

综述

腰椎管狭窄症动物模型研究进展

高松, 刘海鹰, 钱亚龙

(北京大学人民医院脊柱外科 100044 北京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.01.15

中图分类号: R681.5, R-332 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-01-0066-03

腰椎管狭窄是导致腰痛或腰腿痛的常见原因之一。随着社会的老齡化, 腰椎管狭窄症的发病率日渐增高, 对腰椎管狭窄症及脊髓损伤的研究也逐渐增多。腰椎管狭窄动物模型的制作对于探讨病因及治疗方法的研究具有重要意义。通过建立腰椎管狭窄的动物模型, 产生与临床腰椎管狭窄症相类似的马尾神经损害, 在实验动物活体内模拟并观察腰椎管狭窄的过程、生化物质的检验分析、神经电生理的改变及其他伴随症状, 从而为腰椎管狭窄症的病因学、病理学及电生理学的研究提供参考依据, 进而对腰椎管狭窄症的疾病转归、治疗方法和药物治疗的预期效果进行评估。但国内对腰椎管狭窄的动物模型研究并不多, 实验动物及实验方法选择不合理的问题普遍存在, 影响了实验结果。笔者就腰椎管狭窄实验动物的选择、模型的制备方法及其适用范围做一综述。

1 急性腰椎管狭窄模型

1.1 Delamarter 狭窄带法

Delamarter 等^[1]将动物硬膜囊及双侧 L5 神经根显露, 测量 L5 椎体水平的椎管周长($C=2\pi r$)、椎管面积($A=\pi r^2$)。根据实验要求的椎管狭窄程度, 计算出需要狭窄带的长度, 在 L5 椎体水平处用尼龙制成的狭窄带捆扎硬膜囊, 含双侧 L5 神经根在内。按此法分别制作马尾受压 25%、50%、75% 的模型, 3 个月后, 压迫 25% 组神经功能未见损伤, 皮质诱发电位轻度改变, 可见微小的组织学改变, 受压部位神经根静脉充血; 受压 50% 组出现轻度运动障碍, 皮质诱发电位明显改变, 受压部位神经根出现水肿和脱髓鞘反应, 中到重度的静脉充血; 压迫 75% 组失去运动功能, 小便失禁。Richard 等^[2]利用此种方法建立压迫脊髓 60% 的模型, 建模 6h 后进行减压手术, 并与单纯注射甲基强的松龙(MP)的疗效比较, 研究发现, 模型建立时所有动物均出现截瘫、大小便失禁及躯体感觉诱发电位消失, 减压术后不论注射 MP 与否, 术后 2 周神经电生理学指标恢复均强于单独注射 MP 组。杨平林等^[3]将尼龙带换成动脉瘤夹, 用压力约为 98N 的力夹闭脊髓 3min, 取脊髓中央管周围室管

膜区脊髓白质与灰质标本, 用无血清神经干细胞培养基进行培养, 并用含血清神经干细胞培养基进行诱导分化, 观察发现损伤反应性巢蛋白和胶质酸性纤维蛋白阳性共存的细胞的增殖数量及增殖指数明显高于对照组。

此类方法适用于制作较大型动物的急性椎管狭窄模型, 操作简单、效果明确、价格低廉, 行为学及形态学的可重复性及可信赖性好^[4,5], 并且可较为精确地控制狭窄程度, 避免由于狭窄程度不同对研究造成的干扰。目前广泛用于研究狭窄程度与症状、电生理变化、组织学及病理生理学指标的变化。其不足之处在于手术创伤较大, 需大范围切除椎板, 形成纤维粘连瘢痕, 可能影响实验结果, 并且置入物可能发生异物反应。

1.2 硅片填充法

Yamaguchi 等^[6]将 SD 大鼠麻醉后俯卧位固定, 沿脊柱正中中线切开皮肤, 在显微镜下暴露 L4、L5 椎板, 并切除 L4、L5 间黄韧带, 将一厚 0.3mm、面积为 3.5mm² 的硅片放置于 L4 硬膜囊的后方, 硅片大约占据椎管面积的 37%。6 周时观察硅片周围出现纤维组织, 马尾神经根纤维粘连明显、髓鞘肿胀退变、粗纤维减少、细纤维增多, 电镜下发现细胞质聚集, 空泡、致密体增多。Sekiguchi 等^[7]将厚度为 0.5mm、1mm 和 2mm 的硅片分别置入三组小鼠 L4 及 L6 硬膜囊后方, 结果显示 0.5mm 组原发性脱髓鞘反应是最主要的病理变化; 1mm 和 2mm 组表现出更严重的损伤, 肿瘤坏死因子 α 表达增加。Toshinori 等^[8]用此种方法建立椎管压迫约 50% 的模型, 术后第二天检查发现动物痛觉明显减退, 出现间歇性跛行, 脊髓腹侧部神经元及马尾 Schwann 细胞 Rho 族 GTP 酶高表达。

