

·基础研究·

大鼠脊髓损伤后神经源性膀胱模型的制备*

张雨辰¹ 张泓^{1,3} 艾坤² 鲍秋影² 李景兴² 匡静之²

摘要

目的:提供一套较系统、可重复率高、可变系数低的神经源性膀胱模型的制备方案。

方法:采用Hassan Shaker脊髓横断法并加以改良,在Hassan Shaker法的基础上改用国内动物造模常用的水合氯醛行腹腔麻醉,用牙科钩沿横断椎间隙横向钩出脊髓,手术刀切断脊髓后反复刮扫以确定脊髓完全横断;并将此法运用于不同节段的大鼠脊髓损伤模型的制作,根据骶上和骶髓的分组选择不同的位置(T10/11和L2/3椎间隙)进行手术完全切断脊髓,并配合相应的术前、术后护理方案。

结果:改良后的造模方案提高了造模后大鼠的存活率(骶上组80%,骶髓组90%)、成模率(骶上组70%,骶髓组80%)并降低了并发症的发生率(骶上组70%,骶髓组60%);造模后大鼠最大膀胱容量较空白组明显升高($P < 0.01$),与脊髓休克期相比,骶上组大鼠休克后的最大膀胱容量明显降低($P < 0.01$),骶髓组大鼠容量较前无明显变化($P > 0.05$),脊髓休克期后骶髓组大鼠最大膀胱容量明显高于骶上组($P < 0.01$);经光镜观察,造模后大鼠的膀胱组织形态均发生了不同程度的病理损害。

结论:采用改良Hassan Shaker法可制备大鼠骶上和骶髓不同节段脊髓损伤后神经源性膀胱模型。

关键词 骶上脊髓损伤;骶髓损伤;神经源性膀胱;动物模型

中图分类号:R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-06-0542-05

Neurogenic bladder following spinal cord injury: a rat model/ZHANG Yuchen, ZHANG Hong, AI Kun, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(6): 542—546

Abstract

Objective: Developing a consistency, reliability, controllable and reproducibility method to construct neurogenic bladder and urethra dysfunction rat model following spinal cord injury(SCI).

Method: The surgical procedure and post-operative care was induced by using modified Hassan Shaker method: The intraperitoneal anesthesia was induced by using chloral hydrate and complete sections of spinal cord were performed at the thoracic (T10/11) and lumbar (L2/3) levels.

Result: The modified surgical procedure and post-operative care could improve the survival rate (suprasacral spinal cord injury group 80%, sacral spinal cord injury group 90%), molded rate (suprasacral group 70%, sacral group 80%) and reduced the complications rate (suprasacral group 70%, sacral group 60%). The maximum bladder volume was significantly higher after being molded($P < 0.01$). After spinal cord shock, maximum bladder volume was significantly less in suprasacral spinal cord injury group than that during the shock($P < 0.01$), but there was no significant difference in the sacral spinal cord injury group. After spinal cord shock, average bladder volume was significantly less in suprasacral injury group than that in sacral injury group($P < 0.01$).

Conclusion: The modified Hassan Shaker method was suitable for the construction of neurogenic bladder and urethra dysfunction rat model following spinal cord injury.

Author's address Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, 410007

Key word suprasacral spinal cord injury; sacral spinal cord injury; neurogenic bladder; animal model

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.06.009

*基金项目:湖南省中医药科研计划项目(201109);湖南省教育厅科研项目(12C0264);湖南省自然科学基金项目(13JJ3098)

1 湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙,410007; 2 湖南中医药大学针灸推拿学院; 3 通讯作者

