

技术方法

定位大鼠下丘脑视上核方法的改良

冯展鹏¹, 张源², 雷清梅¹, 周立志³, 邱炳辉¹, 包赞¹, 漆松涛¹, 武广森²南方医科大学¹南方医院神经外科,²第一临床医学院,³统计教研室, 广东 广州 510515

摘要:目的 改良大鼠立体定向斜向穿刺法。方法 取18只SD大鼠,随机分为实验组(斜穿刺组)和对照组(垂直穿刺组)。实验组从左侧偏转与矢状面成20°角进行斜穿刺,对照组从垂直方向穿刺视上核,比较两组手术时间、并发症发生情况以及死亡率。结果 斜穿刺组核团定位时间长于垂直穿刺组(59.55±3.64 s vs 27.44±2.18 s, $P=0.000$)。术后24 h死亡斜穿刺组率低于垂直穿刺组(0 vs 44.4%, $P=0.082$)。术中上矢状窦破裂率斜穿刺组率低于垂直穿刺组(11.1% vs 88.9%, $P=0.003$)。开颅后止血时间(52.89±24.05 s vs 157.44±38.19 s, $P=0.000$)、穿刺后止血时间(24.33±10.60 s vs 133.89±28.81 s, $P=0.000$)、手术完成时间(178.89±35.22 s vs 362.44±66.52 s, $P=0.000$)均少于垂直组。结论 改良后定位视上核的方法操作简单,稳定性和重复性好,能够根据不同实验需求有效地避开脑内重要血管以及核团,也为不同实验操作者提供更多手术路径,值得在动物实验中推广。

关键词:斜向立体定向穿刺;大鼠;脑视上核

An improved method for stereotactic location of the supraoptic nucleus with oblique stereotactic puncture in rats

FENG Zhanpeng¹, ZHANG Yuan², LEI Qingmei¹, ZHOU Lizhi³, QIU Binghui¹, BAO Yun¹, QI Songtao¹, WU Guangsen²¹Department of Neurosurgery, Nanfang Hospital, ²First Medical Institute, ³Biostatistics Department, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To establish an improved method for stereotactic location of the supraoptic nucleus in rats. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into experimental group (12 rats) and control group (12 rats) for oblique (20° to the left) stereotactic puncture (OSP group) and vertical stereotactic puncture (VSP group), respectively, both targeting the supraoptic nucleus (SON). The surgical data and postoperative (within 24) mortality of the rats were compared between the two groups. **Results** The nucleus locating time was longer in OSP group than in VSP group (59.55±3.64s vs 27.44±2.18 s, $P=0.000$), and the postoperative mortality rate of the rats did not differ significantly between the groups (0 vs 44.4%, $P=0.082$). In OSP group, compared with VSP group, the procedure was associated with a lowered rupture rate of the superior sagittal sinus (11.1% vs 88.9%, $P=0.003$), a shortened hemostatic time after craniotomy (52.89±24.05 s vs 157.44s, $P=0.000$) and after puncture (24.33 vs 133.89 s, $P=0.000$), and also a shortened operation time (178.89 on time vs 362.44 times, $P=0.000$). **Conclusion** The improved method for locating supraoptic nucleus in rats is convenient, stable and reproducible, and helps to avoid important blood vessels and specific nuclei according to the needs of different experiments and allows the operators to choose different surgical paths.

Keywords: oblique stereotactic puncture; rat; supraoptic nucleus

在临床工作中,立体定向技术在功能神经外科发展迅速,应用广泛^[1-3]。在动物实验中,使用立体定向技术能为各种研究提供支持,包括靶点给药^[4]、损毁^[5]、颅内移植^[6-8]等。传统的立体定向穿刺方法大多通过垂直穿刺法,但是对于定位在中线者,实验动物容易在术中出现上矢状窦出血而死亡,死亡率较高。另外,一些实验的目标核团在深部,并且有避开某些核团的,或者进针

