

基础研究

经椎间孔颈脊髓压迫模型的建立

刘记存¹, 刘怀军², 徐英进³, 张 为⁴, 贺 丹², 王志红²

(1 河北医科大学第三医院放射科 050051 石家庄市; 2 河北医科大学第二医院医学影像科 050000 石家庄市;
3 河北大学医学部解剖教研室 071000 保定市; 4 河北医科大学第三医院骨科 050051 石家庄市)

【摘要】目的:探讨经颈椎椎间孔建立适合影像学研究的颈脊髓压迫模型的可行性。**方法:**10 只 12~16 月龄健康山羊, 体重 20~25kg, 随机分为实验组和对照组, 每组 5 只。手术显露左侧 C2/3 椎间孔, 将自制的导管球囊通过椎间孔置入硬膜外腔, 达 C2/3 椎间盘水平; 实验组术后第 10 天经导管缓慢注射生理盐水 0.2ml 使球囊膨胀, 注射时间为 5min, 持续压迫 40d; 对照组不注水。两组动物在术后 11d、50d 分别进行 MRI 检查、脊髓运动功能评分, 术后 50d 进行颈脊髓病理学检查。**结果:**术后 11d, MRI 检查显示球囊位于脊髓的左前方, 实验组球囊呈椭圆形, 脊髓受压变扁、信号无异常, 对照组球囊所在部位蛛网膜下腔变窄, 脊髓无明显受压、信号无异常; 每组术后 50d 与术后 11d 比较无差别; 所有 MRI 图像显示清楚, 无明显伪影。术后 11d 和 50d 时脊髓运动功能评分, 实验组分别为 3.6±0.5 分、3.8±0.4 分, 对照组均为 5 分, 同一时间点两组比较有显著性差异 ($P<0.05$)。病理学检查示实验组受压中心部位脊髓神经元和神经纤维肿胀、变性、坏死, 对照组脊髓正常。**结论:**采用经颈椎椎间孔置入导管球囊制作羊颈脊髓压迫模型保留了椎管的完整性, 能获得较满意的 MRI 图像, 适合影像学研究。

【关键词】 颈椎; 脊髓; 压迫; 动物模型; 磁共振成像; 羊

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-09-0694-04

Establishment of cervical spinal cord compression model via cervical intervertebral foramen/LIU Jicun, LIU Huaijun, XU Yingjin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(9): 694~697

【Abstract】Objective: To explore the feasibility of establishing a goat cervical spinal cord compression model via cervical intervertebral foramen for imaging research. **Method:** Ten goats of 12~16 months old, weighing 20 to 25kg were randomly divided into compression group and control group, 5 goats for each group. A balloon catheter was inserted into the epidural space via the left intervertebral foramen between C2 and C3 for each goat. The balloon was positioned at the level of intervertebral space of C2 and C3. In compression group, the balloon was inflated by slow injection of 0.2ml of saline in 5 minutes at 10 days following operation and the inflated balloon was remained for 40 days. In control group, the balloon was not inflated. Goats were evaluated with MRI and locomotor rating score at 11 and 50 days after operation. Pathological examination was made at 50 days of post-operation. **Result:** The MRI showed the balloon located in the lateral-ventral side of the spinal cord at the level of C2/3 11 days after operation. In compression group, the balloon became oval and the spinal cord was moderately compressed. In control group, the subarachnoid space became narrow and the spinal cord was not compressed. The signal of spinal cord on MRI was normal in both groups. All of the MRI images were clear without apparent distortion. The locomotor rating scores were 3.6±0.5 and 3.8±0.4 in compressed group respectively while 5.0±0.0 in control group at 11 and 50 days of post-operation and there was a significant difference in the scores between the two groups ($P<0.05$). Pathological examination demonstrated swelling and degeneration of axons and neurons in compressed group, while normal in control group. **Conclusion:** It is feasible to establish a cervical spinal cord compression model in goat with balloon catheter via intervertebral foramen. This model is suitable for imaging research as the intact of vertebral canal is preserved and satisfactory MRI images could be achieved.

