

文章编号 1006-8147(2020)05-0482-05

论著

金属螺钉与聚氨酯橡胶慢性脊髓损伤大鼠模型的分析比较

杨世昌, 杨理, 张亮, 李文辉, 杨亚林, 孙伟粽, 王云国, 王凯

(天津医科大学第二医院骨科, 天津 300211)

摘要 目的:比较金属螺钉与聚氨酯橡胶压迫的慢性脊髓损伤(CSCI)大鼠模型的优劣,探索适合CSCI研究的大鼠模型。方法:108只雄性Sprague-Dawley大鼠完全随机分组为假手术组($n=36$)、金属螺钉组($n=36$)和聚氨酯橡胶组($n=36$),记录造模术前及术后2.5 h、7 d、14 d、21 d、28 d各组下肢行为学运动功能评分(BBB评分)和体感诱发电位(SEP),取C5段脊髓组织行苏木精-伊红染色法(HE)和原位末端标记法(TUNEL)染色。结果:BBB评分:金属螺钉组与聚氨酯橡胶组较假手术组均明显降低(金属螺钉组比假手术组, $t=9.671, P<0.0001$;聚氨酯橡胶组比假手术组, $t=4.997, P=0.0025$),且金属螺钉组评分低于聚氨酯橡胶组($t=2.705, P=0.0353$),金属螺钉组持续下降,聚氨酯橡胶组则于术后21 d降至最低后开始上升。SEP:金属螺钉组与聚氨酯橡胶组较假手术组均出现潜伏期延长(金属螺钉组比假手术组, $t=18.02, P<0.0001$;聚氨酯橡胶组比假手术组, $t=10.82, P<0.0001$)和波幅下降(金属螺钉组比假手术组, $t=145.5, P<0.0001$;聚氨酯橡胶组比假手术组, $t=3.97, P=0.0074$),且金属螺钉组潜伏期延长时间长于聚氨酯橡胶组,金属螺钉组波幅降低幅度先大于聚氨酯橡胶组,后较之略低。HE染色:金属螺钉组与聚氨酯橡胶组均出现脊髓损伤的病理表现,且金属螺钉组从腹侧到背侧渐进性加重,聚氨酯橡胶组则表现为一致性。TUNEL染色:金属螺钉组与聚氨酯橡胶组较假手术组TUNEL阳性细胞数明显增多(金属螺钉组比假手术组, $t=4.722, P=0.0032$;聚氨酯橡胶组比假手术组, $t=8.263, P=0.0002$),且主要集中于脊髓灰质前角。金属螺钉组在术后第7天阳性细胞数达到最高,之后明显减少,聚氨酯橡胶组在术后逐渐增加至术后21 d达到最高。结论:两种模型均有效地模拟了CSCI,金属螺钉CSCI模型适合损伤程度逐渐加重的CSCI研究,聚氨酯橡胶CSCI模型则适合压迫程度稳定的CSCI研究。

关键词 金属螺钉;聚氨酯橡胶;慢性脊髓损伤;大鼠模型

中图分类号 R744.2

文献标志码 A

Analysis and comparison of chronic spinal cord injury in rat model with metal screw and polyurethane rubber

YANG Shi-chang, YANG Li, ZHANG Liang, LI Wen-hui, YANG Ya-lin, SUN Wei-zong, WANG Yun-guo, WANG Kai

