

· 综 述 ·

慢性脊髓损伤动物模型的研究进展

李玮农¹, 赵继荣², 邓强², 朱换平², 陈文², 陈祁青², 赵宁², 朱宝², 杨涛¹, 张立存¹

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050)

摘 要 慢性脊髓损伤(chronic spinal cord injury, CSCI)的临床表现复杂多样,严重影响患者的健康和生活质量。深入研究 CSCI 对于提高人们对该病的认识和诊疗水平具有重要意义,而构建完善的动物模型是进行 CSCI 研究的前提。本文从 CSCI 模型动物选择和 CSCI 动物模型构建 2 个方面对 CSCI 动物模型的研究进展进行了综述。

关键词 脊髓损伤;模型;动物;综述

慢性脊髓损伤(chronic spinal cord injury, CSCI)是由于椎间盘突出、骨赘形成、后纵韧带骨化、黄韧带肥厚、脊柱畸形、肿瘤等多种原因导致椎管及神经根管容积减小,渐进性压迫脊髓及其附属结构,进而导致损伤节段出现各种感觉和运动异常、括约肌功能障碍、肌张力异常及病理反射等相应改变的一种损伤。CSCI 的病理过程广泛存在于脊髓型颈椎病、后纵韧带骨化和椎管狭窄等多种疾病的病程中^[1]。CSCI 早期起病隐匿,症状不典型,容易被忽视;在疾病后期,随着脊髓长期受压,可造成脊髓功能不可逆性损伤,致残率较高。虽然医学界很早就开始关注并研究 CSCI,但由于难以复制出与人类 CSCI 病理进程相似的动物模型,限制了人们对该病的认识和诊疗水平。本文从 CSCI 模型动物选择和 CSCI 动物模型构建 2 个方面对 CSCI 动物模型的研究进展进行了综述,现总结报告如下。

1 CSCI 模型动物选择

建立理想的动物模型是开展 CSCI 相关研究的前提条件,而选择的实验动物尤为重要。理想的 CSCI 实验动物应具备以下特点:①发病过程及组织病理学变化与人类相似;②实验操作方便;③耐受损伤的能力强。

目前在 CSCI 的相关基础研究中常选用中小型动物,如兔、大鼠及小鼠等^[1-3]。兔的神经系统较发达,价格相对便宜,容易获得,且耐受损伤能力强,是目前

应用较多的 CSCI 模型动物,被很多研究者应用于 CSCI 的实验研究中^[4-5]。大鼠来源充足,价格较低,容易饲养和护理,而且解剖操作方便、对疾病抵抗力强,其中应用较多的是 Sprague-Dawley 大鼠和 Wistar 大鼠^[6]。但大鼠的椎管周径小、脊髓较细,实验操作中容易误伤脊髓。小鼠与人类有着较高的基因同源性,加之损伤后的行为学评估方法较为成熟,尤其是小鼠具有独特的转基因优势,使其更适用于基因干预的实验研究。近年来,随着转基因技术的发展,科学家们培养出了一种随着年龄增长出现颈椎椎体钙化沉积物增多的小鼠——Twy(tiptoe-walking Yoshimura)小鼠,被认为是目前仅有的无创慢性进行性动物脊髓压迫模型动物^[7]。但小鼠体形小,脊髓较大鼠更细,不利于实验操作。

从方便实验操作及获得实验结果的角度来讲,羊、猪、犬等大型动物不失为更好的选择。它们的神经系统结构、组织器官构造以及损伤后的症状都与人类有着很高的相似性,在脊髓损伤机制研究以及后期药物应用的评估方面都是很好的选择^[8]。但这些动物对饲养环境要求高、价格较贵,很难普遍应用于实验室 CSCI 研究的初期试验。而与人类在解剖结构、生理病理和代谢机能方面最为相似的灵长类动物,因较为稀少、价格昂贵且涉及道德伦理等原因,在研究中也未能普遍应用^[9]。

2 CSCI 动物模型构建

虽然研究者们都在尽量探索与人类 CSCI 病理进程相似、易于推广的标准化 CSCI 动物模型构建方法,但目前还没有任何一种模型能完全模拟出人类 CSCI 的病理进程。理想的 CSCI 动物模型应具备以下特点:①临床相似性。动物模型的病理进程与 CSCI 相