该方法常用于小型动物的急性腰椎管狭窄模型的建立, 成功率高, 狭窄程度相对易于控制, 但该类模型对置入物要求较高, 易发生异物反应, 切除椎板会造成瘢痕、粘连、炎症反应等非预期效应, 置入硅片过程中操作不当可能造成严重腰椎滑脱影响实验结果, 其应用受到限制^[9,10]。

1.3 球囊导管压迫法

1999 年 Oro 等^[11]发明一种球囊装置, 可建立具有可重复性的脊髓受压模型。将一乳胶气球连接到颅内压测量器上, 置入暴露好的脊髓节段并在上下棘突固定, 再使球囊体积从 0.12ml 扩张至 0.34ml, 使球囊膨胀, 从而造成脊髓压迫。通过术前、术中及术后的动作电位测量, 验证了该

第一作者简介: 男(1982-), 博士在读, 研究方向: 脊柱外科

电话: (010)88324110 E-mail: gaos615@163.com

通讯作者: 刘海鹰 E-mail: Liu_haiying@263.net

模型的有效性。Secer 等^[12]从左右双侧切开兔 L6 椎体上下方的黄韧带,在 3/0 带针线的引导下,将两条 3F 的福格蒂导管放置于 L6 椎板下方,并将该导管的上端固定于 L5 棘突,以便能够保证导管的气囊部分准确放置于 L6 椎板的下方,向两条导管中各注入 0.15ml 空气。15d 后组织病理学发现脊髓圆锥与马尾神经标本神经细胞数量减少、神经细胞核仁缺失、空泡变性及间质纤维组织增多。电生理表现为体感诱发电位的波幅降低、潜伏期延长。Lee 等^[13]将其进一步改良:用脊髓穿刺针从腰骶连接处穿至硬膜外腔,从针芯传入导丝,在 X 线透视下确认导丝位置后拔出穿刺针,用扩张器扩张针孔,导丝引导下插入气囊导管,到达预期节段,向气囊充入半浓度的欧乃派克,通过 X 线透视可调节脊髓受压的程度。该方法可重复性建立下肢截瘫模型,对周围肌肉及骨骼等组织无影响,在不损伤椎管及硬膜条件下尽可能模拟临床病理特点及损伤机制^[13,14]。加之其手术创伤小,时间短,大大降低了由手术因素影响实验结果的可能性。是目前应用较广泛的急性椎管狭窄模型建立方法。有人将球囊连接在空气压缩机上并间隔一定时间少量泵入空气来制作慢性狭窄模型,但由于装置复杂,动物行动不便,球囊导管容易脱出等,应用较为局限。

2 慢性腰椎管狭窄模型

2.1 骨粒回植法

龚炎培等^[15]将大鼠椎板切除后用碎骨粒回植于硬膜外,一定时间后可突入椎管内,压迫硬膜囊。术后 9 个月测量大鼠步行距离、知觉过敏度、脊髓体感诱发电位波幅,与正常大鼠比较有明显差别 ($P<0.01$),并且神经根粘连明显,椎管明显狭窄,马尾神经纤维之间明显粘连,并和硬脊膜粘连,间质细胞数增加及明显肿胀。周磊等^[16]将碎骨粒缝合于椎板缺损处,在椎板再生过程中,碎骨粒可突入椎管内,一方面可以起到压迫硬膜囊的作用,另一方面又可作为椎板骨再生的支架和促进物。椎管内瘢痕增生并与硬膜囊粘连造成椎管自外向内的进行性压迫,使椎管逐渐狭窄,在以上因素协同作用下,12~16 周就可出现狭窄模型。

此种方法造成狭窄的压迫来自四周且缓慢加重,临床再现性好。间歇性跛行和逐渐加重的下肢感觉障碍的典型腰椎管狭窄症状都得到了良好模拟。该方法无异物植入,成本较低。但手术范围及手术创伤较大,存在肌肉损伤及瘢痕粘连等非预期效应^[13],而且对狭窄的控制性较差,对大型实验动物应用性相对较低,限制了该模型的应用。

