

文章编号 1006-8147(2017)06-0506-04

论著

体感诱发电位测定甲强龙对大鼠慢性颈脊髓损伤的疗效及病理观察

陈福林, 王凯

(天津医科大学第二医院骨科, 天津 300211)

摘要 目的:探讨甲泼尼龙琥珀酸钠(MP)对大鼠慢性脊髓压迫模型相应时间点的SEP变化与病理变化的相关性。方法:将40只大鼠随机分为实验组与对照组($n=20$),两组均建立慢性脊髓压迫模型,实验组大鼠尾静脉行MP静滴治疗,对照组未行任何治疗;记录实验组治疗后第1、2、3天的BBB评分、SEP信号及脊髓损伤病理变化,且记录对照组同时间段的BBB评分、SEP信号及脊髓损伤病理变化。将SEP信号进行处理分析得出数据,通过HE染色观察受压脊髓组织病理变化情况,用统计学方法分析其相关性。结果:BBB评分:实验组MP治疗后第3天评分明显升高,证实MP对于慢性脊髓损伤大剂量治疗在行为学上是有效的。SEP信号:MP给药后第3天P波峰值及潜伏期缩短的百分比恢复情况远远高于对照组($P<0.05$)。HE染色:在建立模型后至第3天药物治疗过程中,脊髓组织细胞形态有所恢复。结论:慢性脊髓压迫模型大鼠经MP治疗后神经功能明显恢复,且在治疗后第3天效果最为明显。

关键词 慢性脊髓损伤;甲泼尼龙琥珀酸钠;动物模型;体感诱发电位;病理

中图分类号 R744

文献标志码 A

Effect of methylprednisolone on chronic cervical spinal cord injury in rats by somatosensory evoked potentials and its pathological observation

CHEN Fu-lin, WANG Kai

(Department of Orthopedics, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract **Objective:** To investigate the correlation between the changes in somatosensory evoked potentials (SEP) and the pathological changes in chronic spinal cord compression model in rats treated with methylprednisolone sodium succinate (MP) at the corresponding times. **Methods:** Forty rats were randomly divided into experimental group and control group ($n=20$). The chronic spinal cord compression model was established in the two groups. The experimental group was treated with MP intravenous infusion of the tail vein and no treatment was performed on the control group. The BBB score, SEP signal and pathological changes of spinal cord injury were observed at the 1st, 2nd and 3rd day after treatment and the BBB score, SEP signal and pathological changes of spinal cord injury were recorded for the control group. The SEP signal was analyzed. The pathological changes of the spinal cord were observed by HE staining. The correlation was analyzed by statistical method. **Results:** BBB score: The score for experimental group after 3 days of MP treatment was significantly increased, which confirmed that MP for chronic spinal cord injury in large doses of treatment was effective in the behavior. SEP signal: The percentages of P wave peak and latency shortened after 3 days of MP administration were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$). HE staining: After the establishment of the model during the first 3 days of drug treatment, spinal cord tissue morphology had been restored. **Conclusion:** The results suggest that the neurological function of the rats with chronic spinal cord compression could be significantly restored after MP treatment, and the effect is most significant on the third day after treatment.

Key words chronic spinal cord injury; methylprednisolone; animal model; somatosensory evoked potential; pathology

慢性脊髓压迫症(chronic compression spinal cord injury, CCSCI)在中老年患者中最常见,临床上以四肢疼痛麻木、活动受限为主要症状,严重的患者可以发生四肢软瘫甚至截瘫的情况,目前临床上仍然没有显著改善脊髓损伤手术方式或药物^[1]。CCSCI具有病程漫长且病情进行性加重的特点,会对患者心理和生理造成严重的影响及沉重的经济

作者简介 陈福林(1973-),男,副主任医师,学士,研究方向:创伤骨科;王凯, E-mail: wangkaiy48@126.com。

负担,所以,临床上治疗人类脊髓损伤成为当前医疗界研究的重要课题。目前临床上主要研究方向是甲泼尼龙琥珀酸钠(MP)通过抗脂质过氧化治疗脊髓损伤^[2-4]。既往有关MP预防及治疗急性脊髓损伤(ASCI)研究较多,然而对于其在慢性脊髓损伤中的作用则研究极少。本研究旨在建立一个理想的慢性脊髓压迫损伤模型并以体感诱发电位(SEP)作为神经功能监测的方法,探讨在不同时间点固定剂量MP对慢性脊髓损伤的临床作用及病理变化^[5]。