作者简介:张雨辰,女,硕士研究生; 收稿日期:2013-08-08

神经源性膀胱(neurogenic bladder, NB)是指控制排尿功能的中枢神经系统或周围神经受到损害而引起的膀胱尿道功能障碍,是脊髓损伤(spinal-cord injury, SCI)常见的并发症之一,目前脊髓损伤的治疗仍是国际医学难题之一。由此诱发的泌尿系统的一系列并发症可能伴随截瘫患者终生,也是截瘫患者晚期的主要病死原因^[1]。当骶上节段脊髓损伤时,中枢调节排尿的下行通路被阻断,协调膀胱、肠道、括约肌功能的反射通路被打乱^[2]。同时,完全性SCI后,膀胱尿道感觉的上传通路被中断,因而丧失括约肌的保护性反射,以及中枢对逼尿肌自主反射的抑制,导致逼尿肌与膀胱括约肌功能失调^[3](detrusor sphincter dyssynergia, DSD);同时,伴有逼尿肌反射的异常增强,即逼尿肌反射亢进,表现为无抑制性神经源性膀胱和反射性神经源性膀胱,主要以尿失禁为临床表现。当骶髓损伤时,直接或间接损伤支配膀胱的交感神经、副交感神经及躯体运动神经,使外括约肌和内括约肌痉挛、外括约肌去神经,即逼尿肌无反射^[4],表现为自主性神经源性膀胱、无张力性神经源性膀胱及运动麻痹性神经源性膀胱,临床表现为尿潴留。

本研究根据目前国内外大鼠脊髓损伤后神经源性膀胱模型制备以及术后护理的文献,并加以改良,采取脊髓完全横断法制作不同节段(骶上节段和骶髓节段)脊髓损伤后NB大鼠模型,以期提供一套较系统、可重复率高、可变系数低的模型制备方案,提高造模动物模型存活率、成模率,降低术后并发症发生率。为神经源性膀胱的实验和临床研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

雌性SD大鼠30只,体重250—280g,由湖南中医药大学实验动物中心提供。常规饲养20d,大鼠适应环境后,随机分为3组,空白组、骶上损伤组、骶髓损伤组,每组10只。根据不同的分组选择相应节段行脊髓完全横断术,观察术后大鼠并发症发生率、成模率及膀胱容量、膀胱逼尿肌组织结构的变化。

1.2 脊髓横断位置

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,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;躯体神经主要传导膀胱感觉和压力信息。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^[5](表1)。

表1 人和大鼠交感神经、副交感神经、躯体神经位置

	脊髓节段	人对应的 椎体节段	大鼠对应的 椎体节段
交感神经位置	T10—L2	T10—L2	L1—L2
副交感神经和躯体神经位置	S2—S4	S2—S4	L6—S1

1.2.1 骶上节段脊髓损伤横断位置:选择T10/11椎间隙,完全横断大鼠脊髓制作骶上节段脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠模型。大量文献^[6-7]均选此节段造模,既保留了膀胱功能的低级神经控制,又适于利用电刺激方法进行的膀胱功能障碍的康复^[8]。

1.2.2 骶髓节段脊髓损伤横断位置:选择L2/3椎间隙,完全横断大鼠脊髓制作骶髓节段脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠模型。副交感神经和躯体神经在S2—S4,对应大鼠椎体L2—4的任意部位^[9]。横断大鼠L2—4脊髓切断骶副交感神经-膀胱丛抑制逼尿肌收缩及尿道内括约肌松弛,从而抑制膀胱收缩排尿。本实验为使模型尿潴留症状更加明显,便于观察对比,故选取L2/3椎间隙作为横断位置。

1.3 动物造模

空白组常规饲养,不做任何处理。其余大鼠按照不同的分组选择相应的脊髓节段进行造模,具体方法如下:

采用Hassan Shaker脊髓横断法^[10]并加以改良,制作大鼠脊髓横断模型。SD大鼠禁食不禁水24h后,采用10%水合氯醛按40mg/100g体重剂量行腹腔麻醉。待大鼠肌肉松弛,钳夹尾部无收缩时,即麻醉成功。取俯卧位将已麻醉好大鼠固定在鼠板上,按骶上和骶髓的不同分组选择横断位置,常规备皮,络合碘消毒皮肤,以横断位置为中线,沿后正中线做一长约3cm纵行切口。用止血钳钝性分离皮下筋膜,用手术刀切断棘突两侧竖脊肌,暴露椎间隙,用手术剪剪断椎间隙两侧的横突,用牙科钩沿横断椎间隙横向钩出脊髓,并用手术刀切断脊髓,翻转牙科

