

. 实验研究 .

大鼠脊髓损伤模型建立及神经源性肠功能障碍的初步评价

韩芸峰 王振宇 于 涛

【摘要】目的 探讨建立大鼠脊髓损伤模型的方法,并初步评价神经源性肠功能障碍的发生、发展及变化规律。**方法** 56 只大鼠随机分为脊髓损伤组(n=40)、假手术组(n=8)和正常组(n=8),其中脊髓损伤组再根据损伤后时间分为伤后 1 d 组、3 d 组、7 d 组、14 d 组、28 d 组等 5 个亚组,每亚组 8 只。假手术组和正常组合称为非脊髓损伤组。采用自制改良 Allen 脊髓撞击器造成脊髓不完全性损伤,假手术组只暴露硬膜囊。采用肠道推进试验、粪便粒数及粪便含水率测定来评价脊髓损伤后肠功能情况。**结果** 与非脊髓损伤组相比,脊髓损伤组结肠推进率明显降低($P<0.05$);而且,脊髓损伤后 1 d 组结肠推进率降低最明显($P<0.05$)。与非脊髓损伤组相比,脊髓损伤组粪便粒数明显增多($P<0.05$);而且,脊髓损伤后 1 d 组粪便粒数最多($P<0.05$)。与非脊髓损伤组相比,脊髓损伤组粪便含水率明显降低($P<0.05$);而且,脊髓损伤后 1 d 组粪便含水率降低最明显($P<0.05$)。**结论** 采用自制改良 Allen 脊髓撞击器能成功复制大鼠不完全性脊髓损伤模型;大鼠脊髓损伤后出现神经源性肠功能障碍,损伤后急性期(伤后 1 d)尤为显著,随后逐渐改善。

【关键词】 脊髓损伤;神经源性肠功能障碍;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2015)10-0617-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 641; R 744

Establishment of model of spinal cord injury and evaluation of neurogenic bowel dysfunction in rats

HAN Yun-feng, WANG Zhen-yu, YU Tao. Department of Neurosurgery, The Third Hospital, Peking University, Beijing 100191, China

【Abstract】 Objective To establish the model of spinal cord injury (SCI) and study the occurrence, development and variation of neurogenic bowel dysfunction (NBD) in rats. **Methods** Fifty-six rats were randomly divided into spinal cord injury group (SCI group), sham operation group and blank control group. The sham operation and blank control groups were called non-SCI group together. SCI was established by modified Allen method. The spinal dural sac was exposed to air in the sham operation group. Intestinal transit test, fecal pellet number, and fecal water content rate were used to assess the dynamic of intestines. **Results** The colonic transit rate was significantly lower in SCI group than those in non-SCI group ($P<0.05$). The colonic transit rate was significantly lower in SCI group 1 day after SCI than those 28 days after SCI in SCI group and in the sham operation and blank control groups ($P<0.05$). The fecal pellet number was more in SCI group than those in non-SCI group ($P<0.05$). The fecal pellet number was more 1 day after SCI than that 28 days after SCI ($P<0.05$). The water content rate was significantly lower in SCI group than that in the sham operation group ($P<0.05$). **Conclusions** It is suggested that NBD which is caused by SCI induced by the modified Allen method is more severe early after SCI than that late after SCI. The occurrence, development and variation of NBD after SCI may be evaluated by the intestinal transit test, fecal pellet number and fecal water content rate.

【Key words】 Spinal cord injury; Neurogenic bowel dysfunction; Rats

脊髓损伤发病率逐年升高^[1],除造成患者肢体感觉运动障碍外,常常合并内脏功能异常,神经源性肠功能障碍(neurogenic bowel dysfunction, NBD)就是其中一种。NBD 已被公认为影响脊髓损伤患者身心健

康及自理能力的一个重要因素^[2]。本研究尝试建立大鼠脊髓损伤模型,并采用三种方法初步评价 NBD 的发生、发展及变化规律。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雌性 SD 大鼠 56 只,体重(255±21)g,由北京大学医学部实验动物科学部提供。随机分为脊髓损伤组(n=40)、假手术组(n=8)和正常组(n=8),其中脊髓损伤组再根据损伤后时间分为伤后 1 d 组、3 d 组、7 d 组、14 d 组、28 d 组等 5 个亚组,每亚组 8