2.2 环扎法

Iwamoto 等^[17]将 3 周龄的大鼠麻醉后行背部纵行切口,用一块不锈钢板紧贴 L5 椎体,一根不锈钢圈紧紧缠绕 L5 椎体。在成长过程中,由于骨骼生长导致不锈钢圈逐渐切断椎管后缘,慢慢导致脊髓受压症状。在模型建立 1 年后观察,未见实验动物发生瘫痪,组织学检测发现神经纤维轴索变性,脱髓鞘,空泡样变性;硬膜内血管减少;电生理检查发现马尾传导速度减慢。该方法更接近慢性腰椎管

狭窄的形成过程,适用于对腰椎管狭窄的病因及发病机制的研究,但实验时间较长,幼年动物难以耐受此类较大手术,手术成功率较低,限制了该方法的应用。

2.3 螺钉拧入法

孙正义等^[18]将大鼠行椎板钻孔,用直径 3mm、螺距 0.5mm 的塑料螺钉旋入椎板,每隔 3~5d 显露螺钉,将螺钉旋入 0.25mm 制作大鼠慢性压迫模型,通过摄 X 线片检查,发现 28d 时脊髓受压 50%。通过术后 28d 的行为学、病理学、细胞凋亡率及凋亡基因检查,验证了慢性压迫性脊髓损伤可导致神经细胞凋亡,同时可激活内源性保护机制,使脊髓发生适应性改变。

该方法的优点是创伤较小,能较精确地控制压迫程度;不足之处在于其手术操作较为复杂,在拧入螺钉时可能造成脊髓的直接损伤;大鼠椎板比较狭窄,要做到既开孔又不损伤脊髓,操作起来有一定难度;大鼠椎板较薄,而且硬膜外腔狭窄,要使螺距为 1mm 的螺钉保持稳定,而又不致损伤脊髓,也是非常困难的;术后大鼠椎板间的距离会随着脊柱的屈伸活动发生变化,导致螺钉松动、脱落,影响压迫效果^[19]。

综上所述,腰椎管狭窄动物模型的建立还有待完善,较理想的模型应该具备较容易建立、易于成功复制、较少损伤周围组织、尽量保留椎板的完整性、可以较为准确地控制狭窄程度、不受动物体型的限制、能全面反映椎管狭窄特点等条件。对模型的评估可从可操作性、可重复性、损伤程度三个方面来衡量。球囊压迫法避免了椎板切除,去除了由此造成的干扰,是应用最广、最有前景的模型制作方向;狭窄带法及填充法虽创伤较大,但是可操作性及可重复性均较好,也被广泛应用;而三种慢性狭窄模型由于可操作性、可重复性及可控性较差,应用受到限制^[20-24]。目前对于慢性椎管狭窄模型的研究尚不充分,建立一个能充分反映慢性狭窄特点的、可重复性及可控性较好的模型是当务之急。

另外,椎管狭窄的发病原因较多,分类复杂。根据不同的发病原因所建立的椎管狭窄模型其病程进展不尽相同,而不同的动物种属、造模机制所建立的模型又有其各自的特点。在选择模型时应根据临床需要、对椎管狭窄某个方面进行研究的需要以及后续实验研究的需要进行综合考虑,以选择和建立与之相适应的椎管狭窄动物模型。

3 参考文献

1. Delamarter RB, Bohlman HH, Dodge LD, et al. Experimental lumbar spinal stenosis: analysis of the cortical evoked potentials, microvasculature and histopathology [J]. J Bone Joint Surg Am, 1990, 72(1): 110-120.
2. Rabinowitz RZ, Eck JC, Harper CM, et al. Urgent surgical decompression compared to methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: a randomized prospective study in beagle dogs [J]. Spine, 2008, 33(21): 2260-2268.

