

· 基础研究 ·

光化学法诱导猫不完全脊髓损伤动物模型的建立

王熠钊 徐江 许涛 方征宇 徐琦 黄晓琳

【摘要】 目的 观察光化学法诱导猫脊髓损伤后的神经行为学、运动诱发电位及形态学改变,为研究脊髓损伤后神经再生与功能重建建立动物模型。方法 将 15 只猫根据冷光源照射时间不同随机分为 40 min 组、60 min 组和 80 min 组。手术暴露脊髓后,用 35 mg/kg 体重的玫瑰红静脉注射,联合应用强度为 3000 klx 的冷光源照射 T₁₃ 脊髓节段。术后 21 d 内连续观察动物神经行为学改变;于术后第 21 天检测动物的运动诱发电位,并与术前结果比较;取材观察动物脊髓组织形态学改变。结果 3 组动物在手术后 21 d 内的神经行为学评分结果显示,损伤后动物下肢功能神经行为学评分降低,损伤程度与光照时间成正比。60 min 组和 80 min 组动物损伤后运动诱发电位波形消失。3 组动物的脊髓都有明显的缺血性坏死改变。结论 光化学法可诱导猫脊髓内产生微血栓,从而使组织发生缺血性坏死。冷光源照射 60 min、80 min 的动物双下肢运动功能明显受损,与其病理学改变和电生理学改变相符,用这种方法制作不完全脊髓损伤模型稳定可靠。

【关键词】 光化学; 脊髓损伤; 猫

Photochemically induced incomplete spinal cord injury in cat WANG Yi-zhao*, XU Jiang, XU Tao, FANG Zheng-yu, XU Qi, HUANG Xiao-lin. *Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
Corresponding author: HUANG Xiao-lin, Email: xiaolin2006@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the potential of creating a cat model of spinal cord infarction initiated by a photochemical reaction in terms of the neuroethology, motor evoked potential, and morphological outcomes. **Methods** Fifteen cats were divided into three groups at random. T₁₃ in the spinal cord was photochemically irradiated for 40 min, 60 min or 80 min in different groups. A photochemically-induced infarction was produced by intravenous injection of rose Bengal (35 mg/kg) combined with immediate cold light irradiation (3000 klx) of the spinal cord. Neuroethology changes were observed every day after the surgery for 21 days, and morphological changes were examined at day 21, before which the motor evoked potential was examined and compared with measurements taken before injury. **Results** The spinal cord infarctions induced by intravenous injection of rose Bengal plus cold light irradiation for 40 min were stable by day 8, while the other two groups were stable by day 12. The size of the infarction area in the spinal cord was stable, while the neuroethology, electrophysiological and histopathological changes in the cats were significant. **Conclusions** All of the cats demonstrated decreased functional mobility after photochemically induced thrombosis of the spinal cord, with corresponding pathomorphological and electrophysiologic changes. The model of infarction was stable and reliable.

【Key words】 Photochemistry; Spinal cord injury; Cat

建立合适的脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)动物模型是研究 SCI 机制及治疗的基础。1911 年,Allen 首次用重物打击法复制出不完全性 SCI 模型;之后,人们又应用不同方法研制了多种 SCI 动物模

型。光化学法利用光敏材料与光接触后发生光化学反应,光化学反应物可使血管内皮细胞水肿、损伤,同时使血小板活化聚集,与纤维蛋白共同导致血栓形成,从而使局部组织发生缺血性坏死。光化学法最早由 Watson 等^[1-2]于 1985 年用于大鼠脑梗死动物模型的建立,之后,Prado 等^[3]和 Watson 等^[4]又将光化学法用于不同程度 SCI 模型的建立。但目前光化学法诱导 SCI 的动物种类主要集中在大鼠和小鼠等小动物,在大体型动物中的应用不多。因此,我们选择 SCI 实验中较为常用的猫,拟建立符合实验需求的 SCI 模型。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.03.001

基金项目:国家自然科学基金(60874035,30801220)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(王熠钊、徐江、许涛、方征宇、黄晓琳);华中科技大学控制科学与工程系(徐琦)

通信作者:黄晓琳,Email: xiaolin2006@yahoo.com.cn

材料与方法

一、实验动物及分组

健康成年家猫 15 只,雌雄不限,体重 2~4 kg,由武汉市青山畜牧业公司提供,自然光照,标准独笼喂养。根据光照时间不同,将 15 只猫随机分为 40 min 组、60 min 组和 80 min 组,每组 5 只。

