

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.10.007

# 脊髓损伤犬模型的建立及激光多普勒血流测定仪评价的意义

武玉江

(河北省邢台市人民脊柱骨科 054001)

**[摘要]** **目的** 探讨激光多普勒血流测定仪(LDF)在建立的急性犬脊髓损伤模型中的评价作用。**方法** 将 15 只比格犬分为 A、B、C 组。通过改良的脊髓损伤数控装置,采用不同的撞击和压迫时间,建立不同的急性脊髓损伤犬模型。A 组为 1.2 m/s+5 mm+5 mm+15 mns,B 组为 1.2 m/s+5 mm+5 mm+10 mns,C 组为对照组。应用 LDF 分别测量 3 组脊髓损伤模型的脊髓血流(SCBF)图,通过脊髓坏死面积测量评估两组模型犬的病理学改变。**结果** LDF 测量 3 组脊髓损伤模型的 SCBF 图结果显示,A 组模型 SCBF 量降低最明显,A 组损伤程度明显重于 B、C 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。运动诱发电位显示,SCBF 的下降程度与预后及运动功能密切相关。**结论** 通过 LDF 可有效判断急性脊髓损伤的程度和 SCBF 的情况,在动物实验和临床领域有较好的应用前景。

**[关键词]** 激光多普勒流量测定;脊髓损伤;血流动力学;犬模型

**[中图分类号]** R-332      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2016)10-1320-03

## Establishment of canine spinal cord injury model and significance of laser-doppler flowmetry evaluation

Wu Yujiang

(Department of Spine Surgery, Xingtai Municipal People's Hospital, Xingtai, Hebei 054001, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of laser-doppler flowmetry (LDF) in the evaluation of established canine spinal cord injury(SCI) model. **Methods** Totally 15 beagle dogs were randomly divided into the group A, B and C. Through the improved numerical control SCI apparatus, different impacts and compression time were adopted to establish the different acute SCI models. The group A was 1.2 m/s+5 mm+5 mm+15 mns, the group B was 1.2 m/s+5 mm+5 mm+10 mns, while the group C was taken as the control group. LDF was used to measure the spinal cord blood flow(SCBF) chart, the pathologic change was evaluated by measuring the spinal cord necrosis area. **Results** The SCBF chart in 3 groups measured by LDF showed that the decrease of SCBF in the group A was most obvious, the injury degree in the group A was more severe than those in the group B and C, the difference was statistically significant( $P<0.05$ ). The motor evoked potential displayed that the decrease degree of SCBF was closely related with the prognosis and motion function. **Conclusion** LDF could effectively judge the degree of spinal injury and SCBF situation, which has a good application prospect in animal experiments and clinical field.

**[Key words]** laser-Doppler flowmetry; spinal cord injury; hemodynamics; canine model

近年来,为提高日益增多的脊髓损伤患者的疗效<sup>[1-2]</sup>,国内外在建立较稳定的脊髓损伤动物模型方面进行了大量研究<sup>[3-4]</sup>。在此基础上,作者通过改良的脊髓损伤数控装置,模拟不同程度的打击和压迫,建立了不同程度的急性脊髓损伤模型犬,并通过激光多普勒血流测定仪(LDF)评估犬模型脊髓损伤的严重程度,效果较满意,现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 动物及分组** 选取 15 只比格犬,年龄 1.0~1.5 岁,体重 10~13 kg,均购自中国协和医科大学动物实验中心。随机分为 A、B、C 组。通过改良的脊髓损伤数控装置,采用不同的撞击和压迫时间,建立不同的急性脊髓损伤模型犬。A 组:5 只犬,撞击速度 1.2 m/s,撞击深度 5 mm,压迫深度 5 mm,压迫时间 15 min(1.2 m/s+5 mm+5 mm+15 mns)。B 组:5 只犬,撞击速度 1.2 m/s,撞击深度 5 mm,压迫深度 5 mm,压迫时间 10 min(1.2 m/s+5 mm+5 mm+10 mns)。C 组:5 只犬,不予特殊处理,作为对照组。