【Key words】 Cervical vertebra; Spinal cord; Compression; Animal model; Magnetic resonance imaging; Goat

【Author's address】 Depart. of Radiology, Hebei Medical University Third Hospital, Shijiazhuang, 050051, China

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (编号: C2008001109), 河北省科技攻关计划项目 (课题号: 072761226)

第一作者简介: 男 (1970-), 副主任医师, 副教授, 医学博士, 研究方向: 骨关节及脊髓疾病的影像学诊断

电话: (0311) 87027951-3189 E-mail: ljcsy@163.com

脊髓型颈椎病等脊髓压迫损伤是严重危害中老年人健康的常见病。磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)在显示压迫部位、程度、范围等方面发挥着重要作用,是目前评价脊髓压迫损伤的最好方法。近年来有学者还进行了脊髓的扩散加权成像(diffusion weighted imaging, DWI)和扩散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI)的初步研究。由于很难依靠临床病例进行系统的病理学和影像学研究,通过建立动物模型进行深入研究显得尤为重要。但目前的颈脊髓压迫模型多采用经椎体置入金属螺钉进行渐进性压迫,需多次手术,且螺钉等金属器械容易在 MRI 检查时产生伪影。有的模型通过切除后方椎板置入压迫物,丧失了骨性椎管的完整性,不利于准确判断脊髓运动功能。本实验旨在探讨经颈椎椎间孔建立一种适合影像学研究的羊颈脊髓压迫模型的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

12~16 月龄的健康家养山羊 10 只,雌雄不限,体重 20~25kg,随机分为实验组和对照组,每组 5 只。

1.2 导管球囊的制备

将安全套(52±2mm, suretex limited 生产)前端作为球囊,套在硬膜外麻醉导管前端。在距离麻醉导管前端 0.2mm 和 0.8mm 处,用 3 号丝线将球囊结扎固定在导管上。导管球囊最大直径 2mm。

1.3 模型制作

术前动物禁食、禁水 24h,肌肉注射速眠新 0.1ml/kg 麻醉。右侧卧位,颈部备皮后用 2%利多卡因局部麻醉,取颈部左侧切口,钝性分离肌肉,显露左侧 C2/3 椎间孔。将导管球囊通过椎间孔向前、向上缓慢置入硬膜外腔至 C2/3 椎间盘水平,导管固定于椎间孔旁软组织,逐层缝合颈部切口,导管另一端留置于体外。术后 3d,每日肌肉注射青霉素 80 万单位。实验组术后第 10 天经导管缓慢注射生理盐水 0.2ml 使球囊膨胀(通过预实验发现,体重 20~25kg 的山羊,球囊内一次性注水 0.2ml 能导致明显的运动功能损伤,但又不至于导致严重瘫痪),注射时间为 5min。注射后封闭导管外口,球囊持续压迫 40d。对照组不注水,术后观察 50d。所有山羊正常圈养,无死亡。

1.4 脊髓运动功能评分

术后第 11 天、50 天对两组动物进行脊髓运动功能评分,采用 Tarlov 运动功能评分方法^[1],并进行了改进:5 分,正常步态,可以跳跃;4 分,能跑不能跳;3 分,能走不能跑;2 分,肢体可以站立,不能走;1 分,肢体可以活动但不能站立;0 分,肢体完全瘫痪。