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

Abstract Objective: To explore the rat model suitable for chronic spinal cord injury(CSCI), and to compare the advantages and disadvantages of CSCI rat model with metal screw and polyurethane rubber compression. **Methods:** A total of 108 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group, metal screw group and polyurethane rubber group. The lower limb motor function scores (BBB scores) and the somatosensory evoked potency (SEP) were recorded at before and 2.5 hours, 7 days, 14 days, 21 days and 28 days after the operation. The HE staining and the TUNEL were used for C5 spinal cord. **Results:** BBB scores showed that compared with sham operation group, metal screw group and polyurethane rubber group were significantly lower (metal screw group vs. sham operation group $t=9.671, P<0.0001$; polyurethane rubber group vs. sham operation group $t=4.997, P=0.0025$), and the metal screw group score was lower than the polyurethane rubber group ($t=2.705, P=0.0353$). BBB score in the metal screw group continued to decrease, while the polyurethane rubber group score firstly decreased to the lowest 21 days after operation and then it began to rise. SEP indicated that compared with sham operation group, metal screw group and polyurethane rubber group showed prolonged latency (metal screw group vs. sham operation group $t=18.02, P<0.0001$; polyurethane rubber group vs. sham operation group $t=10.82, P<0.0001$) and decreased amplitude (metal screw group vs. sham operation group $t=145.5, P<0.0001$; polyurethane rubber group vs. sham operation group $t=3.97, P=0.0074$), and the latency period of the metal screw group was longer than that of polyurethane rubber group. The degree of amplitude reduction of the metal screw group was greater than that of polyurethane rubber group. HE staining showed that the pathological appearance of spinal cord injury was observed in metal screw group and polyurethane rubber group, and the metal screw group gradually increased from the ventral to the dorsal side, while the polyurethane rubber group showed consistency. TUNEL staining indicated that the number of TUNEL positive cells in metal screw group and polyurethane rubber group was significantly greater than that in the sham operated group (metal screw group vs. sham operation group $t=4.722, P=0.0032$; polyurethane rubber group vs. sham operation group $t=8.263, P=0.0002$), and was mainly concentrated in the anterior horn of gray matter. The number of TUNEL positive cells in the metal screw group reached the highest at 7 days after

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81702110)

作者简介 杨世昌(1995-),男,硕士在读,研究方向:脊髓损伤及其修复;通信作者:王凯, E-mail: wangkai48@126.com。

operation, and then decreased significantly, while the polyurethane rubber group reached the highest at 21 days after operation. **Conclusion:** Both models are effective in simulating CSCI. Furthermore, the CSCI model of metal screw is suitable for the CSCI research with gradually increasing degree of compression, while the CSCI model of polyurethane rubber is suitable for CSCI research with stable degree of compression.

Key words metal screws; polyurethane rubber; chronic spinal cord injury; rat model

慢性脊髓损伤(chronic spinal cord injury, CSCI)是一种持续存在的脊髓压迫损伤,临床表现为不同程度的神经功能障碍。它是导致患者截瘫和四肢瘫的主要原因之一,随着世界人口老龄化问题愈发凸显,CSCI发病人数逐年增多,给患者及其家庭和社会带来了沉重的负担^[1-3]。由于CSCI标本难以从临床获得,因此无法在临床中展开大样本CSCI的病理生理学研究。鉴于此,建立能够模拟人类CSCI的动物模型对于从整体水平、组织水平及细胞分子水平研究人类CSCI的病理生理过程、损伤机制以及有效治疗方法显得尤为重要和紧迫^[4-6]。本研究分别从螺钉拧入法和植入物法中选择了研究历史悠久的金属螺钉压迫和新近备受关注的聚氨酯橡胶压迫制作CSCI大鼠模型,通过比较二者的CSCI大鼠模型的优劣,探索适合CSCI研究的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 选取中国医学科学生物医学研究所购入的体重 250~300 g 的健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 108 只(动物批号:DWL1-20170626),依次编号,完全随机分为假手术组($n=36$)、金属螺钉压迫组($n=36$)和聚氨酯橡胶压迫组($n=36$)。大鼠饲养在饮食自由、光/暗周期为 12 h/12 h、背景噪音(30~50)db、室温 17~23℃、湿度 30%~70%条件下,并提供大鼠专用食料,保持清洁饮用水充足供应。

1.2 压迫材料 根据大鼠 C5 椎管长、宽、直径测量结果:金属螺钉组采用不锈钢材质的抽屉尾翼挂钩型压迫装置,螺丝直径 2.5 mm,螺距 0.5 mm,螺纹区域长 20 mm(图 1);聚氨酯橡胶压迫组使用体积为 1.2 mm×1.2 mm×2.0 mm,吸水后逐渐膨胀,于 14 d 可实现最大膨胀倍数 2.5 倍的高分子聚氨酯化合物(图 2,3)。

