

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00398

## 经皮硬膜外置管法建立绵羊急性颈脊髓损伤模型

黄 轩, 陈 智, 王 琨, 何 平, 沈洪兴\*

第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 应用经皮穿刺技术向硬膜外置入可扩张球囊导管, 建立绵羊急性颈脊髓压迫性损伤模型。**方法** 成年雄性绵羊 12 只, 随机分为对照组(A 组)、0.6 mL 压迫组(B 组)和 1 mL 压迫组(C 组), 每组 4 只。所有动物均使用经皮穿刺鞘管, 透视下自腰椎椎板间隙将 3Fr 球囊导管置入硬膜外, 并输送至 C<sub>6/7</sub> 水平。1 周后 B、C 组动物分别以 0.6 和 1 mL 容量扩张导管球囊, 持续压迫颈髓 1 h 后撤除; A 组动物不作处理。各组动物均在穿刺操作及球囊扩张前后接受 CT 和 MRI 检查, 计算球囊导管的椎管侵占率, 并采用改良 Tarlov 评分评估神经功能。分别于球囊扩张后 24 h 及 48 h 处死每组各 2 只动物, 取压迫节段颈髓送病理检查。**结果** 所有动物均顺利置管。CT 检查测得置管后 A、B、C 组椎管侵占率(%)依次为 9.1±0.2、9.1±0.2 和 8.9±0.2。扩张球囊后 B、C 组椎管侵占率(%)分别增加到 45.5±2.5 和 78.3±2.3。MRI 检查提示扩张的球囊对颈髓腹侧形成压迫。置管后各组动物神经功能正常, 扩张球囊后 B、C 组出现后肢运动减退, 且与扩张容量相关。病理结果提示 B、C 组在球囊扩张 24 h 后, C<sub>6/7</sub> 水平脊髓灰质前角神经元数量减少, 胞体缩小, 白质轻度脱髓鞘, 部分轴突空泡样变; 压迫 48 h 后, 病理改变进一步加重。**结论** 经皮置管技术避免了对脊髓周围正常组织的破坏, 是一种能够模拟临床实际致伤机制的急性颈脊髓损伤造模方法。

**[关键词]** 脊髓损伤; 硬膜外球囊导管; 球囊压迫; 动物模型**[中图分类号]** R 681.531.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)04-0398-05

### Percutaneous epidural balloon catheter insertion for establishing a sheep model of acute cervical spinal cord injury

HUANG Xuan, CHEN Zhi, WANG Kun, HE Ping, SHEN Hong-xing\*

Department of Orthopedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To develop a percutaneous technique with expandable balloon catheter for establishing a sheep model of acute cervical spinal cord compression injury. **Methods** Twelve adult male sheep were randomized into 3 groups: control (A, n=4), 0.6 mL compression (B, n=4) and 1 mL compression (C, n=4) groups. All animals received epidural balloon catheter (3Fr) insertion using a percutaneous trans-lumbosacral interlaminar space technique similar to the method used in vascular access for angiography. The balloon catheter was advanced under fluoroscopic guidance until its distal tip reached the C<sub>6/7</sub> level. One week later, the balloons of group B and C were inflated by 0.6 mL and 1 mL half-strength contrast material; the balloons were left inflated for 1-hour and then deflated. Animals in group A received no treatment. CT and MR images were taken before and after surgical procedures. Quantitative assessment of spine canal occupying rate was accomplished by using a software program based on CT results. Motor functions of animals were assessed by modified Tarlov scale. Two animals were sacrificed each time at 24 h and 48 h after inflation in each group. Spinal segments of the injured level were then obtained for pathologic examination. **Results** Balloon catheters were successfully inserted in all animals, and the spinal-canal-occupying rates were (9.1±0.2)% in group A, (9.1±0.2)% in group B, and (8.9±0.2)% in group C after insertion. After inflation, the rates increased to (45.5±2.5)% in group B and (78.3±2.3)% in group C, and MRI findings indicated ventral compression of the cervical spinal cord. Hind limb movement remained normal after catheter insertion in all groups. Animals in group B and C became paraplegic after inflation, and a positive correlation between injection volume and Tarlov score was observed. Pathological results demonstrated neuron atrophy, increased gap around the neurons, mild demyelinated and vacuolar

**[收稿日期]** 2013-01-18 **[接受日期]** 2013-03-01**[基金项目]** 上海市浦江人才计划(10PJ1412500), 上海市科委基础研究重点科技项目(11JC1415600). Supported by Shanghai Pujiang Talent Program (10PJ1412500) and Key Program on Basic Research of Shanghai Science and Technology Committee (11JC1415600).**[作者简介]** 黄 轩, 硕士, 主治医师. E-mail: xuanhuangcn@qq.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161697, E-mail: shenhxgk@126.com

degeneration in both group B and C at C<sub>6/7</sub> level 24 h after injury. Pathological changes deteriorated at 48 h after injury.

