

唐涛,马小翠,姚冰,等.大鼠脊髓挫伤模型对比及行为学评价[J].中国比较医学杂志,2019,29(2):84-88.
Tang T, Ma XC, Yao B, et al. Comparison and behavioral evaluation of rat models of spinal cord contusion [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(2): 84-88.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.02.014

大鼠脊髓挫伤模型对比及行为学评价

唐 涛¹,马小翠²,姚 冰¹,陈 一¹,朴浩哲^{1*}

(1. 神经外科,2. 麻醉科;中国医科大学肿瘤医院,辽宁省肿瘤医院,沈阳 110042)

【摘要】 目的 建立不同程度 MASCIS 和 IH 大鼠脊髓损伤模型,研究损伤程度、造模方式与行为、解剖结果之间的关系。**方法** 将 80 只雌性 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 20 只。分别制作 NYU 12.5 mm、NYU 25 mm、IH 150 kdyn 和 IH 200 kdyn 模型,对模型制作成功率、BBB 评分、Grid Walking 评价、热痛以及损伤中心残余组织量进行评价。**结果** 两种造模方法成功率相似;所有动物损伤后 0~3 d BBB 评分均降至 0 分左右,随时间增加, BBB 评分均逐渐恢复,4~6 周达到平台期, NYU 25 mm 组评分最低, IH 200 组评分居中, IH 150 组合 NYU 12.5 mm 组评分相似且最高; Grid Walking 坠落率随损伤程度增高而增加; Hargreaves 结果受运动功能影响较大; 运动障碍与损伤中心层面组织残余量成反比。**结论** MASCIS 和 IH 模型均能满足脊髓损伤病理生理机制研究要求,但应根据实验目的选取相适应的造模参数。

【关键词】 脊髓损伤;模型;动物;行为学
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 02-0084-05

Comparison and behavioral evaluation of rat models of spinal cord contusion

TANG Tao¹, MA Xiaocui², YAO Bing¹, CHEN Yi¹, PIAO Haozhe^{1*}

(1. Department of Neurosurgery, 2. Department of Anesthesiology, Cancer Hospital of China Medical University, Liaoning Cancer Hospital & Institute, Shenyang 110042, China)

【Abstract】 Objective To establish animal models of spinal cord injury of different degrees of severity, namely, MASCIS and IH, and to study the relationship among the degree of damage, modeling mode, behavior, and anatomical results. **Methods** Eighty female SD rats were randomly and equally divided into four groups: NYU 12.5 mm, NYU 25 mm, IH 150 kdyn force, and IH 200 kdyn force models. Their rates of successful model establishment, BBB score, grid walking evaluation, Hargreaves test, and total cross-sectional area of the spinal cord at the injury epicenter were evaluated. **Results** The success rates in the two modeling methods were similar. The BBB scores of all animals were reduced to 0 points at 0 to 3 days after spinal cord injury. As time passed, the BBB scores gradually recovered and reached a plateau at 4 to 6 weeks. The NYU 25 mm group scored the lowest, the IH 200 group had an intermediate score, and the IH150 and NYU 12.5 mm groups scored similarly and highest. The grid walking score increased with increasing injury severity. The Hargreaves test results were more affected by motor function. Dyskinesia was inversely proportional to the residual amount of tissue at the center of the injury. **Conclusions** Both MASCIS and IH models are appropriate for research on the pathophysiological mechanisms of spinal cord injury, but appropriate modeling parameters should be selected according to the purpose of the experiment.

【Keywords】 spinal cord injury; model; animal; behavioristics

[作者简介]唐涛(1978—),男,硕士,主治医师,研究方向:脊髓损伤。Email: taotang006@163.com
[通信作者]朴浩哲(1964—),男,博士,主任医师。Email: pzpy@163.com