1.5 MRI 检查

术后第 11 天、50 天对两组动物分别进行 MRI 检查。使用 GE 公司 3.0T Signa Excite 超导 MR 机,相控阵脊柱线圈。动物肌肉注射速眠新 0.1ml/kg 麻醉,左侧卧位。常规行矢状面、冠状面及横轴面 T2WI(快速自旋回波序列,重复时间 2400ms,回波时间 119ms)和 T1WI(自旋回波序列,重复时间 2957ms,回波时间 25.8ms,反转时间 920ms)。矢状面和冠状面层厚 2mm,层间距 0,视野 260mm×260mm,采集矩阵 384×256。横轴面层厚 4mm,层间距 0.5mm,视野 140mm×140mm,采集矩阵 256×256。薄层横轴面 T2WI,层厚 2mm,层间距 0。扩散张量成像检查与常规横轴面扫描定位相同,采用单次激发自旋回波平面回波成像序列,扩散加权系数 500s/mm²,扩散敏感梯度取 6 个不同方向,重复时间 4000ms,回波时间最小,层厚 4mm,层间距 0.5mm,视野 240mm×240mm,采集矩阵 128×128,激励次数 4。应用 Func Tool 2 软件对扩散张量图像进行后处理。处理后的每一个层面分别获得弥散系数图和部分各向异性图。选择椭圆形感兴趣区,放置在脊髓的中部,大小约 20mm²,注意避开脑脊液的部分容积效应、磁敏感伪影和运动伪影的影响,测量弥散系数值和部分各向异性值。脊髓受压程度以脊髓压迫率(compression ratio, CR)表示,在薄层横轴面 T2WI 选择脊髓受压最重的层面测量脊髓最小径和最大径,计算二者比值为 CR 值。

1.6 病理学检查

造模术后 50d,两组动物肌肉注射速眠新 0.2ml/kg 麻醉。手术暴露 C2~C3 脊髓,以放置的球囊部位为中心,切取长 3cm 脊髓组织。将中心处切下长约 7mm 和 2mm 组织,分别用于光镜和电镜检查。

1.6.1 光镜检查 标本置入磷酸盐缓冲液中,常规石蜡包埋,横切片,片厚 5μm,取中间 10 层进行 HE 染色,在光镜下观察。

1.6.2 电镜检查 在每只动物脊髓标本的左侧灰质前角、白质前索、侧索处,各切取 1mm^3 的组织块 3 块,将标本置入 2.5%戊二醛溶液,1%锇酸后固定,丙酮脱水,包埋,超薄切片,片厚 50nm ,醋酸铀染色,每块组织标本各取 4 张切片,应用日立 H-7500 透射电镜观察。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件处理数据,样本均数用 $\bar{x}\pm s$ 表示,所有数据作均数的 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况及脊髓运动功能评分

实验组 1 只动物置入球囊术后清醒时即出现双侧前肢瘫痪,予以重新补充。两组其余动物术后第 2 天行走正常,但跑动减少;术后第 5 天活动恢复正常,运动功能评分均为 5 分。实验组动物术后第 11 天即注水压迫后第 2 天四肢肌力下降,以左侧肢体为著,运动功能评分为 3.6 ± 0.5 分;术后 50d 时运动功能评分 4 分 4 只,3 分 1 只,平均 3.8 ± 0.4 分。对照组术后第 11 天和 50 天时,运动功能评分均为 5 分。两组术后 50d 时的运动功能评分有统计学差异(t 检验, $t=3.975$, $P=0.003$)。

2.2 MRI 表现

术后 11d MRI 检查显示球囊位于脊髓的左前方,实验组球囊 T2WI 呈椭圆形高信号,脊髓受压变扁,CR 值 0.58 ± 0.09 ,脊髓信号无异常(图 1~4,后插页 IV);对照组球囊 T2WI 呈低信号,所在部位蛛网膜下腔变窄,脊髓无明显受压,CR 值 0.77 ± 0.08 ,脊髓信号无异常(图 5~8,后插页 IV);实验组脊髓 CR 值低于对照组(t 检验, $t=6.487$, $P=0.001$)。所有图像显示清楚,没有明显伪影。正常羊颈髓的弥散系数为 $(1.25\pm 0.05)\times 10^{-3}\text{mm}^2/\text{s}$,部分各向异性值为 0.72 ± 0.06 。术后 50d 两组 MRI 检查与术后 11d T1WI、T2WI 图像无差别。

2.3 病理学改变

实验组:术后 50d 时 HE 染色光镜下观察,脊髓受压部位组织轻度水肿,神经元周围空泡形成;神经纤维轴索部分消失,可见炎细胞浸润和胶质细胞增生(图 9、10,后插页 IV);电镜观察脊髓受压部位有髓神经髓鞘部分板层状结构紊乱,部分明显分层;轴索明显水肿,线粒体和微丝、微管的数量减少,线粒体大部分嵴、部分膜融合或消失