**Conclusion** Percutaneous epidural balloon catheter insertion can avoid surgical exposure of normal tissues around the spinal cord, and it may serve as a method for establishing acute cervical spinal cord injury model simulating the clinical condition.

**[Key words]** spinal cord injuries; epidural balloon catheter; balloon compression; animal models

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(4): 398-402]

急性颈脊髓损伤易继发各种并发症,导致后续治疗、护理花费巨大,给个人、家庭和社会带来极大负担<sup>[1]</sup>。由于脊髓损伤相关基础研究水平停滞不前,临床疗效始终难以提高<sup>[2]</sup>。基础研究的开展依赖可靠的动物模型,而常用的撞击、半切/横断、钳夹、螺钉和可扩张球囊压迫等方法<sup>[3]</sup>,均需要通过手术暴露脊髓,破坏了脊髓正常的生理环境,难以真实再现损伤机制。本研究拟借鉴血管经皮穿刺置管技术,于透视引导下将可扩张球囊导管经皮置入硬膜外腔,在避免损伤脊髓周围组织的同时,通过精确控制置入导管的深度、球囊扩张的容量,实现目标节段颈髓不同程度的急性压迫性损伤,以建立一种更为贴近实际致伤机制的动物模型,为后续脊髓损伤机制、治疗手段的研究提供可靠的实验平台。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 选用12只9~10月龄的雄性绵羊,体质量40~45(42.4±1.6) kg,均由第二军医大学实验动物中心提供并负责饲养。所有实验方案均经第二军医大学长海医院伦理委员会批准实施。

1.2 动物分组及造模方法 将动物随机分为3组(每组4只),绵羊术前禁食、水8 h,捆绑四肢后,于双后肢外侧肌注氯胺酮(8 mg/kg)行基础麻醉。待绵羊镇静后,将其侧卧于可透视专用手术台。使用便携式C臂机(GE公司, Brivo OEC 785)透视下定位绵羊腰骶椎板间隙,以间隙位于背部的体表投影处为穿刺点,局部剪除体毛并消毒。以0.1%利多卡因(0.2 mL/kg)局部麻醉后,使用股动脉穿刺针于透视引导下经由棘突椎板间隙穿刺进入腰骶交界水平椎管内,置入导丝替换穿刺针,再顺导丝置入5Fr血管穿刺鞘,移除导丝,将3Fr双腔Fogarty球囊取栓导管经由穿刺鞘输送至C<sub>6/7</sub>水平目标节段(图1)。将穿刺鞘及导管妥善固定于体表(血管穿刺系统和导管分别由Terumo上海公司以及Edwards Lifesciences公司提供,导管球囊最大扩张量2 mL,全长55 cm)。所有动物均于术后送动物房饲养。于相同环境下饲养1周后,B、C组分别使用0.6 mL和1 mL注射用水/造影剂混悬液对球囊进行扩张,维持1 h

后撤除,A组不做任何处理。所有针对球囊的操作均于30 s内完成。术后将动物置于软垫,防止压疮。术中出現脑脊液漏或球囊渗漏的动物予以废弃,同时补充实验动物。在扩张后24 h及48 h两个节点每组各处死2只动物,供实验分析使用。

