

建立大鼠钳夹伤脊髓损伤模型的学习曲线分析^①

陈华¹,程惠²,冷明昊²,潘建海²,何祥春²,张一鸣²,卢山²,张良^{2②}

(1. 湖北医药学院附属随州医院皮肤科,湖北 随州 441300 E-mail:2236647022@qq.com;
2. 湖北医药学院附属随州医院骨二科,湖北 随州 441300)

摘要:目的 分析大鼠脊髓钳夹伤模型建立的学习曲线。方法 将制作大鼠钳夹伤脊髓损伤模型最初的30例资料分为3个阶段(各10例),对手术时间、出血量、假手术组脊髓损伤情况、术后感染、脊髓损伤的(BBB)运动功能评分、运动诱发电位N1峰(MEP-N1峰)潜伏期时间进行分析,并行病理学HE染色。结果 第三阶段操作在手术时间、出血量、假手术脊髓损伤情况、术后感染、BBB评分较第一阶段明显减少,MEP-N1峰潜伏期时间较第一阶段明显增加($P < 0.05$)。HE染色观察到第一阶段有部分模型脊髓没有完全横断性损伤,第三阶段全部脊髓呈现完全横断性损伤。结论 初学者经过耐心反复的训练,可通过学习曲线,于第三阶段,熟练掌握钳夹伤制作脊髓损伤模型。

关键词: 脊髓损伤;模型;大鼠;学习曲线

中图分类号: R744 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2017)03-0186-04
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.03.007

Learning curve analysis of establishing rat models of spinal cord injury by clip compression

Chen Hua¹, Cheng Hui², Leng Minghao², Pan Jianhai², He Xiangchun²,
Zhang Yiming², Lu Shan², Zhang Liang²

(1. Department of Dermatology, Suizhou Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Suizhou 441300, Hubei, China E-mail:791844253@qq.com; 2. Department of Orthopedics, Suizhou Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Suizhou 441300, Hubei, China)

Abstract: **Objective** To analyze the learning curve of establishing rat models of spinal cord injury by clip compression. **Methods** The data of the first 30 consecutive cases of rat models of spinal cord injury by clip compression were collected for this retrospective study. The models were divided into three stages, and each group had 10 cases. Operation time, the volume of blood loss, the rate of spinal cord injury in the sham operation group, post-operative infection, Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) locomotor rating scale for spinal cord injury, motor evoked potentials N1 (MEP-N1) peak were analyzed. Pathological HE staining was also performed.

Results The third stage of operation had obviously shorter operation time, less volume of blood loss, less spinal cord injury happening in the sham operation group, less post-operative infection, lower BBB scores and longer latencies of MEP-N1 peak, compared with the first stage, there were statistical differences (all $P < 0.05$). HE staining presented that at the first stage some models had no completely transactional spinal cord injury, and at the third stage all models had completely transactional spinal cord injury. **Conclusion** Learners could grasp these skills by the learning curve with patient and repeated practice, at the third stage, any model suitable for experimental study of spinal cord injury by clip compression could be established successfully.

Key words: spinal cord injury; models; rats; learning curve

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)发病率较高。000人,并以每年约11 000人的速度增加^[1]。刘鹏等^[2]对2001—2007年的82 720例脊髓损伤数据进行

① 基金项目:湖北省卫生计生科研基金资助(WJ2015MB228)

② 通信作者,E-mail:894033755@qq.com

了分析,发现SCI的发病率也逐年上升。因此,加强SCI修复的基础及临床研究意义重大。对研究者而言提供稳定的、损伤程度一致的SCI模型进行各项实验研究具有重要的意义。我们在实验过程中制作了大量的SCI模型,现就这方面的资料进行分析,整理报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级雌性成年SD大鼠(购于第三军医大学动物实验中心)30只,体重250~300g。将学习制作该模型分3个阶段。每个阶段随机分为2组,对照组(假手术组)及SCI实验组,每组各5只SD大鼠。