二、主要试剂及仪器

主要实验试剂包括氯胺酮、地西洋、玫瑰红($C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$,分子量 1017.64,中国华东师范大学化工厂生产)、小鼠抗大鼠微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2,MAP2)单抗、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)多抗、即用型 SABC 试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司),其它均为市售分析纯产品。主要实验仪器包括德国 Schott 冷光源(光源口径 3.5 mm,卤钨灯,波长范围 340~1100 nm),美国 Cadwell Sierra Wave™ 肌电图仪,丹麦 Dantec 磁刺激仪(线圈直径 9 cm,最大刺激强度 1.9 T),HMIAS-2000 型全自动医学彩色图像分析系统由同济医学院提供。

三、模型制造方法

用氯胺酮(50 mg/kg 体重)复合地西洋(0.2 mg/kg 体重)将猫腹腔注射麻醉后,俯卧位固定于操作台上,背部正中及双下肢内侧备皮;定位 T_{13} 椎体后作背部正中切口,分层剥离筋膜及肌肉,充分暴露 T_{13} 及 L_1 ;用牙科钳将 L_1 棘突咬除,以显露 T_{13} 及 L_1 连接部分,充分止血;将上下两椎体用止血钳提起,使脊柱形成屈曲体位,充分暴露两椎体的椎间隙;用纹式钳将两椎体间的软组织去除,可直接通过间隙看到脊髓及其表面的硬脊膜;动物保持屈曲体位,使椎间隙持续开放;下肢股内侧静脉注射浓度为 1% 的玫瑰红溶液(35 mg/kg 体重),2 min 内注射完;之后立即将冷光源探头垂直紧贴于暴露的椎间隙予冷光源照射,光照强度为 3000 klx,参照杨渊等^[5]的报道,各组采用照射时间分别为 40 min、60 min 和 80 min;照射完后逐层缝合组织,正常喂养,给予膀胱按摩排尿,每天 2 次。

四、神经行为学评分方法

术后 21 d 内每天进行神经行为学评分。采用改良的 Tarlov 评分^[6]:动物后肢完全瘫痪,不能做任何运动计 0 分,如有轻微的运动计 0.7 分;存在髋关节或膝关节的非反射性运动计 1 分,如有髋关节或膝关节运动,但没有踝关节运动计 1.3 分,如踝关节出现可能的协同运动计 1.7 分;有肢体三个主要关节的运动计 2 分,如试图支撑身体计 2.3 分,如只能在站立时支撑身体计 2.7 分;能够行走,但步态不协调计 3 分,如间或

有协调步态计 3.3 分,如缺乏踝关节或足部的控制,用指节或足部表面中部行走计 3.7 分;有协调步态计 4 分,如后肢的支撑姿势有进步,腹部不贴向地面,基本没有足趾拖行计 4.3 分;正常的步态和身体支撑,在快速转身时能保持平衡,没有足趾的拖行计 5 分。

五、电生理学检测方法

皮质运动诱发电位(motor evoked potential,MEP)检测采用经颅磁刺激法^[7]。刺激线圈内圈置于一侧大脑运动皮质上,刺激强度为 75% 最大刺激强度。记录电极为同心圆针电极,检测对侧下肢胫前肌肌腹的肌电信号。地极以针电极置于动物背部皮下。

六、标本制备及形态学观察

术后第 21 天麻醉动物,开胸经左心室行主动脉插管,用 37 °C 生理盐水 500 ml 行快速左心室灌注冲洗,取损伤节段脊髓约 2 cm,用 4% 多聚甲醛后固定 4 h,制作石蜡切片(以损伤灶为中心纵切,片厚 5 μ m),一部分标本行 HE 染色,另一部分行免疫组织化学染色,观察 MAP2 及 GFAP 的表达。免疫组织化学染色时以远离 SCI 部位 10 cm 处脊髓作为正常对照。组织化学标本脱蜡至水,用 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶 10 min;于枸橼酸缓冲液中进行抗原热修复后,滴加 5% BSA 抗原封闭液作用 20 min;滴加一抗,置于 4 °C 环境下孵育过夜;滴加生物素化二抗,37 °C 温箱中孵育 20 min;加入 ABC(1:100)在 25 °C 环境下孵育 2 h;滴加新鲜配制的 DAB- H_2O_2 显色液,室温下显色 10~15 min。将切片脱水、透明、封片,置于显微镜下观察。

