

大鼠脊髓源性痉挛模型的建立和评价

王 杰¹ 敖丽娟^{1,2} 李咏梅¹ 王文丽¹ 陈茉弦¹

脊髓损伤患者经常遭受继发的病损,其中痉挛就是其中之一,据报道50%—60%的脊髓损伤患者会出现痉挛^[1-3]。痉挛,特别是严重的异常痉挛模式的存在,使患者行走困难、平衡障碍、生活不能自理等,并使患者的生存质量受到严重影响,也给患者家属带来了很大痛苦,已成为临床亟待解决的难题和国际医学研究的热点^[4]。过去的研究认为脊髓源性痉挛是以多突触通路的抑制性影响减弱或消失引起的反射亢进,所以大部分的治疗措施的目标就是降低过强的反射,但是患者依然遭受着痉挛的痛苦^[5-8]。为深入研究痉挛的病理生理变化和治疗痉挛的作用机制,建立一种可靠的动物模型已成为当务之急。

1 完全性下位骶段脊髓横断大鼠尾肌痉挛模型

1992年,Ritz等发现,损伤了猫的下位骶段脊髓以后,引起猫尾肌的痉挛而不影响其膀胱、肠道和下肢的功能,并且认为这种尾肌和人类脊髓损伤后的痉挛综合征很相似^[9]。但是由于动物实验多用大鼠而不是猫,所以这种实验方法并没有广泛应用^[10]。1999年,Bennett等建立了S₂脊髓损伤痉挛模型,并建立了一系列的评估方法,以后这种大鼠尾肌痉挛成为一种比较常用的痉挛动物模型^[4]。

1.1 方法

成年雌性SD大鼠,200—250g,动物在联合应用氯胺酮(50mg/kg体重)和赛拉嗪(5mg/kg体重)进行深麻,在无菌的条件下进行手术操作,选择逐层打开背部各层结构,打开硬脊膜,在S₂脊髓水平应用镊子和虹膜切除剪进行完全横断,并且注意不要损伤背部的动脉,因其维持骶尾段脊髓的基本血液循环。因为损伤节段在S₂,因此这种方法既不影响大鼠的四肢运动功能,也不影响肠道和膀胱的功能,因为肠道和膀胱功能的控制是在L₆—S₁₋₂的脊髓节段。术后注意减压,并且在术后前4d应用氨苄西林每天2次以预防感染^[10]。

1.2 评估

1.2.1 行为评估:S₂脊髓损伤后尾部肌肉痉挛的发展过程的评估应用Bennett等总结的痉挛发展四阶段法,观察到在静息张力下,尾部的自发痉挛和阵挛,并且记录尾部对被动的

牵拉、皮肤刺激和轻微的按压的反应^[10-11]。

1.2.2 表面肌电图评估:用一个管状的装置固定大鼠的躯干和四肢,仅保留尾部能在外活动,刺激大鼠尾部产生屈曲反射,同时应用表面肌电图记录痉挛大鼠尾肌的活动^[10,12]。

1.2.3 神经刺激和H反射的评估:应用上述固定装置固定大鼠,在大鼠清醒状态下,刺激大鼠尾部神经,同时记录M波和H反射,并进行H/M比值的分析,发现痉挛大鼠尾部H波幅增高,H/M比值增大^[10,12]。

1.3 优点

这种痉挛模型不影响大鼠的肠道、膀胱、下肢和爬行功能,造成的损伤小,护理简单,感染和死亡率低;并且这种模型造成的肌肉痉挛的特征和持续时间与临床上脊髓损伤患者很相似。这种模型主要用来研究脊髓损伤后神经机制^[10]。

1.4 缺点

现在有些人认为这种痉挛大鼠模型是不合适的:①大鼠的尾巴和人的下肢是很不相同的,并且痉挛的临床特征在痉挛的大鼠尾巴上很少体现。②人类痉挛是一种多因子综合征,现在应用这种模型的研究主要集中在单独的肌张力或者神经兴奋性的增加,而没有综合障碍的报道,并且不适合痉挛肌肉特性的研究。所以,对痉挛大鼠尾巴的研究很难满足探索人类痉挛的需要^[13]。

