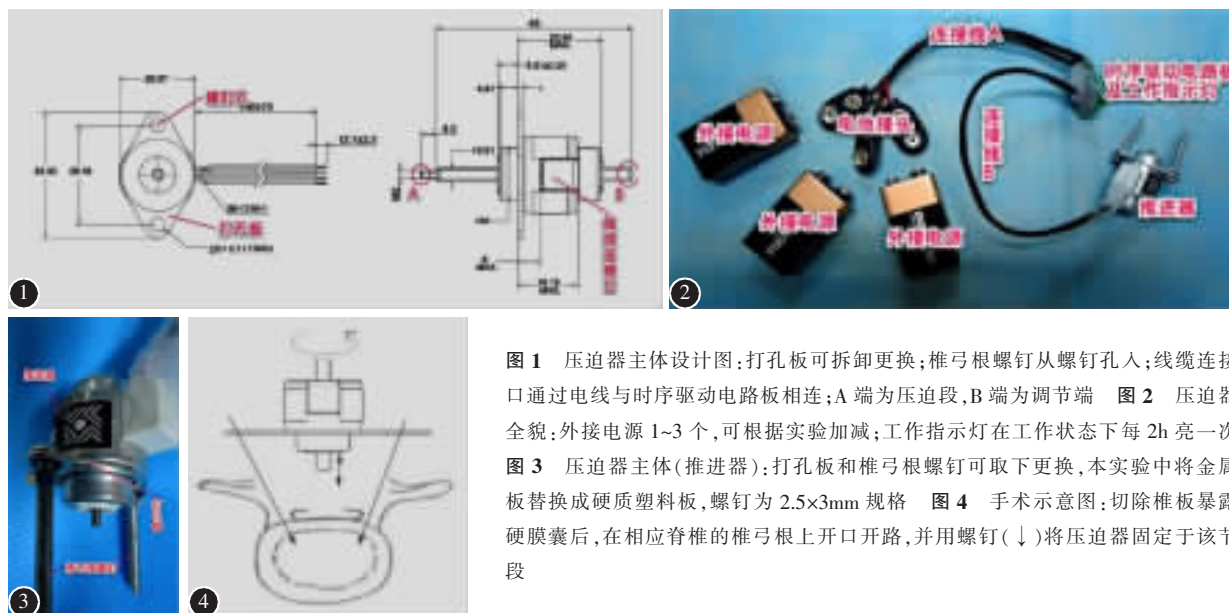


图 1 压迫器主体设计图;打孔板可拆卸更换;椎弓根螺钉从螺钉孔入;线缆连接口通过电线与时序驱动电路板相连;A 端为压迫段,B 端为调节端 图 2 压迫器全貌;外接电源 1~3 个,可根据实验加减;工作指示灯在工作状态下每 2h 亮一次 图 3 压迫器主体(推进器):打孔板和椎弓根螺钉可取下更换,本实验中将金属板替换成硬质塑料板,螺钉为 2.5×3mm 规格 图 4 手术示意图:切除椎板暴露硬膜囊后,在相应脊椎的椎弓根上开口开路,并用螺钉(↓)将压迫器固定于该节段

灰质白质分界不清。高倍镜下两侧后角血管周围有炎症细胞浸润;白质内出现不规则的脱髓鞘区,胶质细胞增生及空洞(图 5);灰质内神经细胞肿胀,可见嗜神经细胞现象。

讨论 一直以来急性脊髓损伤是医学研究的热点,其模型制作较为容易,可重复性及可控性较好,但将急性脊髓损伤的研究方法应用于慢性脊髓压迫研究是不可行的,两者损伤的机理截然不同。急性损伤特点是有明确的原发及继发损伤,前者是瞬间的脊髓挫裂伤引起脊髓内部结构的断裂坏死,血管破裂,细胞崩裂;后者是随之释放的大量炎症因子及毒性分子引起继发破坏。而慢性损伤是缓慢的不易觉察的过程,没有上述急性损伤明确的病理过程,期间存在脊髓本身适应、代偿过程。在病理发展上,急性损伤主要是坏死、出血、炎症、水肿,最后形成空洞和疤痕;而慢性脊髓压迫无明显出血^[9],主要是逐渐缺血引起灰质变性,轴索脱髓鞘,及至逐渐坏死的过程。

目前的慢性压迫模型并不能真正地反映临床实际的脊髓病理变化,无法解答临床慢性脊髓压迫的机理,如脊髓慢性压迫机理、脊髓慢性压迫的自身代偿机制、压迫减压后脊髓功能恢复的病理基础、脊髓静止性压迫状态下的病理发展、以及突然减压后的再灌注损害等目前尚未解决

但又亟需解决的问题。因此,有必要完善或重新设计慢性脊髓压迫模型,使其极为模仿疾病的压迫过程,在模型基础上加强慢性脊髓压迫的研究,为临床目前为止尚未解决关键问题提供依据,并指导临床治疗。

微机电系统(MEMS)技术是 21 世纪前沿性、多学科交叉的高科技技术,在生物、医学、宇航等领域具有广泛的应用前景。本研究采用微机电系统技术,制作由单片机(单片微型计算机)控制的微型智能化推进器。在动物模型中,将压迫器固定于脊柱,使其推进端造成持续性压迫,如半年时间 5mm 进程,分解到数小时或每小时一次激活,而每次激活压迫器向前推进千分毫米。

