

综述

慢性压迫性脊髓损伤动物模型的制作方法

宁 斌, 郑修军, 胡有谷

(青岛大学医学附属医院骨科 266003 山东省)

中图分类号: R683.2, R322.81 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-05-0316-03

慢性压迫性脊髓损伤在临床上十分常见, 脊髓型颈椎病(CSM)、后纵韧带骨化(OPLL)和颈、胸椎管狭窄等均可引起。其病理机制十分复杂, 至今尚不十分清楚。由于无法依靠临床病例开展系统的病理学及病理机制的基础研究, 通过建立动物模型进行实验研究则显得尤为重要。笔者就国内外有关慢性压迫性脊髓损伤动物模型建立的方法作一综述。

1 动物选择

用于慢性压迫性脊髓损伤实验研究的动物有多种选择。猿、猴等灵长类动物的脊髓解剖最接近人类, 猪、犬、猫等四肢行走动物的脊髓与人类的相似, 而兔、鼠等动物的脊髓再生能力较强, 与人类脊髓功能相距较远。从观察截瘫肢体恢复功能的难易和可靠性来说, 猿、猴可站立者最好, 猪、犬、猫等四肢站立行走者较易, 而兔、大鼠等四肢爬行和跳行动物则观察较难, 且准确性不如高等动物。但初期试验多选择兔、鼠等低等动物, 而实验愈近成功, 则趋向于大动物。

2 模型制作方法

脊髓型颈椎病是引起慢性压迫性脊髓损伤最常见的原因^[1]。自 1948 年 Brain 对其进行描述以来, 临床对该疾病认识已较熟悉, 但缺乏详尽的病理生理学方面的研究, 影响了其诊治水平进一步提高。国内外关于慢性压迫性脊髓损伤动物模型的建立有以下几种常见方法。

2.1 气囊压迫

Tarlov 等分别于 1953 年和 1954 年发表了气囊压迫法制作脊髓损伤的动物实验模型, 用一个小气囊连接聚乙烯导管, 置于硬膜外椎板下, 在术后 24h 动物恢复正常后, 向气囊中充气对脊髓造成压迫伤, 其损伤程度主要取决于压力的大小和压迫的时间长短。杨诗球等^[2]对该模型进行了改进, 采用向囊内注入泛影葡胺使胶囊膨胀压迫脊髓, 0.10~0.30ml 压迫 6h, 0.40ml 压迫 3h 及 5h, 用脊髓诱发电位(SSEP)监测压迫结果, 所得实验结果较前者有明显改观。2003 年, Takahashi 等^[3]将一个塑料球置于狗的 S1 椎板下, 塑料球连接一个 ATS-1000 空气压力系统, 在 10mmHg

的注射压力下缓慢地向球内注射一种称为“konnyaku”的物质, 对脊髓形成压迫。这一模型的优点为可对不同脊髓节段压迫致伤, 持续时间可控, 重复性好, 方法简便。但其缺点为气球膨胀时球内压力并非呈直线样改变。通过对气球材料的改进, 造成脊髓受压的变化曲线或许可以近似于直线样改变。

2.2 螺钉压迫

1972 年, Hukuda 等^[4]首次采用经颈前路于 C5 椎体正中攻入螺钉, 此后每日将螺钉攻入一个螺纹(约 1mm), 直至犬出现脊髓功能障碍, 从而测得脊髓最大压迫率, 如此制造了亚急性压迫性脊髓损伤模型。此种方法在制作慢性压迫性脊髓损伤模型时被广泛应用。但 Kanchiku^[5]等认为, 这种脊髓压迫是一种非线性压迫, 在压迫的早期阶段, 螺钉拧入的速度即使稍快脊髓诱发电位也常无明显变化; 而在后期, 螺钉拧入速度即使很慢, 脊髓诱发电位也会出现明显异常改变。在脊髓压迫增加的间歇期, 螺钉长时间的直接压迫可造成脊髓神经元的脱髓鞘改变, 引起脊髓神经纤维的传导性损害。1993 年, Al-Meffy 等^[6]制作特氟隆螺钉, 观察在最大压迫率状态下犬脊髓慢性压迫性损伤的改变。蔡钦林等^[7]采用双套管螺钉法模拟渐进性加压。此方法的优点为便于再次手术时操作和控制深度, 利于长期加压。缺点为反复前路手术不仅降低了动物存活率, 而且局部瘢痕化增加了后期手术操作难度, 因此成功率低, 仅 35%。此外犬椎管直径约 10mm, 而脊髓直径相对较小, 仅约 6mm, 因此直径过大的螺钉侵入椎管, 实际上造成椎管节段性渐进性狭窄, 成为椎管狭窄模型, 并不符合颈椎病脊髓点状受压的机制。

