

· 短篇论著 ·

腹主动脉夹闭法制作大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型有效性的探讨

陈功 陈绪贵

【摘要】 目的 评价腹主动脉夹闭法制作大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型的有效性。**方法** 将 24 只健康成年 SD 大鼠随机分为假手术组 (G-C) 和缺血再灌注组 (G-I/R), G-I/R 组夹闭腹主动脉 50 min, G-C 组开腹但不夹闭腹主动脉。检测再灌注 6 h 后脊髓组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙二醛 (MDA) 的含量及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 进行 6 h、30 h、54 h 神经行为学评分。**结果** 两组之间神经行为学评分、TNF- α 、MDA、SOD 没有统计学差异。**结论** 腹主动脉夹闭法不能造成有效的大鼠脊髓缺血再灌注损伤。

【关键词】 脊髓; 缺血再灌注; 模型, 动物; 大鼠

脊髓缺血再灌注损伤 (spinal cord ischemia-reperfusion injury, SCII) 是国内外研究的热点问题之一。一种有效的动物模型能帮助人们研究脊髓的原发损害和继发缺血再灌注损害的机制, 评估各种干预手段的效果和寻求有效的治疗方法。很多关于脊髓缺血再灌注损伤的研究采用夹闭大鼠腹主动脉的方法制作动物模型, 阻断位置一般在左肾动脉分支下或左肾动脉分支上, 阻断时间一般在 30~45 min^[1-2], 这种方法能造成大鼠有效的脊髓缺血再灌注损伤吗? 我们拟采用阻断左肾动脉分支上腹主动脉 50 min 的方法处理大鼠, 通过观察处理后大鼠的后肢运动功能、脊髓组织内肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、丙二醛 (malonyldialdehyed, MDA) 及超氧化物歧化酶 (super-oxide dismutas, SOD) 活性的变化, 探讨腹主动脉夹闭法制作大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型的有效性。

一、材料与方法

(一) 实验材料

24 只健康成年 SD 大鼠, 清洁级, 雌雄不拘, 体重 250~300 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。TNF- α 、MDA 和 SOD 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

(二) 动物分组及模型建立

按随机数字表将 24 只大鼠随机分为假手术组 (G-C)、手术组 (G-I/R), 每组 12 只。手术组按文献^[3]方法操作。水合氯醛 0.3 mg/kg 腹腔注射麻醉后, 仰卧于工作台, 消毒后下腹正中纵行打开腹腔, 暴露腹主动脉, 辨认双侧肾动脉, 于左右肾动脉之间用无创动脉夹夹闭腹主动脉。确认夹闭后左肾由鲜红色变为暗红色, 下方腹主动脉搏动消失。50 min 后松开动脉夹, 开始再灌注。仔细检查腹腔确认无出血后逐层缝合。假手术组除未用动脉夹夹闭腹主动脉外, 余操作与手术组相同。

(三) 检测项目

1. 脊髓组织内 TNF- α 、MDA 及 SOD 活性检测: 于再灌注

6 h 各组随机选取 6 只大鼠, 断头处死动物, 取腰段脊髓组织, 用冰生理盐水洗去残血, 拭干, 玻璃匀浆器冰浴匀浆待测。TNF- α 用 ELISA 法, MDA 采用硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法, SOD 测定采用黄嘌呤氧化酶法。操作步骤按试剂盒说明书进行。

2. 神经行为学评分: 各组剩余 6 只动物分别于再灌注 6 h、30 h、54 h 后由不了解手术分组的人员按照改良 Tarlov 评分标准进行后肢神经行为学评定并记录^[4]。0 分: 完全瘫痪, 针刺下肢无反应; 1 分: 完全瘫痪, 针刺下肢有反应, 但肢体不能活动; 2 分: 肢体可活动, 但不能站立或站立不稳 (<5 s); 3 分: 可站立, 但无法行走; 4 分: 可行走数步, 但不稳; 5 分: 能缓慢行走, 但不灵活, 存在一定缺陷; 6 分: 正常行走。

(四) 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 结果以均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 神经行为学评分 (表 1): 再灌注 6 h 两组大鼠后肢活动稍差, 但两组大鼠之间运动评分没有统计学差异 ($P = 0.64$); 30 h、54 h 两组大鼠后肢活动均正常, 评分均能达到 6 分, 之间没有差异。

表 1 再灌注 6、30、54 h 神经行为学评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	再灌注 6 h	再灌注 30 h	再灌注 54 h
假手术组	6	5.33 \pm 0.82	6.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00
手术组	6	5.50 \pm 0.55	6.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00

2. 实验室指标 (表 2): 再灌注 6 h 后脊髓组织 TNF- α ($P = 0.80$)、MDA ($P = 0.98$) 及 SOD 活性 ($P = 0.95$) 两组大鼠之间差异没有统计学意义。

表 2 再灌注 6 h 后脊髓组织 TNF- α 、MDA、SOD 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α (ng/L)	MDA (nmol/mgprot)	SOD (U/ml)
假手术组	6	60.72 \pm 13.77	1.15 \pm 0.34	98.74 \pm 19.36
手术组	6	64.74 \pm 7.15	1.15 \pm 0.27	101.27 \pm 9.89

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.21.100

作者单位: 100007 北京军区总医院八一脑科医院麻醉科 (陈功、陈绪贵); 广东医学院 2011 级研究生 (陈功)