钩,横向刮扫,闻及骨膜摩擦音后,即可确定脊髓完全横断,缝合两侧竖脊肌,后缝合筋膜及表皮,术中用消毒纱布压迫止血,清洁视区,术后络合碘消毒切口。

1.4 术后护理

各大鼠于术前2h腹腔注射20万U青霉素。手术过程中及术后用电热毯保温进行体温控制直到大鼠完全恢复为止,用体温计测量大鼠肛温使其维持在37.0—37.5℃之间。术后单笼饲养大鼠,应降低笼子高度,以便于大鼠进食、饮水,饮水予10%葡萄糖水加强营养。术后前两天通过皮下注射补充乳酸盐林格溶液(20ml/kg)以抗电解质紊乱。术后1—3d腹腔注射青霉素20万U, bid; 4—7d腹腔注射青霉素20万U, qd。用Cred法在大鼠清醒状态下进行人工排尿,每天3次;排尿后用50%酒精擦拭大鼠下半身并外喷Grannick苦苹果喷雾,防止大鼠自噬。待脊髓休克期后,大鼠生命体征稳定,结束体温控制,在室温24℃、相对湿度40%环境下单笼饲养,自由进食、水,饮用水选用Ⅲ级水。

1.5 成模标准及剔除标准

1.5.1 成模标准:造模手术醒麻后,大鼠双下肢拖动行走,尾部不能活动,大鼠下腹部可触及充盈膀胱,自主排尿受限,膀胱最大容量明显增加,即可判定模型制作成功^[1]。大鼠在手术麻醉及脊髓休克期,膀胱处于尿潴留状态,膀胱胀大明显,不能自行排尿。脊髓休克期过后,根据骶上和骶髓不同节段的损伤,临床分别表现为尿失禁和尿潴留。

1.5.2 剔除标准:造模后大鼠出现自主排尿者、自噬或死亡的情况,则剔除实验。

1.6 最大膀胱容量检测

分别于术后第1、3、5、7、9、11、13、15天在大鼠清醒状态下测量大鼠最大膀胱容量,具体操作步骤如下:手法辅助大鼠排尿后将大鼠固定在操作台上,将两根导尿管内注满温生理盐水,并沿尿道先后将两根导尿管插入膀胱,轻柔按压大鼠下腹部,使尿液沿一根导尿管排出,待无尿液流出后,向红色刻度导尿管内以0.01ml/s的速度向膀胱内注射37℃生理盐水,同时注意黑色刻度导尿管口是否有液体溢出,当有液体溢出时,所注入的生理盐水容量极为大鼠最大膀胱容量。

1.7 HE染色

大鼠造模后第14天在水合氯醛腹腔麻醉下剖取膀胱,在冰上截取膀胱逼尿肌平滑肌1mm×1mm,并用冰生理盐水冲洗,置于4%多聚甲醛中固定48h以上后行HE染色,并于×100,×400倍光镜下观察染色结果。

1.8 统计学分析

数据均用均数±标准差表示,所有资料均进行正态性检验及方差齐性检验。凡符合正态分布者,多组计量资料采用单因素方差分析,方差齐者用LSD法和SNK法,方差不齐者用Dunnett T3法;凡不符合正态分布者,采用多个独立样本比较的秩和检验。所有数据使用SPSS16.0软件进行分析。

2 结果

2.1 术后并发症及处理

20只SCI大鼠(骶上组=10n;骶髓组=10n)并发症总表(表2)。动物的死亡大多发生在术后第1周,主要的死亡原因包括术后体温过低、低血压、感染造成的死亡和自噬。骶上组10只大鼠(术后感染死亡1只,自噬合并术后感染死亡1只,自噬剔除实验1只),存活率80%,成模7只,3只剔除实验,成模率70%;骶髓组10只大鼠(术后感染死亡1只,自噬剔除实验1只),存活率90%,成模8只,2只剔除实验,成模率80%。并发症总发生率,骶上组70%,骶髓组60%。