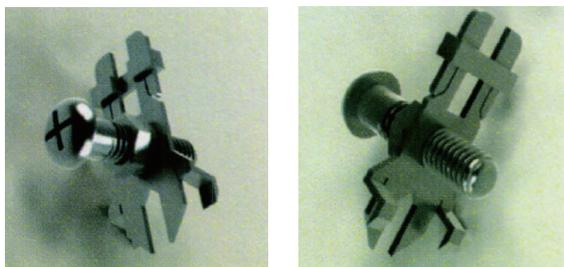


图 1 抽屉尾翼挂钩型压迫装置

Fig 1 Drawer-Hook type compression device



图 2 实验所用标准为 1.2 mm×1.2 mm×2.0 mm 的高分子聚氨酯化合物

Fig 2 The standard used in the experiment is 1.2 mm × 1.2 mm × 2.0 mm high polymer polyurethane compound

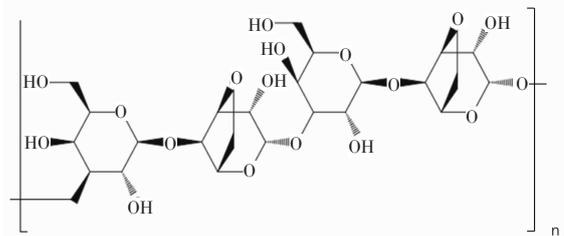


图 3 高分子聚氨酯化合物化学结构式

Fig 3 Chemical structural formula of polymer polyurethane compound

1.3 CSCI 模型制作 根据国家脊髓损伤统计中心的数据库,中颈段脊髓损伤(C3~C5)的患病率高于上颈段(C1~C2)和下颈段(C6~C8)脊髓损伤^[7]。此外,因为大鼠 C5 水平易于定位,国内外相关研究通常采用 C5 水平脊髓损伤模型^[7-11]。因此,本研究兼顾临床意义与国内外研究特点选择 C5 水平进行研究。

术前记录 3 组大鼠的下肢行为学运动功能评分(BBB 评分)^[12],按 $[0.3 \times (\text{体重}/100 \text{ g}) + 0.1]$ mL 抽取 10%水合氯醛腹腔内注射麻醉。将麻醉满意的大鼠于俯卧位保持躯干伸展固定在操作台上。备皮消毒后,无菌孔巾覆盖手术区,体表定位 T2 椎体棘突,沿大鼠脊柱正中自 T2 棘突向头端做一长约 3 cm 纵行切口,依次切开 C5~T2 节段背部皮肤、皮下组织及颈背部筋膜,钝性剥离椎旁肌肉,充分暴露 C5~T2 节段棘突及椎板。(1)假手术组:切除 C6 椎板后逐层关闭伤口,术后 1 周切口愈合列入假手术组。(2)金属螺钉组:切除 C6 椎板后安放抽屉尾翼挂钩型压迫装置,旋入锁定螺钉使钉头与椎板平齐,确认无急性脊髓损伤后,逐层关闭伤口,术后按

照 0.25 mm 半圈/7 d 速度拧入至颈椎 X 线片显示椎管侵占率达 50%(约 1.00 mm), 结束螺钉拧入后继续饲养 1 周切口愈合, 该组模型制作完成。(3) 聚氨酯橡胶组: 切除 C6 椎板后将 1.2 mm×1.2 mm×2.0 mm 标准制备的聚氨酯压块塞入 C5 椎板与硬膜之间, 逐层关闭伤口, 术后 1 周切口愈合, 该组模型制作完成。术后 2.5 h 复苏后行 BBB 评分, 若大鼠 BBB 评分较术前减少 3 分以上考虑急性脊髓损伤, 处死并补齐相应组, 术后单笼饲养, 饲养条件同前, 所有实验大鼠术后连续 5 d 腹腔内注射 3 万单位庆大霉素预防伤口感染, 记录术后并发症。