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.10.013

基金项目:北京市自然科学基金(7144253)

作者单位:100191 北京,北京大学第三医院神经外科(韩芸峰、王振宇、于 涛)

通讯作者:王振宇, E-mail: wzyu502@hotmail.com

只。假手术组和正常组合称为非脊髓损伤组。

1.2 大鼠脊髓损伤模型建立

1.2.1 术前准备及麻醉 术前禁食不禁水 12 h。5% 盐酸氯胺酮注射液 (60 mg/kg; 100mg/支, 福建古田药业有限公司) 右侧股二头肌注射 + 0.2% 地西洋注射液 (3 mg/kg; 10 mg/支, 国药集团容生制药有限公司) 左侧股二头肌注射麻醉大鼠, 全身肌肉松弛、钳夹肢体无回缩时麻醉成功。

1.2.2 手术方法 大鼠背部备皮俯卧位固定于脊髓撞击器平台, 定位胸₁₀棘突^[3], 后正中切开皮肤长约 1 cm, 分离椎旁肌肉后暴露胸_{9~11}棘突, 剪断胸₁₀棘突头尾两侧的棘上和棘间韧带, 由尾侧向头侧小心咬除胸₁₀棘突及椎板, 暴露硬膜囊并保证完整。采用 10 g 重锤自 20 cm 高处沿自由落体, 撞击能量为 200 g·cm, 击打脊髓撞击针, 后者直径 1 mm, 贴敷于硬膜囊表面中线处, 击打后控制下陷深度为 3 mm。击打后迅速移除重锤和脊髓撞击针, 间断分层缝合。假手术组依据上述方法仅暴露硬膜囊后关闭伤口。

1.2.3 脊髓损伤成功的判定标准 被打击处脊髓表面充血、水肿或出血, 大鼠双下肢强直阵挛, 尾巴翘起, 麻醉苏醒后双下肢弛缓性瘫痪, 双下肢 Basso-Beattie-Bresnahan 运动功能量表 (Basso, Beattie & Bresnahan locomotive rating scale, BBB) 评分 0 分^[4]。

1.2.4 术后护理 术后连续 3 d 给予青霉素钠 (160 万 U/支, 华北制药股份有限公司) 10 万 U/只皮下注射, 每 8 h 膀胱按摩一次辅助排尿, 直至建立反射性排尿; 挤压直肠辅助排出大便, 同时按摩和被动活动双下肢防止褥疮和血栓形成。

1.3 HE 染色 脊髓损伤后 1 d 分离损伤处脊髓组织, 长约 2 mm, 经常规脱水、石蜡包埋、横断面切片 (厚度 5 μm)、HE 染色, 镜下观察损伤处脊髓病理改变。正常组和假手术组采用同样方法获取相同部位的脊髓组织, 并行 HE 染色。

1.4 肠道推进试验以及粪便粒数和粪便含水率测定 造模后 1、3、7、14 和 28 d 进行肠道推进试验。试验前禁食不禁水 12 h, 给予 2 ml 半固体营养糊 (蒸馏水 50 ml + 羧甲基纤维素钠 1 g + 食用蔗糖 2 g + 食用蛋白粉 4 g + 食用淀粉 2 g + 药用炭末 2 g) 灌胃, 记录灌胃时间, 6 h 后麻醉解剖取出盲肠后结肠起始部至肛门口的全部结肠及直肠。无张力状态下测量取出肠道的全长 (d_1) 及黑色半固体营养糊的推进距离 (d_2), 计算结肠推进率 (%) = $(d_2/d_1) \times 100\%$ 。

