

大鼠完全脊髓横断损伤膀胱功能障碍模型的建立及评价*

赵雪燕¹ 石 萍^{1,3} 孙煜浩² 蓝 宁¹

摘要

目的:建立和标准化一个脊髓上完全脊髓横断损伤引起的膀胱功能障碍的大鼠模型。

方法:在16只成年雌性Sprague-Dawley大鼠脊髓T9—T11处进行椎板切除,造成完全脊髓横断。采用术后每天手动按摩膀胱排尿的尿量变化和脊髓损伤大鼠与健康大鼠的两组膀胱内压图比较来进行评价。6只鼠作为健康对照。

结果:通过术后护理降低并发症。术后每天进行按摩排尿,尿量不断上升,1周左右达到峰值,之后开始下降。对健康大鼠和脊髓损伤大鼠的膀胱以相同灌注速度持续灌注生理盐水,正常大鼠的膀胱呈现稳定的周期性排尿收缩活动,而脊髓损伤大鼠在膀胱内压持续升高后产生重复性强烈的排尿收缩。

结论:在脊髓休克期结束之后的脊髓恢复期内,所有脊髓损伤模型的大鼠膀胱都呈现逼尿肌—括约肌协同失调症状。本实验成功地建立了大鼠完全性脊髓损伤引起的膀胱功能障碍的模型,此模型简单经济,为进一步研究脊髓损伤下膀胱功能障碍的电刺激调节和康复提供了有价值的大鼠模型。

关键词 脊髓损伤;膀胱功能障碍;大鼠模型;神经调节

中图分类号:R744, R694 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2012)-02-0099-04

Evaluation of a rat model of bladder dysfunction induced by complete spinal cord transection/ZHAO Xueyan, SHI Ping, SUN Yuhao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(2): 99—102

Abstract

Objective: To establish and evaluate bladder dysfunction following complete suprasacral spinal cord transection in a standardized rat model.

Method: Sixteen adult female Sprague-Dawley rats were operated at T9—T11 vertebra, after laminectomy rat's suprasacral spinal cords were completely transected. After surgery daily weight of expressed urine was measured and recorded to assess the changes of bladder activity. Measurements of continuous uroflow cystometry were performed and compared between intact rats and spinal cord transected rats. Six healthy rats were used as controls.

Result: Most of the complications could be relieved with post-surgery care. The weight of urine increased initially and reached to a peak at 1-week post-spinal-transection followed by gradually declining. Under continuous infusion of saline into the bladder with constant rate, the bladder of intact rats initiated periodic voiding contractions. In contrast, the bladder of spinal-transection rats showed uninhibited non-voiding contractions with increasing pressure and smaller void contractions at larger bladder volumes with high and sustained intravesical pressures.

Conclusion: In the recovery period the spinal cord transected rats had detrusor-external sphincter dyssynergia. The rat model with bladder dysfunction following complete suprasacral spinal cord transection was successfully established. The rat model could be used to investigate the efficacy of sacral-neuromodulation for treating bladder dysfunction in future studies.

Author's address Med-X Research Institute, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200030

Key word spinal cord injury; bladder dysfunction; rat model; neuromodulation

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)患者常伴有膀胱功能障碍,其并发症往往造成患者死亡,如膀胱高压引起尿液反流造成肾衰竭,这是髓上SCI患者后期死亡的第一位原因^[1]。脊髓损伤后膀胱功能障碍一直是未能很好解决的临床难题之一,通过建立SCI动物模型进行膀胱功能恢复与重建的研究将有利于进一步探讨膀胱功能障碍的康复问题。目前,SCI动物模型有很多种,包括完全性脊髓损伤和不完全性脊髓损伤,损伤方法和损伤部位也不尽相同,不同的SCI动物模型用于不同的研究目的^[2-4]。然而目前文献对于研究大鼠完全性脊髓横断引起的膀胱功能障碍模型的建立没有一个较统一的标准,且在模型术后护理和评价方面的描述不详细,这就对重复前人实验以比较结果,或基于原实验做改进造成了困难。我们建立了一个重复性好、并发症少、病死率低的完全脊髓横断膀胱功能障碍大鼠模型,明确描述术后膀胱活动的变化情况,用标准化的方法来进行定量分析和评价。