1 对象和方法

1.1 实验对象 选购符合中国实验动物使用及照顾条例的40只SD大鼠,重量约250~300 g,将其随机分为2组(每组20只),实验组(损伤组)和对照组,设定实验组中大鼠损伤脊髓节段位于颈5椎体(C5)水平。饲养条件为:自由饮食、室温(19 ± 4)℃、背景噪音(40 ± 10)db、湿度为(50 ± 20)%、光/暗周期为12 h/12 h,将SD大鼠分笼饲养,专门购置大鼠专用的清洁饮用水食料,保持供应充足。

1.2 建立大鼠慢性脊髓压迫模型 对大鼠行腹腔内麻醉药物(水合氯醛0.1 mL/kg)注射,在操作台上将麻醉完毕的大鼠置于俯卧位,沿大鼠脊柱正中用手术刀片自T2棘突向近端行一长约3 cm切口,切开大鼠C4-T2节段皮肤组织、皮下软组织和筋膜层,沿脊柱正中以小蚊式弯钳钝性剥离大鼠椎旁肌,通过牵开器撑开手术切口,充分暴露C4-T2椎板及棘突,以显微镊破坏C5-C6及C4-C5椎板间软组织结构,增大椎板间隙。术中需确认无明显脊髓损伤及神经血管的损伤,彻底止血,以防影响术中的视野及术后结果。同时提起C4椎板,用显微镊将1.2 mm×1.2 mm×2 mm大小可膨胀高分子压块塞入硬膜和C5椎板之间,观察记录同侧肢体活动情况。充分使用生理盐水冲洗伤口,逐层缝合筋膜、皮下组织及皮肤。碘伏消毒伤口和周围皮肤;术后给予电热毯保温,注意保持术后环境温度,避免大鼠术后体温过低出现各种并发症甚至导致死亡。术后大鼠需要单笼饲养,术后约1.5 h大鼠恢复清醒,同时观察记录大鼠四肢运动情况,如大鼠无明显大小便障碍和无明显活动受限可视为建立慢性脊髓压迫模型成功。在术后连续5 d内需每日向SD大鼠腹腔内注射30 000 U庆大霉素预防大鼠伤口感染,如果在术后2~5 h内大鼠无进食,保持安静蜷曲状态,应考虑手术伤口疼痛所致。在实验期间,需记录大鼠二便情况及运动行为。

1.3 大鼠尾静脉留置针 大鼠建模成功后2周,行尾静脉穿刺置管,实验组静滴MP注射液30 mg/(kg·d),对照组静滴生理盐水,剂量为6 mL/(kg·d),静滴完毕后用0.3 mL肝素盐水冲管,保持鼠尾静脉通畅。操作完毕后两组大鼠均单笼喂养、自由进食,观察尾静脉有无异常,如留置针位置、尾端血运、穿刺点出血情况。保持两组鼠笼干燥、清洁,此时需注意大鼠自行将静脉留置针摘除,可用医用骨水泥固定。

1.4 大鼠行为学检查 实验组和对照组在不同时间点(在成功建立模型后第14天,MP治疗后第15、16、17天)分批观察SD大鼠后肢运动功能情况:在

直径为3 m的圆形平台上将两组大鼠依次使其自由爬行,进行Basso Beattie Bresnahan(BBB)运动功能评分计算^[9]。具体评分标准:两位专业训练的实验人员评分记录。实验台放置大鼠,使大鼠适应约10 min左右,每只大鼠观察时长为5 min,实验人员一同记录并观察每只大鼠,包括前肢、肘关节、躯干、踝关节、邻近小关节及尾巴在内共10种不同的运动情况,两位实验人员记录的分数值的平均值计算为该大鼠最终BBB评分。评分标准可根据21分评分标准划分为3类,第一类动物不能站立(1~7分),评判动物后肢各关节活动;第二类评判动物后肢步态和协调功能(8~13分);第三类评判动物运动中爪的精细动作(14~21分),本次研究采用大鼠后肢进行BBB评分。

1.5 测定SD大鼠SEP信号 分别记录实验组与对照组建模前,建模2周后MP治疗1、2、3 d后的SEP信号时频域变化特征。通过体感诱发电位信号评估脊髓的功能性和完整性。连接好电极,将采集到的信号通过信号放大器放大10万倍,以频率介于2~2 000 Hz之间的滤波屏蔽其他波的干扰,并记录2~2 000 Hz之间的波形,SEP信号通过数据采集卡收集,为提高信号准确性,所收集信号均设置于5 000 Hz的采样率和12位分辨率,500个SEP信号进行叠加后获得最终结果。计算P波与N波及潜伏期延迟之间的波峰差值,后期处理体感诱发电位波形。