路径沿着核团长轴的需要,因此国内外学者开始探索斜向入路穿刺的方法。陈起亮等^[9]通过与脑矢状面成8°穿刺大鼠垂体和弓状核;石林等^[10]学者对比了斜向立体定向穿刺法与垂直立体定向穿刺法的差别;Seidman等^[11]为避开横窦,选择由后往前与冠状面成20°穿刺。但是以往文献多无给出具体的计算方式,石林等^[10]斜向定位方法计算及操作步骤均复杂。因此,建立一种简单易行且稳定性、重复性好的立体定向穿刺方法至关重要。由于过去有学者^[12]穿刺邻近上矢状窦的核团,发现动物容易死亡,而且已经有文献表明大鼠上矢状窦受刺激后会出现抑郁^[13]、偏头痛^[14]等不良现象。因此,本研究以斜向定位穿刺至视上核(垂直穿刺容易损毁上矢状窦)为例,介绍一种操作简便,计算过程简单,术中安全性高的斜向穿刺方法。

收稿日期:2016-10-11

基金项目:南方医科大学南方医院院长基金(2013B017,2015C028);广东省科技计划项目(2013B021800304);国家临床重点专科建设项目经费;南方医科大学临床研究培育项目(LC2016PY012)

作者简介:冯展鹏,博士,E-mail: 359512405@qq.com;张源,本科,E-mail: 424489271@qq.com。冯展鹏、张源共同为第一作者

通信作者:包赞,主治医师,E-mail: bobkuanci@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 实验材料和仪器

SD大鼠18只[由南方医科大学动物实验中心提供, SPF级, 许可证号: SCXK(粤)2011-0015], 体质量220~260 g, 小动物麻醉系统, 吸入性麻醉剂异氟烷, 牙科钻(瑞沃德), 电损毁仪(UGO), Hamilton微量注射器, 立体定向仪(Stoelting, 51603)。

1.2 方法

1.2.1 术前准备 取18只SD大鼠随机分为斜向穿刺组(实验组, 9只)和垂直穿刺组(对照组, 9只), 禁食、禁水12 h, 两组均以异氟烷诱导(浓度4%)、维持(浓度2.5%)进行气体吸入性麻醉。

1.2.2 对照组手术处理方法 按照国内外文献[15-16]垂直状态下立体定向垂步骤, 参考Paxinos & Watson^[17]大鼠鼠脑图谱, 找到视上核的相对坐标为(1.0, 1.5, 9.3), [即以前囟为零点(0, 0, 0), 向后移动1.0 mm, 旁开1.5 mm, 深度为9.3 mm]之后, 用牙科钻钻孔开颅, 压迫止血, 垂直穿刺至视上核, 电极电流1 mA, 损毁15 s后拔针, 再次压迫止血, 缝皮, 置笼观察。

1.2.3 实验组手术处理方法 斜向穿刺具体步骤(以经左侧偏转20°穿刺视上核为例): (1)SD大鼠固定于立体定向仪头架上, 备皮消毒并沿着大鼠顶骨正中切开头皮暴露颅骨, 而微量注射器固定于垂直位置(图1A); (2)通过移动立体定向X轴, Y轴以及Z轴方向, 使得微量注射器针尖恰好接触大鼠前囟点, 并记录下当前的坐标位置为(31.2, 48.7, 72.2); (3)参考Paxinos & Watson^[17]大鼠鼠脑图谱, 左侧视上核位置与前囟的坐标差为(1.0, -1.5, -9.3), 经过计算, 坐标(32.2, 47.2, 62.9)应为左侧视上核于垂直方向的坐标; (4)在Z轴方向上移微量