1 脊髓损伤位置的选择

人和大鼠膀胱神经控制系统类似,但神经在脊髓中的位置不完全相同。控制膀胱的低级神经中枢主要有交感神经、副交感神经和躯体神经。交感神经主要支配膀胱顶、膀胱颈和尿道;躯体神经主要传导膀胱感觉和压力信息;交感神经和躯体神经协调控制膀胱放松和括约肌收缩达到贮尿目的;副交感神经主要支配膀胱逼尿肌和尿道括约肌,其兴奋可促进膀胱收缩排尿。对于人,交感神经位于T10—L2,副交感神经和躯体神经均位于S2—S4;对于大鼠,交感神经位于L1—L2,副交感神经和躯体神经均位于L6—S1^[5]。T10—T11完全横断大鼠模型保留了膀胱功能的低级神经控制,适于利用电刺激方法进行的膀胱功能障碍的康复^[6]。也有T4和T9完全横断损伤后膀胱功能障碍模型^[7],但这种高位脊髓损伤可能影响到呼吸功能,大鼠术中病死率较高。我们采用在大鼠T9—T11进行完全横断制作模型。

2 脊髓损伤模型制作

2.1 动物和主要器械

体重200—300g的健康成年雌性Sprague-Daw-

ley大鼠,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,上海交通大学Med-X研究院动物房饲养。16只大鼠用于模型制作的标准化研究,6只大鼠用于模型膀胱功能状况的评估。按手术时间先后标记大鼠。模型制作后利用WZ-50C6微量注射泵(浙江史密斯医学仪器有限公司)通过膀胱灌注进行膀胱功能评估。SMUP-E4生物信号处理系统(上海嘉龙教仪厂)采集膀胱内压。

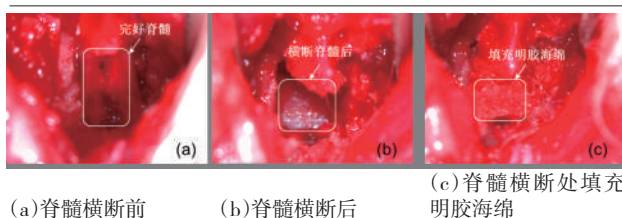
2.2 模型制作

大鼠用10%水合氯醛(350—400mg/kg)腹腔注射麻醉,俯卧位放置于37℃恒温加热毯上。手术器械用酒精擦拭消毒。手术前先手动按压下腹部排空膀胱。根据解剖学标志找到T10位置,在背部相应位置开一长约2cm的切口,剥开筋膜、脂肪,紧贴棘突骨面分离椎旁肌(棘肌、背半棘肌和多裂肌)以显露T9—T11的棘突和椎板,过程中用棉球按压止血。咬骨钳咬除T9—T10棘突,在手术显微镜下用高速牙科电钻磨开两侧椎板,小心不要碰到里面的脊髓,用显微镊移出椎板,显微剪剪开硬脊膜和蛛网膜,暴露脊髓,切口以外的软膜保持完整,脊髓背静脉血管用电凝止血,然后用显微剪横断脊髓,取出约1—2mm节段的脊髓组织,脊髓内缩形成一个洞,洞内用无菌明胶海绵填充以确保神经完全分离(脊髓横断前后见图1)。在用无菌棉球按压完全止血后依次缝合肌肉、筋膜和皮肤,皮肤缝合处用酒精擦拭消毒。术后再次对大鼠进行手动按压膀胱排尿,之后大鼠放在加热毯上,至苏醒后放回笼中饲养。经手术的大鼠以下简称为SCI大鼠。

3 术后护理

SCI大鼠术后1周内每天腹腔注射青霉素以预防感染。术后1周内每天早晚定时手动按压腹部排尿(Crede法)1次,1周后降低到每天1次。SCI大鼠

图1 脊髓横断过程



术后1周内每天腹腔注射青霉素以预防感染。术后1周内每天早晚定时手动按压腹部排尿(Crede法)1次,1周后降低到每天1次。由于大鼠术后疼痛,在按压腹部过程中会激烈挣扎,从操作方便和安全角度考虑,故在按压腹部排尿前采用10%水合氯醛(350—400mg/kg)对大鼠进行麻醉,这样不仅防止了大鼠挣扎过程中对操作者造成伤害,同时麻醉状况下膀胱的尿道括约肌松弛更利于按压腹部排尿。开始按摩时用力要轻,以防挤爆膀胱,等排出尿后可适当加力。此外,由于脊髓损伤后大鼠肠胃的自主控制功能往往丧失,术后有时会出现便秘或腹部胀气,需要手动按压排尿时对腹部按摩一会,帮助排便。SCI大鼠与健康大鼠分笼饲养,每笼不超过2只,笼子的垫料保持清洁,食物和水的高度适当调低。