2 脊髓局部缺血性痉挛模型

缺血性脊髓病是多种疾病的并发症,随着人口的老龄化和血管外科的发展,其发病率有增高的趋势,众多实验表明脊髓创伤除机械等因素的原发损伤外,更主要的是其后的脊髓缺血、缺氧所致的各种继发损害可导致原本可逆的感觉和运动功能障碍变为持久性的,并且常继发严重的痉挛性运动功能障碍。

1997年Kanellopoulos等^[14]结合介入放射学方法用气囊栓塞法在主动脉水平阻断血流,制备了损伤程度不同的脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)模型。2002年Sufianova等^[15]利用闭塞腹主动脉及其支脉使得腰段脊髓暂时性缺血,制备脊髓缺血损伤模型。在制作脊髓暂时局部缺血动物模型中,发

现这种脊髓损伤模型也可引起痉挛,所以这种脊髓缺血损伤模型也被用作制作脊髓损伤后痉挛模型。

2.1 方法

SD大鼠,首先用异氟烷麻醉,利用恒温系统保持体温在37℃,通过尾动脉导管检测周围动脉压和心率,左侧颈动脉插入20号聚四氟乙烯插管以减少血供,避免颈内动脉压过高。为造成脊髓缺血,一个2F福格蒂导管左股动脉到达胸主动脉,尖端到达锁骨下动脉的水平。这个动脉内球状导管被充满一种软接触镜保护液(含硫柳汞、硼酸和EDTA),阻断动脉里的血液流动,通过一种直接的血压测量方法进行持续周围动脉血压监测,保持系统血压(40mmHg)。60s后,抽去球状管里的液体,恢复血液灌注,并且皮下注射抗凝药,10min后恢复动脉血压稳定,并缝合切口。一般脊髓缺血损伤后7—10d出现痉挛^[16-18]。

2.2 评估

可观察到足趾背伸张开,旋转踝关节时感觉到肌肉抵抗,并且表面肌电图可观察到腓肠肌的痉挛性电活动,刺激胫神经,记录M波、H波及H/M波幅的比值。

2.3 优点

本模型很好地模拟了人类脊髓缺血性损害后痉挛,并且与常用的下位骶段脊髓损伤引起的大鼠尾肌痉挛相比,本模型引起了大鼠后肢肌肉的痉挛,和人类的下肢痉挛更接近,并且可以用于研究痉挛后肌肉的变化机制。

2.4 缺点

本模型的手术操作较复杂,要求较高的手术操作技术,并且阻断大血管的血流,如时间过长可造成动物死亡率高;且影响大鼠的肠道和膀胱功能,有更高的护理要求。

3 脊髓撞击损伤后痉挛模型

1911年Allen^[19]首次设计了脊髓背侧打击模型,该打击法利用不同重量的重锤从不同的高度沿一套管垂直落下打击脊髓背侧造成不同程度的损伤,此致伤方法与临床脊柱骨折脱位损伤脊髓更加相似,后人又不断进行了改进^[20]。由于此方法操作较简单,且与临床脊髓损伤吻合度相对较好,近年来也用来制作大鼠脊髓源性痉挛模型。

3.1 方法

SD大鼠,100g/L水合氯醛300mg/kg体重行大鼠腹腔内麻醉,生效后,予胸腰背部手术区备皮,俯卧固定于手术台,以T10棘突为中心,体表定位,常规消毒、铺巾,背部正中纵切口,显露T8—T12棘突及椎板,切除T9—T10棘突及椎板,暴露相应脊髓段作为损伤区。使用自制大脑三维定位仪改良设计的Allen打击装置,应用WD法致伤脊髓(2.94×10N)(15g×20cm,即15g重物从20cm高度上垂直落下产生的致伤力)。局部见:打击处脊髓组织出现水肿、淤血(但硬脊膜