七、统计学分析

计量资料数据用($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 13.0 版软件包进行分析。神经行为学评分采用重复测量资料的方差分析;MEP 潜伏期、细胞计数、病理学灰度值比较采用单向方差分析,方差齐时采用 q 检验进行组间比较,方差不齐时采用 Dunnett T3 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、神经行为学评分

3 组动物连续 21 d 的 Tarlov 评分发现,动物术前的评分均为 5 分;损伤后第 1 天,3 组动物评分均降低,但 40 min 组评分高于其它组,差异有统计学意义($P < 0.05$);60 min 组与 80 min 组之间评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。术后随着时间推移,3 组动物的 Tarlov 评分有所恢复,其中 40 min 组评分约于第 8 天稳定,第 8 天与第 21 天之间评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);60 min 组与 80 min 组的评分约于第 12 天稳定,第 12 天与第 21 天之间评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

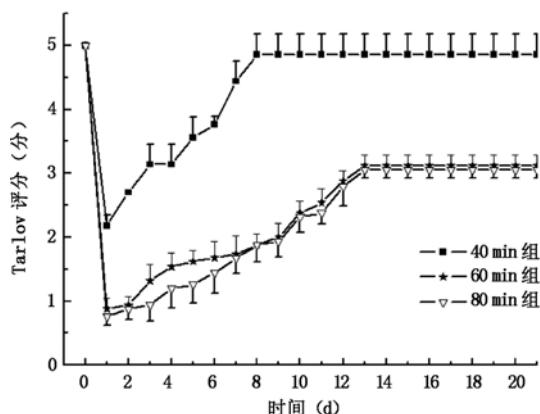


图 1 各组动物损伤前、后 Tarlov 评分比较

二、电生理学检测

损伤前所测 3 组动物 MEP 潜伏期比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 40 min 组损伤后 MEP 潜伏期与损伤前相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 60 min 组与 80 min 组损伤后 MEP 测不出。MEP 波形和数据见图 2 和表 1。

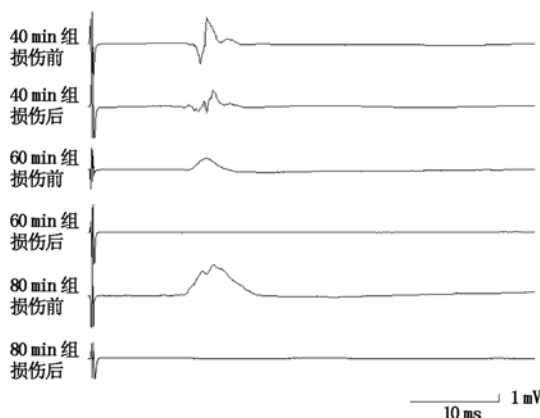


图 2 各组动物损伤前、后 MEP 波形比较

表 1 各组动物损伤前、后 MEP 潜伏期比较 (ms, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	损伤前	损伤后
40 min	5	10.60 ± 0.27	10.94 ± 0.71 ^a
60 min	5	10.62 ± 0.54	-
80 min	5	10.88 ± 0.54	-

注: 与损伤前相比, ^a $P > 0.05$

三、SCI 程度的组织病理学检测

GFAP 染色阳性及 MAP2 染色阳性以细胞及其突起部位呈棕褐色为主要特征。术后第 21 天, 3 组动物空洞边缘 GFAP 灰度值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 取远离 SCI 部位 10 cm 处脊髓作为正常对照, 3 组动物空洞边缘 GFAP 表达均有增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。术后第 21 天, 3 组动物空洞边缘 MAP2 阳性细胞计数比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 取远离 SCI 部位 10 cm 处脊髓作为正常对照,

差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3 ~ 5。

关于 SCI 的程度, 通过 HE 染色后对 3 组动物标本的观察可以发现, 照射区域神经组织缺损形成空洞, 40 min 组的 SCI 空洞最浅, 到达脊髓灰质前角, 但尚未涉及脊髓前索白质; 60 min 组和 80 min 组的 SCI 空洞均穿透脊髓灰质, 最深到达脊髓前索白质, 但尚未穿透白质, 见图 5i 和 j。