1.6 脊髓病理学观察 选取实验组建模时及MP治疗后3 d的脊髓标本,对照组亦选取同时段的脊髓标本。维持大鼠心脏缓慢灌注PBS溶液,直到大鼠四肢及躯体僵硬伸直。灌注完毕后小心切开后肢椎管,勿破坏或牵拉脊髓,以C5段为中心取约2 cm颈髓标本,将对照组与实验组的标本置于中性福尔马林溶液(10%)中,记录标本编号。制作标本切片,并行HE染色,在显微镜下观察染色结果,截取合适图片并保存。

1.7 统计学处理 本实验中所有统计学资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多个样本均数的比较采用重复测量资料的方差分析,多个样本均数间的两两比较行两样本均数的 t 检验,所有数据均由SPSS18.0统计软件分析处理,当 $P<0.05$ 时,具有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学检查 后肢运动评分显示脊髓损伤后完全性后肢瘫痪的各组大鼠逐渐恢复运动功能, BBB评分结果显示:实验组和对照组在15 d、16 d的BBB评分未见明显差异($P>0.05$),而实验组17 d的BBB评分显著优于对照组,差别有统计学意义($P<0.05$),随治疗时间越长效果越好(表1)。

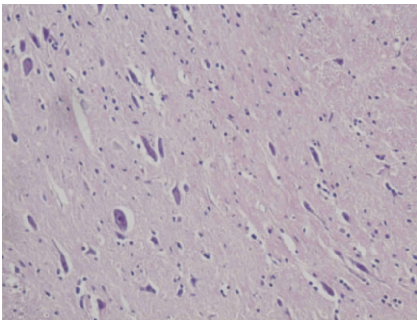
表 1 各组大鼠后肢运动功能 BBB 评分 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 BBB scores of hindlimb motor function for each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	实验组	对照组	P
15 d	15.20±1.56	14.00±2.01	>0.05
16 d	16.82±1.08	14.40±1.82	>0.05
17 d	20.62±1.10	14.90±1.20	<0.05

2.2 病理学观察 实验组均可观察到梭行运动神经元,在矢状位切片可以看到高分子压块膨胀,C5 脊髓节段受压,脊髓中央管变形,未见髓内出血及硬膜外血肿形成,脊髓后索纤维束水肿、破坏,HE 病理染色可见标本中脊髓灰质前角狭窄,周围白质较正常白质排列紊乱、结构疏松,脊髓灰质后角静脉充血扩张,毛细血管增生,出现海绵样改变并可见神经元不同数量变性坏死而导致的密度减低。

在建模后 2 周脊髓标本受压最为明显,病变最重,并可见大量脊髓组织液化,局部可见出血坏死,前角运动神经元细胞显著减少,可观察到核固缩及大量炎性细胞浸润,并伴有髓鞘密度减低,可见空泡形成,但未见明显瘢痕形成(图 1)。



镜下呈现大鼠脊髓受压表现,血管腔增大;高倍镜视野中可见神经元较正常体积减小,部分神经元丢失,形成空泡,白质疏松,胶质细胞增生,可见脱髓鞘

图 1 脊髓损伤镜下表现(HE×200)

Fig 1 Spinal cord injury under microscope(HE×200)

17 d MP 治疗后标本镜下已无明显液化坏死,可见损伤修复,瘢痕形成,所有实验组中均可见到不同程度的神经细胞数目减少,还可观察到小胶质细胞大量增生并包绕神经细胞的现象,瘢痕形成。17 d 对照组神经元密度明显降低,白质中出现髓鞘破坏,胶质细胞增生,大量空泡形成,呈海绵状,后柱病变较重(图 2)。

2.3 SEP 数据和数据分析图 图 3~5 表示了不同的 SEP 波形。每张图都可见 P 和 N 峰,图像上每个峰都有其潜伏时间及峰值。在实验中我们采用的对比方法主要是与基底值(0 值)作为对比,所以 P 值(正值)比 N 值(负值)更为重要。P 值正常的潜伏期

