

犬椎间盘脱出模型的建立及其脊髓微循环与组织学变化观察

王雪乔¹, 饶宇腾¹, 吴伟澎¹, 程鹏², 李伟², 姜代勋¹, 陈武²

(1. 北京农学院(中医药)北京市重点实验室; 2. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206)

【摘要】目的 通过外科手术方法建立犬椎间盘脱出模型, 观察造模前后脊髓微循环与组织学变化, 为研究椎间盘病脊髓的病理和治疗机理积累资料。**方法** 健康成年犬随机分为正常对照组和模型组。半椎板切除术暴露L₁段脊髓后, 将6Fr硅胶双腔导管球囊放置在T₁₂-T₁₃脊髓左下方处, 向导管内注入约0.5 mL的碘海醇使球囊内膨胀压迫脊髓, 模拟由于髓核脱出引起的椎间盘脱出症; 利用激光散斑血流监控系统实时监测压迫前后L₁段脊髓血流量(spinal cord blood flow, SCBF)变化; 术后14 d观察压迫部位脊髓组织学形态。**结果** 模型组两侧后肢运动机能极显著下降($P < 0.01$), L₁段脊髓血流量显著下降($P < 0.05$); 与正常组相比, 模型组脊髓白质出现空泡化, 灰质腹角正常神经元数量极显著下降($P < 0.01$)。**结论** 球囊压迫法可成功建立犬椎间盘脱出瘫痪模型, 并观察到脊髓局部微循环障碍和形态学变化, 可作为评价针灸等治疗效果和机理的模型。

【关键词】 犬; 椎间盘脱出模型; 脊髓; 微循环; 组织学

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 06-0022-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.006.005

Establishment of a dog model of intervertebral disc extrusion and observation of the histological and microcirculatory changes in the spinal cord

WANG Xue-qiao, RAO Yu-teng¹, WU Wei-peng¹, CHENG Peng², LI Wei², JIANG Dai-xun¹, CHEN Wu²

(1. Beijing Key Laboratory of Veterinary Medicine (Traditional Chinese Medicine and Pharmacology);

2. Department of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

【Abstract】 Objective To establish a canine model of intervertebral disc extrusion by surgery and observe the histological and microcirculatory changes of the spinal cord, in order to accumulate data for studies on the pathology and mechanism of treatment for intervertebral disc extrusion. **Methods** Normal healthy adult dogs were divided randomly into two groups; normal control group and model group. To simulate the intervertebral disc extrusion caused by spinal cord compression, 6Fr double lumen catheter with ballon was inserted into the spinal cord T₁₂-T₁₃ and filled with about 5 mL Iohexol after the exposure of spinal cord L₁ by hemilaminectomy. The spinal cord blood flow (SCBF) at the L1 level before and after compression was measured by laser-Doppler flowmetry. Morphological changes of the compressed spinal cord at 14 days after compression was examined by histopathology. **Results** The (Texas spinal cord injury score) (TSCIS) scores of the motor function of bilateral hind limbs were highly significantly decreased ($P < 0.01$). The blood flow of spinal cord at

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号:31372473)。

[作者简介] 王雪乔(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 针灸机理。E-mail: wxq_1771@126.com。

[通讯作者] 陈武(1966-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 中兽医学。E-mail: tcvmchenwu@hotmail.com。

the L1 level was significantly decreased ($P < 0.05$) after compression than that before. Compared with the normal control group, the model group showed abnormal vacuolization in the white matter and the number of normal neurons in the ventral horn of gray matter was significantly lower ($P < 0.01$). **Conclusions** Our findings demonstrate that canine models of intervertebral disc extrusion can be successfully established by balloon catheter compression, showing local impairment of microcirculation and histological changes in the spinal cord. This canine model may provide a useful model for evaluation of therapeutic effects of acupuncture and for mechanism studies.

【Key words】 Dog/canine; model; Intervertebral disc extrusion; Spinal cord; Microcirculation; Histology