3. 杨平林, 贺西京, 李浩鹏, 等. 成年大鼠压迫性脊髓损伤后损伤区神经干细胞的分离培养实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(2): 151-155.
4. Marques SA, Garcez VF, Del Bel EA. A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment [J]. J Neurosci Methods, 2009, 177(1): 183-193.
5. Kontogeorgakos VA, Voulgaris S, Korompilias AV, et al. The efficacy of erythropoietin on acute spinal cord injury: an experimental study on a rat model [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2009, 129(2): 189-194.
6. Yamaguchi K, Murakami M, Takahashi K, et al. Behavioral and morphologic studies of the chronically compressed cauda equina [J]. Spine, 1999, 24(9): 845-851.
7. Sekiguchi M, Kikuchi S, Myers RR. Experimental spinal stenosis: relationship between degree of cauda equina compression, neuropathology, and pain [J]. Spine, 2004, 29(10): 1105-1111.
8. Toshinori I, Seiji O, Katsuhiko H, et al. Rho kinase inhibitor improves motor dysfunction and hypoalgesia in a rat model of lumbar spinal canal stenosis [J]. Spine, 2007, 32(19): 2070-2075.
9. Toshinori I, Seiji O, Gen I, et al. Glial phosphorylated p38 MAP kinase mediates pain in a rat model of lumbar disc herniation and induces motor dysfunction in a rat model of lumbar spinal canal stenosis [J]. Spine, 2007, 32(2): 159-167.
10. Takenobu Y, Katsube N, Marsala M, et al. Model of neuropathic intermittent claudication in the rat: methodology and application [J]. J Neurosci Methods, 2001, 104(2): 191-198.
11. Oro JJ, Gibbs SR, Haghighi SS. Balloon device for experimental graded spinal cord compression in the rat [J]. Spinal Disord, 1999, 12(3): 257-261.
12. Secer HI, Izci Y. The CSF creatine kinase-BB isoenzyme activity in experimental lumbar spinal stenosis model [J]. Spinal Disord Tech, 2008, 21(2): 148-152.
13. Lee JH, Choi CB, Chung DJ, et al. Development of an improved canine model of percutaneous spinal cord compression injury by balloon catheter [J]. J Neurosci Methods, 2008, 167(2): 310-316.
14. Onda A, Yabuki S, Iwabuchi M. Lumbar sympathectomy increases blood flow in a dog model of chronic cauda equina compression [J]. J Spinal Disord, 2004, 17(6): 522-525.
15. 龚炎培, 高井宏明. 腰椎管狭窄动物模型的实验研究 [J]. 南通医学院学报, 2003, 23(4): 412-413.
16. 周磊, 李明, 刘培来, 等. 椎板切除碎骨粒回植法制作腰椎管狭窄动物模型 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2007, 25(6): 660-664.
17. Iwamoto H, Matsuda H, Noriage A, et al. Lumbar spinal canal stenosis examined electrophysiologically in a rat model of chronic cauda equina compression [J]. Spine, 1997, 22(22): 2636-2640.
18. 孙正义, 赵斌, 洪光祥, 等. 大鼠脊髓慢性压迫及减压后神经细胞凋亡及其相关基因的表达 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2003, 13(3): 164-167.
19. 梁益建, 孙善全, 汪克建, 等. 大鼠脊髓慢性压迫性损伤实验模型的建立 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2006, 24(3): 320-324.
21. Sato K, Konno S, Yabuki S, et al. A model for acute, chronic, and delayed graded compression of the dog cauda equina [J]. Spine, 1995, 20(22): 2386-2391.
20. Watanabe K, Konno S, Sekiguchi S, et al. Spinal stenosis: assessment of motor function, VEGF expression and angiogenesis in an experimental model in the rat [J]. Eur Spine J, 2007, 16(11): 1913-1918.
22. 孙琳, 潘少川. 脊柱实验研究中动物模型的选择与实验设计 [J]. 中华小儿外科杂志, 2001, 22(5): 313-314.
23. 李长青, 周跃, 梅芳瑞. 不同程度椎管狭窄对马尾神经脑脊液营养来源影响的实验研究 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2002, 12(5): 356-358.
24. 李长青, 周跃, 梅芳瑞. 实验性腰椎椎管狭窄的神经功能及组织学变化 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(2): 262-264.

(收稿日期: 2009-07-21 修回日期: 2009-08-12)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

中国老年学学会脊柱关节疾病专业委员会第三届学术大会会议通知

中国老年学学会脊柱关节疾病专业委员会第三届学术大会定于 2010 年 6 月中旬在浙江省温州市举行。由中国老年学学会脊柱关节疾病专业委员会主办, 浙江省温州医学院附属第二医院骨科承办。大会将邀请国内外知名专家授课, 并希望国内有关专业的专家积极投稿。

征稿内容: 老年脊柱、关节疾病如老年性骨质疏松症、骨质疏松性骨折、老年退行性脊柱疾病、老年退行性骨关节疾病等内容的预防、诊断、治疗、围手术期处置的临床经验及相关内容的研究进展。

会议具体时间地点见第二轮通知。

征稿截止时间: 2010 年 5 月 15 日。

联系人: 林胜铭; 联系电话: 15088981225, 0577-88879123; E-mail: feygm@126.com。