完整)。整体见:大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩扑动后,双后肢呈迟缓性瘫痪,表明撞击成功。一般脊髓损伤1周以后出现后肢痉挛^[21-23]。

3.2 评估

3.2.1 改良的Ashworth分级评定法。被动活动脊髓损伤后大鼠后肢,根据肢体被动活动及关节屈伸的自由程度分为5级^[24-25]。①0级:无肌张力增高,大鼠活动自如;②1级:轻度肌张力增高,在屈伸过程中出现一过性停顿;③2级:明显肌张力增高,但肢体尚易屈伸,有轻度共济失调;④3级:明显肌张力增高,被动活动困难,有中度共济失调;⑤4级:肢体屈伸受限,有重度共济失调。1级及1级以上即为模型成功^[25]。

3.2.2 肌电图评估:刺激大鼠腓窝颈神经,同时记录M波和H反射,并进行H/M比值的分析,发现痉挛大鼠尾部H波幅增高,H/M比值增大,说明造模成功。

3.3 优点

操作相对较简单,技术容易掌握,动物死亡率低,和人类脊髓损伤较为相似。

3.4 缺点

脊髓损伤程度和痉挛的出现率关系很大,轻度的脊髓损伤一般仅引起轻微大鼠肢体运动功能障碍,痉挛的出现率很低;重度的脊髓损伤引起大鼠肢体功能的严重障碍,肢体无感觉和运动功能残留,一直处于软瘫期,痉挛的出现率也比较低。所以在制作这种模型的时候需要掌握好脊髓损伤的程度。一般中度脊髓损伤,损伤平面以下有部分感觉功能残留时,痉挛的出现率较高。

4 小结

脊髓源性痉挛是临床上常见的现象,尽管痉挛的治疗方法很多,但很多脊髓损伤患者仍遭受着痉挛的痛苦,并且现在的研究对于痉挛的机制仍不是很清楚。很大程度上,动物研究的目的是阐释人类疾病的生理机制,从而为治疗方法的改进提供基础。关于脊髓源性痉挛模型,在过去的几年里,下位骶段脊髓横断的动物模型常被用来研究尾肌的痉挛,作为研究脊髓源性痉挛机制的一种方法。但是近几年来也有一些人认为这种痉挛大鼠模型是不合适的。①大鼠的尾巴和人的下肢是很不相同的,并且人的下肢是基本的痉挛性运动障碍,并且痉挛的临床特征在痉挛的大鼠尾巴上很少体现。②痉挛大鼠模型表现的肌张力增加和人类痉挛很不符合。③痉挛肌肉改变的特征是什么呢?人们推断痉挛患者肌肉的组织化学和结构的变化以及肌节的丧失在肌痉挛的发生发展过程中起着重要的作用,尽管这些肌肉的变化与肌肉痉挛和运动障碍有多大关系仍不十分清楚。因此这种尾肌痉挛模型显然不能适应这种研究的要求。随着脊髓损伤

动物模型的逐渐发展,开始出现利用脊髓缺血和重物撞击的脊髓损伤方法制作脊髓源性痉挛大鼠模型,这两种方法各有优缺点,但是这两种方法都存在进一步定量脊髓损伤程度,探索提高痉挛出现率的问题。并且对于肢体痉挛的客观定量评估还有待进一步的研究^[13]。