4 术后观察

16只SCI大鼠术后的并发症统计见表1。若不对术后大鼠进行护理,可能出现的并发症包括因感染造成的术后死亡,术后血尿等,其处理方法也在表中列出。血尿一般在术后1—3天内出现,这可能是由于膀胱壁膨胀导致毛细血管破裂而产生的^[8],之后会消失。此外,有的大鼠腹部尿道周围出现掉毛现象,使用酒精每日擦洗消毒大鼠腹部可减轻症状。因脊髓损伤后大鼠饮食减少,故体重普遍下降。大多数并发症经注射青霉素和提高日常护理后可大大降低,存活率也提高了。其中3只SCI大鼠在术后1周内尿道会排出少量的尿液,这可能是膀胱充盈性尿失禁症状。

5 术后评价

5.1 通过排尿量评价

记录术后大鼠每日排尿重量,用来反映膀胱潴

留尿量和膀胱活动恢复情况。尿量变化的统计数据见图2,从图2中可见每天按压排尿量在术后1周左右到达顶点,之后开始下降。排尿前,有的大鼠被抓住提起来时就开始排尿,可能是压力性尿失禁现象。

5.2 通过膀胱内压评估大鼠膀胱活动状况

分别对健康大鼠和SCI大鼠进行膀胱灌注实验,记录膀胱压力曲线图,比较健康大鼠和SCI大鼠膀胱压力反射活动状况。先用10%水合氯醛(350—400mg/kg)对大鼠进行全身麻醉,在下腹部中间剪开皮肤,在膀胱顶部避开血管作一小切口,插入导管,用7—0丝线做荷包缝合固定,导管从腹部引出并固定,关腹。用注射器经导管抽空膀胱后,导管接微量注射泵。注射泵和压力换能器的连接方式见图3。

以0.1ml/min灌注速度对膀胱进行持续灌注室温下的生理盐水,膀胱内压用信号采集系统采集,采样频率1kHz,放大倍数100倍,DC—500Hz带通滤波同时50Hz工频陷波。健康大鼠和SCI大鼠的膀胱内压变化情况分别见图4a和b。正常大鼠的膀胱呈现稳定的周期性排尿收缩活动;而SCI大鼠的膀胱先产生非排尿收缩,待膀胱内压持续缓慢上升达到一定程度时膀胱响应产生重复的不完全排尿收缩。

6 讨论

图2 6只SCI大鼠每天按压排尿量

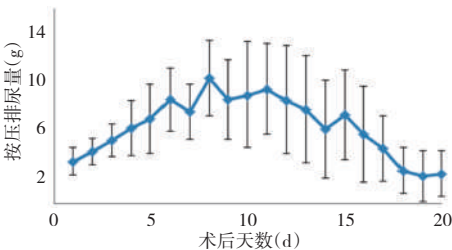


图3 膀胱插管中导管与微量注射泵、注射器和压力换能器的连接方式

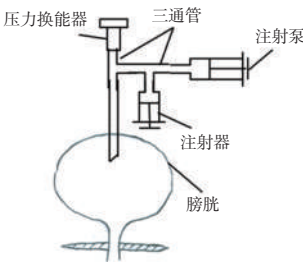
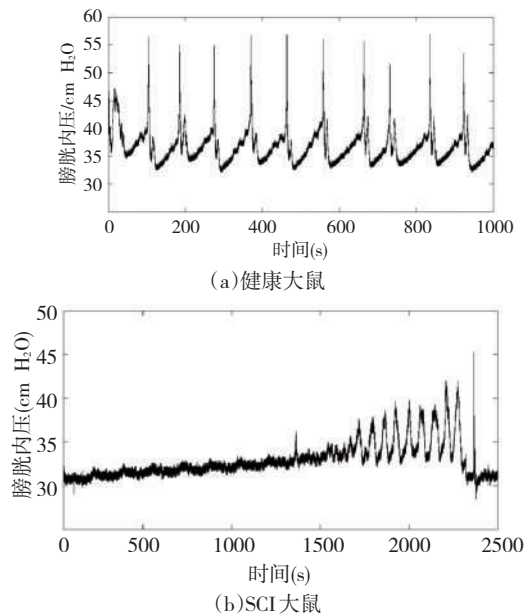


表1 脊髓损伤术后并发症发生情况			
并发症	鼠数	占总数百分比(%)	处理方法
(1)术后死亡	3	18.75	术中严格无菌操作,术后注射抗生素
(2)血尿	9	56.25	注射抗生素
(3)尿脓	6	37.50	注射抗生素
(4)伤口开裂	2	12.50	牢固切口缝合
(5)肠梗阻/肠胀气	5	31.25	每日腹部按摩两次
(6)腹泻	2	12.50	
(7)膀胱结石	2	12.50	饮用蒸馏水