在该压迫器研制时,我们反复测量了兔骨架外形尺寸,打孔板可塑形以贴合实验动物腰椎的弧度。通过螺钉经椎弓根将压迫器固定于脊柱,可防止压迫器脱落。通过设定时序驱动电路板调节压迫端前进速度,可定量设定脊髓的压迫程度。该压迫具有实验操作简单、避免反复手术、固定可靠、准确定位、精确定量、可重复使用、可模拟单节段椎间盘突出及脊柱髓外肿瘤等多种临床常见疾病等优点,对其病理机理的研究具有巨大的意义。

本研究仅仅成功建立模型,未来需要通过大量的动

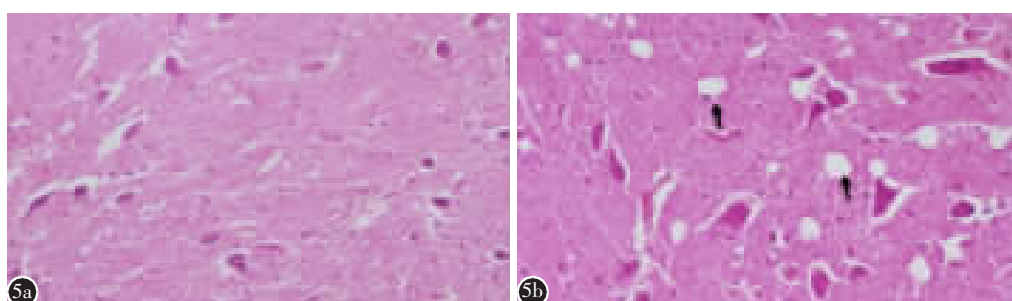


图 5 分别为对照组(a)和实验组(b)脊髓白质 HE 染色(×200),实验组白质中出面大量的空洞(↑),神经组织肿胀

(下转第 1150 页)

中国康复医学会第七届脊柱脊髓专业委员会成员

(按姓氏拼音排列)

名誉主任委员:张光铂

前任主任委员:侯树勋

主任委员:刘忠军

候任主任委员:邱勇

副主任委员:冯世庆 海涌 吕国华 罗卓荆 宋跃明 田伟 杨惠林 袁文

周跃 朱庆三

常务委员:陈伯华 陈其昕 姜建元 金大地 郝定均 李淳德 李中实 马迅

阮狄克 沈慧勇 孙天胜 王义生 王自立 夏虹 徐华梓 许建中

杨群 张永刚 仇建国

委员:陈建庭 陈伟高 邓树才 董健 高延征 贺石生 贺西京 洪毅 霍洪军

冷向阳 李波 李超 李锋 李明 梁裕 林建华 刘宝戈 刘建麟

刘一 陆颀骥 马华松 马远征 彭宝淦 戎利民 申才良 申勇 盛伟斌

孙宏慧 孙建民 谭明生 汤逊 王炳强 王欢 王清 王文军 伍骥

伍亚民 项良碧 肖增明 徐少克 闫景龙 杨述华 杨永军 张宏其 张宁

张文智 赵杰 镇万新 郑力恒 郑燕平 郑召民 朱卉敏 朱立国 朱悦

秘书:刘晓光 王华东

(上接第 1127 页)

物实验,通过更为精确缓慢的压迫模拟慢性压迫过程,希望在慢性脊髓压迫机理上有所突破。由于代价较昂贵,压迫器工艺复杂,尚不能内置电池使之微型化,目前难以应用到体积比兔子小的动物身上;且受到材料的局限,在 CT 和 MRI 上有大量伪影,而在 X 线片中由于兔脊椎骨阻挡不能清楚显示压迫器压迫段。这些需要进一步改进。

参考文献

- Shinomiya K, Mutoh N, Furuya K. Study of experimental cervical spondylotic myelopathy[J]. Spine, 1992, 17(10 Suppl): S383-387.
- Tarlov LM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies: I. experimental techniques to produce acute and gradual compression[J]. Arch Neurol Psychiat, 1953, 70(6): 813-819.
- 蔡钦林, 杨文. 犬慢性压迫性颈脊髓病的实验研究:病理及微血管造影的初步观察[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 1996, 6(5): 210-214.
- Tarlov IM. Spinal cord compression studies. III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs [J]. AMA Arch Neurol Psychiatry, 1954, 71(5): 588-597.
- Kazanci A, Seckin H, Karadeniz U, et al. Comparison of the effect of mexiletine and methylprednisolone on neural function and histopathological damage after transient spinal cord ischemia in rabbits[J]. Turk Neurosurg, 2010, 20(1): 43-49.
- 平少华, 程爱国, 王相利. 感觉诱发电位在实验性脊髓损伤中的应用[J]. 华北煤炭医学院学报, 2004, 6(4): 452-453.
- Iyer S, Maybhat A, Presacco A, et al. Multi-limb acquisition of motor evoked potentials and its application in spinal cord injury[J]. Neurosci Methods, 2010, 193(2): 210-216.
- Bohlmann HH, Bahniuk E, Rasjulemez G, et al. Mechanical factors affecting recovery from incomplete cervical spinal cord injury: a preliminary report[J]. Johns Hopkins Med J, 1979, 145(3): 115-125.

(收稿日期:2013-03-14 末次修回日期:2013-07-19)

(本文编辑 彭向峰)