1.4 BBB 评分 记录造模术前及术后 2.5 h、7 d、14 d、21 d、28 d 各组的 BBB 评分, 由熟练掌握 BBB 评分并经过专业训练的 2 名实验人员分别观察并记录后取平均值。

1.5 SEP 信号测定 各组大鼠模型完成后的 7、14、21、28 d ($n=4$) 检测 SEP 信号, 麻醉同前, 连接好电极, 恒流刺激器持续发出频率为 5.1 Hz、周期为 0.2 ms 的方波持续刺激大鼠前肢正中神经, 刺激强度逐渐增大至大鼠运动阈值的 2 倍时, 可见前肢肌肉轻度抽搐, 通过信号放大器 (SCXI-1120, National Instruments Co., TX, USA) 将采集到的信号放大 10 万倍并应用频率介于 2~2 000 Hz 之间的带通滤波屏蔽其他波的干扰, 并记录 2~2 000 Hz 之间的波形, 通过数据采集卡 (DAQcard-1200, National Instruments Co., TX, USA) 收集所有 SEP 信号, 所收集信号均为 12 位分辨率和 5 000 Hz 的采样率, 为提高信号准确性, 每组实验将 500 个 SEP 信号叠加后获得最终结果。后期处理体感诱发电位波形, 计算潜伏期延迟及 P 波与 N 波之间的波峰差值。

1.6 病理学观察 麻醉同前, 仰卧位, 打开胸腔, 暴露心脏, 心脏快速灌注 200~250 mL PBS 溶液, 待右心耳流出无色清亮液后, 继续 200~300 mL 4% 多聚甲醛灌注, 直至大鼠躯体及四肢伸直僵硬, 表示标本固定完毕。灌注完毕后取 C5 脊髓节段, 置于 10% 中性福尔马林液中固定, 脱水后, 石蜡包埋, 4 μ m 切片。分别行 HE 和 TUNEL 染色。

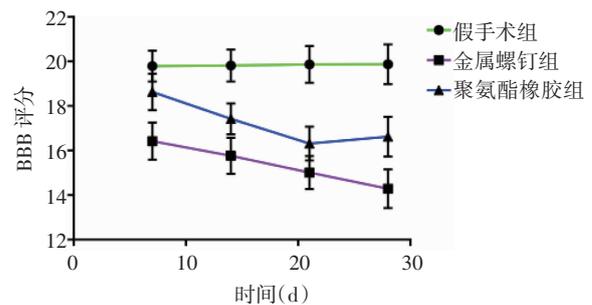
1.7 统计学处理 本实验中所有符合正态分布的计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多个样本均数的比较采用重复测量资料的方差分析进行统计学处理, 多个样本均数间的两两比较行两样本均数的 t 检验, 所有数据均由 SPSS22.0 统计软件分析处理, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 假手术组耗时 1 周, 无急性脊髓损

伤例数, 术后均成活; 金属螺钉组耗时 4 周, 术后出现急性脊髓损伤 3 例, 因伤口感染死亡 1 例, 造模成功率 88.89%; 聚氨酯橡胶组耗时 4 周, 术后出现急性脊髓损伤 2 例, 无死亡例数, 造模成功率 94.44%。

2.2 BBB 评分 造模术后各组大鼠 BBB 评分随时间变化见图 4。术后假手术组各时间点评分差异无统计学意义 ($P>0.05$), 同时间金属螺钉组与聚氨酯橡胶组较假手术组评分显著降低 (金属螺钉组比假手术组 $t=9.671, P<0.000 1$; 聚氨酯橡胶组比假手术组 $t=4.997, P=0.002 5$), 且金属螺钉组评分低于聚氨酯橡胶组 ($t=2.705, P=0.035 3$), 金属螺钉组评分随术后时间的推移持续降低, 聚氨酯橡胶组在术后 21 d 降到最低后开始上升。