因脊髓损伤后大鼠饮食减少,体重普遍明显降低。采用体温控制和皮下注射乳酸盐林格溶液有效减少了体温过低、低血压等并发症。确保手术在严格的无菌条件下进行,以及围手术期抗生素的使用,都有效的防止了尿路感染及术后感染。血尿一般在

表2 脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠模型的并发症

并发症	骶上损伤		骶髓损伤		对症处理方法
	鼠数	%	鼠数	%	
死亡	2	20	1	10	术前注射青霉素,术中严格无菌操作,术中及术后进行体温控制,术后注射乳酸钠林格溶液、青霉素
自噬	2	20	1	10	外喷苦苹果喷雾
血尿	7	70	6	60	注射青霉素
尿路感染	5	50	5	50	注射青霉素
肠梗阻/肠胀气	3	30	1	10	腹部按摩 bid
腹泻	1	10	0	0	无
创口皮下血肿	2	20	2	20	注射器抽吸
总计	7	70	6	60	

术后1—3d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^[1],之后会消失。部分大鼠有自噬下肢现象,考虑为脊髓横断后神经功能缺损导致,用50%酒精擦拭大鼠下半身并外喷Grannick苦苹果喷雾,防止了褥疮的产生并有效预防大鼠自噬。以上的对症处理,提高了造模后大鼠的存活率、成模率并降低了并发症的发生率。

2.2 最大膀胱容量的改变

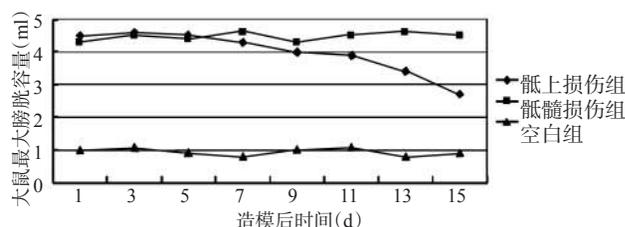
空白、骶上脊髓损伤组、骶髓损伤组各10只大鼠。造模后,骶上组3只剔除实验,成模7只;骶髓组2只剔除实验,成模8只。各组大鼠造模后最大膀胱容量变化见图1、表3所示。

表3 脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠最大膀胱容量变化 ($\bar{x} \pm s, \text{ml}$)

组别	例数	脊髓休克期 (大约术后1—7d)	脊髓休克期后 (大约术后8—15d)
空白组	10	0.950±0.097	0.960±0.143
骶上组	7	4.093±0.268 ^①	3.185±0.567 ^②
骶髓组	8	4.338±0.233 ^①	4.450±0.251 ^③

①P<0.01与空白组相比;②P<0.01与脊髓休克期相比;③P<0.01与骶上组相比

图1 各组大鼠最大膀胱容量



造模后1—7d,骶上组和骶髓组大鼠均处于尿潴留状态,最大膀胱容量明显升高,提示大鼠可能处于脊髓休克。骶上组大鼠于造模第7天后,最大膀胱容量呈明显下降趋势,考虑为脊髓休克期后大鼠膀胱逼尿肌兴奋而出现尿失禁;造模第13—15天后大鼠最大膀胱容量进入平台期,可能提示骶上脊髓损伤后神经源性膀胱模型可能已趋于稳定。而骶髓组大鼠最大膀胱容量造模后第1—15天无明显变化,呈持续尿潴留状态。根据图1的变化趋势,选择各组大鼠造模后第7天的最大膀胱容量作为脊髓休克期大鼠最大膀胱容量,造模后第15天的最大膀胱容量作为脊髓休克期后大鼠最大膀胱容量,进行统计分析。