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种高致残率疾病,目前对其复杂的病理生理机制尚不完全清楚^[1]。脊髓损伤动物模型作为脊髓损伤研究的重要载体,作用至关重要。Allen AR 在 1911 年创造了重物坠击法制作脊髓损伤模型^[2]。之后,随着对动物模型的要求逐渐提高,越来越多的造模方法被发明和改进,其中脊髓挫伤模型更适用于继发性脊髓损伤病理生理改变的变研究。多中心动物脊髓损伤模型(Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study, MASCIS)及无限视野模型(infinite horizon, IH)应用广泛、效果显著,各有特点^[3]。本实验通过建立不同参数的 MASCIS 模型及 IH 模型,对这两种模型进行比较分析,并通过行为学及组织学对其评价,分析模型特征,为脊髓损伤研究动物模型及参数选择提供必要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用成年健康雌性 SPF 级 SD 大鼠 80 只,体重 250~300 g,由军事医学科学院动物实验中心提供, [SCXK(军)2012-0004]。随机分为 4 组($n=20$),分别为(1)NYU 12.5 mm 组,(2)NYU 25 mm 组,(3)IH 150 组,(4)IH 200 组。饲养于隔离屏障环境 [SYXK(军)2012-0065],每笼 2 只,12 h 昼夜交替,室温 22℃~23℃,相对湿度 40%~45%,可自由获取食物及饮用水。实验于军事医学科学院基础医学研究所完成,饲养及实验严格遵守军事医学科学院啮齿类动物实验规范。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备

大鼠称重后,腹腔注射 1%戊巴比妥钠溶液(0.6 mL/100 g)麻醉,以 T10 棘突为中心备皮,俯卧位固定于手术操作板上。咬骨钳咬除 T9-T11 棘突及 T10 椎板,形成一个直径约 4 mm 类圆形骨窗。将大鼠移至脊椎固定器固定,调整棘突夹使 T10 脊髓平面置于水平位置。根据实验分组,NYU 组应用 MASCIS 打击器,IH 组应用 IH 打击器建立不同损伤程度的大鼠脊髓挫伤模型。NYU 模型组设立打击终速度(± 2 s)为质控范围,IH 模型设立形变量(± 2 s)为质控范围。打击后观察到 T10 脊髓段充血,大鼠尾巴痉挛性摆动,双下肢及躯体回缩扑动,实际打击数据未超质控范围认定造模成功。术后大鼠灭菌饲养盒饲养,

一周内给予软质食物及温水饲喂。每日 3 次膀胱按摩排尿护理至主动排尿恢复。

1.2.2 BBB 运动评分(Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale, BBB scale)

于术前 2 日建立 BBB 评分基线,术后 3 d、1 周、2 周、3 周、4 周、6 周及 8 周进行双侧后肢 BBB 评分。评分由不清楚实验分组的工作人员实施^[4]。

1.2.3 Grid Walking 评分(Grid Walking Test)

分别于术前 2 d 及术后 4 周和 8 周评价,将大鼠放置于架起的 100×100 cm² 格网上,单个网格大小为 2×2 cm²,记录其自由行走总步数(Steps)和后肢从网上掉落次数(Drops),计算 Drops/Steps 比值。

1.2.4 热痛

测试前将大鼠置于测试平台上的有机玻璃箱内,设置测试环境温度 27℃,适应 15 min 后开始测试。应用热辐射仪(SERIES 8 Model 390G IITC LifeScience, USA)对大鼠后肢足底中心进行照射,通过反光镜进行监测,记录从开始照射到大鼠抬脚的反应时间。5 min 后重复检测,总共重复测量 6 次,去掉最高值和最低值,计算其余 4 次的平均值和标准差,确定(± 2 s)为正常范围,如有测量值超出该范围应当去除。如无异常值,该平均值作为该动物正常热痛阈值。

1.2.5 组织学观察

于手术后 8 周将大鼠麻醉后多聚甲醛 PBS 缓冲液灌注,取 T3 至 L4 阶段脊髓放置于多聚甲醛 PBS 缓冲液 4℃ 过夜,经 30%蔗糖溶液脱水后,OCT 包埋。恒冷切片机连续切片,片厚 20 μ m,冷贴片,选取损伤中心切片行 HE 染色,应用 ImageJ 进行灰度转换,计算残余脊髓组织面积、残余组织面积占总横断面积的百分比^[5]。

1.3 统计分析

应用 R 对实验数据进行统计学分析,四格表资料行卡方检验;计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示;单因素测量资料组间比较如符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析(One way ANOVA)及 Tukey 事后检验('Tukey's test, Tukey's post-hoc test),如不符合正态分布或方差不齐则用秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模成功率比较