通讯作者: 陈绪贵, Email: xuguic@163.com

三、讨论

动物模型的选择对研究结果的意义具有重要的影响,一种合适的动物模型应能客观模拟疾病的发生发展过程,准确反映疾病的病理生理变化。在脊髓缺血再灌注损伤的研究中,很多采用夹闭大鼠腹主动脉的方法制作模型,这种模型是否能反映脊髓缺血再灌注损伤的病理变化?我们试图复制此模型,在实验中,阻断位置在大鼠左肾动脉分支上腹主动脉,夹闭时间为50 min,观察了反映脊髓损伤程度的常用指标神经行为和组织中MDA、SOD、TNF- α 含量^[5-6],但是,却并没有观察到两组大鼠相应指标有统计学上的差异。虽然再灌注6 h后大鼠后肢活动较正常大鼠有一定缺陷,但是由于两组大鼠之间并不存在统计学上的差异,此时的运动缺陷不能排除麻醉和手术的影响。Carrillo等^[7]也试图运用此方法制作大鼠脊髓缺血模型,他们从能量代谢的角度,比较了夹闭组和未夹闭组大鼠脊髓组织的丙酮酸、乳酸、葡萄糖及ATP含量,亦未发现之间存在统计学差异。

腹主动脉夹闭法制作脊髓缺血再灌注损伤动物模型最早由Zivin教授等^[8]提出,他们通过夹闭左肾动脉分支下腹主动脉而造成兔有效的脊髓缺血再灌注损伤,其理论依据主要是因为动物脊髓的动脉来源主要有两个:来自椎动脉的降支即脊髓后动脉和脊髓动脉;从节段性的血管来的多个根动脉。根动脉是节段性血管,来自颈升动脉,颈深动脉,肋间动脉,腰动脉和骶动脉等。它们是供应胸,腰,骶和尾髓的主要动脉^[9]。在多数动物,其中有一条根动脉较其他根动脉粗大,称为Adamkiewicz动脉,它提供所支配脊髓段1/4~1/2的血液供应,阻断它能造成相应脊髓缺血坏死和神经功能损伤。兔的Adamkiewicz动脉开口于腹主动脉肾动脉分支以下,阻断左肾动脉分支下的腹主动脉可以造成相应脊髓段有效缺血。但是,在Schievink等^[10]的研究中发现大鼠体内并没有明显的Adamkiewicz动脉,8~12条根动脉共同汇聚成脊髓前动脉和两条脊髓后动脉,完成脊髓的血液供应。当一条根动脉被阻断,侧枝系统可以起到代偿供血作用,防止阻断部分脊髓节段的缺

血。同时,锁骨下动脉的分支直接与脊髓前动脉相通,共同保证脊髓血液供应。这些血流特性与人的脊髓血供很相似,在人类肾动脉以下夹闭腹主动脉很少引起瘫痪^[11]。我们和Carrillo等的实验也证实夹闭大鼠腹主动脉的确不能造成有效的脊髓缺血再灌注损伤。

综上所述,我们认为腹主动脉夹闭法不能造成大鼠脊髓有效的缺血再灌注损伤,用这种方法制作的大鼠模型不适合用于脊髓缺血再灌注损伤的研究。

参 考 文 献

- [1] 曾小华,刘丹彦,安民.胞二磷胆碱预处理对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的影响.第三军医大学学报,2011,33:2587-2591.
- [2] 张子峰,白玉树,侯铁胜.甲基强的松龙与钙蛋白酶抑制剂对大鼠缺血再灌注损伤脊髓保护作用比较.中国矫形外科杂志,2011,19:1026-1029.
- [3] 张子峰,侯铁胜.甲基强的松龙对大鼠脊髓缺血再灌注损伤中钙蛋白酶表达的影响.中国脊柱脊髓杂志,2006,16:70-72.
- [4] Khalaj L, Peirovi H, Khodaghali F, et al. Acute 17 β -estradiol pretreatment protects against abdominal aortic occlusion induced spinal cord ischemic-reperfusion injury. Neurochem Res, 2011, 36: 268-280.
- [5] 王立勋,黄焯渊,姜建元,等.中性粒细胞在急性脊髓损伤中作用的实验研究.中国脊柱脊髓杂志,2003,13:544-546.
- [6] Deng SL, Yuan T, Liao WH. Effect of fetal spinal cord graft with nerve growth factor and nimodipine in secondary injury of spinal cord of adult rat. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2001, 15: 74-76.
- [7] Carrillo SEL, Guimarães SB, Vasconcelos PRC, et al. Is subdiaphragmatic aortic cross-clamping a suitable experimental model for spinal cord ischemia/reperfusion injury study in rats? Acta Cir Bras, 2006, 21: 219-222.
- [8] Zivin JA, DeGirolami U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model. Stroke, 1980, 11: 200-202.
- [9] 邝国璧,叶鹿鸣.脊髓的血液供应.广东解剖学通报,1983, z1: 49-51.
- [10] Schievink WI, Luyendijk W, Los JA. Does the artery of Adamkiewicz exist in the albino rat? Anat, 1988, 161: 95-101.
- [11] Ratcliffe JF. The arterial anatomy of the adult human lumbar vertebral body: a microarteriographic study. Anat, 1980, 131: 57-79.

(收稿日期:2013-08-13)

(本文编辑:戚红丹)