椎间盘脱出症是人类医学和兽医临床上犬的多发病和疑难病。通过外科手术减压疗法解除脊髓压迫,是常用治疗方法之一,但在犬对深部痛觉丧失超过 48 h 的重症病例无效。然而以电针为主的针灸疗法,在无创的情况下对犬的椎间盘脱出症显示疗效同样显著^[1],其机理可能与改善脊髓微循环和组织微观结构有关,需要进一步研究。由于对临床病例的脊髓状态评价困难,且已有的犬椎间盘脱出模型多为短时间(0.5~1) h 压迫^[2-4],不能很好地模拟和评价重症椎间盘脱出症的过程。本研究尝试建立犬的椎间盘长时间脱出模型,并采用激光散斑多普勒血流测定法(Laser-Doppler flowmetry, LDF)监测压迫后脊髓血流量(spinal cord blood flow, SCBF)和组织学变化,为进一步揭示犬椎间盘脱出症的病理与治疗机理积累资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康成年杂种犬 9 只,体重(5~10) kg (7.97 ± 1.03),动物生产合格证号[SCXK(京)2011-0006],饲养于北京农学院实验动物房[SYXK(京)2010-0003]。实验犬随机分为正常对照组($n = 3$),模型组($n = 6$)。正常对照组不进行手术,常规饲喂。

1.2 主要仪器和试剂耗材

激光多普勒散斑血流检测视频系统(PeriCam PSI System, Perimed, Sweden),呼吸麻醉机(SurgiVet,美国),超声骨刀(速迈医疗),高频电刀(北京中科科仪技术发展有限责任公司),碘海醇(50 mL:15 g,扬子江药业集团有限公司),异氟烷(100 mL,鲁南贝特制药有限公司),注射用氨苄西林(悦康药业集团北京凯悦制药有限公司),6Fr 一次性无菌双腔导尿管(大连库利艾特医疗制品有限公司),焦油紫(Sigma-Aldrich),苏木精(Amresco Company),伊红(Amresco Company)。

1.3 犬椎间盘脱出模型的建立

麻醉前 15 min 阿托品(0.02 mg/kg)皮下给药,静脉推注丙泊酚(6 mg/Kg)诱导麻醉,气管插管异氟烷吸入维持麻醉。

动物俯卧保定,以第一腰椎(L₁)为中心消毒。手术严格无菌操作,第 13 胸椎至第 2 腰椎(T₁₃-L₂)棘突左侧旁开约 1.5 cm 切开皮肤,沿皮肤切口切开皮下脂肪,显露并切开浅深层外筋膜,钝性分离髂腰肌纤维,骨膜剥离器钝性剥离背最长肌、多裂肌,切断附着肌腱,牵引器紧贴肋头前缘放置在创口前后,高频电刀切断乳头突周围附着肌肉,用咬骨钳去除乳头突,超声骨刀打磨 L₁-L₂ 段椎板,锥板咬骨钳暴露左腹侧 L₁-L₂ 段脊髓。将 6Fr 双腔导尿管沿硬膜向前伸至 T₁₂-T₁₃,向内缓慢注入约 0.5 mL 碘海醇(图 1),封堵固定导尿管,脊髓血流监测完毕后分层缝合切口。术后肌注抗生素(氨苄西林,25 mg/kg,每天 3 次),第 2 天正常饲喂,对食欲不振者行常规输液支持疗法。

术后进行 X 线检查,确认气囊压迫存在(图 2),并进行运动机能评分,判断造模是否成功。

压迫 48 h 后气囊减压,抽出导管解除压迫。

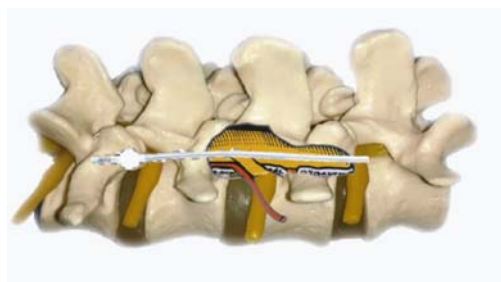


图 1 球囊压迫法,沿硬膜插入后注入碘海醇。

Fig. 1 Balloon catheter compression method.

The picture shows that the balloon catheter with Iohexol was inserted into the spinal canal.

1.4 SCBF 微循环测定

术中暴露 L₁-L₂ 段脊髓后,LDF 散斑血流检测仪监测血流 5 min,导尿管压迫后监测血流 5 min,14 d 后再次开创暴露脊髓,监测相同脊髓段血流 10 min。(仪器相关参数设定:监测激光与 L₁-L₂ 段



图 2 犬椎间盘脱出模型压迫后 X 线片。

Fig. 2 X-ray images of the canine model of intervertebral disc extrusion after compression.