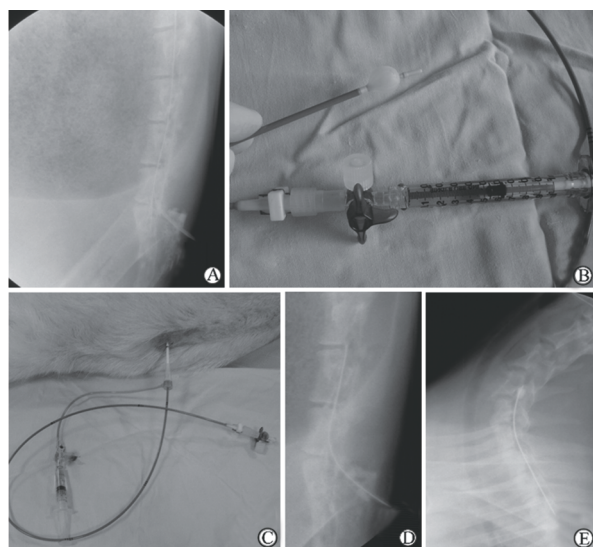


图1 经皮置管造模过程

Fig 1 Procedures of percutaneous balloon catheter insertion and inflation

A: Introduction of the guide wire through the vascular sheath; B: The Fogarty balloon catheter; C: Introduction of the catheter along the guide wire; D: The catheter was introduced into the epidural space; E: The balloon was inflated at C<sub>6/7</sub> level

1.3 神经功能评估 分别于穿刺操作及球囊扩张前后,采用改良Tarlov评分<sup>[4]</sup>对动物后肢运动功能进行评估;5分,正常步态,可以跳跃;4分,能跑不能跳;3分,能走不能跑;2分,后肢可以站立,不能走;1分,后肢可以活动但不能站立;0分,后肢完全瘫痪。

1.4 影像及病理学检查 所有动物均分别于穿刺操作后、扩张球囊前后及处死前接受64排CT(Siemens公司, Somatom Sensation)和1.5T MRI(GE公司, Brivo MR355)检查,检查前均给予氯胺酮或地西洋10 mg镇静。选择经C<sub>6/7</sub>椎间盘水平的横断面影像测量导管的椎管侵占率(CT自带Syngo A70A软件)。实验结束时,给予静脉内丙泊酚(8 mg/kg)

麻醉动物,再推注过量氯化钾施以安乐死。经手术分别获得 C<sub>6/7</sub>水平头尾两端约 3 cm 的脊髓组织,置入 10%甲醛溶液中固定 12 h(4℃)后,常规石蜡包埋,取 4 μm 横切片行 H-E 染色,光镜下观察。

### 2 结果

2.1 一般情况 所有动物均顺利置管,无脑脊液漏、球囊渗漏及穿刺部位感染发生,未见导管移位或脱出,术后均存活至实验结束。

2.2 行为学评估结果 A 组绵羊各时间点改良 Tarlov 评分均为 5 分;B、C 组在穿刺置管前后及扩张球囊前评分均为 5 分;球囊扩张后 8 h,B 组中 3 只评分下降为 1 分,1 只下降为 2 分,C 组中 4 只均丧失后肢自主活动,评分为 0;球囊扩张 8 h 后至实验终止,除 B 组 2 只绵羊后肢运动功能有所改善外(球囊扩张后 24 h,评分从 1 分增加至 2 分),剩余 6 只评分均无明显变化。B、C 组所有动物均于球囊扩张后出现尿失禁表现。

2.3 影像学检查结果 CT 和 MRI 结果显示,穿刺置管后导管均位于椎管内硬膜外间隙,未对脊髓形成明显压迫,A、B 和 C 组椎管内侵占率(%)分别为 9.1±0.2、9.1±0.2 和 8.9±0.2;扩张 B、C 组球囊后可见球囊对 C<sub>6/7</sub>水平脊髓腹侧形成压迫,椎管内侵占率(%)分别增加至 45.5±2.5 和 78.3±2.3(图 2)。

2.4 病理学检查结果 H-E 染色可见 A 组 C<sub>6/7</sub>水平脊髓组织内部神经元和轴突结构无明显异常。B、C 组球囊扩张压迫 24 h 后,均可见相应节段脊髓灰质前角神经元胞体缩小,数量明显减少,胞体周围间隙增大,白质轻度脱髓鞘,部分轴突空泡样变;压迫 48 h 后,均可见神经元变性明显,神经元细胞核固缩,白质弥漫性脱髓鞘改变,轴突广泛空泡样变性(图 3)。