注射器(避免稍后X轴方向和Y轴方向上移动时针尖与大鼠顶骨摩擦而变弯), 然后移动微量注射器使得针尖X轴与Y轴位于坐标(32.2, 47.2)的位置, 此时不必移动Z轴方向的坐标; (5)于Z轴方向缓慢下移微量注射器, 使得针尖刚好接触大鼠颅骨后, 双眼注视针尖与颅骨接触点, 缓慢于Z轴方向上移微量注射器, 同时用笔标记接触点I位置(图1B); (6)通过调节角度, 使得微量注射器向左侧偏转, 与矢状面成20°, 并且通过移动X轴和Z轴方向, 使得微量注射器针尖与接触点I重合, 并记录当前坐标(59.0, 47.2, 38.4, 图1C); (7)因于垂直位置下Z轴方向应向下移动9.3 mm, 故转换为斜向后, 应在X轴上向右移动 $9.3 \times \sin 20^\circ = 3.2$ mm, Z轴上向下移动 $9.3 \times \cos 20^\circ = 8.7$ mm, 而Y轴方向不必移动, 即目标核团与步骤6中的坐标(59.0, 47.2, 38.4)的相对坐标为(3.2, 0, -8.7), 故目标核团于斜向位置下坐标应为(62.2, 47.2, 29.7); (8)于Z轴方向上移微量注射器一段距离后(避免稍后移动X轴针尖接触到大鼠颅骨), 向X轴方向上向右移动使得X轴坐标到达62.2, 在Z轴方向缓慢向下移动微量注射器, 使得针尖与大鼠颅骨刚好接触时双眼注视接触点像步骤5所说方法标记接触点II(图1D); (9)标记接触点II后, 通过X轴与Z轴向左和向上移动微量注射器后, 使用牙科钻于接触点II钻孔; (10)钻孔后, 压迫止血, 然后使坐标移动至(62.2, 47.2, 29.7), 进行斜向穿刺; (11)到达目标核团后, 电极通电, 电流1 mA, 损毁15 s, 拔针, 然后压迫止血, 缝皮, 置笼观察。图2为其几何学上的计算原理, $x' = z \cdot \sin \alpha$, $y' = 0$, $z' = z \cdot \cos \alpha$ (其中x, z为垂直位置下目标核团与前囟的相对位置; x' , y' , z' 为斜向位置下目标核团与1.2.1中接触点II的相对位置)。

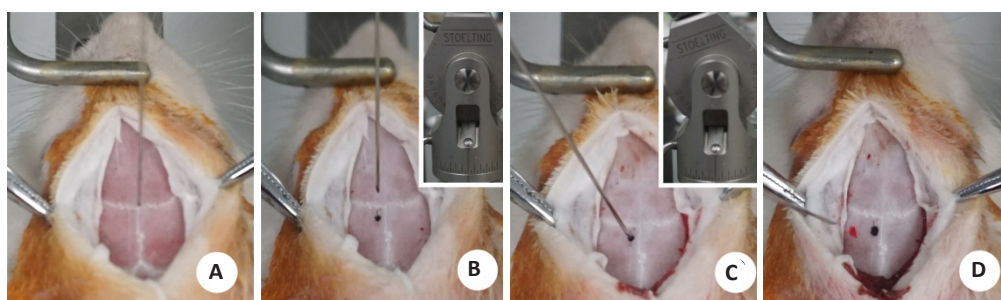


图1 大鼠立体定向斜向穿刺步骤

Fig.1 Procedures of oblique stereotactic puncture in rats. A: Targeting the bregma, marking it as the point O; B: Moving to the target coordinate, marking it as black point I; C: Placing the needle at the black point I at an oblique angle; D: Moving to the red point II.

简洁步骤: 第1步: 定前囟位置, 记录立体定向仪3个轴(x, y, z)的坐标读数分别为a、b、c。第2步: 查图谱, 确定目标核团与前囟在3个坐标上的相差的具体读数分别为d、e、f。第3步: 将立体定向仪X轴及Y轴移动至g、h显示的数据的位置, 标记接触点I, 其中 $g = a - d$, $h =$

b-e。第4步: 调节角度, 倾斜状态与接触点I重合, 记录当前坐标(i, j, k)以及倾斜角度 α 。第5步: 得出倾斜状态下目标核团坐标(l, m, n), 其中 $l = i - f \cdot \sin \alpha$, $m = j$, $n = k + f \cdot \sin \alpha$, 并穿进穿刺针, 达到该坐标位置。