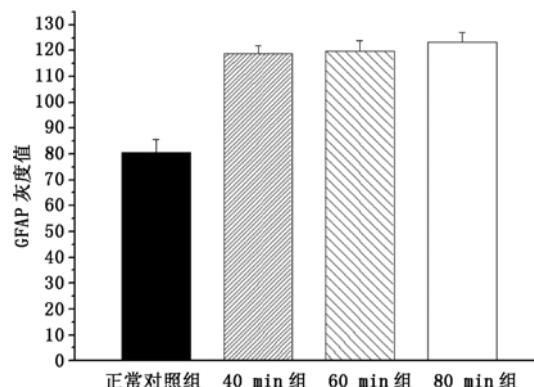


图 3 术后第 21 天 3 组动物空洞边缘与正常对照 GFAP 灰度值比较

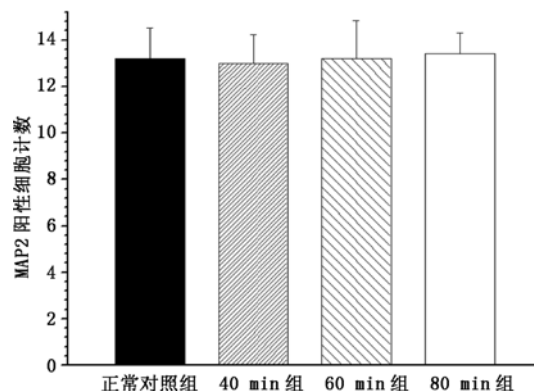
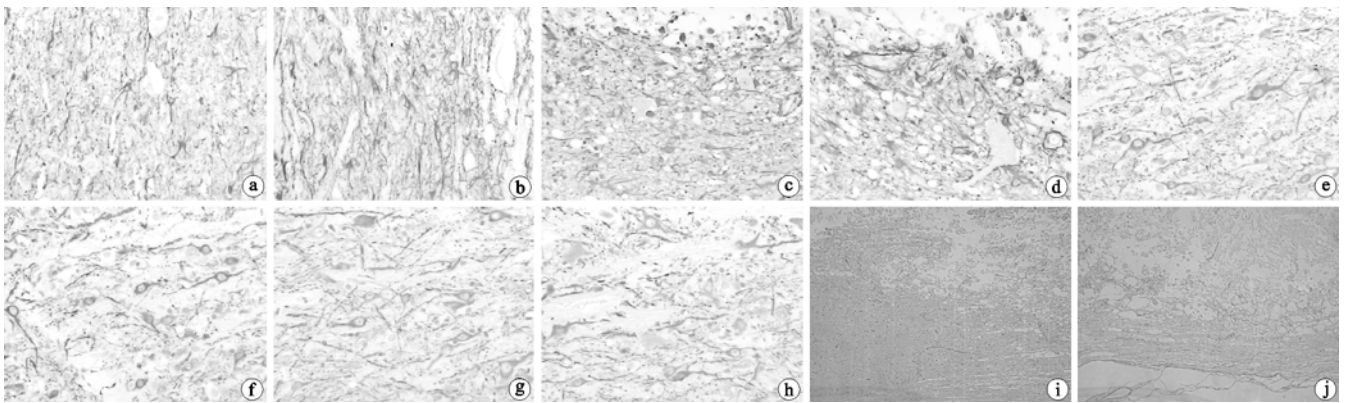


图 4 术后第 21 天空洞边缘 MAP2 阳性细胞计数比较

讨 论

目前, 应用较为广泛的 SCI 造模方法有重物打击法、静压法、脊髓横切以及脊髓半切法, 这几种方法都有其自身的特点。与这些造模方法相比, 光化学法具有较好的可重复性, 对动物的创伤小, 操作的复杂程度亦较低, 通过对动物模型的行为学评定、神经电生理检查等, 可以对动物模型 SCI 程度进行量化控制。

GFAP 特异性地表达于正常星形胶质细胞和反应性星形胶质细胞中, 可用于标记损伤后组织的胶质反应, 其表达水平的高低可间接地反映星形胶质细胞增生、肥大、坏死等情况。中枢神经系统损伤后, 可促使星形胶质细胞增生、肥大和迁徙, 形成反应性星形细胞胶质化^[8]。MAP2 是一种细胞骨架蛋白, 主要表达于



a. 正常对照脊髓 GFAP 的表达 (DAB 染色, $\times 200$); b. 40 min 组损伤空洞旁 GFAP 的表达 (DAB 染色, $\times 200$); c. 60 min 组损伤空洞旁 GFAP 的表达 (DAB 染色, $\times 200$); d. 80 min 组损伤空洞旁 GFAP 的表达 (DAB 染色, $\times 200$); e. 正常对照脊髓 MAP2 的表达 (DAB 染色, $\times 200$); f. 40 min 组损伤空洞旁 MAP2 的表达 (DAB 染色, $\times 200$); g. 60 min 组损伤空洞旁 MAP2 的表达 (DAB 染色, $\times 200$); h. 80 min 组损伤空洞旁 MAP2 的表达 (DAB 染色, $\times 200$); i. 40 min 组损伤空洞深度达脊髓灰质 (HE 染色, $\times 100$); j. 60 min 组损伤空洞深度达脊髓前索白质 (HE 染色, $\times 100$)