共造模动物 80 只,脊髓打击阶段 NYU 组成功

36 例,成功率 90%,IH 组成功 39 例,成功率 97.5% (表 1),行卡方检验, $P>0.05$,两组造模方法造模成功率无统计学差异。

表 1 脊髓损伤造模结果

Table 1 Results of modeling of spinal cord injury

造模方法	造模例数 Number of model samples			
Modeling methods	结果: Results:	成功 Success	失败 Fail	合计 SUM
NYU		36	4	40
IH		39	1	40
合计 SUM		75	5	80

2.2 BBB 评分结果

术前所有实验动物均于适应新的饲养环境后 2 天进行 baseline 检测,未发现异常动物,得分均为 21 分。脊髓打击造模后 3 天行 BBB 评分,所有动物均出现不同程度双侧后肢瘫痪,虽偶见体动,但大部分评分还是接近于 0 分。术后 1~2 周,实验动物评分明显上升,IH 150 组、IH 200 组以及 NYU 12.5 mm 组上升趋势相似,明显好于 NYU 25 mm 组 ($P<0.05$)。4 周后 BBB 评分上升进入平台期,上升趋势减缓,IH 150 组与 NYU 12.5 mm 组表现出较 IH 200 组明显的恢复趋势 ($P<0.01$)。IH 150 组与 NYU 12.5 mm 组间无统计学差异,IH 200 组低于 IH 150 组与 NYU 12.5 mm 组 ($P<0.001$),而高于 NYU 25 mm 组 ($P<0.001$)。(图 1)

2.3 Grid Walking 结果

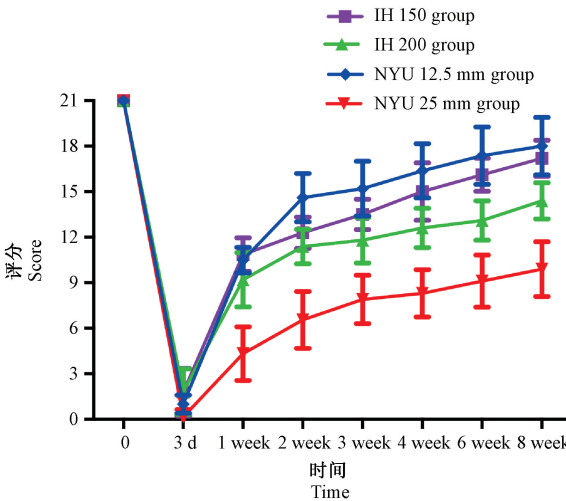
损伤后第 4 周及第 8 周进行 Grid Walking 评价 (图 2),可见损伤后后足坠落率明显升高 ($P<0.001$);第 4 周和第 8 周 NYU 25 mm 组均显示出更高的失误率 ($P<0.01$)。

2.4 Hargreaves 结果

脊髓损伤后模型动物足中心热痛明显,且有随损伤加重热痛显著的趋势 ($P<0.05$),NYU 25 mm 组结果显示好于其它造模组,考虑因为该组动物后肢运动功能尚未恢复至可自由运动的阶段,掩盖了实际结果。由于该评价结果标准差较大,同时间点各组间比较无统计学差异 (图 3)。

2.5 组织学结果

定量分析脊髓损伤中心层面残余组织面积及残余组织面积/脊髓总横断面积比值 (图 4,图 5),损伤中心脊髓总横断面积随损伤程度的增加而降低,NYU 25 mm 组残余组织面积最少,明显低于其他研究组 ($P<0.001$);IH 150 组与 NYU 12.5 mm 组损伤中心层面残余组织无统计学差异;在损伤中心处残余组织面积占总横断面积的百分比与损伤程度的增加成反比 ($P<0.001$)。