1.2 手术步骤及损伤模型制备 用5%水合氯醛按350 mg/kg行腹腔麻醉后^[3],俯卧位固定于小动物手术台上。纵向切开背部皮肤,分离肌肉,暴露棘突和椎板。确定T10、T11椎体位置^[4]。暴露脊髓。实验组采用小号动脉夹,钳夹脊髓30 s。钳夹完毕后用生理盐水冲洗伤口,无菌缝合。假手术组除不损伤脊髓外,其余同实验组。术后常规人工排尿2~3次/天,直至恢复自主膀胱排尿。

1.3 术中及术后一般情况观察 观察麻醉时间、手术时间、术中出血情况。术后观察假手术组脊髓损伤情况、术后感染及死亡情况。

1.4 术后动物行为学观察 各组在术后1 d、3 d、5 d、1周、2周对受试鼠进行Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)运动功能评分, BBB运动功能评分是观察动物的臀、膝、踝关节、行走、躯干运动及其协调情况^[5]。

1.5 病理学检查 动物麻醉后,行心脏灌注固定。简述如下:经心脏灌注生理盐水,再用4%多聚甲醛灌注固定。然后取出以损伤处为中心上下约0.5 cm的脊髓,再置于4%多聚甲醛固定24 h,随后行石蜡包埋,HE染色。

1.6 运动诱发电位N1峰(MEP-N1峰)潜伏期测定

动物麻醉后,固定在脑立体定位仪上。切开头皮暴露颅骨,在冠状缝下1 mm、矢状缝右旁开1 mm处,暴露硬脑膜,将电极贴至硬脑膜。远端电极固定于坐骨神经或者置于皮下。应用Powerlab/16SP型诱发电位仪,刺激频率4 Hz波宽0.2 ms,强度3 mA,各组分别在术后1 d、3 d、5 d、1周、2周进行MEP检测。

1.7 SCI模型制作成功的标准 实验组大鼠在苏醒后,双下肢自主活动消失,并有肌张力降低,明显尿潴留,大都无可见后肢活动,后肢掌面向上,显示造模成功。

1.8 统计学方法 采用SPSS 18.0统计学软件分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间两两比较应用 q 检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同阶段SCI模型制作成功率比较 第一阶段SCI模型制作成功率33.33%,第二、三阶段成功率均为100%,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.200, P = 0.0273$)。

2.2 不同阶段一般情况比较 麻醉时间减去该阶段平均麻醉时间行统计学分析,发现这个变量第一阶段和第三阶段差异有统计学意义($P < 0.05$),第二阶段同第一阶段差异无统计学意义($P > 0.05$),第二阶段同第三阶段差异有统计学意义($P < 0.05$)。手术时间、术中出血量、术后伤口感染,第一阶段和第三阶段差异有统计学意义($P < 0.05$),第二阶段同第一阶段差异无统计学意义($P > 0.05$),第二阶段同第三阶段在手术时间和伤口感染率上比较差异无统计学意义($P > 0.05$),第二阶段同第三阶段在出血量上比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时我们还观察到,在第一阶段,假手术组出现脊髓损伤情况,然而死亡率在各个阶段差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 不同操作阶段一般情况比较 ($n = 5/10$)

指标	操作阶段			F / χ^2	P
	第一阶段	第二阶段	第三阶段		
麻醉时间($\bar{x} \pm s, \text{min}$)	97.70 ± 14.14	93.70 ± 12.52	83.30 ± 8.033	0.2792	0.8401
麻醉时间-该阶段平均麻醉时间($\bar{x} \pm s, \text{min}$)	41.24 ± 3.314	36.44 ± 3.043	20.16 ± 4.402	6.892	0.0009
手术时间($\bar{x} \pm s, \text{min}$)	48.47 ± 18.25	46.32 ± 10.57	30.25 ± 5.68	3.584	0.0356
术中出血量($\bar{x} \pm s, \text{ml}$)	2.54 ± 0.44	2.48 ± 0.19	1.18 ± 0.10	7.358	0.0026
假手术组出现脊髓损伤(例)	(3/5)	(0/5)	(0/5)	10.59	0.0142
伤口感染(例)	(4/6)	(1/9)	(0/10)	10.39	0.0155
死亡(例)	(2/10)	(1/10)	(0/10)	3.81	0.2828