图4 持续进行生理盐水灌注时膀胱内压变化情况



在手术过程中,根据我们的经验,需要在横断脊髓时取出1—2mm节段的脊髓组织,中空部填充明胶海绵进行止血是十分必要的。若仅进行横断,我们发现,大鼠在术后有出现手术部位出血死亡的可能;即使大鼠存活,恢复良好,但发现这种情况下的大鼠下肢力量有所恢复,怀疑是术中脊髓未能完全截断或其他未知原因。故通过截取部分脊髓节段,中空部分填充止血物质将保证大鼠完全性SCI模型的可信度。

脊髓完全横断会导致膀胱尿潴留和充盈性尿失禁现象,这可能是膀胱反射消失引起。术后10d显示膀胱中潴留尿液减少,膀胱活动开始恢复。对比健康大鼠和SCI大鼠的膀胱内压图可知,SCI大鼠膀胱呈现非自主性的无效逼尿肌收缩,首次出现排尿时的膀胱容量也大大增加了。这些与文献中描述一致^[7,9],也与临床上脊髓损伤患者相似^[10]。

T9—T11损伤可能干扰了控制膀胱逼尿肌放松以贮尿的节前交感神经元和控制尿道外括约肌的副交感神经和躯体神经的传入与传出通路,膀胱失去了骶髓上的神经抑制且出现了异常的神经反射,因此,SCI大鼠的膀胱出现逼尿肌过度活动和逼尿肌—括约肌协同失调症状,表现为尿潴留。大鼠比大型动物如狗更适于进行膀胱功能障碍的研究,这是

因为大鼠的寿命短,其饲养费用较低,大鼠的排尿控制神经和生理病理学状况也已经被深入了解^[11]。

本文所提供的标准化模型制作方法是对经过多次术中中和术后护理方法改进后的模型制作的描述。人工排尿法虽在麻醉状态下进行,但不影响对尿液测量的准确性,且能较真实地反映膀胱功能障碍处于哪个阶段。而通过膀胱内压的测定来评估大鼠膀胱功能障碍,与通过尿道括约肌肌电信号测量评估方法一样,其数据的准确性被大多数研究者认为将会受到麻醉状态的影响^[12]。因此,如何测量清醒状态下模型的尿动力学特征是一个难点。

综上所述,本文成功建立了完全脊髓横断损伤膀胱功能障碍大鼠模型,为以后通过骶神经电刺激方法重建膀胱功能提供了一个可靠的模型。

参考文献

- [1] Frankel HL, Coll JR, Charlifue SW, et al. Long-term survival in spinal cord injury: a fifty year investigation[J]. Spinal Cord, 1998, 36(4):266—274.
- [2] 纪江峰,冯世庆.脊髓损伤动物模型研究进展[J].中华实验外科杂志,2006,23(9):1151—1152.
- [3] Vignes JR, Deloire M, Petry K. Animal models of sacral neuromodulation for detrusor overactivity[J]. Neurology and Urodynamics, 2009, 28(1):8—12.
- [4] Fry CH, Daneshgari F, Thor K, et al. Animal models and their use in understanding lower urinary tract dysfunction[J]. Neurology Urodyn, 2010, 29(4):603—608.
- [5] Inskip JA, Ramer LM, Ramer MS, et al. Autonomic assessment of animals with spinal cord injury: tools, techniques and translation[J]. Spinal Cord, 2009, 47(1):2—35.
- [6] Zvara P, Sahi S, Hassouna MM. An animal model for the neuromodulation of neurogenic bladder dysfunction[J]. Br J Urol, 1998, 82(2):267—271.
- [7] David BT, Steward O. Deficits in bladder function following spinal cord injury vary depending on the level of the injury [J]. Exp Neurol, 226(1):128—135.
- [8] Santos-Benito FF, Muñoz-Quiles C, Ramón-Cueto A. Long-term care of paraplegic laboratory mammals[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(3—4):521—536.
- [9] D'Amico SC, Schuster IP, Collins WF 3rd. Quantification of external urethral sphincter and bladder activity during micturition in the intact and spinally transected adult rat[J]. Exp Neurol, 2011, 228(1):59—68.
- [10] Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC. The neural control of micturition[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(6): 453—466.
- [11] Paxinos G. The rat nervous system[M]. Third Edition. China: Elsevier Academic Press, 2004.321—331.
- [12] Ozkurkcugil C, Ozkan L. Effects of anesthetics on cystometric parameters in female rats[J]. International Urology and Nephrology, 2010, 42(4):909—913.