2.3 双套管法压迫

何海龙等^[8]采用弹性塑料双套管作致压物, 利用两管间的滑动作用推入内管, 达到渐进性压迫脊髓的目的。此动物模型的优点: 导管加压端渐进性加压操作方便, 实验成功率高; 细管径的致压物可更理想地模拟脊髓受到点状压迫。不足之处为导管在 X 线下不显影, 导管缓慢推进的距离难以达到双套管螺钉的精确度。

2.4 肿瘤压迫

1951 年 Comman 等用肿瘤组织作为硬膜外腔压迫物制作了肿瘤压迫模型。实验中经后路将一定浓度的肿瘤细胞接种到指定的棘突下、椎管的后方或侧方, 让肿瘤组织

在硬膜外腔生长,对脊髓逐渐产生压迫。脊髓受压的程度按动物的运动功能变化分级观察,在压迫的不同阶段检查脊髓的病理改变。他们提出脊髓静脉回流障碍和出血是肿瘤组织压迫脊髓的主要损害因素。之后的 50 年,有许多研究者利用肿瘤压迫的动物模型来研究脊髓受压时各种病理机制。1999 年 Pinazo-Seron 等^[8]用植入的肝肿瘤细胞造成脊髓压迫,通过骨性结构的改变直接影响肿瘤组织对脊髓的压迫。此方法通过接种肿瘤细胞,诱导局部肿瘤组织的生长,导致脊髓受压,压迫产生的方式与肿瘤压迫相似,从椎体、椎板及附件开始向脊髓压迫,这种模型对研究椎管内肿瘤有一定的价值。缺点为肿瘤组织生长速度太快,不宜用于脊髓慢性压迫性损伤的研究;恶性肿瘤侵袭性生长会直接损害脊髓的结构,引起脊髓神经纤维和神经细胞的功能改变,出现脊髓压迫之外的病理变化;转移瘤会对实验动物的全身情况产生影响,缩短动物生存时间;脊髓的受压程度是以动物运动功能变化为指标,无法直接反应脊髓受压迫的大小,难以复制、重复实验结果,实验结果之间缺乏可比性。

2.5 转基因压迫

1981 年 Hosoda 等^[9]利用转基因技术培养出一种小鼠,随着小鼠年龄的增长,颈椎钙化沉积物增多,从而产生脊髓压迫。2002 年 Uchida 等^[10]利用转基因的小鼠作为慢性压迫性颈髓损伤模型来对脊髓压迫性疾病进行研究。动物来源于日本癌症研究协会的小鼠,使异质结合体的同胞小鼠进行交配,其后代具有常染色体隐性遗传病。因为纯合子的骨肥大小鼠可以通过特征性的踮脚尖行走 (the tiptoe-walking Yoshimura, Twy) 来确认,通常简称这种小鼠为 Twy 鼠。具有常染色体隐性遗传病的小鼠,在 C1、C2 关节后面特征性地出现钙化沉着物,随着钙化物的沉积,就会产生不同程度的 C2、C3 的脊髓压迫。随着小鼠年龄的增长,寰枢椎的表层钙化物体积进行性增加,最终压迫脊髓的后部和后侧方,造成慢性压迫性脊髓损伤。2002 年 Yamaura 等^[11]利用 Twy 鼠对慢性脊髓压迫的病理改变及组织学改变进行了研究,发现细胞凋亡在慢性脊髓损伤中能在损伤部位诱发继发性变性,并能在远离损伤部位的脊髓产生慢性脱髓鞘作用。2003 年 Uchida 等^[12]利用 Twy 鼠进行研究,发现在邻近机械压迫点的运动神经元区域脑源性神经营养 (细胞诱导) 因子、神经营养蛋白的过分表达能够使其出现代偿性改变,这些蛋白的表达有助于神经的存活和塑形。Twy 鼠是仅有的无创的慢性进行性压迫的动物模型,这是此模型与其它类型的最大区别点;压迫的产生是由于颈椎钙化缓慢沉积形成的,符合临床上慢性压迫的病理改变,同实际的病程相符;体内没有异物置入,不存在组织相容性问题。但由于此模型是无创的,颈椎钙化的程度不能人为精确调控,所以在慢性压迫形成的过程中,无法控制压迫形成的程度;而且由于不能重复操作,无法重复实验结果,个体间缺乏较好的比较性。

