

完全性骶髓损伤后大鼠神经源性膀胱模型的制备与观察

罗静^{1,2}, 邓石峰¹, 余雨荷¹, 刘笑萌¹, 艾坤¹, 许明¹, 张泓¹

【摘要】 目的:对完全性骶髓损伤后大鼠神经源性膀胱模型(NB)进行制备并观察验证,以期对骶髓损伤后神经源性膀胱模型大鼠的制备提供实验依据。**方法:**42只健康雌性SD大鼠随机抽取12只设为空白组,常规饲养后于第19天行尿流动力学检测。剩余30只大鼠采用改良Hassan Shaker脊髓横断法制成骶髓损伤大鼠NB模型,成模后随机分为3个次组(A/B/C组),每组10只;模型组大鼠造模术后行规范化护理,观察记录大鼠膀胱功能、手法排尿量及并发症等情况;A/B/C组大鼠分别于造模术后第19、23、28天行尿流动力学检测,检测结束后断颈处死大鼠,膀胱逼尿肌苏木素-伊红染色(HE)后镜下观察其形态变化。**结果:**模型组大鼠造模术后28天内膀胱功能障碍持续表现为尿潴留;术后第19天模型组大鼠生命体征稳定,并发症控制良好;与空白组进行对比:光镜下可见模型组大鼠逼尿肌肌束排列紊乱、肌纤维萎缩严重、间质结构填充增多等病理性改变;尿流动力学检测结果显示:与空白组相比较,模型组大鼠膀胱漏尿点压力(LPP)降低、膀胱最大容量(MCC)、膀胱顺应性(BC)增加,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。A/B/C组大鼠造模术后第19、23、28天尿流动力学检测结果比较显示:3个阶段大鼠膀胱漏尿点压力、最大容量、顺应性无统计学差异。**结论:**于大鼠L2-3节段采用改良的Hassan Shaker法完全横断SD大鼠骶段脊髓,成功复制完全性骶髓损伤大鼠神经源性膀胱模型,且模型质量稳定可靠。

【关键词】 骶髓损伤;神经源性膀胱;尿流动力学;动物模型

【中图分类号】 R49;R694 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2022.07.001

Establishment and application of neurogenic bladder model after complete sacral cord injury in rats Luo Jing, Deng Shifeng, Yu Yuhe, et al. *Acupuncture—Massage and Rehabilitation College of Hunan University of Traditional Chinese Medicine*, Changsha, Hunan 410208, China

【Abstract】 Objective: To establish and verify the neurogenic bladder (NB) model of rats after complete sacral cord injury. **Methods:** A total of 12 rats were randomly selected from 42 female SD rats as blank group, and urodynamic test was performed at the 19th day after conventional feeding. The remaining rats were used to establish the NB model of sacral SCI by modified Hassan shaker spinal cord transection, and randomly divided into three experimental groups: groups A, B and C, with 10 rats in each group after modeling. After modeling, the rats in the model group were given standardized nursing care. The bladder function, manual micturition and complications were observed and recorded. At the 19th, 23rd and 28th day after modeling, the rats in the groups A, B and C were tested for urodynamic measurements. **Results:** Bladder dysfunction in model group was urinary retention within 28 days after modeling; At the 19th day after operation, the vital signs of rats in the model group were stable and the complications were well controlled. As compared with the blank group, pathological changes such as disordered arrangement of detrusor muscle bundles, serious atrophy of muscle fibers and increase of interstitial structure filling were observed in the model group under the light microscope. Urodynamic examination showed that the LPP decreased, the MCC and BC of bladder increased ($P<0.01$). The results of urodynamics in the model group were compared with

those at the 19th, 23rd and 28th day after modeling, and there were no significant changes in the LPP, MCC and BC of bladder in the three stages, suggesting that dysfunction of urinary retention persisted in rats of model group. **Conclusion:** Using the improved Hassan shaker method to completely transect the L2-3 spinal cord of SD rats successfully reproduced the NB model of rats, and the quality of the model was stable and rel-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81874510);湖南省高等学校“国内一流培育学科”中西医结合学科经费资助(NO. 2020ZXYJH23);长沙市自然科学基金项目(NO. KQ2007041)