2.3 不同操作阶段BBB评分比较 在假手术组出现脊髓损伤,在我们观察的时间内(2周),没有完全恢

复。在SCI组观察到:学习制作模型的第一阶段和第三阶段相比,术后第1 d、3 d、5 d、1周、2周, BBB评分

差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 第二阶段同第一阶段相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 第二阶段同第三阶段相比, 除了术后第 5 d 以外, 其余差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 不同时间点各个阶段 BBB 评分比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	操作阶段			F	P
	第一阶段	第二阶段	第三阶段		
对照组	13.20±3.24	21	21	5.772	0.0071
SCI 实验组					
术后第 1 d	1.20±0.46	0.70±0.33	0	4.152	0.0126
术后第 3 d	2.50±0.73	1.70±0.68	0	6.265	0.0016
术后第 5 d	3.90±1.00	2.70±0.80	1.70±0.15	2.954	0.0454
术后第 7 d	5.40±1.05	3.90±0.83	2.30±0.15	3.532	0.0243
术后第 2 周	8.40±1.43	6.20±1.09	4.00±0.21	4.573	0.0082

2.4 不同操作阶段 MEP-N1 峰潜伏期时间比较 假手术组, MEP-N1 峰潜伏期时间在各个学习制作模型的阶段, 没有明显的差异。在 SCI 组观察到: 学习制作模型的第一阶段和第三阶段相比, 术后第 1 d、3 d、5 d、1 周、2 周, MEP-N1 峰潜伏期时间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 第二阶段同第一阶段相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 第二阶段同第三阶段相比, 除了 1 周以外, 其余差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 不同时间点各个阶段神经电生理检查 N1 波潜伏期比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s, ms$)

组别	操作阶段			F	P
	第一阶段	第二阶段	第三阶段		
对照组	2.77±0.22	2.39±0.07	2.32±0.06	2.105	0.1398
SCI 实验组					
术后第 1 d	3.11±0.50	4.11±0.18	4.39±0.08	3.873	0.0294
术后第 3 d	3.02±0.49	3.95±0.22	4.24±0.06	3.581	0.0434
术后第 5 d	2.92±0.43	3.77±0.24	4.04±0.04	3.288	0.0479
术后第 7 d	2.86±0.42	3.67±0.22	4.15±0.19	3.393	0.0438
术后第 2 周	2.71±0.30	3.55±0.23	3.78±0.10	4.54	0.0174

2.5 组织病理学改变 假手术组我们没有观察到明显的脊髓损伤。在学习制作模型的第一阶段, 我们观察到: 脊髓没有完全横断性损伤, 存在部分损伤。第二、三阶段, 脊髓呈现完全横断性损伤, 见图 1。

3 讨论

目前动物模型的制作主要是利用大鼠、兔等比较常见的实验动物^[6-7]。如何制作稳定、损伤程度一致的 SCI 模型具有重要的意义。在实验中我们观察到学习制作 SCI 模型的第一阶段, 存在假手术组脊髓损伤的情况, 提示大鼠脊髓胸节的损伤可能性较大, 在手术操作过程中, 应该仔细地操作, 在第二、三阶段, 假手术组脊髓损伤的情况没有再发生, 提示经过一定的训练, 在