### 3 讨论

目前学界普遍认为,理想的造模技术应具备再现性好、重复性强、可定量分级、操作简单和适应性广 5 个要素<sup>[5]</sup>。撞击伤模型是目前应用最为广泛的颈脊髓损伤模型。该模型利用重锤垂直下落砸击脊髓背侧,通过调整重锤质量和砸落高度改变撞击强度,模拟不同程度的撞击性损伤。造模所使用的器材较为简单,操作过程易于重复,并可实现损伤程度的定量分级。但由于造模过程需要将实验动物严格固定,撞击前必须通过手术去除部分椎板,暴露靶节段脊髓背侧,破坏了致伤部位脊髓的正常生理环境和

结构,并且手术过程极易对脊髓造成副损伤,导致基于该模型的实验结果容易受各种混杂因素影响。因此,撞击伤模型通常仅被用于啮齿类动物,而明显的种属差异又进一步限制了相关研究结果的临床应用。

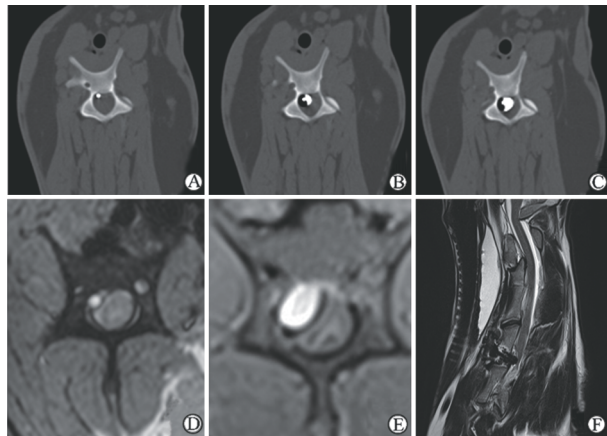


图 2 置管后 CT 和 MRI 检查结果  
Fig 2 CT and MRI findings after balloon catheter insertion and inflation

A-C: CT images of different inflation volume (0 mL, 0.6 mL, and 1 mL) of the balloon catheter. D-E: MRI images (D: No obvious spinal cord compression without inflation; E: Inflation with 0.6 mL caused ventral lateral compression of the cervical spinal cord; F: Sagittal T<sub>2</sub>-weighted images showed compression of the cervical spinal cord with 0.6 mL inflation)

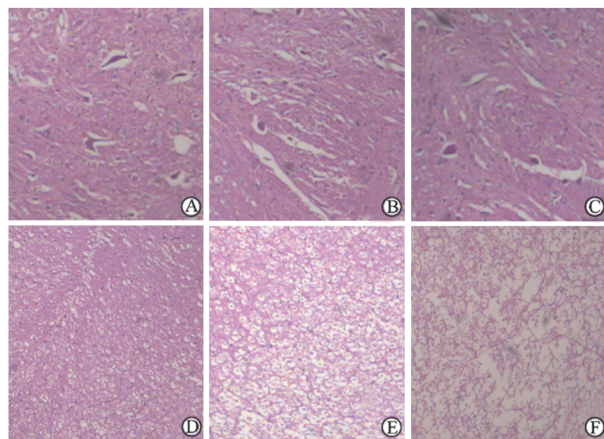


图 3 球囊扩张压迫后 H-E 染色结果  
Fig 3 Pathologic results of cervical spinal cord after balloon inflation

A-C: Grey matter area; D-F: White matter area. A, D: Normal neurons, white matter and axon in control group(percutaneous epidural balloon catheter insertion with inflation volume of 0 mL); B, E: Neuronal degeneration, neuronatrophy and moderate demyelination 24 h after 1 mL inflation; C, F: Severe neuronal degeneration in the grey matter and vacuolar change in the white matter 48 h after 1 mL inflation. Original magnification: ×40