2.6 可膨胀材料压迫

1989 年, Ehud 等将甲基纤维素-聚丙烯腈块状置入硬膜外,直径 0.25mm (该块状物 37.5℃下在普通生理盐水中 6d 之内可膨胀为原来的 11 倍),使其在硬膜外膨胀时对脊髓产生直接压迫。1997 年 Cornefjord 等^[13]利用成份为酪蛋白衍生物的一种坚硬的塑料材料做成 Ameroid 压缩器,压缩器吸收水分后能够缓慢膨胀。将猪的马尾骶神经根放入 Ameroid 压缩器中央,观察其受到慢性压迫后的病理变化。用于研究的压缩器外层有一坚硬的金属外壳,使其只能向内心膨胀。将压缩器附加 37℃的盐水试管,压缩器的内径每天用双目显微镜测量,持续 40d。该动物模型的优点为操作比较简单,手术成功率高;前路皆有压迫,符合临床患者的病变特征。缺点为材料膨胀速度不易控制,与慢性脊髓压迫的产生条件不一致;材料组织相容性不好。如果能找到一种合适的材料,有良好的组织相容性,可以人为控制其膨胀速度、膨胀方向,而且有足够长的膨胀时间,并且放置于椎管内合适的位置,将会是一种较理想的脊髓环状受压模型。

2.7 通过脊柱运动产生压迫

Iwamoto 等^[14,15]分别利用不锈钢丝造成大鼠脊髓的慢性压迫性损伤。在大鼠 3 周大小的时候,用一根不锈钢丝环绕 L5 椎骨,在椎体的腹侧用一个不锈钢的盘状物对椎体保护,置于实验室内,保持温度 23℃±1℃、湿度 55%±5% 的条件。随着动物的生长及活动,不锈钢丝嵌入椎管的背侧,对脊髓产生慢性的压迫。Yasuhara^[16]和 Yamaguchi 等^[17]对大鼠腹腔注射麻醉后行无菌手术, L4 上方背部皮肤纵向切口,分离竖脊肌,手术显微镜下行 L4 椎板切除术。将一硅酮片 (0.3mm 厚, 3.5mm² 大小) 嵌入椎管,覆盖于硬膜外背部,硅酮片平均占据 L4 椎管代表性区域的 37%,闭合伤口,待其恢复。手术创伤恢复以后,随动物活动的增加,逐渐出现脊髓受压症状,活动出现障碍。该模型的优点为脊髓损害表现出现缓慢,逐渐加重,与患者的发病过程相似;脊髓的病理改变与脊髓损伤的症状表现一致。缺点为置入物的组织相容性不好;大鼠的运动与直立行走的人类不一致。

3 慢性压迫性脊髓损伤的理想动物模型

建立有效的慢性脊髓压迫损伤的动物模型是对慢性脊髓损伤病理生理和组织学等进行深入研究的前提,唯有建立标准的、高度可重复性的实验动物模型,才能择优选出治疗脊髓损伤的可行方案,为脊髓损伤造成严重后果的逆转带来新的突破。

理想的慢性压迫性脊髓损伤动物模型制作方法应具有以下五个方面的特点:(1)再现性好,即应再现所要研究的人类慢性脊髓损伤的特征,与实际损伤机制类似;(2)重复性强,即用同一方法相同的致伤量作用于同种动物的同一部位能复制出相近程度的脊髓损伤;(3)可定量分级,即压迫力度、压迫时间可自由控制,用同一方法不同的压迫作用动物脊髓同一部位产生不同程度的脊髓损伤,压迫程

度大小与脊髓损伤程度成线性关系,以便进一步施加处理因素;(4)适应性广,即一种方法既能复制多种类型的慢性脊髓损伤,又能在多种实验动物上应用;(5)操作简单,即所用设备要求不高,操作不繁琐,能快速大批制作。从目前的研究状况看,可膨胀材料动物模型法虽有一些缺点,但其操作比较简单,手术成功率高,前后路皆有压迫,符合临床患者的病变特征,不失为一种较为可行的制作慢性脊髓损伤动物模型方法。