参考文献

- [1] Kirshblum S. Treatment alternatives for spinal cord injury related spasticity[J]. The Journal of Spinal Cord Medicine, 1999, 22(3):199—217.
- [2] Skold C, Levi R, Seiger A. Spasticity after traumatic spinal cord injury: nature, severity, and location[J]. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 1999, 80(12):1548—1557.
- [3] Walter JS, Sacks J, Othman R, et al. A database of self-reported secondary medical problems among VA spinal cord injury patients: its role in clinical care and management[J]. Journal of Rehabilitation Research and Development, 2002, 39(1):53—61.
- [4] 窦祖林,范建中,郭铁成,等.痉挛——评估与治疗[M].北京:人民卫生出版社,2004.
- [5] Bennett DJ, Sanelli L, Cooke CL, et al. Spastic long-lasting reflexes in the awake rat after sacral spinal cord injury[J]. J Neurophysiol, 2004, 91(5):2247—2258.
- [6] Dietz V. Proprioception and locomotor disorders[J]. Nat Rev, 2002, 3:781—790.
- [7] Dietz V, Sinkjaer T. Spastic movement disorder: impaired reflex function and altered muscle mechanics[J]. Lancet Neurol, 2007, 6(8):725—733.
- [8] Hultborn H. Changes in neuronal properties and spinal reflexes during development of spasticity following spinal cord lesions and stroke: studies in animal models and patients[J]. J Rehabil Med, 2003, 35:46—55.
- [9] Katz RT, Rovai GP, Brait C, et al. Objective quantification of spastic hypertonia: correlation with clinical findings[J]. Arch Phys Med Rehabil, 1992, 73(4):339—347.
- [10] Bennett DJ, Gorassini M, Fouad K, et al. Spasticity in rats with sacral spinal cord injury[J]. Journal of Neurotrauma, 1999, 16(1):69—84.
- [11] Kim YI, Na HS, Han JS, et al. Critical role of the capsaicin-sensitive nerve fibers in the development of the causal-gic symptoms produced by transecting some but not all of the nerves innervating the rat tail[J]. J Neurosci, 1995, 15(6): 4133—4139.
- [12] Steg G. Efferent muscle innervation and rigidity[J]. Acta Physiol Scand, 1964, 61:1—53.
- [13] Dietz V. Studies on the spastic rat: an adequate model for human spastic movement disorder[J]. J Neurophysiol, 2008, 99(2):1039—1040.
- [14] Kanellopoulos GK, Kato H, Hsu CY, et al. Spinal cord ischemic injury. Development of a new model in the rat[J]. Stroke, 1997, 28(12):2532—2538.
- [15] Sufianova GZ, Usov LA, Sufianov AA, et al. New minimally invasive model of spinal cord ischemia in rats[J]. Bull Exp Biol Med, 2002, 133(1):98—101.
- [16] Taira Y, Marsala M. Effect of proximal arterial perfusion pressure on function, spinal cord blood flow, and histopathologic changes after increasing intervals of aortic occlusion in the rat[J]. Stroke, 1996, 27(10):1850—1858.
- [17] Marsala M, Hefferan MP, Kakinohana O, et al. Measurement of peripheral muscle resistance in rats with chronic ischemia-induced paraplegia or morphine-induced rigidity using a semi-automated computer-controlled muscle resistance meter[J]. J Neurotrauma, 2005, 22(11):1348—1361.
- [18] Michael P, Hefferan L, Karolina Kucharova, et al. Spinal Astrocyte Glutamate Receptor L. Overexpression after Ischemic Insult Facilitates Behavioral Signs of Spasticity and Rigidity[J]. The Journal of Neuroscience, 2007, 27(42):11179—11191.
- [19] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report[J]. JAMA, 1911, 57:878—880.
- [20] 余永桂,张功礼,施勇彦,等.丹参注射液椎管内局部灌注对急性脊髓损伤的保护作用[J].中华实验外科杂志,2004,21:993—994.
- [21] Wrathall JR, Pettegrew RK, Harvey F. Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups [J]. Exp Neurol, 1985, 88(1):108—122.
- [22] 徐晓庆,肖达,睢久红,等.急性脊髓损伤动物模型的建立[J].中国修复重建外科杂志,2003,17(1):22.
- [23] Wu LZ, Cui CL, Tian JB, et al. Suppression of morphine withdrawal by electroacupuncture in rats: dynorphin and kappa-opioid receptor implicated[J]. Brain Res, 1999, 851(1—2): 290—296.
- [24] Ashworth B. Preliminary trial of carisoprodol in multiple sclerosis[J]. Practitioner, 1964, 192:540—542.
- [25] 马丙祥,李华伟,黄生生,等.三甲苄康康颗粒对痉挛性脑性瘫痪大鼠肌张力的影响[J].中国临床康复,2004,8(33):7500—7502.