收稿日期:2021-12-31

作者单位:1. 湖南中医药大学针灸推拿与康复学院,长沙 410208;2. 岳阳市中心医院,湖南 岳阳 414000

作者简介:罗静(1987-),男,在读硕士研究生,主要从事针灸对神经系统疾病的康复机理与研究。

通讯作者:张泓,zh5381271@sina.com

iable.

【Key words】 sacral cord injury; neurogenic bladder; urodynamics; animal model

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是指由于外界直接或间接因素导致脊髓损伤。流行病学研究表明,近年来随着社会经济的发展,SCI 的发生率在世界范围内呈逐年上升的趋势,其中,亚洲人脊髓损伤发病率近些年已从每百万人 12.06 人的发生率上升到 61.6 人^[1]。神经源性膀胱(neurogenic bladder, NB)是 SCI 后最常见的并发症,以骶髓损伤为例,NB 功能障碍表现为逼尿肌收缩强度或持续时间降低即逼尿肌无反射或低反射,膀胱排空时间延长或排空不能,残余尿量增多,临床表现为尿潴留。这种排尿困难和高压储尿状态是并发膀胱-输尿管反流、肾功能损伤等上尿路疾病的主要原因,严重降低了患者的生存质量^[2]。SCI 所致的 NB 是临床与实验研究的重点和热点内容之一,然而,目前绝大多数的实验及动物模型研究主要集中在骶上水平,选择骶髓水平损伤的实验及动物模型研究较少,且现有的研究造模方法不统一、缺少脊髓损伤术后的系统护理说明以及模型稳定性的判定^[3]。因此,对脊髓骶髓水平损伤的动物模型进行系统研究就显得十分必要。本实验选取大鼠为实验对象,采用脊髓完全横断术成功复制骶髓损伤后大鼠神经源性膀胱模型,汇报如下。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 SPF 级健康 SD 雌性大鼠 42 只,体质量 250~280g,湖南中医药大学动物实验中心提供(动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002;实验设施实验许可证号:SYXK(湘)2013-0005),24~26℃的安静环境中适应性喂养 3 周。适应性喂养后采用随机数字表法编号,随机抽取 12 只设为空白组,剩余 30 只大鼠采用改良 Hassan Shaker 脊髓横断法制作成完全性骶髓损伤后神经源性膀胱模型。实验过程对大鼠的处置方式严格按照中华人民共和国科技部 2006 年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要材料、试剂与仪器 主要材料、试剂:水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司),青霉素钠(哈药集团制药总厂),4%多聚甲醛(上海威奥生物科技有限公司),乳酸盐林格溶液(哈药集团制药总厂),橡皮生肌膏(湖南中医药大学第一附属医院自制),其余常规试剂(上海国药生物)。主要仪器:微量注射泵(浙江史密斯医学仪器有限公司/WZ-50C6),F3 导尿管(上海康鸽),16 通道生理记录仪(美国 BIOPAC 公司/MP150-WSW),YP10002 小动物电子秤(上海佑科仪