图 5 损伤部位脊髓的形态学表现

神经元胞体和树突,是微管的构成成分,具有稳定细胞骨架结构的作用,因此可用 MAP2 来标记神经元^[9]。MEP 能够反映机体运动通路的状态和完整性。通过对下肢 MEP 的检测,可以评估机体下肢运动通路的完整性。SCI 后,传导通路受损会反映为 MEP 潜伏期的延长甚至波形的消失^[7]。

本研究形态学观察结果发现,40 min 组 SCI 程度较 60 min 组和 80 min 组轻,这与其神经行为学评分和电生理检测结果相一致。40 min 组动物的 SCI 深及脊髓灰质前角,但尚未达前索白质;动物术后的神经行为学评分提示为较轻的不完全性 SCI;MEP 检测结果亦提示位于前索的皮质脊髓束未明显受损,其潜伏期与术前比较,差异无统计学意义。60 min 组与 80 min 组动物的 SCI 已穿透脊髓灰质,到达前索白质,但尚未穿透所有白质;2 组动物术后的神经行为学评分表现为较重的不完全性 SCI;MEP 检测未测出波形,提示前索内皮质脊髓束已有损伤。我们的 MEP 检测结果与 Prado 等^[3]的研究相一致,他们亦发现光照时间较长组的电生理检测结果较光照时间较短组差。本研究中 60 min 组与 80 min 组术后 MEP 均测不出,且神经行为学评分与 SCI 的深度组间比较,差异无统计学意义。我们分析可能是因为猫脊髓的前后径较大鼠等啮齿类动物大,而我们所采用的冷光源为卤素灯,光源能量强度尚无法穿透脊髓,故光照 60 min 时已达冷光源的最大作用深度。

Bunge 等^[10]的研究发现,光化学反应损伤脊髓急性期内,产生的血栓可使周围区域发生坏死,形成所谓的“损伤性空洞”。本研究中,3 组动物都形成了损伤性空洞,空洞边缘的 GFAP 灰度值较正常脊髓组织高,提示空洞边缘 GFAP 表达增强,可能为 SCI 后星形胶质

细胞反应性增生、肥大的结果。Von 等^[11]的研究亦发现,光化学法诱导大鼠 SCI 后第 3 周,GFAP 免疫组织化学检测结果提示,损伤空洞附近有持续的神经胶质细胞增生,与本研究结果一致。我们通过对空洞边缘 MAP2 阳性细胞计数进行比较,发现 3 组动物空洞边缘的神经元计数与正常脊髓组织相比,差异无统计学意义;3 组动物空洞边缘的 GFAP 灰度值比较,差异亦无统计学意义。这提示光化学损伤所引起的病理反应在 3 组动物是没有差异的,损伤程度的不同主要是由所形成的 SCI 性空洞的深度所决定。而损伤性空洞的深度,即脊髓病理改变的严重程度,与光照时间成正比。本研究发现,40 min 组所形成的损伤性空洞的深度较其它组浅,这与 Watson 等^[3]用光化学法诱导大鼠 SCI 的情况一致。

光化学法诱导 SCI 是一个渐进的病理过程。Cameron 等^[12]观察了光化学法诱导大鼠 SCI 后 28 d 的情况,病理学检测显示空洞的体积在损伤后第 7 天可达到最大。本研究中亦发现光化学法诱导猫 SCI 后,动物的下肢功能急剧下降,但在术后逐渐恢复,8~12 周逐渐稳定。我们分析一方面可能是造模术后动物出现一定程度的脊髓性休克,随着时间的推移,脊髓性休克逐渐恢复;另一方面,光化学法诱导猫脊髓内产生微血栓,使组织产生的缺血性坏死空洞也逐渐形成。两方面共同作用下,40 min 组术后第 8 天神神经行为学评分结果趋于稳定,60 min 与 80 min 组神经行为学评分于术后第 12 天稳定。后者所需时间较长可能是因其损伤空洞较大所致。