1.3 实验数据记录及统计学分析

所有手术均由同一个人进行,而术前、术中、术后数据统计均由统计教研室完成。术前所需统计的数据包括:两组大鼠术前体质量和性别;术中所需统计的数据包括:两种核团定位方法所需时间 T_1 (即从头皮切开后到用牙科钻开颅骨时间)、两组术中上矢状窦破裂率 P_1 、两组钻孔后止血时间 T_2 、拔针后止血时间 T_3 、手术完成所用时间 T_4 (从头皮切开到拔针后缝皮,由于两组留针时间相同);两组术后24 h大鼠死亡率 P_2 。所有数据采用SPSS 13.0统计软件进行数据处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,经检验数据均符合正态分布且方差齐。采用独立样本 t 检验以及 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

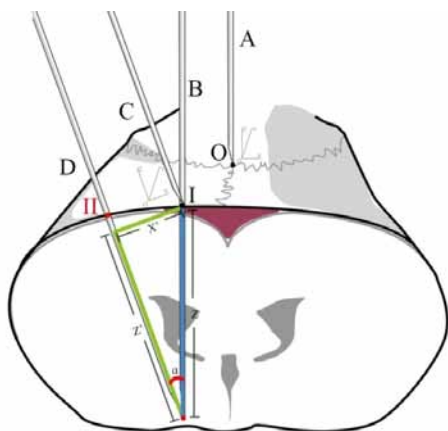


图2 穿刺的冠状面

Fig.2 The coronal plane of the puncture. O: Bregma; A: Position of the puncture needle in Fig.1A; B: Position of the puncture needle in Fig.1B; C: Position of the puncture needle in Fig.1C; D: Position of the puncture needle in Fig.1D. I: The black point I. II: The red point II. Dark red area: The superior sagittal sinus.

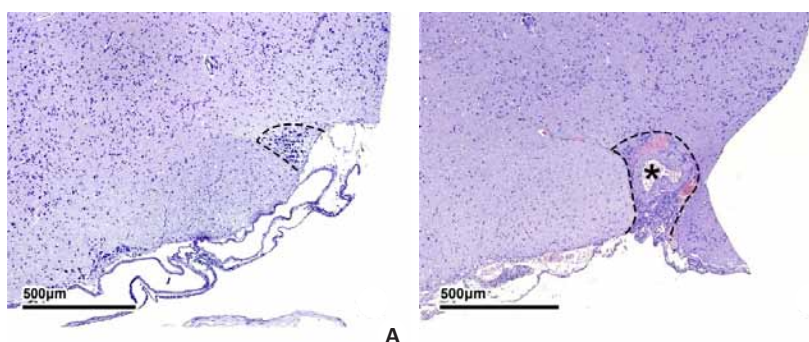


图3 斜向穿刺损毁大鼠视上核

Fig.3 Electrical lesion of the supraoptic nucleus (sagittal plane, Original magnification: $\times 10$). A: The supraoptic nucleus of a normal rat; B: The supraoptic nucleus with electrical lesion in oblique stereotactic puncture (OSP) group. Dashed area: Supraoptic nucleus. *: The electrical lesion point.

行穿刺,而且具体步骤同样不详。本研究提出的方法操作简便,计算简单,其技术的精髓在于在垂直位置上先移水平和前后方向后,再调整偏转角度,重新调零,再

2 结果

实验组和对照组均顺利完成手术,术中均无出现死亡。虽然实验组中核团定位所用时间 T_1 大于对照组,但是,实验组术中上矢状窦破裂率 P_1 、钻孔后止血时间 T_2 、穿刺后止血时间 T_3 、以及手术完成所用时间 T_4 、大鼠术后24 h死亡率 P_2 均低于对照组,有统计学差异。两组大鼠一般资料、手术情况和术后死亡率具体数据见表1。

3 讨论

动物立体定向技术是神经生物研究的基础,配合不同的针尖和导管进行电生理^[18-19]、脑室给药^[20]、微透析^[21]和光遗传学^[22]等技术。但是常规的定位和穿刺方法是垂直路径进针,到达目标核团,但是实际研究工作中会有对颅脑中线及附近结构的研究,以常规路径的方法,必然会经过上矢状窦,穿刺时会出现大出血,严重者动物会当场死亡^[12];另外,某些对深部核团的研究,为了避开某些浅部的功能核团,同样不能按垂直路径穿刺,例如切除垂体模型因为所处位置较深选择咽旁入路切除^[23-24]或者经耳抽除^[25],但这些方法因没有使用立体定向定位而导致位置不准确;再有,损毁核团的坐标设计应依循图谱上最大面积的层次作为坐标,而一些核团或结构会有一定的长轴形态,如果根据长轴损毁可以达到全损效果,而且减少对其他无关组织的损伤^[10]。但是,使用本研究中的斜向定位穿刺技术便可满足以上需求。