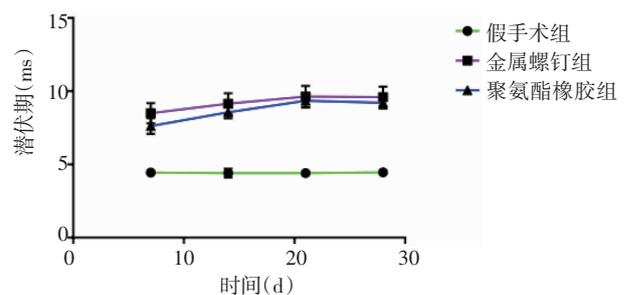


注: BBB 评分: 下肢行为学运动功能评分

图 4 造模术后各组大鼠 BBB 评分与时间的关系

Fig 4 The relationship between BBB scores and time in each group after modeling

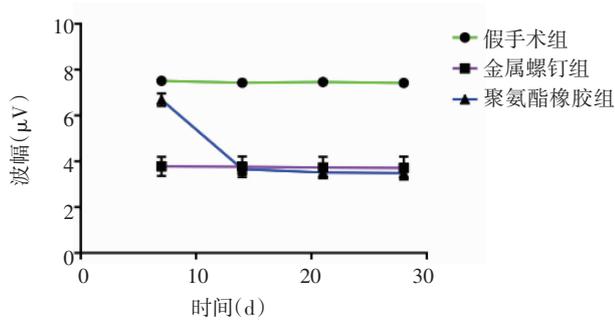
2.3 体感诱发电位 (SEP) 造模术后各组大鼠 SEP 检测的潜伏期 (图 5) 和波幅 (图 6) 随时间变化的结果表明, 与假手术组各时间相比, 金属螺钉组和聚氨酯橡胶组的潜伏期明显延长 (金属螺钉组比假手术组 $t=18.02, P<0.000 1$; 聚氨酯橡胶组比假手术组 $t=10.82, P<0.000 1$), 波幅显著降低 (金属螺钉组比假手术组 $t=145.5, P<0.000 1$; 聚氨酯橡胶组比假手术组 $t=3.97, P=0.007 4$), 且金属螺钉组潜伏期延长时间长于聚氨酯橡胶组, 金属螺钉组波幅降低幅度先大于聚氨酯橡胶组, 后较之略低。



注: SEP: 体感诱发电位

图 5 造模术后各组大鼠 SEP 潜伏期与时间的关系

Fig 5 The relationship between SEP incubation period and time of rats in each group after modeling



注:SEP:体感诱发电位

图 6 造模术后各组大鼠 SEP 波幅随时间变化的关系

Fig 6 Changes of SEP amplitude with time in rats of each group after modeling operation

2.4 HE 染色 造模术后各组大鼠脊髓组织 HE 染色情况见图 7。与假手术组相比,金属螺钉组与聚氨酯橡胶组均可观察到脊髓灰质水肿,神经细胞数目减少伴空泡样改变,胶质细胞大量增生并包绕神经细胞,形成瘢痕。金属螺钉组的上述病理学改变随着术后时间递增由脊髓的腹侧向背侧(压迫侧)渐进性加重,聚氨酯橡胶组同时间点损伤表现为一致性。

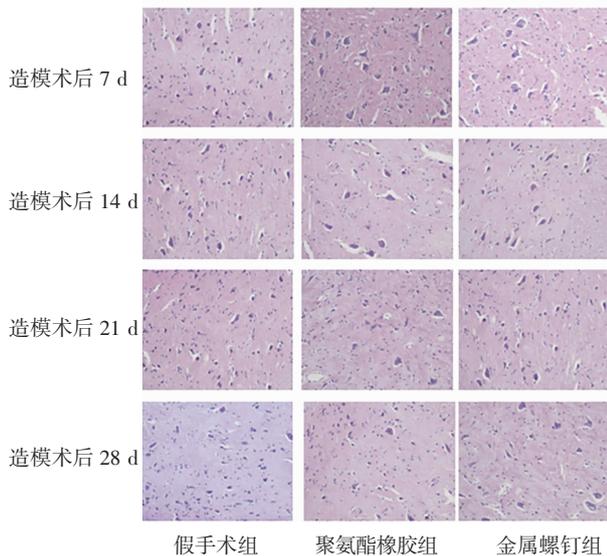


图 7 造模术后各组大鼠脊髓组织 HE 染色(200×)

Fig 7 HE staining of rat spinal cord tissue after modeling(200×)