脊髓垂直,探头与 $L_1 - L_2$ 段脊髓左侧的监测距离设定约为 16 cm,分辨率为 0.15mm,监测区域图像面积约 10 ~ 15 mm²,圆心位于 L_1 段脊髓左侧的中心,采样频率:10 图像/s)

1.5 运动功能评分

同一执业临床兽医师于术前、1 d、4 d、7 d、14 d 采用犬 TSCIS 评分法^[6-7],从步态、本体感受器定位、痛觉感受方面对各组犬的运动功能进行评价(正常为 10 分)。步态:最小离地间隙是指在犬肢体伸展时将四肢抬离地面的能力;本体感受器定位:本体感受的测定方法:给予外力支撑犬的体重,轻轻地将其爪背面对着地,恢复正常位置的时间超过 2 s 则判为反应迟钝。伤害感受:深部伤害感受的测定方法:止血钳横行钳闭远端肢体或者甲床。浅部伤害感受的测定方法:止血钳钳夹趾间蹼。

1.6 脊髓组织病理学观察

14 d 后采集损伤段脊髓,HE 和焦油紫染色观察脊髓组织学变化并进行神经元计数。观察脊髓白质和灰质神经元形态及神经元数量变化,脊髓中央管水平线以下设为计数面积,神经元采用人工双盲计数法^[8], $P < 0.05$ 表示组间差异显著, $P < 0.01$ 表示组间差异极显著。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析/LSD 多重比较分析差异显著性, $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P < 0.05$ 表示差异显著,有统计学意义, $P > 0.05$ 表示差异不显著。

2 结果

2.1 犬椎间盘脱出模型的运动功能评分结果

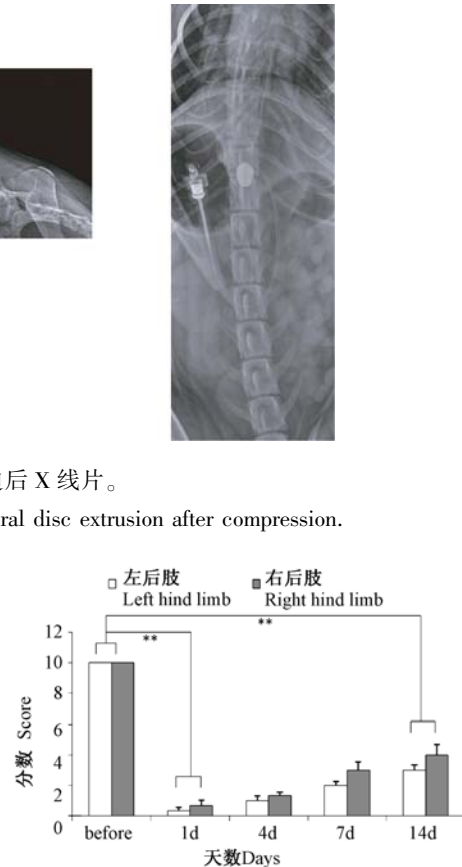


图 3 犬压迫前后运动功能评分结果($P < 0.01$)

Fig. 3 Motor function scoring of the dog hind limbs before and after compression($P < 0.01$)

图 3 可见,术前 TSCIS 评分结果皆为满分 10 分。术后第 1 天左、右后肢的评分结果分别为(0.33 ± 0.23)、(0.67 ± 0.37),两后肢均丧失深部痛觉。与压迫前相比,后肢运动机能评分下降极显著($P < 0.01$),至术后 14 d 左后肢(3 ± 0.37)、右后肢(4 ± 0.71)运动机能评分有所升高,但与术前相比仍旧极显著下降($P < 0.01$),模型建立成功。正常对照组 1 d 及 14 d 左右后肢运动功能评分均为满分 10 分。

2.2 犬椎间盘脱出模型脊髓血流量变化

犬椎间盘脱出模型压迫后 5 min (94.08 ± 12.52)和 14 d 后(97.36 ± 10.39)脊髓血流量显著低于($P < 0.05$)压迫前(131.02 ± 5.67)(图 4)。

2.3 犬椎间盘脱出模型脊髓组织形态学观察

正常对照组脊髓白质纤维束排列紧密有序,左侧腹角灰质可见深蓝色大而圆的神经元且数量较多,多突起,胞浆内尼氏小体结构完整,细胞核位于中央;模型组脊髓白质纤维束断裂,成空泡状,灰质可见神经细胞崩裂,尼氏小体不明显,神经元数量

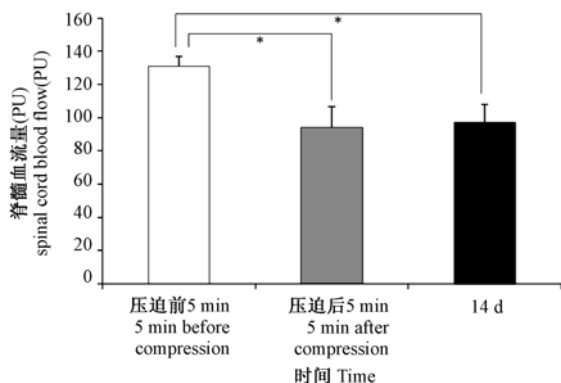


图 4 犬椎间盘脱出模型压迫前后脊髓血流量变化 ($P < 0.05$)