目前国内外部分学者也对斜向定位穿刺技术也进行了探讨和实验。但是,以往文献较少涉及立体定向方案的具体的计算方式。其中,石林等^[10]定位方法从定前囟即调整角度,后需要通过复杂的计算得出:斜向穿刺的核团深度较垂直穿刺增加了 $[(1/\cos \alpha - 1) \times z]$ mm,旁开距离较垂直亦增加了 $[(z \times \tan \alpha + x) \times \cos \alpha - x]$ mm,再进

通过移动斜向位置上的X轴和Z轴以达到垂直位置的深度。

斜向穿刺法在核团定位时间比垂直穿刺稍长,但整

表1 两组大鼠一般资料、手术情况和术后死亡率

Tab.1 Surgical data and mortality of the rats in the 2 groups

Item	OSP group (n=9)	VSP group (n=9)	t/χ^2	P
Weight (g)	224.56±15.13	233.67±11.71	1.428	0.172
T ₁ (s)	59.55±3.64	27.44±2.18	13.097	0.000
P ₁	11.1%	88.9%	10.889	0.003
T ₂ (s)	52.89±24.05	157.44±38.19	6.949	0.000
T ₃ (s)	24.33±10.60	133.89±28.81	10.705	0.000
T ₄ (s)	178.89±35.22	362.44±66.52	7.316	0.000
P ₂	0	44.4%	5.143	0.082

T₁: Time for locating supraoptic nucleus; T₂: Hemostatic time after craniotomy; T₃: Hemostatic time after puncture; T₄: Time for operation; P₁: Rupture rate of the superior sagittal sinus; P₂: The mortality during postoperative 24 hours.

个手术完成时间比垂直法短。由于对照组上矢状窦破裂率高,止血时间长,不仅影响手术完成时间,而且还造成术后大鼠预后不良甚至死亡。而在实验组中,由于选择了斜向穿刺的方法,就穿刺视上核而言,巧妙地避开了上矢状窦,即使是初学者操作,也能大大减少开颅时候动物出血量,提高实验的成功率。除此之外,鉴于多数核团的长轴方向并非成垂直方向,而是与正中矢状面成一定的角度,所以斜向穿刺法也能为术者提供更多更完美的穿刺路径^[10]。立体定向仪精确度为2°,最大偏差2°,在进针后与目标位置最大偏差距离为:深度*(sin 20-sin18)=9.3 mm*(sin 20-sin18)=9.3*(0.34-0.31)=0.28 mm。该距离不会导致穿刺针偏离视上核。另外,使用本斜向穿刺还有一个不足之处是观测误差,在调整角度时,因仪器本身和使用者目测或环境因素的原因,客观上不能保证每次操作都精确调准角度,对此本研究并进行矫正和相关研究。在实际工作中,我们推荐定时养护仪器;倾斜角度时以刻度允许的范围调整,即最小角度间隔为2度;调整时使用者视线应与刻度同一水平;工作环境温度在22℃~25℃。

总而言之,本研究中提出的斜向穿刺方法步骤具体,方法简单。就穿刺视上核而言,选择斜向穿刺法因巧妙避开上矢状窦,大鼠术中止血时间短,术后死亡率低,穿刺安全性更高。本研究提出的斜向穿刺法能为不同实验提供更多的手术入路,值得推广。

参考文献:

[1] 汪业汉. 立体定向技术发展史[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2015, 15 (9): 696-702.

[2] 魏样品, 凌士营, 汪业汉. 立体定向外科进展[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2000, 13(1): 43-9.

[3] 刘宗惠. 脑立体定向技术临床应用新进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2003, 2(1): 1-3.