2.5 TUNEL 结果 造模术后各组大鼠 TUNEL 阳性细胞数目随时间变化关系见图 8。金属螺钉组与聚氨酯橡胶组较假手术组 TUNEL 阳性细胞数目明显增多(金属螺钉组比假手术组 $t=4.722, P=0.003 2$; 聚氨酯橡胶组比假手术组 $t=8.263, P=0.000 2$), 且主要集中于脊髓灰质前角。金属螺钉组在术后第 7 天 TUNEL 阳性细胞达到最高,之后明显减少,聚氨酯橡胶组在术后逐渐增加至术后 21 d 达到最高。

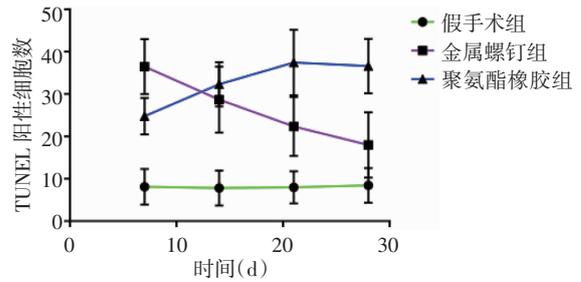


图 8 造模术后各组大鼠脊髓灰质前角 TUNEL 阳性细胞数目随时间变化关系

Fig 8 The number of TUNEL positive cells in the anterior horn of spinal cord gray matter changed with time after modeling

3 讨论

CSCI 发病机制复杂,为了更好的研究 CSCI 的发病机制、病理生理过程及其治疗方法,模拟人类 CSCI 的动物模型必不可少^[13]。最理想的动物为灵长类动物,因其系统功能、组织结构、生理特性等与人类极为相似,但该类动物属于稀有物种,价格昂贵,不但受国家相关法律法规的保护,而且需要特殊饲养,因此不能满足大量临床研究的要求。狗、羊、牛等动物同样因进化程度、社会、经济等原因并不适用于临床大样本模拟研究。而大鼠因良好的临床相关性、抗感染能力强、同源性好、生长周期短、经济负担小等诸多优点,多用于当前 CSCI 的大样本实验研究。

理想的 CSCI 大鼠模型应尽量复制人类 CSCI 发生及进展的完整过程,即脊髓能够受到一定程度的外力压迫,而且该压迫是持续、渐进性的。因此,构建理想的 CSCI 大鼠模型应尽量满足以下条件:(1)操作简单,即所用设备要求不高,能快速大批制作,死亡率低,并发症少,同时这种方法具有广泛的适用性,能够不受动物体形、大小等因素的影响。(2)可控制性较好,即脊髓所受压迫的程度、时间等可自由控制,且压迫力能尽量符合线性改变的特点。(3)可移植性好,即在同一实验中能使用相同的方法使脊髓在不同部位受压迫,使得在脊髓某节段造模困难的情况下,可更改压迫部位。(4)临床相似度高,能尽可能完整模拟人类 CSCI 特性,且在尽量不破坏脊柱生理结构的条件下造成椎管相对狭窄。

对于 CSCI 大鼠模型的制备,方法各异,主要有撞击损伤模型、横断损伤模型、缺血损伤模型、钳夹损伤模型等^[14]。螺钉拧入法由 Hukuda 等于 1972 年首次用于犬 CSCI 模型制作,后因 Kanhiku 等发现该压迫是一种初期速度偏快、后期速度偏慢的非线性压迫,且会造成脊髓神经纤维传导损害而废弃。1993 年,al-Mefty 等采用改良材质的特氟隆螺钉造

模犬 CSCI 并被 Kanhiku 等于新西兰兔复制。Lee、Xu 等采用自制金属慢性压迫装置在大鼠造模成功。2004 年, Kim 等在大鼠的 C5~C6 椎板间放置聚氨酯橡胶块, 逐渐膨胀的橡胶块对脊髓产生了进行性的慢性压迫, 成功建立了 CSCI 大鼠模型, 其操作简单, 易于模拟脊髓慢性压迫, 但不易控制压迫进程。通过上述实例、文献检索以及前期充分验证, 笔者分别从螺钉拧入法和植入物法中选择了研究历史悠久的金属螺钉压迫和新近备受关注的聚氨酯橡胶压迫制作 CSCI 大鼠模型。