综上所述,光化学法可诱导猫脊髓内产生缺血性坏死空洞,空洞深度与光照时间长短相关,有与其相符的神经行为学评分和电生理学检测结果。其中 40 min

组的损伤到达脊髓灰质,SCI 程度较轻;而 60 min 与 80 min 组的损伤深度到达脊髓前索白质,不完全性 SCI 的程度较重,更符合下肢功能研究的需求。60 min 组与 80 min 组的损伤程度比较,差异无统计学意义,可能与本研究所采用的冷光源在 60 min 时已达到其作用深度极限所致。因此,我们认为采用 35 mg/kg 体重的玫瑰红静脉注射,联合强度为 3000 klx 的冷光源照射 T₁₃ 脊髓节段 60 min,可获得符合下肢功能研究需求的猫不完全性 SCI 动物模型。

参 考 文 献

- [1] Watson BD, Dietrich WD, Busto R, et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*, 1985, 17:497-504.
- [2] Dorffler-Melly J, Schwarte LA, Ince C, et al. Mouse models of focal arterial and venous thrombosis. *Basic Res Cardiol*, 2000, 95:503-509.
- [3] Prado R, Dietrich WD, Watson BD, et al. Photochemically induced graded spinal cord infarction. Behavioral, electrophysiological, and morphological correlates. *J Neurosurg*, 1987, 67:745-753.
- [4] Watson BD, Prado R, Dietrich WD, et al. Photochemically induced spinal cord injury in the rat. *Brain Res*, 1986, 367:296-300.
- [5] 杨渊,郭瑞友,张苏明,等.光化学诱导老年大鼠局灶性脑梗塞模型的研究. *中国老年学杂志*, 2001, 21:35-38.
- [6] Crowe MJ, Sun ZP, Battocletti JH, et al. Exposure to pulsed magnetic fields enhances motor recovery in cats after spinal cord injury. *Spine*, 2003, 28:2660-2666.
- [7] Luft AR, Kaelin-Lang A, Hauser TK, et al. Transcranial magnetic stimulation in the rat. *Exp Brain Res*, 2001, 140:112-121.
- [8] Eng LF, Ghirmikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, 2000, 25:1439-1451.
- [9] Goedert M, Crowther RA, Garner CC. Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci*, 1991, 14:193-199.
- [10] Bunge MB, Holets VR, Bates ML, et al. Characterization of photochemically induced spinal cord injury in the rat by light and electron microscopy. *Exp Neurol*, 1994, 127:76-93.
- [11] Von EM, Sundstrom E, Seiger A. Morphological characterization of the evolving rat spinal cord injury after photochemically induced ischemia. *Acta Neuropathol*, 1997, 94:232-239.
- [12] Cameron T, Prado R, Watson BD, et al. Photochemically induced cystic lesion in the rat spinal cord. I. Behavioral and morphological analysis. *Exp Neurol*, 1990, 109:214-223.

(修回日期:2009-08-29)

(本文编辑:吴倩)

· 消息 ·

第二届上海国际骨科康复学术会议将于 2010 年 4 月举行

由上海交通大学医学院附属第九人民医院、上海市康复医学工程研究会、上海交通大学康复医学工程研究所共同主办,世界华裔骨科学会、香港“站起来”计划、上海市残疾人联合会、上海市康复医学会共同合办,上海阳光康复中心承办的第二届上海国际骨科康复学术会议暨第二届现代关节外科康复学讲习班将于 2010 年 4 月 23 日至 26 日在上海阳光康复中心召开。

会议将特邀美国、香港、台湾和大陆的专家聚焦“膝关节康复”专题开展指导讲座,从膝关节置换术的康复计划与技术、膝前交叉韧带损伤与重建、膝骨关节炎、髌骨软化症、膝部假肢、半月板损伤、社区骨科康复 7 个主题进行探讨,力图从生物力学、手术、康复训练、康复工程等多方位阐述膝关节伤病康复治疗的最新理念和技术。参会者将授予国家级继续教育 I 类学分 8 分。

为满足学员对康复技术的需求,会后还将举行“多元化骨科物理治疗技术”实训课程,将邀请多名来自台湾、香港和美国的资深物理治疗师及手法名家针对本体感觉神经肌肉促进技术、淋巴按摩技术、开链/闭链训练、膝关节松动术等进行现场讲授,并为学员提供动手实践的机会。

联系人:殷宁;联系电话:021-63139920;Email:shrehab@163.com。

大会网址及正式通知请关注 <http://orthorehab.blog.sohu.com>。