(图 11,后插页 IV)。对照组:术后 50d 时脊髓放置球囊部位光镜和电镜观察未见明显异常(图 12~14,后插页 IV)。

3 讨论

建立合适的动物模型是深入进行颈脊髓压迫影像学研究的前提。理想的动物模型应能自由控制压迫程度、速度和持续时间,损伤小,能获得高质量的 MRI 图像,没有明显的变形和伪影。目前的动物模型都有一些不足。如采用螺钉或其他金属器械从椎体前方置入,每隔 2~4 周需再次手术进行加压,一般需要 3~4 次手术进行加压,对动物损伤大,而且每次加压都是一次急性损伤^[2~4]。有人经椎体或椎间孔直接置入螺钉,一次性加压到位,但手术过程中容易导致脊髓挫伤^[5~6]。另外,置入的螺钉等金属物在 MRI 检查容易产生金属伪影。采用肿瘤组织、骨组织作为压迫物造模时需通过手术或注射等方法将肿瘤细胞和诱导成骨物质置入到椎管内,肿瘤组织和骨组织逐渐生长,对脊髓产生压迫^[7~9]。这种方法产生的压迫是逐渐增加的,与临床的渐进性压迫最接近。压迫物为骨组织或肿瘤组织,与椎间盘、骨赘等常见压迫物相似。但肿瘤组织和骨组织的生长难以准确控制,不能准确控制压迫的程度、速度、持续时间,而且植入的肿瘤组织还可能侵犯脊髓等结构,出现压迫以外的损伤。本研究借鉴 Tarlov 等方法^[1],采用自制的导管球囊内注射生理盐水作为压迫物。主要是考虑球囊柔软,不会刺伤周围组织。连接导管选用麻醉置管,有硬度,不易变形脱落,容易固定于椎旁组织^[10]。注射生理盐水后球囊在 MRI 显影清楚,与邻近的骨组织、脊髓等分界清楚,图像质量好,没有伪影。本方法容易控制压迫的程度、速度、持续时间,加压过程通过导管外口注射生理盐水,不需要再次手术。

以往的球囊置入方法多是从后路切除椎板置入球囊^[11,12],方法虽然简单,但切除椎板会破坏椎管完整性,影响脊柱的稳定性,不利于动物活动,易产生继发损伤,影响对脊髓功能的准确评价;有局部减压作用,改变了自然病程。由于手术部位解剖结构发生改变,MRI 图像质量也较差。Fukuda 等^[11]采用经犬 L3/4 椎间孔置入导管球囊,向头侧推进球囊至 L1 水平,注射生理盐水使球囊膨胀,压迫 10min 后取出球囊。经颈椎椎间孔置入球囊

还未见报道。本研究借鉴 Fukuda 的方法,经颈椎椎间孔置入球囊,并进行长时间压迫。将球囊从后向前斜行插入椎间孔,球囊进入脊髓的前侧方,与 Fukuda 报道的球囊位于脊髓后方不同。这可能是腰椎和颈椎的结构差异所致。脊髓型颈椎病病例多数是椎间盘突出、椎体骨质增生等引起的脊髓腹侧受压,本模型与此类似。由于受压最明显的部位是前索和侧索,损伤后主要表现为运动异常,易于通过运动功能评分评价脊髓功能。由于保持了椎管结构的完整性,更符合临床实际,而且压迫部位的解剖结构清楚,MRI 图像质量较好。

本研究在造模后第 10 天,待动物的行为完全恢复正常以后,向球囊内注水,对脊髓产生压迫,排除了造模手术本身对脊髓造成的损伤。这样,所观察到的运动功能和 MRI 的变化都是由于压迫所致,不是造模手术所致。脊髓的病理改变主要是神经细胞和神经纤维的水肿、变性,炎细胞浸润,与文献报道的脊髓压迫性损伤病理改变类似^[11,13]。对照组造模术后 50d 病理检查没有明显异常,说明本模型是单纯的压迫损伤模型。本研究发现,对体重 20~25kg 的山羊,球囊内一次性注水 0.2ml 能导致明显的运动功能损伤,但又不至于造成严重瘫痪。但实验组不同个体的运动功能评分有所差别,可能是由于不同个体椎管的大小有所不同所致。以后仍需进一步探索提高模型的一致性。