[4] Segura T, Schmokel H, Hubbell JA. RNA interference targeting hypoxia inducible factor 1alpha reduces post-operative adhesions in

rats[J]. J Surg Res, 2007, 141(2): 162-70.

[5] Sheth C, Furlong TM, Keefe KA, et al. Lesion of the rostromedial tegmental nucleus increases voluntary ethanol consumption and accelerates extinction of ethanol-induced conditioned taste aversion[J]. Psychopharmacology (Berl), 2016, 233(21/22): 3737-49.

[6] Xiao JJ, Yin M, Wang ZJ, Wang XP. Transplanted neural stem cells: Playing a neuroprotective role by ceruloplasmin in the substantia nigra of PD model rats[J]? Oxi Med Cell Longev, 2015, 2015: 618613.

[7] 段奎甲, 王向鹏, 杨智勇, 等. GDNF 基因修饰神经干细胞移植治疗大鼠帕金森病[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(1): 32-8.

[8] 赵宇, 谢鹏, 朱晓峰, 等. 神经干细胞和神经生长因子联合移植对大鼠中动脉阻塞大鼠的影响[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(7): 1123-6.

[9] 陈起亮, 李金华, 周志菁, 等. 损毁或刺激垂体和下丘脑弓状核对大鼠痛觉调制的影响[J]. 生理学报, 1995, 47(5): 505-9.

[10] 石林, 杨岸超, 孟大伟, 等. 斜向立体定向穿刺法与垂直立体定向穿刺法的对比研究[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2012, 25(6): 349-51.

[11] Seidman, Moore L, Cynthia J. Current laboratory methods in neuroscience research: Springer New York[M]. 2014.

[12] 刘伟, 朱贤立, 赵洪洋, 等. 损毁下丘脑室旁核尿崩症动物模型的建立及评价[J]. 中国临床神经外科杂志, 2005, 10(5): 364-6.

[13] 李征, 于生元, 梁景耀, 等. 反复电刺激大鼠上矢状窦后的抑郁行为学表现[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 6-10.

[14] 王蓉飞, 于生元, 刘若卓, 等. 化学刺激大鼠上矢状窦区硬脑膜的偏头痛模型的可行性研究[J]. 中国疼痛医学杂志, 2008, 14(4): 222-5.

[15] 王少锦, 孙彦辉, 赵志国, 等. 大鼠脑立体定向手术校正的三种方法[J]. 河北医科大学学报, 2001, 22(2): 75-7.

[16] Warr WB, Olmos JSD, Heimer L. Neuroanatomical tract-tracing methods: Plenum press[M]. 1981. 207-62 p.

[17] Paxinos G, Watson C. Paxinos and Watson's the rat brain in stereotaxic coordinates: Academic Press[M]. 2014.

[18] 崔鹏, 王桂松, 徐纪文, 等. 吗啡成瘾对大鼠伏隔核神经元自发放电的影响[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2009, 22(2): 78-81.

[19] 金秀东, 关艳中, 张书捷, 等. 酚妥拉明阻断去甲肾上腺素对吗啡成瘾大鼠束旁核痛反应神经元电活动的影响[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(2): 266-8.

[20] 孙伟敏, 郝宏强, 孔卫娜, 等. 侧脑室注射 rAAV-HIF-1a 基因治疗 AD 模型大鼠的研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(12): 2711-4.

[21] 只达石, 黄慧玲. 微透析技术系统在神经科学中的应用[J]. 生物医学工程与临床, 2005, 9(1): 56-60.

[22] Wei P, Liu N, Zhang ZJ, et al. Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6756.

[23] 杨孔宾, 戴钦舜, 胡志强, 等. 经咽旁入路选择性切除大鼠垂体前叶的研究[J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(7): 431-3.

[24] Wang YH, Zhao CP, Wang ZG, et al. Apoptosis of supraoptic AVP neurons is involved in the development of central diabetes insipidus after hypophysectomy in rats [J]. BMC Neurosci, 2008, 9(1): 1143-53.

[25] 王毛毛, 漆松涛, 张嘉林, 等. 立体定向去垂体性尿崩症大鼠模型的建立[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(2): 414-6.

(编辑: 经 缓)