**1.2 建模方法** 给予所有犬全身麻醉后,取俯卧位,固定四肢,以 T<sub>12</sub>~T<sub>13</sub>为中心,做后正中切口,依次切开,暴露椎板和

小关节。去除椎板,充分暴露脊髓。将椎弓根螺钉置入 T<sub>12</sub>~T<sub>13</sub>双侧椎弓根,将犬牢牢固定在脊柱节段固定器上。通过改良的脊髓损伤数控装置,对 A 组和 B 组进行不同的撞击和压迫时间(图 1A、B)<sup>[5]</sup>。在判定脊髓损伤模型犬建立成功后,关闭犬背部切口。术后 3 d,每组犬模型每天给予肌内注射青霉素 8 万 U/kg,预防感染,同时,适当给予静脉营养,给予不能自主排尿的犬尿道插管留置导尿。

### 1.3 术后评估方法

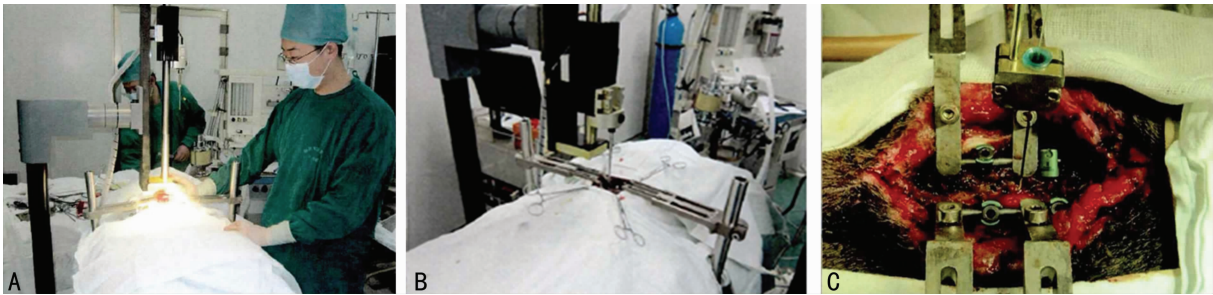
**1.3.1 MRI** 伤后 8 d 使用 MRI(GE, Signa\_HDx\_3.0T, 产自美国通用公司)检查每只模型犬脊髓损伤的位置和程度,确定脊髓损伤范围,计算脊髓损伤横断面的面积。

**1.3.2 LDF 监测脊髓血流(SCBF)** 使用 Moor-VMS LDF(产自英国 Moor 公司)测量各组模型犬的 SCBF。测量时,暴露模型犬的脊髓,使脊髓损伤数控装置与 LDF 相配套,测量完成后,再依次给予以缝合,见图 1C。

### 2 结果

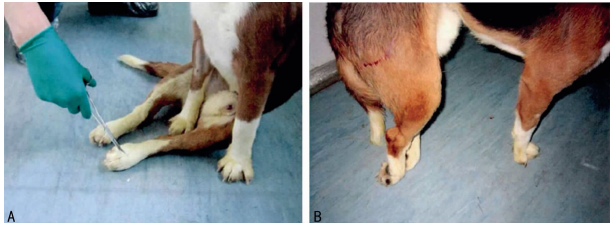
**2.1 脊髓损伤模型构建情况** 所有犬均成功达成脊髓损伤,A 组术后均截瘫,B 组表现为不全瘫,见图 2。

作者简介:武玉江(1963—),副主任医师,本科,主要从事脊柱、骨质疏松疾病研究。



A: A 组; B: B 组; C: C 组。

图 1 通过脊髓损伤数控装置建立不同程度的脊髓损伤犬模型



A: A 组; B: B 组。

图 2 脊髓损伤模型

**2.2 MRI 结果分析** 脊髓损伤犬模型建立后 8 h, 受损脊髓有出血影像表现。MRI 结果显示受损脊髓 T2 加权像信号加强, 预示出血 A. 组和 B 组间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见图 3。