基金项目:国家自然科学基金项目(81760877);甘肃省科技计划项目(20YF3FA014,20YF3FA016);甘肃省中医药管理局科研课题(GZK-2018-35);兰州市人才创新创业项目(2018-RC-99)

通讯作者:赵继荣 E-mail:1395010574@qq.com

似,能反映脊髓受损后的病理变化和运动行为改变情况。②可控性。能根据实验需要,准确调节损伤的进程和强度,达到慢性、渐进性损伤的要求。③可复制性。动物模型的制作技术和设备要求适中、动物死亡率低、实验可重复性好,从而可以快速大批量制作。

目前国内外较为成熟的 CSCI 动物模型有球囊压迫模型、螺钉压迫模型、骨粒回植诱导骨赘压迫模型、硅胶片压迫模型、肿瘤压迫模型、可膨胀材料压迫模型、Twy 小鼠模型等^[10-12]。

2.1 球囊压迫模型 球囊压迫法可控性较强,被广泛应用于脊髓损伤的实验研究中。Tralov 等^[13]于 1953 年用犬建立了最早的可充气式球囊压迫模型,他们通过手术将球囊植入实验动物椎管内,待麻醉恢复后,通过拧紧螺钉使硬脊膜外气囊充气压迫脊髓,形成血流供给障碍,造成脊髓组织缺血缺氧,进而导致脊髓组织变性坏死。这种模型中脊髓损伤的程度主要取决于球囊提供的压力大小和脊髓受压时间的长短。由于气囊膨胀时囊内压力并非呈线性增加,且反复充气对脊髓的反复刺激容易造成急性及亚急性损伤,难以完全模拟 CSCI 的病理进程。杨诗球等^[14]对这一模型进行了改进,他们自大鼠胸椎椎弓根处向椎管内钻一小圆孔,通过圆孔将 1 个水囊放置在硬脊膜囊外,用骨腊封闭圆孔后向水囊内注入不同剂量的泛影葡胺使水囊膨胀压迫脊髓。但这种改进后的水囊压迫模型也未能解决球囊膨胀时非线性压迫的弊端,只是通过注入不同剂量的液体控制了椎管狭窄的程度。

2.2 螺钉压迫模型 Hukuda 等^[15]于 1972 年选择犬作为模型动物,通过颈前路手术将螺钉置于犬颈椎椎体中,并在体外留一旋转柄,通过旋转柄缓慢将螺钉推进到椎管内,以造成颈脊髓慢性压迫。这种造模方式能较好地控制脊髓损伤的进程和强度,被广泛应用于脊髓损伤的动物实验中。但这种直接的螺钉压迫常导致脊髓直接性损伤,易造成实验动物瘫痪及死亡,且金属螺钉在 MRI 检查时会出现伪影,不利于实验效果的评价。为解决这一问题,Xu 等^[16]将特殊设计的固定装置固定在大鼠 T₇~T₉ 脊椎上,自 T₈ 椎板开窗放置 1 块塑料板,通过旋转螺钉推挤塑料板对脊髓进行缓慢间接的压迫,持续 6 周,期间每周通过影像学检查对压缩装置的放置位置和脊髓的受压程度进行观察,并计算大鼠的运动感觉缺陷指数,6 周后

收集受压的 T₇~T₉ 脊髓进行组织学检查。这种改进后的装置通过对脊髓的渐进性压迫,成功诱发了大鼠运动和感觉功能紊乱。该模型通过在硬脊膜外使用塑料板,避免了螺钉直接损伤脊髓,可以较好地控制压迫程度,形成 CSCI。这种造模方式的弊端在于塑料垫片在 X 线检查时不显影,拧入螺钉过程中不易评价螺钉、垫片与脊髓之间的位置关系。赵鹏等^[17]也采用与 Xu 等^[16]相似的装置进行 CSCI 造模,但将塑料垫片改为钢板,证实了该装置及所制作的动物模型的稳定性和可靠性。如何消除或减少急性损伤导致的动物瘫痪和死亡,是应用此类方法造模的关键^[18]。