Fig. 4 Change of the spinal cord blood flow in the dogs before and after compression ($P < 0.05$)

减少,出现固缩。脊髓腹角(脊髓中央管水平线以下)正常神经元计数模型组为(13.58 ± 3.14)个,极显著低于($P < 0.01$)正常对照组(34.52 ± 4.68)个(图 5,6 见彩插 1)。

3 讨论

椎间盘脱出症是由于椎间盘的纤维环变性破裂,中央髓核脱出压迫脊髓及其相应脊神经根,导致神经通路被阻断,同时压迫造成脊髓血液循环障碍,加速神经细胞死亡,引起运动功能障碍^[9]。临床实践中,动物短时间内出现的重度瘫痪往往伴随后肢深部痛觉完全丧失甚至尿闭或尿失禁,这多由于髓核瞬时压迫引起脊髓急性损伤,随着压迫持续存在进而引起脊髓局部缺血缺氧造成继发性损伤^[9]。球囊压迫法能够较好地模拟椎间盘脱出引起的急性重度持续性压迫,并可对压迫程度进行适度的调节,且重复性良好。早期球囊压迫法是通过椎板全切术暴露脊髓进行压迫,但对脊髓周围组织的损伤较大。经过改良,现多采用经皮穿刺至蛛网膜下腔后压迫^[10-13],但此法也有其局限性,主要是压迫位置很难准确定位在脊髓正下方或侧下方,因而无法模拟椎间盘髓核脱出对脊髓的压迫。此外,由于没有暴露脊髓,所以无法直接监测脊髓微循环血流量的变化。本研究采用的半椎板切除术是解除髓核压迫的临床常用手术通路,其既减少对脊髓周围组织的损伤又客观评价脊髓状态,更接近犬椎间盘脱出症的自然损伤过程,符合理想椎间盘脱出模型的要求。球囊内注入碘海醇代替生理盐水,有利于术中定位及术后评价。研究结果模型组后肢

运动机能极显著下降,出现后肢瘫痪,失去深部痛觉,与临床上犬的椎间盘脱出症一致。

微循环障碍是机体原发性和继发性致病的重要因素,也与细胞再生和机能恢复密切相关,因此对其进行测定能客观评价脊髓损伤和机能恢复的程度。激光散斑血流监测仪是一种监测组织血流的常用方法,其通过光电探测器接受反射光,然后转化成电信号,生成组织血细胞移动的数据。Yasminda Malik 等^[14]指出 LDF 受多种因素影响,例如室温、体位、外部光源等因素。为此,本实验在监测过程中保持室温在 25°C ,关闭无影灯,加热毯温度保持在 38°C ,输液暂停,同时人员保持安静,减少走动,尽最大可能减少干扰因素,以获取可信的数据。

课题组前期研究表明椎间盘脱出大鼠模型 SCBF 下降显著,且压迫后即刻下降,前后分界明显^[5]。本试验观察到椎间盘脱出模型犬 SCBF 同样下降显著,但压迫后瞬时脊髓血流量呈缓慢下降至稳定值,这可能与压迫物选择不同和种属间差异有关。压迫后脊髓血流量显著下降,且 14 d 后脊髓血流量仍保持较低水平,这说明急性和慢性的脊髓血流微循环障碍可能是椎间盘脱出症致病的重要机制。

造模后 14 d 在观察到脊髓微循环血流量显著降低的同时,模型组出现神经元变性坏死、尼氏小体固缩、白质空泡化等形态学变化。已有研究表明脊髓灰质神经元的迁移受血管密度和分布影响^[15],说明脊髓微循环障碍对神经元修复的影响。提示调节脊髓微循环,改善脊髓神经细胞微环境,促进脊髓神经细胞再生和重构可能是治疗该病的关键。14 d 后脊髓造影显示压迫部位造影剂仍无法正常通过,说明压迫并未随着解压而消失,这可能正是发病 48 h 后手术减压效果不佳的原因。

上述结果表明,此球囊压迫法建立的重度椎间盘脱出模型能够再现临床经过,可以作用于观察脊髓微循环和组织形态学变化,用于该病病理和治疗机理的相关研究。

参考文献:

- [1] 陈武,吴英伟,郭泽领,等.犬椎间盘病的中西医结合诊疗与病例分析[C].中国畜牧兽医学学会论文集,中国,中国畜牧兽医学学会,2003,128-131.
- [2] 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 : 310 - 316.
- [3] Lim JH, Jung CS, Byeon YE, et al. Establishment of a canine spinal cord injury model induced by epidural balloon compression [J]. *J Vet Sci*, 2007, 8: 89 - 94.
- [4] 于向华, 刘郑生. 压力球囊置入法致颈脊髓慢性压迫实验模型的建立 [D]. 中国人民解放军军医进修学院, 硕士学位论文, 2003.
- [5] 卢知松, 陈益山, 姜代勋, 等. 椎间盘脱出大鼠模型的脊髓血流量变化及电针效应 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(5): 381 - 386.
- [6] Gwendolyn JL, Jonathan M. L, Christine M. B, et al. Description and repeatability of a newly developed spinal cord injury scale for dogs [J]. *Prev Vet Med*, 2009, 89: 121 - 127.
- [7] Byung OK, Ying L, Yiwen R, et al. Neuropathologies in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 tat protein under the regulation of the astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein promoter and doxycycline [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162: 1693 - 1707.
- [8] 虞攀峰, 王岩. 新型犬脊髓损伤模型的建立和激光多普勒脊髓血流评价 [D]. 中国人民解放军总医院, 军医进修学院, 博士学位论文, 2011.
- [9] Lahunta AD, Glass EN. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology* (Third Edition) [M]. American Elsevier, 2009. 243 - 280.
- [10] Fukuda S, Nakamura T, Kishigami Y, et al. New canine spinal cord injury model free from laminectomy [J]. *Brain Res Protoc*, 2005, 14: 171 - 180.
- [11] 卢鹏. 实验动物脊髓的损伤模型 [J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2008, 23(2): 174 - 176.
- [12] 白殿卿, 沈宁江. 犬脊髓损伤治疗动物模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2002, 10(2): 120 - 122.
- [13] 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]. *Am J Neuroradiol*, 2003, 24: 177 - 184.
- [14] Yasminda M, David S, Martin K, et al. Laser-Doppler M easurements of spinal cord blood flow changes during hemilaminectomy in chondrodystrophic dogs with disk extrusion [J]. *Vet Surg*, 2009, 38: 457 - 462.
- [15] 王志新, 王卉, 王延芬, 等. 小鼠脊髓灰质发育过程中细胞迁移与血管之间的关系 [J]. *神经解剖学杂志*, 2013, 29(4): 415 - 420.

[修回日期] 2014-03-10

继续教育

动物实验技术中级培训

建立实验动物人才职业准入制度是实验动物行业发展和人才队伍现代化建设的必然趋势。为了推进实验动物人才队伍标准化培训,逐步完善建立社会化考核体系,落实国家各项实验动物法规,中国实验动物学会联合清华大学生命科学学院于 2014 年 7 月 8 ~ 12 日开展首期实验动物专业技术人员中级资格培训,培训后经考试合格者,由中国实验动物学会颁发中级实验动物技师证书。

本次培训分为理论课学习和实验课操作两部分。理论课学习分为专家讲座和学生自学答题两部分。实验课操作将对小鼠、大鼠、兔子、大动物进行常用实验八项技术技能的专业培训,包括抓取与保定,给药,采血,无菌技术,麻醉,安乐死,解剖,组织取材等。本期培训招生规模为 30 人,凡具备相关初级专业技术资格,连续从事实验动物领域工作 2 年及以上或具有生物、医学类相关专业本科学历等实验动物从业人员均可报名。本次集中培训将邀请美国实验动物学会教育培训总监 Nicole Duffee 教授,欧洲实验动物联盟教育培训专家 Marcel Gyger 教授,亚洲实验动物联合会资深专家 Noriyuki Kasai 教授,国内实验动物界资深专家教授就实验动物中级技术人员技术要求,实验动物专业技术人员培训体系以及实验动物行业前沿技术做介绍,并重点对动物实验常用实验的八项技术进行讲解并进行实际操作训练。学员完成全部课程,经考核通过,由中国实验动物学会颁发中级实验动物技师证书。该证书是实验动物从业人员职业岗位能力的证明,可作为岗位聘用、任职、定级和晋升职务的重要依据,从业人员在申请职业技能鉴定时,此证书可作为接受相关职业资格培训的证明,证书全国范围内通用。

孟俊红