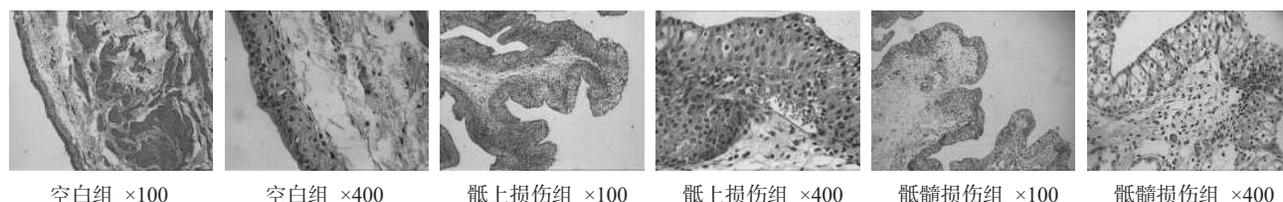
各组大鼠造模后最大膀胱容量均较空白组明显升高(P<0.01);与脊髓休克期相比,骶上脊髓损伤组大鼠脊髓休克期后的最大膀胱容量明显降低(P<0.01),骶髓损伤组大鼠脊髓休克期后最大膀胱容量较前无明显变化(P>0.05),提示骶上组和骶髓组大鼠均已度过脊髓休克期,分表现为尿失禁和尿潴留状态;与骶上组相比,脊髓休克期后骶髓组大鼠的最大膀胱容量明显高于骶上组(P<0.01),提示骶上脊髓损伤和骶髓损伤后神经源性膀胱所致的膀胱功能障碍以及最大膀胱容量不同,造模成功。

2.3 膀胱HE染色组织形态学结果

如图2所示,与空白组大鼠比较,骶上脊髓损伤和骶髓损伤后大鼠膀胱均出现不同程度的上皮细胞排列紊乱,有大量的空泡样改变,且细胞中可见大量的中性粒细胞,炎性浸润,并有不同程度的细胞充血,甚至有上皮脱落样改变。

图2 各组膀胱组织形态学的光镜观察

(HE染色)



3 讨论

脊髓完全横断根据横断节段的不同会导致膀胱尿失禁和尿潴留的现象。急性期即脊髓休克期,膀胱反射消失表现为无张力性膀胱。骶上脊髓损伤大鼠的骶髓排尿中枢保持了完整并失去了上级排尿中

枢的控制,排尿反射从长程的脊上调节变成节段性反射,逼尿肌自发的产生兴奋出现无抑制性收缩,导致神经源性逼尿肌活动亢进^[12]及逼尿肌-括约肌协同失调,脊髓休克期过后,骶上脊髓损伤大鼠膀胱开始出现反射,表现为间歇性尿失禁。在造模7d后,

骶上脊髓损伤大鼠膀胱中潴留尿液减少,考虑脊髓休克期后,逼尿肌亢进出现尿失禁;而造模12—14d后最大膀胱容量进入平台期,可能提示模型已稳定。而骶髓损伤大鼠的交感神经、副交感神经及躯体运动神经受损,排尿反射上传通路被破坏,使外括约肌和内括约肌痉挛、外括约肌去神经,即逼尿肌无反射^[4],脊髓休克期过后,骶髓损伤大鼠的膀胱仍表现为尿潴留。脊髓休克期后,大鼠根据损伤的节段出现相应的症状,这些与文献中描述一致^[13—15],也与临床上脊髓损伤患者相似^[16],也可推断大鼠已度过脊髓休克期,膀胱状态逐渐趋于稳定。

本研究参照 Hassan Shaker 脊髓横断法^[10]并加以改良,制作不同节段(骶上节段和骶髓节段)大鼠脊髓横断模型。在手术过程中,需剪掉脊髓断端1—2mm,以防止两断端,以防止两脊髓断端链接愈合,我们未在断端处填充异物阻断脊髓,一是考虑脊髓有一定的自愈性,不加以隔断符合临床脊髓损伤后患者的脊髓自愈。术后系统的、有针对性的护理方法,有效降低了大鼠术后体温过低、低血压、自噬、血尿及尿路感染等并发症的发生率,提高了大鼠的存活率和成模率。