1953年, Tarlov等<sup>[4]</sup>首次成功使用球囊建立犬脊髓压迫性损伤模型, 此后该模型不断得到改进和发展。研究表明, 应用球囊造成脊髓压迫性损伤, 能较好地反映真实损伤过程中机械打击和血管受阻两大致伤因素的共同作用<sup>[6]</sup>。此外, 球囊扩张程度便于精确控制, 改变大小型号即可用于不同体型、种属的动物, 被认为基本满足了成为最理想造模技术的要求, 因而成为近年来脊髓损伤动物模型研究的热点<sup>[7]</sup>。针对大型哺乳动物, Lim等<sup>[8]</sup>使用磨钻于犬L<sub>4</sub>左侧椎板开窗, 直视下将3Fr取栓导管置入硬膜外腔, 并于透视引导下输送至L<sub>1</sub>水平, 扩张球囊造成急性脊髓压迫性损伤。Guízar-Sahagún等<sup>[9]</sup>及郑月焕等<sup>[10]</sup>也采用类似方法, 分别建立了猕猴和山羊的硬膜外球囊压迫模型。为了最大限度减少造模过程对脊髓周围正常生理环境的破坏, Fukuda等<sup>[11]</sup>通过手术暴露犬单侧L<sub>3/4</sub>椎间孔, 直视下经椎间孔置入6Fr球囊导尿管, 从而避免了对脊柱骨性结构的破坏。Purdy等<sup>[12]</sup>首次利用血管外科穿刺置管技术, 透视下经皮穿刺犬L<sub>4</sub>单侧椎间孔, 成功地将5Fr取栓导管置入硬膜下腔。然而, 后续研究表明, 经椎间孔穿刺极易损伤神经根及伴行血管; 导管置入硬膜下腔容易造成脑脊液渗漏, 破坏血-脊髓屏障, 影响脊髓正常生理状态<sup>[13]</sup>。本课题组前期也通过将自制带球囊螺钉嵌入山羊颈椎, 制作了颈脊髓腹侧球囊压迫性损伤模型<sup>[14]</sup>, 初步研究结果令人满意。但由于该技术需要行颈前路手术切除部分椎体, 手术副损伤较大, 尚有待进一步改进。Lonjon等<sup>[15]</sup>则首先将椎管内置管技术用于建立大鼠脊髓损伤模型, 在去除部分棘突及椎板后, 使用更细的2Fr取栓导管作为硬膜外致压物。但由于该技术仍不可避免地正常解剖结构造成破坏, 限制了其进一步推广使用。

本研究基于以往球囊压迫模型的研究结果, 采用了经皮穿刺自腰骶椎板间隙置入球囊导管的微创方法建立绵羊急性颈脊髓损伤模型。穿刺置管1周后的评估结果显示, 尽管导管影响了有效椎管容积(约9%), 但MRI未见明显颈髓受压征象, 且绵羊的神经功能并未受到影响。以不同容量扩张球囊后, CT图像提示椎管侵占率明显增加, MRI提示颈髓腹侧明显受压, 绵羊出现颈髓损伤后的后肢运动功能障碍及相应病理改变。

相比目前常用的建模方法, 经皮穿刺自腰骶椎板间隙置管技术具有以下优势: (1) 实现了完全微创化, 改变了以往建模过程烦琐的手术操作。由于绵

羊是最为温顺的大型哺乳动物之一, 并且穿刺置管对动物创伤、刺激小, 因此操作可在局麻下进行, 通过注射少量造影剂配合透视定位, 置管约需10 min完成, 学习曲线短。(2) 提高了置管过程的安全性。椎板间隙无重要神经、血管组织, 腰骶交界水平(L<sub>6</sub>/S<sub>1</sub>)椎管最宽, 此处脊髓已移行为马尾神经, 因而经此部位穿刺置管不易损伤硬膜和脊髓, 导丝及球囊导管容易进入硬膜外腔, 最大程度保留了脊髓正常生理环境; 其次, 血管内导管生物相容性好, 长期置于动物体内不易出现排异反应。(3) 模型制作的重复性明显增强。造模所需材料均较容易获得, 可反复使用, 节省了研究费用。置管后向导管气囊通道注射少量造影剂, 可在透视下将导管精确输送至同一目标节段, 不受动物个体差异影响。(4) 改变了以往损伤研究模式的单一性。通过改变导管在动物体内的长度, 可实现全脊髓任意节段的压迫损伤; 通过控制气囊扩张量、扩张速度可以模拟不同程度和时相的脊髓损伤; 经导管引流通道的介入治疗、获取组织样本, 为研究的多样化提供了可能。

当然, 经皮穿刺自腰骶椎板间隙置管技术仍需进一步完善。首先, 由于目前所能获得的球囊导管成分含有金属, 扩张球囊后进行MRI检查存在较大伪影, 限制了应用MRI对脊髓损伤程度进行评估。为进一步研究, 本课题组拟改用小型号Foley双腔球囊导尿管为致压物, 以消除金属伪影的影响。其次, 因大动物购置、饲养费用较高, 研究纳入样本量较小, 造模后观察时间较短, 无法对相关数据进行统计分析。此外, 本实验未对动物行电生理监测, 而绵羊通常无法完成跳跃动作, 单独使用Tarlov评分受实验员主观影响较大, 一定程度上影响了神经功能评估的准确性。