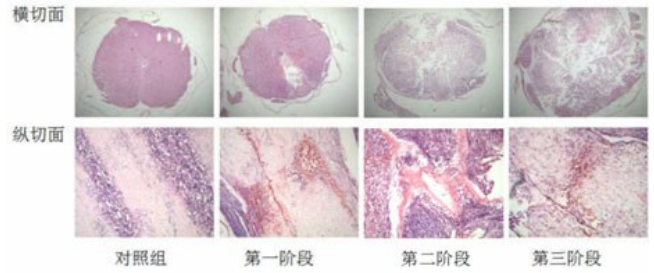


图 1 HE 染色观察钳夹伤对脊髓的损伤情况

对照组(第一阶段假手术组): 脊髓未见明显损伤, 第一阶段: 脊髓部分损伤, 第二、三阶段: 脊髓完全横断性损伤。(横切面: $\times 40$; 纵切面: $\times 100$)

制作脊髓损伤模型过程中, 假手术组是可以避免脊髓损伤的。对一般的情况如手术时间、术中出血及术后感染情况分析, 观察到在制作模型过程中, 经过一段时间学习, 能显著减少不利情况的发生。对麻醉时间的分析, 我们观察到: 在学习制作模型的第一阶段, 各个动物的麻醉时间差异较大, 而第二、三阶段, 各个动物的麻醉时间逐渐均衡, 提示在学习制作模型的第一阶段, 麻醉的深浅掌握不均, 所以每个动物麻醉时间的差异较大。死亡率我们没有观察到明显的差异。提示 SCI 模型对动物的生命相对是安全的。

SCI 模型制作完成后, 有多种评价脊髓损伤的方法, 如大鼠的 BBB 评分法^[5], 小鼠的 BMS 评分法^[8-9], 也常常运用诱发电位来评价脊髓损伤后电生理功能改变^[4, 10-12]。

我们在实验中观察到, SCI 组 BBB 评分和神经电生理 MEP-N1 峰潜伏期时间在学习制作模型的第一阶段和第三阶段差异有统计学意义。结合病理学检查, 观察到在制作脊髓损伤的模型过程中, 在学习的第一阶段, 存在着对脊髓损伤不够的情况, 可能的原因是在运用动脉夹钳夹脊髓的过程中, 夹持的深度不够, 导致脊髓不完全损伤。

总之, 通过 SCI 模型学习曲线, 可以了解到通过多次 SCI 模型的制作, 才能达到制作脊髓损伤程度一致的 SCI 模型。这对于我们以后在实验过程中, 制作运用相关的动物模型提供了一定的指导意义。(致谢: 感谢湖北医药学院附属随州医院骨二科殷道秀老师、储忠卫老师、周厚德老师、肖晶晶老师、申兴龙老师在实验过程中给予的指导)。

参考文献:

[1] Wyndaele JJ. More knowledge of worldwide incidence and epidemiology of spinal cord injury: data from the United States military [J]. Spinal Cord, 2011, 49(8): 857. doi: 10.1038/sc.2011.85

- [2] Liu P, Yao Y, Liu MY, et al. Epidemiology of spinal trauma in Mainland China from 2001 to 2007: an epidemiological study based on a nationwide database [J]. *Spine*, 2012, 37(15): 1310-1315.
- [3] 李少春, 马丽娜, 李峰杰, 等. 不同浓度水合氯醛对大鼠的麻醉作用比较[J]. *中国药业*, 2014, 23(19): 22-23.
- [4] 卢旻鹏, 权正学, 刘渤, 等. 小鼠脊髓损伤标准化重物打击模型的制备及评价[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(8): 933-938.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection [J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2): 244-256.
- [6] 蒙文丹, 解继胜. 骨质疏松动物模型建立的知识图谱分析[J]. *右江民族医学院学报*, 2015, 37(6): 821-823.
- [7] 王兵, 秦军, 俞渊, 等. 慢性肝损伤发胆结石动物模型的构建[J]. *右江民族医学院学报*, 2015, 37(2): 171-174.
- [8] Basso DM, Fisher LC. The Basso mouse scale for locomotion (BMS) is a more sensitive indicator of recovery than the BBB scale in mice with spinal cord injury [J]. *J Rehab Res Dev*, 2003, 40(S3): 12-26.
- [9] 王玉珏, 梁华平, 刘晓奇, 等. 建立 BALB/c 小鼠脊髓钳夹伤后的运动学评价方法[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2011, 45(3): 229-233.
- [10] Hyun SJ, Rhim SC. Combined motor and somatosensory evoked potential monitoring for intramedullary spinal cord tumor surgery: correlation of clinical and neurophysiological data in 17 consecutive procedures [J]. *Br J Neurosurg*, 2009, 23(4): 393-400.
- [11] DiCindio S, Theroux M, Shah S, et al. Multimodality monitoring of transcranial electric motor and somatosensory-evoked potentials during surgical correction of spinal deformity in patients with cerebral palsy and other neuromuscular disorders [J]. *Spine*, 2003, 28(16): 1851-1855.
- [12] 赵军, 权正学, 刘渤, 等. 小鼠 Allen's 脊髓损伤模型的建立及评价[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(11): 1296-1300.