**2.3 不同组间模型犬 SCBF 图测量基础值** 基础值: 3 组间腹侧白质基础值相互差异无统计学意义 (A 组 vs. B 组,  $P=0.667$ ; A 组 vs. C 组,  $P=0.471$ ; B 组 vs. C 组,  $P=0.850$ )。3 组间灰质基础值相互差异无统计学意义 (A 组 vs. B 组,  $P=0.572$ ; A 组 vs. C 组,  $P=0.794$ ; B 组 vs. C 组,  $P=0.383$ )。3 组间背侧白质基础值相互差异无统计学意义 (A 组 vs. B 组,  $P=0.934$ ; A 组 vs. C 组,  $P=0.628$ ; B 组 vs. C 组,  $P=0.721$ )。

**2.4 损伤后 7 d SCBF 图测量结果** 腹侧白质: 3 组间相互差异有统计学意义, A 组较 B、C 组低 ( $P<0.01$ ), B 组较 C 组低 ( $P<0.01$ )。背侧白质: 3 组间相互差异有统计学意义, A 组较 B、C 组低 ( $P<0.01$ ), B 组较 C 组低 ( $P<0.01$ )。灰质: 3 组间相互差异有统计学意义, A 组较 B、C 组低 ( $P<0.01$ ), B 组较 C 组低 ( $P<0.01$ ), 见表 1。犬未损伤时的血流图见图 4, 重度损伤 7 d 后见图 5。



图 3 MRI 结果

表 1 基础值和损伤后 7 d 3 组犬 SCBF 图结果

组别	基础值			7 d 后			7 d 后下降幅度 (%)		
	灰质	腹侧白质	背侧白质	灰质	腹侧白质	背侧白质	灰质	腹侧白质	背侧白质
A 组	348.5	248.4	243.1	63.6	102.2	63.8	-83.1	-60.2	-75.2
B 组	354.5	253.9	243.8	126.4	181.6	120.5	-64.3	-28.5	-50.6
C 组	344.4	256.6	250.8	342.6	252.3	242.5	-1.7	-2.8	-4.6

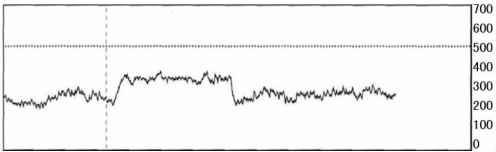


图 4 未损伤前的 SCBF 图



图 5 重度损伤 7 d 后的 SCBF 图

3 讨 论

脊髓损伤是一种常见且致残率很高的疾病, 构建理想的脊

髓损伤动物模型对于研究其病理机制和发展预后具有重要意义。近年来, 由于脊髓损伤的治疗引起了广泛重视, 关于脊髓损伤的实验研究较多, 并取得了一系列研究进展<sup>[6-8]</sup>。

在此基础之上, 本研究通过改良脊髓损伤数控装置, 模拟不同程度的打击和压迫, 建立了不同程度的急性脊髓损伤模型犬, 并通过 LDF 评估模型犬脊髓损伤的严重程度<sup>[9-12]</sup>。近年来, 作为一种新型 SCBF 图检测技术, LDF 由于可在动物实验中良好地评估 SCBF, 而在脊髓损伤的研究领域逐步得到重视<sup>[13-14]</sup>。

改良的脊髓损伤数控装置适合大、中型动物模拟急性脊髓损伤<sup>[15]</sup>。该装置通过控制撞击速度、撞击深度等因素和指标, 建立的脊髓损伤模型更加接近临床实际情况。在本研究中, 通过制作犬截瘫模型, 在解压前对犬脊髓压迫从 5 min 到 30 min 不等, 造成了犬模型不同的解剖学和行为学结果<sup>[16]</sup>。