2.3 骨粒回植诱导骨赘压迫模型 周磊等^[19]切除大鼠 L₅ 棘突,切除部分椎板形成 3 mm × 15 mm 的缺损,将切取的骨块制成直径 0.5 mm 的碎骨粒,回植于切取骨块处(实验组),对照组仅切除 L₅ 棘突及同体积椎板;术后实验组大鼠下肢运动功能评分较术前减小,术后 16 周时实验组大鼠出现明显的间歇性跛行;病理检查发现,术后 10 周时实验组大鼠出现明显椎管狭窄,瘢痕组织与硬脊膜囊粘连明显,再生椎板基本形成;影像学检查发现,术后 1 周时实验组大鼠 L₅ 椎管横截面积较对照组减小 16.1%。由于碎骨粒诱导椎板再生而导致椎管狭窄的过程是慢性进行性的,所以不会对脊髓造成急性压迫和损害,是对 CSCI 病理进程的良好模拟,理论上是一种既简单又理想的造模方法。陈振南等^[20]在新西兰兔 L₅ 左侧椎板开窗,将碎骨粒镶嵌于医用胶原蛋白海绵上,放置于椎板开窗处,也成功复制了 CSCI 模型。这种造模方式的优点在于:①造模后随着瘢痕组织形成,瘢痕组织与硬脊膜囊粘连,可对脊髓组织形成自外向内的慢性压迫,能很好地模拟 CSCI 的病理进程;②操作简便安全,动物成活率高;③模型制作周期短,一般 12~16 周即可完成。其缺点包括:①大鼠、小鼠等小型动物的椎板较小,实验操作难度大,实际中多选用大中型动物,导致实验成本增加;②椎板开窗后将自体骨植入到较小的手术操作区域,由于椎板有一定的再生能力,能很快重新形成硬脊膜后方的骨性屏障,有可能达不到对脊髓组织的持续压迫。

2.4 硅胶片压迫模型 1999 年 Yamaguchi 等^[21]通过在大鼠椎管内放置硅胶片成功制作了 CSCI 模型,组织学检查显示整个实验过程中大鼠脊髓组织轴突持续变性和再生。国内学者刘学勇等^[22]将特制的硅

胶片分别插入大鼠 L_4 和 L_6 椎管,造成横截面积各缩小 30% 的双节段椎管狭窄,制成双节段 CSCI 模型;并进行高频率刺激和追加压迫,观察不同刺激条件和压力下受压马尾神经的复合动作电位和复合感觉神经动作电位的变化情况,发现动态负荷使受压的马尾神经动作电位发生一过性降低。代凤雷等^[23]通过手术将自制的硅胶片放置于大鼠 L_4 、 L_5 椎板下,术后大鼠的平板运动距离较造模前明显减小,CT 检查显示实验部位椎管内密度值较正常椎管内密度值明显升高;进一步的三有限元建模结果显示大鼠椎管内径较正常大鼠明显狭窄;解剖后发现大鼠受压节段的马尾神经受压达 50% ~ 70%。硅胶片压迫造模的优点是:①硅胶植入造成的 CSCI 病理过程与人体椎管狭窄导致的 CSCI 病理过程相似,均属于致压物压迫脊髓及其附属结构产生相应症状;②所采用的医用硅胶具有较好的组织相容性,免疫反应小,且价格较低;③实验者可以选择不同规格的硅胶片植入椎管的不同部位,造成相应部位脊髓损伤。但这种造模方式在实际操作中很难掌握脊髓压迫的程度,存在造成急性、亚急性脊髓损伤的可能。总体来说,该模型符合目前学术界对于 CSCI 病理进程的认识。

2.5 肿瘤压迫模型 肿瘤压迫模型是通过各种途径将肿瘤组织植入到动物硬脊膜外,借助肿瘤组织在硬脊膜外腔的缓慢浸润生长,逐渐对脊髓组织产生压迫的一种模型。Fu 等^[24]将肿瘤组织种植于大鼠 T_9 节段的硬脊膜外间隙,实验动物在术后 18.8 d (平均)时出现了神经损害表现。2013 年, Sarabia - Estrada 等^[25]在一项观察前列腺癌转移至脊柱的试验中,将人前列腺肿瘤细胞 PC3 通过注射方式植入到雄性无胸腺大鼠(5 周龄)的 L_5 椎体,使用视频监控观察动物步态变化,发现在植入肿瘤组织后第 20 天(平均)大鼠出现明显的步态障碍体征(拖曳尾巴,后肢肢体不协调等),第 22 天处死大鼠解剖后观察到大鼠椎体及周围组织均显示出肿瘤浸润生长的迹象并压迫脊髓组织,病理检查发现其脊髓周围肿瘤组织与植入的前列腺癌肿瘤组织一致。这种造模方法的局限性在于:①可用于实验的肿瘤组织来源困难,取材、制备和保存要求高,目前应用较多的有肝癌组织、前列腺癌组织和乳腺癌组织;②肿瘤组织的植入方式和位置无统一标准,且生长浸润方向无法人为控制,对脊髓组织形成压迫的程度也不一致,实验结果的可控性和实