收稿日期: 2017-04-17; 修回日期: 2017-06-12

(上接第 185 页)

参考文献:

- [1] 何建军, 罗玥倩, 张俊, 等. 老年痴呆症的病因及发病机制研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(20): 5924-5926.
- [2] 沈阳, 陈宇, 傅洁瑜, 等. 老年痴呆症的分子机制[J]. *生命科学*, 2014, 26(6): 550-559.
- [3] 范红波. 氧自由基在老年痴呆发病机制中的作用[J]. *中国现代医药杂志*, 2012, 14(4): 130-132.
- [4] 李国星, 麻顺广, 杨翠平, 等. 2012-2015 年濮阳市油条、油饼中铝含量结果分析[J]. *河南预防医学杂志*, 2016, 27(5): 385-387.
- [5] 陆日贵, 李必斌, 孙琦. 南宁市市面制食品油条、馒头中铝含量的调查分析[J]. *实用预防医学*, 2014, 21(3): 334-335.
- [6] 李海, 吴琪俊. 铝暴露的神经毒性及其作用机制的研究进展[J]. *右江民族医学院学报*, 2016, 38(6): 616-618.
- [7] 漆光紫, 周敏, 庞广福, 等. 职业性铝暴露与认知功能障碍的关系研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2016, 38(1): 20-21, 29.
- [8] 胡红柳, 宾慧婷, 蓝贤英, 等. 慢性铝暴露 AD 大鼠学习记忆功能障碍及绿茶多酚的干预作用研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2016, 38(3): 262-264.
- [9] 杨海龙, 梁伟江, 吴艳, 等. 中药海狗福对铝中毒小鼠模型大脑的乙酰胆碱转移酶活性的影响[J]. *环境卫生学杂志*, 2014, 4(6): 509-513.
- [10] 刘祥琴, 刘小琦, 晏宁. 老年性痴呆患者血浆 NO 和 H₂S 的变化及意义[J]. *重庆医学*, 2012, 41(1): 19-21, 24.
- [11] 雷蕾, 彭军, 姜丹. 血清内皮素-1、一氧化氮水平与血管性痴呆患者认知功能的相关性研究[J]. *现代医院*, 2016, 16(11): 1572-1574.
- [12] Mokhtari Z, Baluchnejadmojarad T, Nikbakht F, et al. Riluzole ameliorates learning and memory deficits in A β 25-35-induced rat model of Alzheimer's disease and is independent of cholinergic activation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 87: 135-144.
- [13] Yen K, Patel HB, Lublin AL, et al. SOD isoforms play no role in lifespan in ad lib or dietary restricted conditions, but mutational inactivation of SOD-1 reduces life extension by cold[J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130(3): 173-178.
- [14] Arjmand Abbasi Y, Mohammadi MT, Sarami Foroshani M, et al. Captopril and Valsartan May Improve Cognitive Function Through Potentiation of the Brain Antioxidant Defense System and Attenuation of Oxidative/Nitrosative Damage in STZ-Induced Dementia in Rat [J]. *Adv Pharm Bull*, 2016, 6(4): 531-539.

收稿日期: 2017-04-17; 修回日期: 2017-05-10