本研究选用山羊制作动物模型,主要是考虑山羊体形较大,颈髓较粗大。应用临床 MRI 机,不需要专门的线圈,就能获得满意的图像^[14]。另外,山羊性格温顺,容易管理,便于多次 MRI 复查和进行行为学评分。采用单次激发自旋回波平面回波成像序列,扫描时间短,总体图像质量较好,没有明显的变形和伪影。本研究测定的正常羊颈髓的弥散系数值、部分各向异性值与文献^[15-17]报道的鼠、犬、人的相近,说明本模型测定的这些数值是准确可靠的。

总之,经颈椎椎间孔置入导管球囊可成功制作颈脊髓压迫模型,压迫程度、压迫速度和持续时间可控,易于通过运动功能评分评价脊髓功能;没有切除椎板,保留了骨性椎管的完整性,也没有金属伪影,适合用于影像学研究。

4 参考文献

1. Tarlov IM, Klinger H, Virala S. Spinal cord compression studies (I): experimental technique to produce acute and gradual compression[J]. Arch Neurol Psychiatry, 1953, 70(6): 813-819.
2. 蔡钦林, 黄云忠, 杨文, 等. 慢性压迫性颈脊髓病超微病理变化的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 1996, 6(6): 254-256.
3. 蔡钦林, 杨文, 黄云忠, 等. 犬慢性压迫性颈脊髓病的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 1996, 6(5): 210-214.
4. 王新家, 孔抗美, 齐伟力, 等. 慢性渐进性压迫对大鼠行为功能及脊髓运动神经递质表达的影响[J]. 汕头大学医学院学报, 2002, 15(3): 147-148.
5. 胡志俊, 卞琴, 王拥军, 等. 大鼠脊髓慢性压迫性损伤动物模型的建立[J]. 脊柱外科杂志, 2004, 2(4): 216-219.
6. 王与荣, 顾祖超, 赵建宁, 等. 颈脊髓压迫模型的建立及意义[J]. 医学研究生学报, 2002, 15(3): 220-222.
7. 宁斌, 郑修军, 胡有谷. 慢性压迫性脊髓损伤模型的制作方法[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(5): 316-318.
8. 戎利民, 李佛保, 蔡道章. 脊髓型颈椎病动物模型的初步建立[J]. 解剖学杂志, 2001, 23(4): 313-315.
9. 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 Berl, 2003, 106(1): 29-36.
10. 张峡, 王正国, 朱佩芳. 脊髓腹侧压迫损伤模型的建立与病理学观察[J]. 创伤外科杂志, 2004, 6(3): 164-166.
11. Fukuda S, Nakamura T, Kishigami Y, et al. New canine spinal cord injury model free from laminectomy [J]. Brain Res Protoc, 2005, 14(3): 171-180.
12. Purdy PD, Duong RT, White CL, et al. Percutaneous translumbar spinal cord compression injury in a dog model that uses angioplasty balloons: MR imaging and histopathologic findings[J]. AJNR, 2003, 24(2): 177-184.
13. 舒衡生, 于建华, 孙志明, 等. 大鼠压迫性脊髓损伤的特征性超微病理表现[J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(12): 921-922.
14. 吴叶, 侯树勋, 何海龙, 等. 颈脊髓慢性压迫模型的建立及其病理改变[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(1): 57-61.
15. Ford JC, Hackney DB, Alsop DC, et al. MRI characterization of diffusion coefficients in a rat spinal cord injury model[J]. Magn Reson Med, 1994, 31(5): 488-494.
16. Schwartz ED, Hackney DB. Diffusion-weighted MRI and the evaluation of spinal cord axonal integrity following injury and treatment[J]. Exp Neurol, 2003, 184(2): 570-589.
17. 王霄英, 谭可, 倪石磊, 等. MRI 和 DTI 评价犬急性脊髓损伤后的形态及功能改变[J]. 中国医学影像技术, 2004, 20(12): 1821-1824.

(收稿日期: 2008-05-23 修回日期: 2008-07-03)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 李伟霞)