验的可重复性较差;③肿瘤细胞在动物体内生长机制复杂,易造成重要脏器损伤,影响动物寿命,导致样本丢失严重;④肿瘤组织生长速度快,容易对脊髓形成急性及亚急性损伤。由于存在这些问题,目前在 CSCI 实验研究中,该模型已很少被应用。

2.6 可膨胀材料压迫模型 1989 年, Arbit 等^[26]首次将一种遇水可膨胀材料(甲基纤维素 - 聚丙烯腈)植入动物硬脊膜外,制成 CSCI 模型。此后,这种造模方式在脊髓损伤的实验研究中多有应用。2013 年, Long 等^[27]将一块吸水后可膨胀聚氨酯薄板(规格为 $1\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 1\text{ mm}$,能在 2 h 内吸收椎管内液体,使体积增大为原来的 7 倍)植入大鼠 C_6 椎板和硬脊膜之间,利用其在硬脊膜外吸水后的膨胀力对脊髓形成直接压迫。由于材料膨胀速度过快,容易造成脊髓组织急性或亚急性损伤,该模型不完全符合 CSCI 慢性压迫的损伤机制。2016 年,李金轩^[28]采用医用甲基乙烯基硅橡胶进行 CSCI 造模,这种材料的吸水成分为交联聚乙烯基吡咯烷酮水凝胶,这种材料在吸水性和保水性方面具有较强的稳定性,吸水后体积近似均匀增长,7 d 后体积增大为原来的 2.92 倍;实验中他们将规格为 $3\text{ mm} \times 1.5\text{ mm} \times 1.2\text{ mm}$ 的压迫材料放置在大鼠 $C_6 \sim C_7$ 硬脊膜外,术后观察大鼠脊髓慢性受压后的病理变化,证实了应用吸水性和保水性方面更稳定的材料能更好地模拟 CSCI 慢性渐进性的损伤特点。可膨胀材料压迫模型的优点是:①手术操作简单,一次手术就可完成造模操作;②感染率较低,动物成活率较高,样本量丢失较少;③材料膨胀时可形成对脊髓的均匀压迫,较为符合 CSCI 的病理特征。不同材料内植物遇水膨胀的速度以及持续时间差别较大,而且难以人为控制,因此这种造模方法也容易形成急性或亚急性脊髓损伤,影响实验效果。相信随着材料工艺和技术的不断进步,这种造模方式将会成为理想的 CSCI 造模方法。

2.7 Twy 小鼠模型 1981 年, Hosoda 等^[29]培育出一种转基因小鼠,这种小鼠与异质结合体的同胞小鼠产生的后代具有常染色体隐性遗传病,随着年龄增长,会在其颈椎后出现钙化物沉积,逐渐造成颈脊髓压迫,因其特征性的踮脚爬行方式,故被命名为 Twy 小鼠。Yato 等^[30]利用 Twy 小鼠证实了中度慢性脊髓压迫($20\% < \text{占位率} < 30\%$)并不会引起脊髓组织结构改变,而是导致脊髓运动神经元功能改变。Song

等^[31]利用 Twy 小鼠研究发现,丝裂原活化蛋白激酶 2 信号通路参与慢性压迫性颈脊髓损伤的炎症反应,抑制丝裂原活化蛋白激酶 2 能减轻颈脊髓炎症反应,从而抑制颈脊髓细胞凋亡,使神经功能障碍得到显著改善。Twy 小鼠模型目前被广泛应用于 CSCI 的实验中,但该模型存在压迫过程中不能控制压迫程度,且无法重复实验结果的弊端。