总之,目前慢性脊髓压迫损伤模型各有其特点和优缺点,应根据研究需要和实际条件选用适当的动物模型。

4 参考文献

- 何海龙,贾连顺,李家顺,等.颈脊髓慢性压迫症实验模型的初步研究[J].颈腰痛杂志,2002,23(2):96-99.
- 杨诗球,谭正中,鲁晓滨,等.判断脊髓受压程度的实验研究[J].中华外科杂志,1987,25(3):6-8.
- Takahashi N, Yabuki S, Aoki Y, et al. Pathomechanisms of nerve root injury caused by disc herniation: an experimental study of mechanical compression and chemical irritation [J]. Spine, 2003, 28(5):435-441.
- Hukuda S, Wilson CB. Experimental cervical myelopathy: effects of compression and ischemia on the canine cervical cord [J]. Neurosurg, 1972, 37(6):631-652.
- Kanchiku T, Taguchi T, Keneko K, et al. A new rabbit model for the study on cervical compressive myelopathy [J]. J Orthop Res, 2001, 19(4):605-613.
- Al-Meffy O, Harkey HL, Marawi IM, et al. Experimental chronic compression cervical myelopathy [J]. J Neurosurg, 1993, 79(4):550-561.
- 蔡钦林,杨文,黄云钟,等.犬慢性压迫性颈脊髓的实验研究[J].中国脊柱脊髓杂志,1996,6(5):210-212.
- Pinazo, Seron MJ, Benet A, et al. Compression medullar pometastasis departes dehepatocarcinoma [J]. An Med Interna, 1999, 16(1):587-589.
- Hosoda Y, Yoshimura Y, Higaki S. A new breed of mouse showing multiple osteochondral lesions: Twy mouse [J]. Ryu-machi, 1981, 21(Suppl):157-164.
- Uchida K, Kenzo D. Progressive changes in neurofilament proteins and growth-associated protein-43 immunoreactivities at the site of cervical spinal cord compression in spinal hyperostotic mice [J]. Spine, 2002, 27(5):480-486.
- Yamaura I, Yone K, Nakahara S, et al. Mechanism of destructive pathologic changes in the spinal cord under chronic mechanical compression [J]. Spine, 2002, 27(1):21-26.
- Uchida K, Baba H, Maezawa Y, et al. Increased expression of neurotrophins and their receptors in the mechanically compressed spinal cord of the spinal hyperostotic mouse (twy/twy) [J]. Acta Neuropathol, 2003, 106(1):29-36.
- Corneford M, Sato K, Olmarker K, et al. A model for chronic nerve root compression studies: presentation of a porcine model for controlled, slow-onset compression with analyses of anatomic aspects, compression onset rate, and morphologic and neurophysiologic effects [J]. Spine, 1997, 22(9):946-957.
- Iwamoto H, Kuwahara H, Matsuda H, et al. Production of chronic compression of the cauda equina in rats for use in studies of lumbar spinal canal stenosis [J]. Spine, 1995, 20:2750-2757.
- Iwamoto H, Hisao, Matsuda H, et al. Lumbar spinal canal stenosis examined electrophysiologically in a rat model of chronic cauda equina compression [J]. Spine, 1997, 22(22):2636-2640.
- Yasuhara K, Murakami M, Takahashi K, et al. Chronic compression model of the cauda equina: histological and electrophysiological study [J]. J Orthop Science, 1996, 1:376-383.
- Yamaguchi K, Murakami M, Takahashi K, et al. Behavioral and morphologic studies of the chronically compressed cauda equina: Experimental model of lumbar spinal stenosis in the rat [J]. Spine, 1999, 24(9):845-851.

(收稿日期:2004-02-09 修回日期:2004-04-21)

(本文编辑 彭向峰)

消息

第三届脊柱外科新技术学习班通知

宁波市第六医院骨科拟于2005年7月29~31日举办第三届脊柱外科新技术学习班及宁波市2005年骨科论坛,届时将由著名脊柱外科专家卢世壁院士、杨述华、贾连顺、杨迪生、徐荣明、陈其昕等教授授课。

授课内容:(1)当代脊柱外科进展;(2)脊柱肿瘤手术进展;(3)枕颈固定技术;(4)寰枢椎不稳椎弓根螺钉固定和四点内固定技术;(5)颈椎侧块螺钉内固定技术;(6)颈椎椎弓根内固定技术;(7)颈椎椎间盘置换技术;(8)颈椎前路内固定技术;(9)胸椎椎弓根钉内固定技术;(10)胸腰椎畸形经椎弓根截骨矫形技术;(11)胸腰椎前路重建固定技术;(12)腰椎前、后路融合界面固定技术;(13)脊柱侧凸三维矫形技术;(14)骶髂关节复合体损伤的手术固定技术。

学习班以具有五年以上骨科临床基础的医师为主要对象,鼓励学员携带疑难病例资料交流,配有大量的内固定技术操作练习,计划招收学员40名,按报名先后顺序录取,额满为止。学习班结束后,将举办宁波市2005年骨科论坛,欢迎各位学员观摩。会务费600元(含资料费),住宿费用自理。**联系地址:**浙江省宁波市第六医院骨科 马维虎主任医师,邮政编码:315040;电话:(0574)87801999 转 2105、2107 或 13065662871。