在本研究中,MRI 结果显示,脊髓损伤模型犬建立后 8 h,受损脊髓有出血影像表现。统计学分析 A 组和 B 组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。而不同组间模型犬 SCBF 图测量基础值结果显示,3 组间腹侧白质、灰质、背侧白质基础值差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),说明本研究所测的实验动物处于同一水平,在此水平上的实验结果是客观正确的。

本研究中,不同组间犬模型损伤后 7 d SCBF 图测量结果显示,腹侧白质、灰质、背侧白质 3 组间差异有统计学意义( $P<0.01$ );说明 A 组和 B 组均表现为对腹侧白质损伤最小,对背侧白质次之,而灰质损伤最为严重。C 组血流值未下降,而 A 组和 B 组血流值较之前下降,且 A 组下降幅度最大,提示 LDF 测出的血流值和犬模型损伤程度密切相关。A、B 两组的灰质、背侧白质、腹侧白质的血流相对于 C 组均有所降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。其中 A 组更低,损伤更为严重。

以往国内外的临床研究显示,脊髓损伤后几小时内 SCBF 量进行性下降,呈低流状态,其中以脊髓灰质最为明显,称为“创伤后梗阻”<sup>[17-18]</sup>。研究显示,脊髓损伤后进行性缺血机制主要是由脊髓损伤后,交感神经张力降低,脊髓自动调节血流的能力丧失<sup>[19]</sup>。同时,外伤可直接损伤脊髓局部血管,创伤后的一系列反应造成组织缺血、缺氧,从而产生组织损伤<sup>[20]</sup>,最终导致脊髓内的神经细胞死亡<sup>[21]</sup>。

综上所述,本研究在已建立的犬脊髓损伤的动物模型基础上,应用 LDF 对脊髓损伤后 SCBF 图进行检测<sup>[5,22]</sup>。建立的脊髓损伤模型犬标准化程度高,重复性良好。对损伤组的测量和对比的结论很好地评价了脊髓损伤各层面的血流情况,是一种效果良好的评价手段<sup>[23-24]</sup>,具有重要的临床意义和实用价值。

## 参考文献

- [1] Duhamel G, Callot V, Cozzzone PJ, et al. Spinal cord blood flow measurement by arterial spin labeling[J]. Magn Reson Med, 2008, 59(4): 846-854.
- [2] Levine GJ, Levine JM, Budke CM, et al. Description and repeatability of a newly developed spinal cord injury scale for dogs[J]. Prev Vet Med, 2009, 89(1/2): 121-127.
- [3] Duhamel G, Callot V, Decherchi P, et al. Mouse lumbar and cervical spinal cord blood flow measurements by arterial spin labeling: sensitivity optimization and first application[J]. Magn Reson Med, 2009, 62(2): 430-439.
- [4] 陈银海, 刘敏, 何井华. 脊髓损伤患者流行病学调查[J]. 实用医学杂志, 2011, 21(6): 1032-1034.
- [5] 虞攀峰. 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]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2011.
- [6] Cizkova D, Kakinohana O, Kucharova K, et al. Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells[J]. Neuroscience, 2009, 147(2): 546-560.
- [7] 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(2): 310-316.
- [8] Vaccaro AR, Hulbert RJ, Patel AA, et al. The subaxial cervical spine injury classification system: a novel approach to recognize the importance of morphology, neurology, and integrity of the disco-ligamentous complex[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(21): 2365-2374.
- [9] Wang XY, Dai LY, Xu HZ, et al. The load-sharing classification of thoracolumbar fractures: an in vitro biomechanical validation[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(11): 1214-1219.
- [10] Feron F, Perry C, Cochrane J, et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury[J]. Brain, 2008, 128(12): 2951-2960.
- [11] Courtine G, Bunge MB, Fawcett JW, et al. Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of Treatments for spinal cord injury in humans[J]. Nat Med, 2007, 13(5): 561-566.
- [12] Onifer SM, Rabchevsky AG, Scheff SW, et al. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery[J]. ILAR J, 2007, 48(4): 385-395.
- [13] 宁广智, 冯世庆. 天津市脊髓损伤流行病学调查研究[M]. 天津: 天津医科大学, 2012.
- [14] Agus H, Kayali C, Arslanas M. Nonoperative treatment of burst-type thoracolumbar vertebra fractures: clinical and radiological results of 29 patients[J]. Eur Spine J, 2006, 14(6): 536-540.
- [15] Moore TA, Vaccaro AR, Anderson PA. Classification of lower cervical spine injuries[J]. Spine, 2009, 31(11 Suppl): S37-43.
- [16] Barbiro-Michaely E, Tolmasov M, Rinkevich-Shop S, et al. Can the "brainsparing effect" be detected in a small-animal model? [J]. Med Sci Monit, 2007, 13(10): BR211-219.
- [17] Vaccaro AR, Lehman RA Jr, Hurlbut RJ, et al. A new classification of thoracolumbar injuries: the importance of injury morphology, the integrity of the posterior ligamentous complex, and neurologic status[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(20): 2325-2333.
- [18] Vaccaro AR, Zeiller SC, Hulbert RJ, et al. The thoracolumbar injury severity score: a proposed treatment algorithm[J]. J Spinal Disord Tech, 2011, 18(3): 209-215.
- [19] Fehlings MG, Perrin RG. The timing of surgical intervention in the treatment of spinal cord injury: a systematic review of recent clinical evidence[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(11 Suppl): S28-35.
- [20] 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(1): 89-94.
- [21] Zhang YP, Burke DA, Shields LB, et al. Spinal cord contusion based on precise vertebral stabilization and tissue displacement measured by combined assessment to discriminate small functional differences[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(10): 1227-1240.
- [22] Riis V, Verrier MC. Outpatient spinal cord injury rehabilitation: managing costs and funding in a changing health care environment[J]. Disabil Rehabil, 2007, 29(19): 1525-1534.