纵行剖开肠道, 记数残留颗粒状粪便, 留取粪便

后即刻称重记为粪便湿重。将所得粪便于电热恒温鼓风干燥箱 (DH-101-2, 天津中环实验电炉有限公司) 90 ℃ 烘干 3 h, 以 30 min 内粪便质量变化小于 0.1 g 为烘干标准^[5], 称量干重。计算粪便含水率 (%) = $[(\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重}] \times 100\%$ 。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 或中位数 (极小值, 极大值) 表示, 两组间比较采用独立样本 Mann-Whitney U 检验, 多组间比较采用单因素方差分析或独立样本 Kruskal-Wallis 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 所有实验大鼠均未出现死亡。术后约 10 d 伤口愈合, 未出现伤口感染。非脊髓损伤组大鼠精神状态佳, 自主活动良好 (BBB 评分 21 分), 饮食和大小便正常。脊髓损伤组大鼠双下肢瘫痪, 活动量明显减少; 除尿潴留外, 大便排出明显困难, 干结粪便嵌顿在直肠内, 需挤压直肠辅助排便。

2.2 损伤处脊髓组织结构变化 非脊髓损伤组大鼠脊髓组织横断面可见灰白质结构清晰、分界清楚, 灰质内神经元形态正常, 白质内神经纤维排列有序; 脊髓损伤组大鼠损伤处脊髓可见组织结构紊乱、灰白质破损、中央管破裂、大量红细胞浸润, 神经元数目减少、残留神经元肿胀伴空泡形成等征象 (图 1)。

2.3 结肠推进率、粪便粒数和粪便含水率变化 与非脊髓损伤组相比, 脊髓损伤组结肠推进率明显降低 ($P < 0.01$); 而且, 脊髓损伤后 1 d 组结肠推进率降低最明显 ($P < 0.05$)。与非脊髓损伤组相比, 脊髓损伤组粪便粒数明显增多 ($P < 0.01$); 而且, 脊髓损伤后 1 d 组粪便粒数最多 ($P < 0.05$)。与非脊髓损伤组相比, 脊髓损伤组粪便含水率明显降低 ($P < 0.01$); 而且, 脊髓损伤后 1 d 组粪便含水率降低最明显 ($P < 0.05$)。详见表 1。

3 讨论

NBD 是脊髓损伤后肠道失去神经支配, 肠道蠕动频率降低、幅度下降、传输时间延长、直肠肛门协调性紊乱, 表现为排便困难、大便失禁等症状, 是影响患者日常生活质量和身心健康的重要因素^[6,7]。

本研究根据 Allen 自由落体法, 采用自制改良脊髓撞击器造成脊髓背侧撞击, 属于脊髓直接撞击伤类型。该脊髓撞击器主要由底座和 X 轴、Y 轴、Z 轴三维运动支架 (大鼠立体定位仪)、自制带有刻度的有机玻璃导管 (长约 20 cm)、10 g 重锤、自制脊髓撞

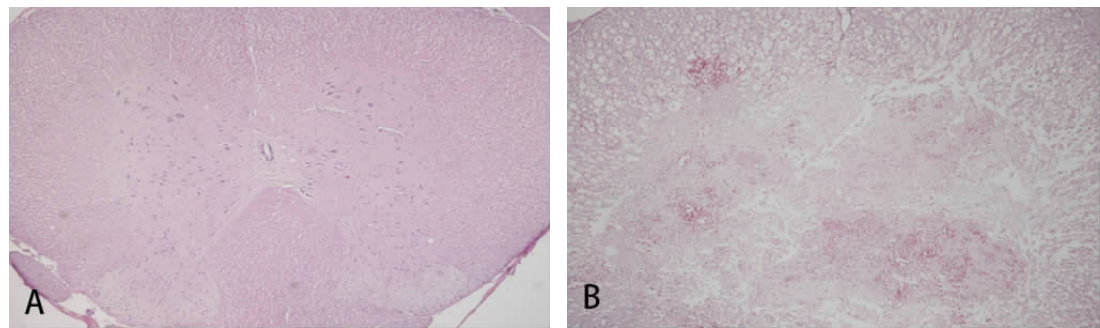


图 1 正常大鼠和脊髓损伤后 1 d 大鼠脊髓组织 HE 染色图(×40)