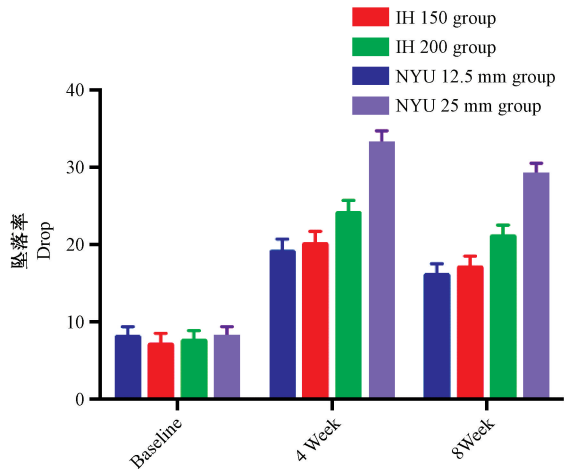


注:IH 150 组与 NYU 12.5 mm 组表现出较 IH 200 组明显的恢复趋势, $P<0.01$ 。IH 200 组低于 IH 150 组与 NYU 12.5 mm 组, $P<0.001$,而高于 NYU 25 mm 组 $P<0.001$ 。

图 1 大鼠脊髓损伤后 BBB 评分变化

Note.The IH 150 group and the NYU 12.5 mm group showed a significant recovery trend compared with the IH 200 group, $P<0.01$. The scores of the IH 200 group was lower than that of the IH 150 group and the NYU 12.5 mm group, $P<0.001$, and higher than that of the NYU 25 mm group, $P<0.001$.

Figure 1 Changes in BBB scores after spinal cord injury in the rats



注:损伤组与正常组相比坠落率明显增高, $P<0.001$ 。第 4 周和第 8 周 NYU 25 mm 组与同时段其它损伤组相比,均显示出更高的坠落率, $P<0.01$ 。

图 2 各组 Grid Walking 行为学评价

Note. The drop rate of the injury group was significantly higher than that of the normal group, $P<0.001$. At the 4th and 8th weeks, the NYU 25 mm group showed a higher drop rate than the other injury groups at the same time, $P<0.01$.

Figure 2 Behavioral evaluation of grid walking in each group

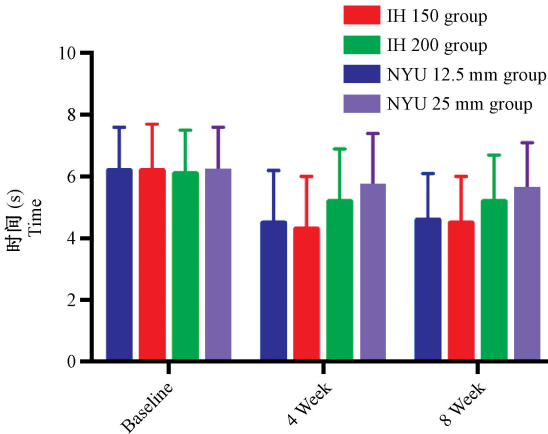
3 讨论

脊髓挫伤模型是一种急性脊髓损伤模型,因其致伤过程与人类脊髓损伤过程高度相似,被广泛应用于创伤性脊髓损伤病理生理机制研究中^[6-7]。研究人员通过使用 MASCIS 及 IH 两种不同的造模方法,建立 4 种不同损伤程度的大鼠脊髓损伤模型,造模成功率高,均达到实验设计要求。MASCIS 打击

模型失败原因主要为打击速度未达到设计要求以及打击偏离;IH 打击模型失败原因为组织位移较小。BBB 评分显示,IH 150 组、IH 200 组以及 NYU 12.5 mm 组动物均于损伤后 4 周恢复到 12 分以上,而 NYU 25 mm 组只达到 (8.30 ± 1.56) 分,4 周后运动功能恢复进入平台期,提示 IH 150 kdyn、IH 200 kdyn 和 NYU 12.5 mm 损伤程度模型更易于后期观察运动恢复情况,且由于 Grid Walking 和 Hargreaves 等行为学评价在实验动物 BBB 评分高于 12 分后结果更确切^[8],IH 150 组、IH 200 组以及 NYU 12.5 mm 组动物在 Grid Walking 和 Hargreaves 评价中均表现出与其损伤程度相关的结果。通过对损伤后 8 周损伤中心脊髓组织残余组织量及残余组织面积占总横断面积的百分比的研究,证明损伤程度与中心脊髓组织残余组织量及残余组织面积占总横断面积的百分比相关。

MASCIS 打击器与 IH 打击器是目前应用最广泛、最成熟的商品化脊髓挫伤打击器^[3],两者均能方便的调整参数,从而控制损伤严重程度^[9],达到实验设计要求,但在实际工作中研究人员发现两者各有优缺点。