多在 9~12 ms,峰值在 5~20 μV 之间。当我们进行测量 SEP 时可以发现,需进行 1 000 次 4.1 Hz 方波刺激 0.1 ms 的迭加,通过在这段时间内潜伏时间和 P 峰的峰值的恢复测量情况,与正常时所测标准值作对比,最后以柱状图显示。由此在对照组进行比较。

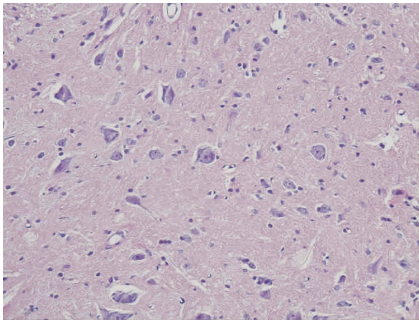


图 2 脊髓修复镜下表现(HE×200)

Fig 2 Spinal cord repair under microscope(HE×200)

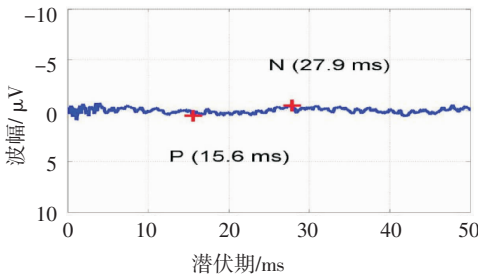


图 3 建模后 2 周(14 d)大鼠 SEP 波型

Fig 3 Rat SEP wave type 2 weeks (14 d) after modeling

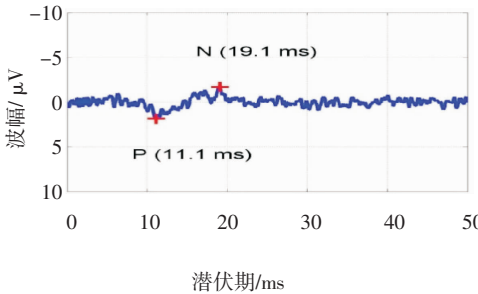


图 4 对照组观察第 3 天(17 d)大鼠 SEP 波型

Fig 4 Third day (17 d) rat SEP wave type of the control group

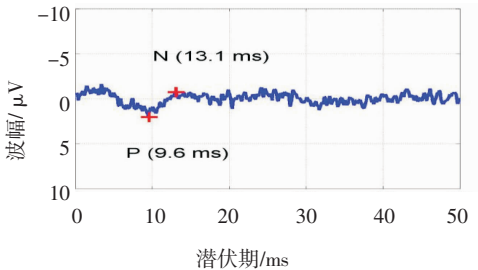


图 5 实验组第 3 天(17 d)大鼠 SEP 波型

Fig 5 Third day (17 d) rat SEP wave type of the experiment group

SEP 信号显示:各实验组中体感诱发电位均出现不同程度的潜伏期延长,同时可见信号波幅值普遍降低,术后 14 d 组相对应的 SEP 信号 P 波峰值最低,其与 N 波峰差值最小且潜伏期最短。所以本

实验选择术后 14 d 脊髓损伤最重时给药观察,随着 MP 治疗时间的延长,SEP 信号波幅逐渐增大,潜伏期逐渐缩短,接近至正常 SEP 信号曲线形态,但未能恢复正常(表 2)。

表 2 两组间 P 值和 P 波潜伏期对比 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of P value and P wave latency between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组间	15 d		16 d		17 d	
	P	P 波潜伏期	P	P 波潜伏期	P	P 波潜伏期
对照组	0.92±0.13	15.6±1.52	0.97±0.11	15.2±1.61	1.11±0.04	14.9±1.71
实验组	1.21±0.21	12.2±1.55	1.52±0.42	10.5±1.42	2.41±0.61	10.01±1.12

术后第 3 天给药实验组 P 波峰值和 P 波潜伏期情况对比有统计学意义($P<0.05$)

各组 P 波峰值的恢复情况见图 6, 术后第 3 天 MP 给药后实验组恢复的幅度明显高于对照组($P<0.05$)。此外,术后第 3 天给药实验组 P 波峰值的恢复情况与对照组第 3 天的数据具有统计学意义($P<0.05$)。术后治疗组第 1、2 天给药组及对照组的 P 波峰值的恢复情况无统计学意义($P>0.05$)。术后第 3 天给予 MP 具有最好的结果。表明在一定时间内,给予一定剂量的 MP,P 峰恢复更大波峰幅度,其波形接近于正常组。