A. 正常脊髓,灰白质结构清晰、分界清楚,灰质内神经元形态正常,白质内神经纤维排列有序;B. 损伤后 1 d,脊髓组织结构紊乱、灰白质破损、中央管破裂、大量红细胞浸润,神经元数目减少、残留神经元肿胀伴空泡形成

表 1 各组大鼠结肠推进率、粪便粒数和粪便含水率比较

组别	结肠推进率(%)	粪便粒数(个)	粪便含水率(%)
脊髓损伤组	48.50(0.00, 100.00)*	6.0(0.0, 12.0)*	24.40(3.60, 73.50)*
非脊髓损伤组	100.00(0.00, 100.00)	0.0(0.0, 6.0)	61.10(55.60, 73.90)
正常组	100.00(100.00, 100.00)	0.0±0.0	—
假手术组	60.65(0.00, 100.00)	2.6±2.1	61.10(55.60, 73.90)
脊髓损伤后 1 d 组	0.00(0.00, 25.60)#	8.3±2.3#	14.90(6.30, 33.60)
脊髓损伤后 3 d 组	48.50(0.00, 66.40)#	4.8±2.8#	54.30(50.90, 73.50) [△]
脊髓损伤后 7 d 组	63.75(35.20, 100.00)#	5.1±2.4#	22.35(3.60, 25.60) [△]
脊髓损伤后 14 d 组	48.80(5.40, 100.00)#	5.0±1.9#	53.25(49.00, 67.60) [△]
脊髓损伤后 28 d 组	72.35(22.20, 89.80)#	3.9±2.4 ^{#△}	18.55(5.80, 24.20) [△]

注:与非脊髓损伤组相应值比,* $P<0.05$;与正常组相应值比,# $P<0.05$;与脊髓损伤后 1 d 组相应值比, Δ $P<0.05$;—:表示无残留粪便;

击针构成。本研究所有大鼠实验前 BBB 评分均为 21 分,脊髓损伤组大鼠造模后 BBB 评分为 0 分,随着造模后时间的推移,BBB 评分有不同程度的恢复,说明采用自制改良 Allen 脊髓撞击器能成功复制大鼠脊髓不完全性损伤模型^[8]。

肠道推进试验、粪便粒数、粪便含水率测定是研究肠道运动功能的常用方法^[9, 10]。本研究发现脊髓损伤组大鼠结肠推进率明显降低,而且损伤后 1 d 结肠推进率降低最为显著($P<0.05$);随着造模后时间推移,结肠推进率逐渐恢复。结肠内残留粪便粒数和粪便含水率也有同样发现。由此可见,脊髓损伤急性期(1 d)NBD 尤为显著,随着时间推移有所恢复,分析原因可能与急性期的脊髓休克、创伤性应激、损伤处脊髓病理生理改变有关。

相比放射影像、核素显像、酸碱指示剂等评价肠道运动功能的方法^[10, 11],本研究采用的自制半固体营养糊灌胃后测定结肠推进率、收集残留粪便计算粪便含水率的方法简便易行。然而,本实验模型以经典的 Allen 脊髓撞击模型为基础,不能充分模拟临床

脊髓损伤的致伤机制;另外三种评价方法尚不能精确反应结肠动力,也不能实时动态观察,故对于脊髓损伤后 NBD 的评价需要多方面和系统的评价方法和体系。

【参考文献】

[1] Awad RA. Neurogenic bowel dysfunction in patients with spinal cord injury, myelomeningocele, multiple sclerosis and Parkinson's disease [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(46): 5035-5048.

[2] Ruiz-López MC, Coss-Adame E. Quality of life in patients with different constipation subtypes based on the Rome III criteria [J]. Rev Gastroenterol Mex, 2015, 80(1): 13-20.

[3] 尚云龙,李一帆,宁云峰,等. 大鼠脊髓损伤模型的解剖学参考定位[J]. 解剖学研究, 2013, 35(6): 412-414.

[4] Beattie MS, Bresnahan JC, Basso DM. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection [J]. Exp

Neurol, 1996, 139(2): 244-256.

[5] 朱飞叶. 芍药甘草汤对慢传输型便秘大鼠的作用及其对肠神经递质及 SCF/c-kit 信号途径的作用机制研究[D]. 浙江中医药大学, 2014. 35-40.

[6] Liu CW, Huang CC, Yang YH, *et al.* Relationship between neurogenic bowel dysfunction and health-related quality of life in persons with spinal cord injury [J]. J Rehabil Med, 2009, 41(1): 35-40.