3 讨 论

肝脏是酒精代谢的主要场所,长期大量饮酒会引起酒精性肝炎、脂肪肝、肝硬化等疾病。而奇魅植物酵素包含消化酶如糖化酶、脂肪酶等酶类成分,富含益生菌,且低能量、无脂肪。更值得一提的是,与化学药品、中药制剂等解酒药相比,奇魅植物酵素是通过代谢酶解酒,不会给肝肾造成代谢负担及任何不良反应。已有研究表明植物酵素具有良好的润肠通便<sup>[8]</sup>、解酒醒酒<sup>[9]</sup>的作用。本文旨在探讨植物酵素对酒精性肝损坏的保护作用。

ALT 和 AST 是存在于肝细胞质和线粒体中的转氨酶,当肝细胞严重病变、坏死时,ALT 和 AST 就会渗漏入血,所以血清 ALT 和 AST 活性升高为肝细胞损伤的特异性指标,而肝脏病理学检查则被认为是判断肝脏损伤的金标准<sup>[10]</sup>。本实验采取连续灌胃的方法建立慢性酒精性肝损伤模型<sup>[11]</sup>,发现模型组小鼠血清 ALT 和 AST 活性水平明显升高,肝脏出现明显的脂肪和炎症性病理学改变,证实小鼠酒精性肝损伤模型建立成功。研究发现与模型组相比,中剂量和高剂量组的 ALT、AST 的活性和 MDA 的水平显著降低,GSH 的水平显著升高。这与夏伟等<sup>[12]</sup>发现桦木酸可以改善酒精对小鼠的机体损伤,降低 ALD 大鼠血清中 AST、ALT 的活性水平,上调肝组织总蛋白的水平及提高肝组织中 GSH,降低 MDA 的水平指标有相同的效用。而 MDA 是机体进行脂质过氧化作用的终产物,MDA 的水平反应组织过氧化的程度<sup>[13]</sup>,由此说明植物酵素可能是通过抗氧化作用来保护肝脏的。