本研究成功复制了金属螺钉压迫与聚氨酯橡胶压迫模型, 并对二者进行了行为学与病理学方面的研究和对比。金属螺钉组和聚氨酯橡胶组大鼠的 BBB 评分均较假手术组明显降低, 且金属压迫组下肢行为运动功能的恢复情况不佳, 其 BBB 评分持续下降, 聚氨酯橡胶组的恢复情况优于金属压迫组。金属螺钉组和聚氨酯橡胶组 SEP 信号与假手术组相比均出现潜伏期延长和波幅下降, 且金属螺钉组神经功能恢复略差。从 HE 染色上看, 两压迫组均出现脊髓损伤的病理性表现, 金属螺钉组的脊髓损伤区域从腹侧到背侧(压迫侧)渐进性加重, 聚氨酯橡胶组脊髓整体均有压迫, 较为符合临床实际病理特征。两压迫组较假手术组 TUNEL 阳性细胞数目明显增多, 且聚氨酯橡胶组与金属螺钉组相比, 其凋亡细胞存在时间更长, 数目更多, 脊髓压迫更为稳定持久。

综上, 金属螺钉压迫与聚氨酯橡胶压迫的 CSCI 大鼠模型均有效地实现了对 CSCI 的模拟。金属螺钉 CSCI 模型虽然制模步骤复杂, 周期长, 但压迫程度可调, 因此适合损伤程度逐渐加重的 CSCI 研究。聚氨酯橡胶 CSCI 模型虽然压迫程度不可控, 但制模过程简便, 周期短, 成功率高, 因而适用于压迫程度稳定的 CSCI 研究。

参考文献:

- [1] Hutson T H, Di Giovanni S. The translational landscape in spinal cord injury: focus on neuroplasticity and regeneration[J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(12): 732
- [2] Pruss H, Tedeschi A, Thiriot A, et al. Spinal cord injury-induced immunodeficiency is mediated by a sympathetic-neuroendocrine-adrenal reflex[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(11): 1549
- [3] Torres-Espin A, Forero J, Fenrich K K, et al. Eliciting inflammation enables successful rehabilitative training in chronic spinal cord injury[J]. *Brain*, 2018, 141(7): 1946
- [4] Wang X J, Peng C H, Zhang S, et al. Polysialic-acid-based micelles promote neural regeneration in spinal cord injury therapy[J]. *Nano Lett*, 2019, 19(2): 829
- [5] O'Shea T M, Burda J E, Sofroniew M V. Cell biology of spinal cord injury and repair[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(9): 3259
- [6] Dias D O, Kim H, Holl D, et al. Reducing pericyte-derived scarring promotes recovery after spinal cord injury[J]. *Cell*, 2018, 173(1): 153
- [7] Wu M J, Vinit S, Chen C L, et al. 5-HT7 receptor inhibition transiently improves respiratory function following daily acute intermittent hypercapnic-hypoxia in rats with chronic midcervical spinal cord contusion[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2020, 34(4): 333
- [8] Burnside E R, De Winter F, Didangelos A, et al. Immune-evasive gene switch enables regulated delivery of chondroitinase after spinal cord injury[J]. *Brain*, 2018, 141(8): 2362
- [9] Hollis E R, 2nd, Ishiko N, Yu T, et al. Ryk controls remapping of motor cortex during functional recovery after spinal cord injury[J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(5): 697
- [10] 谭波涛, 刘捷, 虞乐华, 等. 成年小鼠颈 5 脊髓钳夹损伤模型的制备与评价[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29(2): 164
- [11] 黄志平, 林俊育, 刘俊豪, 等. 小鼠颈脊髓半侧挫伤模型的建立及其组织学特点[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2019, 37(1): 40
- [12] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1
- [13] 李敏, 杨孝, 向武, 等. 大鼠脊髓损伤动物模型建立的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(72): 111
- [14] 李晓彬, 刘涛, 周俊锋, 等. 实验性大鼠脊髓损伤模型的制备及研究进展[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2016, 19(23): 78

(2020-02-27 收稿)

欢迎广大作者踊跃投稿