[7] Noonan VK, Kopec JA, Zhang H, *et al.* Impact of associated conditions resulting from spinal cord injury on health status and quality of life in people with traumatic central cord syndrome [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2008, 89(6): 1074-1082.

[8] 董贤慧, 高维娟. 脊髓损伤动物模型建立方法研究进展

[J]. 神经解剖学杂志, 2014, 30(1): 117-120.

[9] 朱黎婷, 朱 毅. 脊髓损伤神经源性肠道功能障碍的诊断、评价和康复治疗现状[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(12): 1163-1167.

[10] Media S, Christensen P, Lauge I, *et al.* Reproducibility and validity of radiographically determined gastrointestinal and segmental colonic transit times in spinal cord-injured patients [J]. Spinal Cord, 2009, 47(1): 72-75.

[11] Liu GX, Yang YX, Yan J, *et al.* Glial-derived neurotrophic factor reduces inflammation and improves delayed colonic transit in rat models of dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 19(1): 145-152.

(2015-03-19 收稿, 2015-05-24 修回)

(上接第 613 页)

偏瘫和语言障碍是切除岛叶胶质瘤最严重的并发症,这通常是破坏周围结构或血供所致。偏瘫可能是直接手术分离或切断大脑中动脉 M₂段长穿支,损害了走行于上环岛沟深部的放射冠下行运动纤维部分,也可能是损伤内囊后支,更常见的是损伤外侧豆纹动脉^[6-10]。我们可以术前行 DSA 检查,了解豆纹动脉位置,豆纹动脉位于肿瘤内侧时,手术切除应格外小心,在这种情况下手术遇到豆纹动脉应停止切除肿瘤。相反,豆纹动脉局限于肿瘤外侧,肿瘤可以安全全切除。侧裂静脉的保护也很重要,因为这些静脉一旦损伤会导致严重的后果,比如严重的脑水肿、脑静脉血栓形成以及手术创面不断的渗血。

综上所述,我们提出的岛叶胶质瘤分型简单、明了,能为我们在术前定义肿瘤扩展范围及决定手术方式提供有力支持。岛叶解剖结构复杂,毗邻重要的神经和血管,显微外科手术技术的发展提高了岛叶病变的手术切除安全系数,疗效更为理想,能在完全切除肿瘤的同时对周围脑组织及血管组织进行保护,最大限度地降低术后并发症。

【参考文献】

[1] Yasargil MG, Ammon K, Cavazos E, *et al.* Tumour of the limbic and paralimbic systems [J]. Acta Neurochir (Wien),

1992, 11(8): 40-52.

[2] 江 涛, 刘福生. 脑胶质瘤[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007. 192-193.

[3] Sanai N, Polley MY, Berger MS. Insular glioma resection: assessment of patient morbidity, survival, and tumor progression [J]. J Neurosurg, 2010, 112(1): 1-9.

[4] 王 磊, 赵继宗. 岛叶病变的显微外科手术治疗[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(7): 507-508.

[5] 李家亮, 于春江. 岛叶低级别胶质瘤的显微外科治疗[J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(6): 364-365.

[6] 张方成, 陈俊瑜, 王孟阳. 岛叶胶质瘤的手术治疗[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2013, 42(1): 103-105.

[7] 陈俊瑜, 王孟阳, 金 玉, 等. 豆纹动脉的位置在岛叶胶质瘤手术中的重要性[J]. 中国临床神经外科杂志, 2013, 18(8): 452-454.

[8] 杨允东, 朱树干. 岛叶与基底节区的显微解剖关系及临床意义[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 7: 4089-4091.

[9] 何光建, 王俊伟, 邹德伟, 等. 岛叶胶质瘤的显微手术治疗(附 35 例分析)[J]. 中国临床神经外科杂志, 2014, 19(11): 645-647.

[10] 刘俊峰, 张华楸, 陈 旭, 等. 岛叶胶质瘤的显微外科治疗[J]. 中国临床神经外科杂志, 2013, 18(3): 129-131.

(2015-04-13 收稿, 2015-08-13 修回)