MASCIS 打击器可以提供范围更广的损伤范围,并能通过读取的实际参数计算损伤力的大小;但实际操作中对于操作人员的要求较高,需要人工提起打击杆,很难控制其对脊髓的压迫时间^[10];打击杆下落时易与套筒摩擦,导致实际速度未达到设计速度,损伤程度差异过大;打击头精度不高,容易

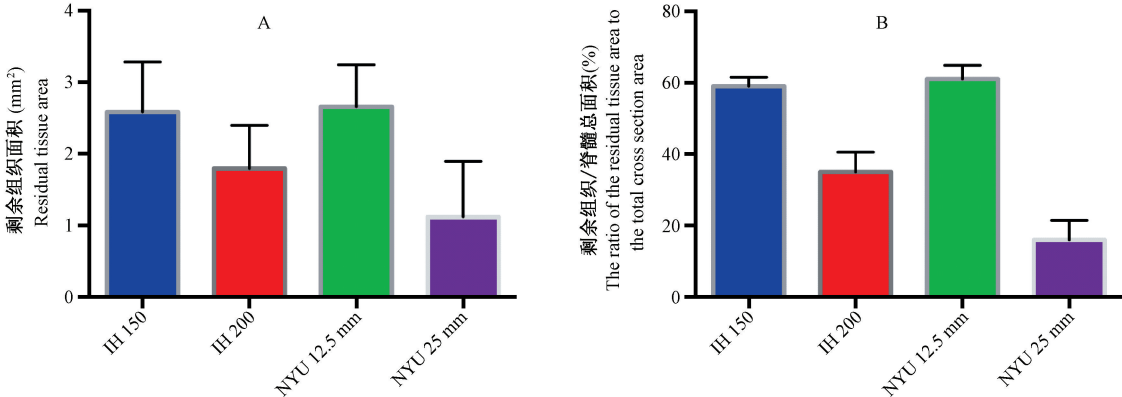


注:各损伤组损伤后与损伤前比较足中心热痛明显, $P < 0.05$;同一时间点个损伤组间比较无统计学差异, $P > 0.05$ 。

图 3 各组 Hargreaves 行为学评分

Note. After spinal cord injury, the foot center heat pain of the model rats was obvious, $P < 0.05$; there was no statistical difference between the injury groups at the same time point, $P > 0.05$.

Figure 3 Hargreaves test behavior scores in each group

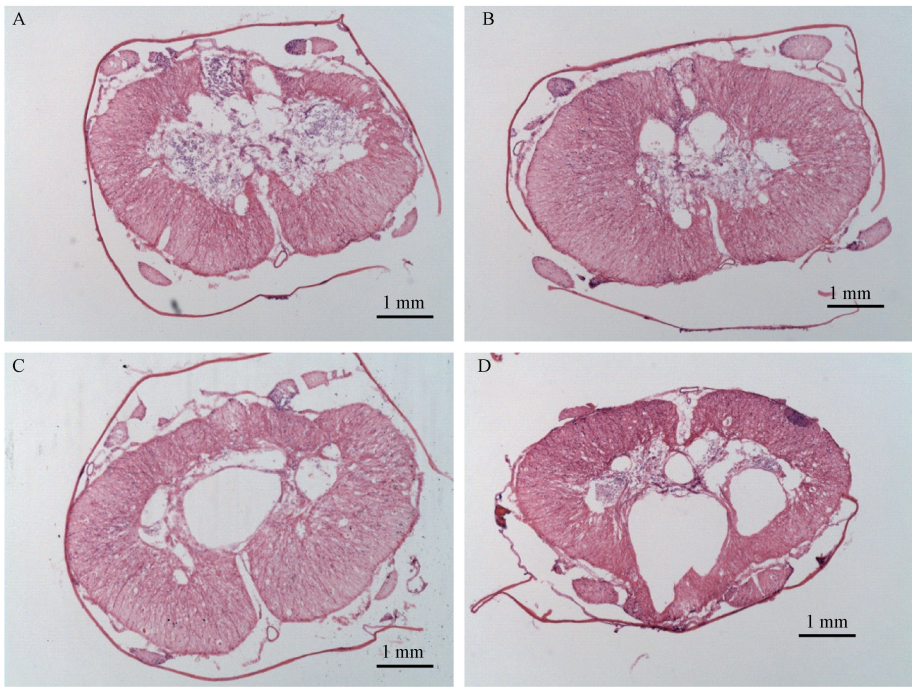


注:A.NYU 25 mm 组损伤中心层面残余组织面积明显低于其它损伤组, $P < 0.001$;B. 损伤中心层面残余组织面积与总横截面积的比值与损伤程度的增加成反比, $P < 0.001$ 。