饮酒后,约 90%在肝内代谢,进入体内的酒精大部分通过 ADH 代谢转化为乙醛,乙醛再经 ALDH 的作用,代谢为无毒的乙酸。然而,乙醛代谢为乙酸的速度较慢,易导致乙醛在体内蓄积<sup>[14]</sup>。乙醛可与肝细胞中的蛋白质、DNA 发生螯合,形成乙醛加合物,如 MDA-乙醛加合物等。诸多乙醛加合物可导致受其影响的蛋白发生变构,失去应有的功能,从而引起肝细胞功能受损<sup>[15-17]</sup>。另外酒精性肝损伤可出现轻度的黄疸和肝脏肿大,肝质量常达正常肝脏的 2~3 倍。本研究发现各剂量肝组织中的 ADH、ALDH 的水平均显著降低,同时肝指数也显著降低。说明奇魅植物酵素可能是通过促进酒精在肝组织中的代谢来保护肝脏的。

综上所述,高剂量的奇魅植物酵素可以有效地改善酒精性肝损伤,其作用机制可能与抗氧化作用和促进酒精代谢有关,其药用价值有待进一步开发。

参考文献

[1] 丁晓东.酒精性肝病肝损伤的信号通路[J]. 肝脏,2012,17(4):269-271.

[2] Rehm J,Mathers C,Popova S,et al. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders [J]. Lancet, 2009, 373

(9682):2223-2233.

[3] Roede JR,Orliry DJ,Fisher AB,et al. Over-expression of peroxiredoxin 6 dose not prevent ethanol-mediated oxidative stress and may play a role in hepatic lipid accumulation[J]. J Pharmacol Exp Ther,2009,330(1):79-88.

[4] Osama EI, Feng H, Kim WH, et al. IL6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver[J]. Cell Mol Immunol,2004,1(3):205-211.

[5] Reuben A. Alcohol and the liver[J]. Curr Opin Gastroenterol,2008,24(4):328-338.

[6] Loguercio C,Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis[J]. Free Radical Bio Med,2003,34(1):1-10.

[7] Dolganiuc A,Szabo G. In vitro and in vivo models of acute alcohol exposure [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(10):1168-1177.

[8] 赵金凤,曲佳乐,皮子凤,等. 植物酵素润肠通便保健功能研究[J]. 食品与发酵科技,2012,48(3):54-56.

[9] 曲佳乐,赵金凤,皮子凤,等. 植物酵素解酒护肝保健功能研究[J]. 食品科技,2013,38(9):51-55.

[10] 马晓茜. 大鼠酒精性肝损伤模型的制备及观察[J]. 山东医学高等专科学校学报,2011,33(2):81-83.

[11] 吴伟青,陈静,刘超群,等. 绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学,2011,32(13):310-313.

[12] 夏伟,朱若岑,蒋维维,等. 桦木酸对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 营养学报,2015,37(1):68-72.

[13] 黄川锋,王海鑫,康爱英,等. 辛夷对急性酒精性肝损伤小鼠的肝保护作用及机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015,31(7):515-518.

[14] 吴高峰. 牛磺酸对大鼠酒精性肝病防治作用及其机理的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2006.

[15] Xu D,Thiele GM,Beckenhauer JL,et al. Detection of circulating antibodies to malondialdehyde-acetaldehyde adducts in ethanol-fed rats[J]. Gastroenterology,1998,115(3):686-692.

[16] 赵雪珂,穆茂,程明亮. 酒精性肝病与氧化应激[J]. 临床肝胆病杂志,2014,30(2):118-120.

[17] Setshedi M,Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2010,3(3):178-185.

(收稿日期:2015-11-08 修回日期:2015-12-20)

(上接第 1322 页)

[23] Zhang YP,Shields LB,Zhang Y,et al. Use of magnetic stimulation to elicit moto revoked Potentials,somatosensory evoked potentials,and H-reflexes in non-sedated rodents[J]. J Neurosci Methods,2007,165(1):9-17.

[24] Darian-Smith C. Monkey models of recovery of voluntary hand movement after spinal cord and dorsal root injury [J]. ILAR J,2007,48(4):396-410.

(收稿日期:2015-11-08 修回日期:2015-12-06)