近年来,关于脊髓损伤后神经源性膀胱的研究越来越多,而损伤节段的选择、造模方法、护理方法也各有不同。本研究采用的模型制备方案的优势在于:①本研究参考了目前国内外关于大鼠脊髓损伤后神经源性膀胱模型制备以及术后护理的大量文献,并在反复的实验中多次改良,采取脊髓完全横断法制作不同节段(骶上节段和骶髓节段)脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠模型,并完善了相应的术后护理方案,有效提高了造模后大鼠的存活率、成模率并降低了并发症的发生率。②本文明确了骶上脊髓损伤和骶髓损伤后神经源性膀胱的不同脊髓损伤节段的选取。③通过对大鼠最大膀胱容量的检测,推断出了大鼠脊髓损伤后脊髓休克期,脊髓休克期后、平台期可能的时间段,为介入治疗的时间选择提供了一定的依据。④本研究采用了脊髓完全横断,虽然与大多数人的脊髓损伤情况不一样,不过这个模型可重复率高,且可变系数低。

综上所述,本文采用脊髓完全横断法制备不同节段(骶上节段和骶髓节段)脊髓损伤后神经源性膀胱

大鼠模型,并完善了相应的术后护理方案,以期提供一套较系统、可重复率高、可变系数低的模型制备方案,提高造模动物模型存活率、成模率,降低术后并发症发生率,为重建膀胱功能的研究提供基础。

参考文献

- [1] Pagliacci MC, Franceschini M, Di Clemente B. A multicentre follow-up of clinical aspects of traumatic spinal cord injury[J]. *Spinal Cord*, 2007,45:404—410.
- [2] Craggs MD. Pelvic somato-visceral reflexes after spinal cord injury: measures of functional loss and partial preservation[J]. *Prog Brain Res*, 2006, 152:205—219.
- [3] Thomas DG, Lucas MG. The urinary tract following spinal-cord injury[M]. Chisholm, Fair W. *Scientific Foundations of Urology*. 3rd ed. Oxford: Heinemann Medical Books, 1990.286—299.
- [4] Kane RJ, Siroky MB. Classification of neuro-urologic disorders[M]. In: Kane RJ, Siroky MB, eds. *Clinical neuro-urology*. 2nd ed. Boston: Little Brown & Co, 1979.143—158.
- [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] Li RZ, Zhou MW, Zeng FS. Observation of neuropeptides in bladder after spinal cord injury in rats[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2012,92(15):1058—1061.
- [7] Abdel-Gawad M, Dion SB, Elhilali MM. Evidence of a peripheral role of neurokinins in detrusor hyperreflexia: a further study of selective tachykinin antagonists in chronic spinal injured rats[J]. *J Urol*, 2001,165(5):1739—1744.
- [8] 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.
- [9] 曾晓勇,章慧平,陈忠,等.大鼠脊髓不同平面损伤后神经源性膀胱模型的尿流动力学检查[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29(10):664—666.
- [10] Shaker H, Mourad MS, Elbially MH, et al. Urinary Bladder Hyperreflexia: A Rat Animal Model[J]. *Neurourology and Urodynamics*, 2003,22:693—698.
- [11] 潘兆君,邹自灏,钟剑峰,等.脊髓损伤性神经源性膀胱逼尿肌受体改变研究[J]. *广州医药*, 2012,43(1):9—12.
- [12] Shaker HS, Hassouna M. Sacral root neuromodulation in idiopathic nonobstructive chronic urinary retention[J]. *J Urol*, 1998,159:1476—1478.
- [13] David BT, Steward O. Deficits in bladder function following spinal cord injury vary depending on the level of the injury[J]. *Exp Neurol*, 2010, 226(1): 128—135.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC. The neural control of micturition[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008,9(6):453—466.