图 4 定量分析脊髓损伤后损伤中心层面残余组织

Note. A. The residual tissue area at the injury epicenter of the NYU 25 mm group was significantly lower than that of the other study groups ($P < 0.001$). B. The ratio of the residual tissue area at the center to the total cross-sectional area was inversely proportional to the increase in the degree of injury ($P < 0.001$).

Figure 4 Quantitative analysis of the residual tissue at the injury epicenter after spinal cord injury



注:A. IH 150 组;B. NYU 12.5 mm 组;C. IH 200 组;D. NYU 25 mm 组。

图 5 损伤中心 HE 染色

Note. A. IH 150 group; B. NYU 12.5 mm group; C. IH 200 group; D. NYU 25 mm group.

Figure 5 Histological changes revealed at the spinal cord cross-sections taken at the epicenter of injury (HE staining)

偏离中心,导致双侧损伤不均一,甚至打击到骨质,造成造模失败。

IH 打击器能够很好的控制打击力度,打击部位精确,并能直接通过软件观察到组织位移程度及实际受力情况,易于进行质量控制,双侧损伤均一性高^[11-12];但 IH 打击器应用电机控制,达到设置打击力后瞬时收回,不能设置持续挤压时间,不能完全模拟临床脊髓损伤的病理生理改变;参数设置范围较小,大鼠造模推荐参数范围为 100~200 kdyn,损伤程度差别较小,不易建立梯度损伤模型。

MASCIS 和 IH 模型均能满足脊髓损伤病理生理机制研究要求,为创伤性脊髓损伤提供有效的研究手段,因其本身特点存在部分差异,在应用过程中应根据实验目的选取适当的造模方式及造模参数,以利于揭示疾病本质。

参考文献:

[1] Liu C, Jin A, Zhou C, et al. Nitric oxide synthase gene expression in injured spinal cord tissue[J]. Chin Med J (Engl), 2002,115(5):740-742.
[2] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column[J]. Jama, 1911,lvii(11):878-880.
[3] 张军,陈晓,张荣佳,等. 脊髓损伤动物模型的研究进展[J].

中华全科医学,2017(03):501-504.
[4] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma,1995,12(1):1-21.
[5] Cao Q, Zhang YP, Iannotti C, et al. Functional and electrophysiological changes after graded traumatic spinal cord injury in adult rat[J]. Exp Neurol,2005,191 Suppl 1:S3-S16.
[6] 熊春翔,宗少晖,曾高峰,等. 大鼠 Allen's 脊髓损伤模型的建立及评价[J]. 广西医科大学学报,2011(02):215-217.
[7] 王力,于丽,窦慧慧,等. 实验性脊髓损伤模型的研究进展[J]. 解剖科学进展,2009(02):253-256.
[8] Hama A, Sagen J. Behavioral characterization and effect of clinical drugs in a rat model of pain following spinal cord compression[J]. Brain Res,2007,1185:117-128.
[9] 陈月娟,石玲玲,谢秀梅,等. 大鼠 PSI-IH 脊髓撞击损伤模型的制备[J]. 华中科技大学学报(医学版),2016(04):420-423.
[10] 田峰,王春芳,李鹏飞,等. 两种构建小鼠脊髓打击损伤模型仪器的比较和探讨[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2015(02):164-170.
[11] Fujioka Y, Tanaka N, Nakanishi K, et al. Magnetic field-based delivery of human CD133(+) cells promotes functional recovery after rat spinal cord injury[J]. Spine (Phila Pa 1976),2012,37(13):E768-E777.
[12] Furuya T, Hashimoto M, Koda M, et al. Treatment of rat spinal cord injury with a Rho-kinase inhibitor and bone marrow stromal cell transplantation[J]. Brain Res,2009,1295:192-202.

[收稿日期] 2018-08-04