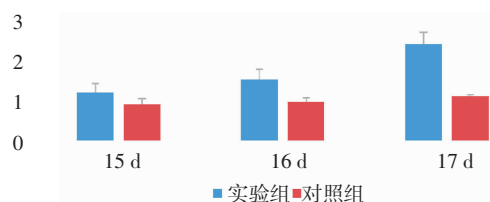


图 6 两组 P 波峰值的恢复情况

Fig 6 Recovery of P wave peak in two groups

两组 P 波潜伏期时间见图 7, 术后 3 d 后给药组潜伏期恢复的幅度明显高于对照组及建模后 14 d, 有明显的统计学差异($P<0.05$)。术后第 1、2 天给药组及对照组的 P 波潜伏期恢复的幅度无统计学意义($P>0.05$)。术后第 3 天给予 MP 具有最好的结果。表明在一定时间内,给予一定剂量的 MP,P 峰恢复更短的潜伏时间和更大波峰幅度,其波形接近于正常组。

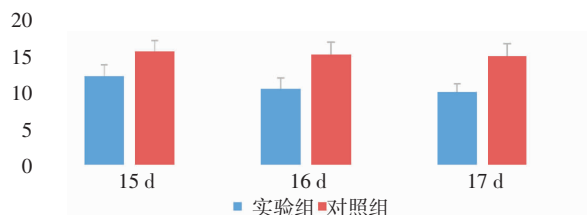


图 7 两组 P 波潜伏期时间

Fig 7 P wave latency in two groups

3 讨论

CCSCI 在临床上应用 MP 治疗是否有效一直存在争议,本研究旨在探讨 MP 对慢性脊髓损伤的临床作用及病理变化^[7-8],而建立一个理想的慢性脊髓压迫损伤模型成为该研究的关键。1911 年,Allen 首次采用重物坠击(weight-dropping, WD)法在实验动物上复制出急性脊髓损伤模型,为 ASCI 的临床研究做出巨大贡献。与此同时,通过相关实验研究证实在大鼠硬膜外放置压块对大鼠硬膜造成的压迫能较为理想地模拟出慢性脊髓损伤,已有专家学者证实了该慢性压迫性脊髓损伤模型中脊髓受压的病理学改变、影像学特点以及大鼠神经功能障碍的可靠性^[9-11],而在该类动物模型中,无论高分子压块在植入后 2 h 还是需要更长时间才能达到体积膨胀的最大值,均能建立一个理想的慢性脊髓压迫损伤模型。

结合造模后不同时间点 SEP 信号变化与病理学表现可知,在该慢性脊髓损伤模型中放置压块后脊髓组织损伤,出现出血、水肿等表现。损伤进行性加重,随后神经细胞发生损伤坏死,同时伴发脱髓鞘改变^[12]。术后 17 d(MP 治疗后第 3 天)大鼠的 BBB 行为学评分明显高于对照组的评分,并具有统计学差异;术后 17 d(MP 治疗后第 3 天)大鼠 HE 染色镜下显示:大鼠神经细胞损伤修复,瘢痕形成;术后 17 d(MP 治疗后第 3 天),与对照组相比 P 波峰值及 P 波潜伏期有明显的统计学差异($P<0.05$)。

本研究结果体现了行为学评分、病理学观察与 SEP 检测结果的一致性,提示经 MP 治疗后慢性脊髓损伤模型大鼠的神经功能明显恢复,MP 治疗大鼠的慢性脊髓损伤是有效的,且在治疗后第 3 天效果最为明显。在慢性脊髓损伤的临床治疗过程中,使用 MP 没有确切的哪个时间点应用效果最佳^[13]。本研究应用临床上监测脊髓电信号最为敏感的

(下转第 515 页)

治疗的一个关键靶点。

参考文献:

- [1] Favoriti P, Carbone G, Greco M, et al. Worldwide burden of colorectal cancer: a review[J]. *Updates Surg*, 2016,68(1):7
- [2] Costi R, Leonardi F, Zanoni D, et al. Palliative care and end-stage colorectal cancer management: the surgeon meets the oncologist[J]. *World J Gastroenterol*, 2014,20(24):7602
- [3] Son H, Moon A. Epithelial-mesenchymal transition and cell invasion[J]. *Toxicol Res*, 2010,26(4):245
- [4] Creighton C J, Gibbons D L, Kurie J M. The role of epithelial-mesenchymal transition programming in invasion and metastasis: a clinical perspective[J]. *Cancer Manag Res*, 2013,5:187
- [5] Lee K W, Yeo S Y, Sung C O, et al. Twist1 is a key regulator of cancer-associated fibroblasts[J]. *Cancer Res*, 2015,75(1):73
- [6] Zou H, Feng X, Cao J G. Twist in hepatocellular carcinoma: pathophysiology and therapeutics[J]. *Hepatol Int*, 2015,9(3):399
- [7] Vesuna F, Bergman Y, Raman V. Genomic pathways modulated by Twist in breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2017,17(1):52.
- [8] Zhuo X, Chang A, Huang C, et al. Expression of TWIST, an inducer of epithelial-mesenchymal transition, in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014,7(12):8862
- [9] Sun H X, Feng H, Song Y. Expression of Twist and relation with epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma[J]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2015,33(5):534
- [10] Chen T, You Y, Jiang H, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation and tumorigenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2017. [Epub ahead of print]
- [11] Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2001,77(3):201
- [12] Liu C Y, Lin H H, Tang M J, et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation[J]. *Oncotarget*, 2015,6(18):15966
- [13] Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence[J]. *Cancer Cell*, 2008,14(1):79
- [14] Gao Y, Xuan X Y, Zhang H Y, et al. Relationship between Twist expression and epithelial-mesenchymal transition of oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cell Biol Int*, 2012,36(6):571
- [15] Ru G Q, Wang H J, Xu W J, et al. Upregulation of Twist in gastric carcinoma associated with tumor invasion and poor prognosis [J]. *Pathol Oncol Res*, 2011,17(2):341

(2017-02-21 收稿)

(上接第 509 页)

SEP,监测 MP 治疗 CCSCI 后 SEP 图形的改变,并且有病理学切片加以论证,结果可以表明哪个时间点 MP 治疗更为有效,可以为临床治疗慢性脊髓损伤的 MP 的应用提供理论支持。

参考文献:

- [1] Nieuwenhuijse M J, Van Erkel A R, Dijkstra P D. Percutaneous vertebroplasty for subacute and chronic painful osteoporotic vertebral compression fractures can safely be undertaken in the first year after the onset of symptoms[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2012, 94(6):815
- [2] Tesla R, Wolf H P, Xu P, et al. Neuroprotective efficacy of aminopropyl carbazoles in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012,109(42):17016
- [3] Hu Y, Wen C Y, Li T H, et al. Somatosensory-evoked potentials as an indicator for the extent of ultrastructural damage of the spinal cord after chronic compressive injuries in a rat model[J]. *Clin Neurophysiol*, 2011, 122(7):1440
- [4] Hua R R, Li P, Yang J, et al. Evaluation of somatosensory evoked potential and pain rating index in a patient with spinal cord injury accepted cell therapy[J]. *Pain Physician*, 2016, 19: E659
- [5] Long H Q, Li G S, Lin E J, et al. Is the speed of chronic compression an important factor for chronic spinal cord injury rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2013,545:75
- [6] Morris S H, Howard J J, El-Hawary R. Comparison of motor-evoked potentials versus somatosensory-evoked potentials as early indicators of neural compromise in rat model of pinal cord compression[J]. *Spine*, 2017, 42(6): E326
- [7] Song C, Wang K, Yu Z Q, et al. Anterior decompression and internal fixation for lower cervical spine dislocation[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2016, 9(2):4143
- [8] Wang Y, Zhang Z, Li X, et al. Usefulness of time-frequency patterns of somatosensory evoked potentials in identification of the location of spinal cord injury[J]. *Clin Neurophysiol*, 2015, 32(4): 341
- [9] Thirumala P, Zhou J, Krishnan R, et al. Diagnostic accuracy of evoked potentials for functional impairment after contusive spinal cord injury in adult rats[J]. *J Clin Neuroscience*, 2016, 25: 122
- [10] Wang Y, Li G, Luk K D K, et al. Component analysis of somatosensory evoked potentials for identifying spinal cord injury location[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 2351
- [11] 杨建东, 贾连顺. 预防使用大剂量甲基强的松龙对大鼠急性脊髓损伤神经保护作用的实验研究[M]. 第二军医大学外科学(骨科): 2004: 115-115
- [12] Thirumala P D, Huang J, Thiagarajan K, et al. Diagnostic accuracy of combined multimodality somatosensory evoked potential and transcranial motor evoked potential intraoperative monitoring in patients with idiopathic scoliosis[J]. *Spine*, 2016, 41(19): E1177
- [13] 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

(2017-04-23 收稿)