3 小 结

在 CSCI 模型动物的选择上,大鼠因具有容易获取、生长周期短、抗感染能力强等优点,成为众多 CSCI 造模方式中首选的模型动物。球囊压迫模型、螺钉压迫模型、骨粒回植诱导骨赘压迫模型、硅胶片压迫模型、肿瘤压迫模型、可膨胀材料压迫模型及 Twy 小鼠模型等均为目前国内外较为成熟的 CSCI 动物模型,但尚无一种模型被学界公认。CSCI 的发病原因多样、机制复杂,根据不同的发病原因所建立的模型,其病程进展不尽相同,而采用不同的动物、造模机制所建立的模型又有其各自的特点,所以在选择 CSCI 动物模型时,应根据实验需要,选择与之相适应的 CSCI 实验动物和造模方式。建立一种具有高度可重复性和稳定性,能客观、准确、定量模拟出与人类 CSCI 病理进程类似的动物模型还有一定困难,还需在前期研究的基础上不断完善。

参考文献

[1] 齐英娜,谭明生. 脊髓损伤动物模型的研究现状[J]. 中国矫形外科杂志, 2018, 26(10): 927-929.

[2] 王琛,吴智兵,林兴栋,等. 大黄素对慢性压迫性损伤大鼠脊髓细胞因子的影响[J]. 中成药, 2019, 41(7): 1697-1701.

[3] 时愔,杨华,王开化,等. 慢性脊髓损伤通过上调 PD-1 表达破坏 CD8⁺T 细胞的功能[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(2): 298-300.

[4] 陈盛,刘建航,刘本涛,等. 脊髓型颈椎病动物模型制作的关注热点[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(24): 3890-3896.

[5] 王想福,王兴盛,赵道洲,等. 红花注射液对兔脊髓慢性渐进性压迫后的治疗作用及其量效关系研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2016, 31(5): 499-502.

[6] 李敏,杨孝,向武,等. 大鼠脊髓损伤动物模型建立的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(72): 111-112.

[7] 姜昊,田自开,徐浩钦,等. 动物颈脊髓压迫模型的研究进展[J]. 中华灾害救援医学, 2017, 5(5): 288-291.

[8] 刘国库,艾宗勇,牛宝华,等. 脊髓损伤动物模型研究进展[J]. 药物生物技术, 2017, 24(3): 279-282.

[9] 王雨榕,邓强,郭铁峰,等. 缺血再灌注脊髓损伤动物造模研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 658-662.

[10] 杜盛超,张玮,胡浩然,等. 一种改良大鼠慢性脊髓压迫模型的建立与评价[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(10): 1806-1809.

[11] 沈宝良,李云飞,韩擎天,等. 慢性压迫性颈脊髓山羊模型的建立与评估[J]. 实用骨科杂志, 2018, 24(7): 609-612.

[12] 杨超华,禹宝庆,游庆华,等. 球囊压迫法建立兔双节段脊髓损伤模型[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2017, 10(1): 63-66.

[13] TARLOV I M, KLINGER H, VITALE S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression[J]. AMA Arch Neurol Psychiatry, 1953, 70(6): 813-819.

[14] 杨诗球,谭正中,鲁晓滨,等. 判断脊髓受压程度的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1987, 25(1): 6-8.

[15] HUKUDA S, WILSON C B. Experimental cervical myelopathy: effects of compression and ischemia on the canine cervical cord[J]. J Neurosurg, 1972, 37(6): 631-652.

[16] XU P, GONG W M, LI Y, et al. Destructive pathological changes in the rat spinal cord due to chronic mechanical compression. Laboratory investigation [J]. J Neurosurg Spine, 2008, 8(3): 279-285.

[17] 赵鹏,王凯,周涛. 脊髓慢性压迫损伤动物模型实验研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(18): 8304-8307.

[18] 胡志俊,卞琴,王拥军,等. 大鼠脊髓慢性压迫性损伤动物模型的建立[J]. 脊柱外科杂志, 2004, 2(4): 216-219.

[19] 周磊,李明,刘培来,等. 椎板切除碎骨粒回植法制作腰椎管狭窄动物模型[J]. 中国临床解剖学杂志, 2007, 25(6): 660-664.

[20] 陈振南,周忠,王万明,等. 腰椎板开窗术后微小骨粒回植模型的建立及意义[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(12): 42-46.

[21] YAMAGUCHI K, MURAKAMI M, TAKAHASHI K, et al. Behavioral and morphologic studies of the chronically compressed cauda equina. Experimental model of lumbar spinal stenosis in the rat [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1999, 24(9): 845-851.

[22] 刘学勇,邓纯博,刘吉泉. 急性腰椎管狭窄动物模型的建立及对马尾神经动作电位的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(28): 3471-3474.