总之, 我们的初步研究结果表明, 经皮置管技术避免了对脊髓周围正常组织的破坏, 是一种能够模拟临床实际致伤机制的急性颈脊髓损伤造模方法。通过进一步改进技术, 扩大样本量, 增加不同程度的损伤组别, 延长观察时间, 有望更好地将该模型用于各种不同节段脊髓损伤的基础研究, 促进临床脊髓损伤诊疗水平的提高。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Ditunno J F, Cardenas D D, Formal C, Dalal K. Ad-

- vances in the rehabilitation management of acute spinal cord injury[J]. *Handb Clin Neurol*,2012,109:181-195.
- [2] Tohda C, Kuboyama T. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury[J]. *Pharmacol Ther*,2011,132:57-71.
- [3] McDonough A, Martínez-Cerdeño V. Endogenous proliferation after spinal cord injury in animal models[J]. *Stem Cells Int*,2012,2012:387513.
- [4] 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*,1953,70:813-819.
- [5] Hagen E M, Rekan T, Gilhus N E, Grønning M. Traumatic spinal cord injuries; incidence, mechanisms and course[J]. *Tidsskr Nor Laegeforen*,2012,132:831-837.
- [6] Nout Y S, Rosenzweig E S, Brock J H, Strand S C, Moseanko R, Hawbecker S, et al. Animal models of neurologic disorders; a nonhuman primate model of spinal cord injury[J]. *Neurotherapeutics*,2012,9:380-392.
- [7] Lee J H, Choi C B, Chung D J, Kang E H, Chang H S, Hwang S H, et al. Development of an improved canine model of percutaneous spinal cord compression injury by balloon catheter[J]. *J Neurosci Methods*,2008,167:310-316.
- [8] Lim J H, Jung C S, Byeon Y E, Kim W H, Yoon J H, Kang K S, et al. Establishment of a canine spinal cord injury model induced by epidural balloon compression[J]. *J Vet Sci*,2007,8:89-94.
- [9] Guízar-Sahagún G, Grijalva I, Hernández-Godínez B, Franco-Bourland R E, Cruz-Antonio L, Martínez-Cruz A, et al. New approach for graded compression spinal cord injuries in Rhesus macaque; method feasibility and preliminary observations[J]. *J Med Primatol*,2011,40:401-413.
- [10] 郑月焕,方洲,曹鹏,郑涛,孙长惠,陆炯,等. 微创可扩张球囊技术制备活体山羊急性脊髓压迫损伤模型[J]. *中华医学杂志*,2012,92:1591-1595.
- [11] Fukuda S, Nakamura T, Kishigami Y, Endo K, Azuma T, Fujikawa T, et al. New canine spinal cord injury model free from laminectomy[J]. *Brain Res Brain Res Protoc*,2005,14:171-180.
- [12] Purdy P D, Duong R T, White C L 3rd, Baer D L, Reichard R R, Pride G L Jr, et al. Percutaneous translumbar spinal cord compression injury in a dog model that uses angioplasty balloons: MR imaging and histopathologic findings[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*,2003,24:177-184.
- [13] Purdy P D, White C L 3rd, Baer D L, Frawley W H, Reichard R R, Pride G L Jr, et al. Percutaneous trans-lumbar spinal cord compression injury in dogs from an angioplasty balloon: MR and histopathologic changes with balloon sizes and compression times[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*,2004,25:1435-1442.
- [14] 陈智,何平,黄轩,王琨,綦珂,张帆,等. 球囊注射压迫法建立山羊颈脊髓慢性压迫模型[J]. *第二军医大学学报*,2012,33:1301-1304.  
Chen Z, He P, Huang X, Wang K, Qi K, Zhang F, et al. A goat model of chronic cervical spinal cord compression by balloon compression system[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*,2012,33:1301-1304.
- [15] Lonjon N, Kouyoumdjian P, Prieto M, Bauchet L, Haton H, Gaviria M, et al. Early functional outcomes and histological analysis after spinal cord compression injury in rats[J]. *J Neurosurg Spine*,2010,12:106-113.

[本文编辑] 孙岩