表有限公司),显微镜(厦门麦克奥迪),摇床(其林贝尔),恒温箱(北京六一),切片机(浙江金华益迪试验器材),包埋机(常州中威电子仪器)。

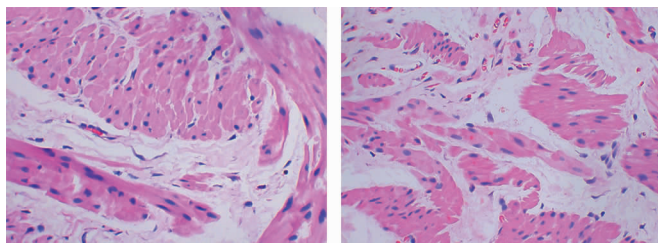
1.3 方法

1.3.1 手术方法 采用改良 Hassan Shaker 脊髓全断法进行模型制备^[4],大鼠术前 24h 禁食不禁水,术前 2h 腹腔注射 20U 单位抗生素预防感染;随即以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉后(300mg/kg),俯卧位捆绑固定、备皮、消毒;于 L₂~L₃ 椎间隙处完全横断脊髓,损伤大鼠脊髓 S₂₋₃ 节段^[4-5];具体为:于鼠背部皮肤相应位置以手术刀沿后正中中线作 3cm 的纵向切口;逐层钝性分离筋膜、肌肉暴露 L₂₋₄ 椎体棘突及椎板,去除 L₃ 棘突和椎弓根以充分暴露脊髓,注意避免邻近神经等组织损伤。选用 5 号牙科钩平口探头端沿椎管一侧下缘穿过脊髓底部,用手术刀完全切断脊髓,确保无神经纤维残留。手术过程严格无菌操作,确认止血充分后由内而外逐层严密缝合创面。成模标准^[5-7]:①大鼠脊髓休克期后,后肢运动功能障碍且膀胱功能障碍表现为尿潴留;②尿流动力学检测:漏尿点压力(leak point pressure, LPP)降低、膀胱最大容量(maximum cystometric capacity, MCC)增加,膀胱顺应性(bladder compliance, BC)增加,满足以上即可判断成模。剔除标准:术后存在自主排尿、尿失禁,或出现严重尿血、尿路感染、自噬、腹胀等并发症的大鼠予以剔除。

1.3.2 术后护理 ①术后大鼠单笼饲养,保证大鼠充分的活动空间;②予抗生素预防感染(术后 1~3d,20U 单位青霉素酸钠 2 次/只/d;术后 4~7d 给予 20U 单位 1 次/只/d);③预防电解质失衡(手术当天及第 2 天予大鼠乳酸盐林格溶液皮下注射,20ml/kg,2 次/d)。④予苦味酸皮肤喷洒预防自噬,出现自噬者及时采取创面消毒包扎处理,并予青霉素钠预防感染。⑤肠道并发症预防:手术当天仅予葡萄糖喂养;术后 2~7d,葡萄糖加少量饲料喂养(约 10g/d/只),7d 后常规喂养,出现腹胀者,减少饲料喂养并适当补充葡萄糖,温和按揉腹部,更换大笼饲养,保证其活动范围。⑥膀胱护理:以 crede 手法排尿,3 次/d,避免膀胱尿液长期大量潴留膀胱造成肾、膀胱的功能损伤,若出现血尿及尿路感染等,予腹腔注射青霉素钠(20 万 u/只/d)持续治疗。

1.3.3 分组处理 空白组大鼠适应性喂养后常规饲养 18 d,于第 19 天行尿流动力学检测,断颈处死后剪取膀胱组织,以备 HE 染色后光镜下进行形态学观察。

2.2.1 逼尿肌组织镜下观察 HE 染色后结果显示,空白组大鼠膀胱逼尿肌呈正常形态结构,肌束排列紧致、肌纤维饱满、排列整齐,间质填充少;造模术后第 19 天,模型组大鼠逼尿肌肌束排列紊乱、肌纤维严重萎缩、间质结构填充多。见图 1。结果提示:大鼠骶髓损伤后逼尿肌失神经支配,适应性地出现病理性改变。



a. 空白组($\times 400$) b. 模型组($\times 400$)

图 1 a~b 空白组与模型组大鼠逼尿肌组织 HE 染色比较

2.2.2 大鼠尿流动力学检测结果 尿流动力学检测结果显示:与空白组相比较,模型组大鼠膀胱 LPP 降低,膀胱 MCC、BC 增加($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 空白组与模型组大鼠尿流动力学指标比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	漏尿点压力	膀胱最大容量	顺应性
		LPP(mmHg)	MCC(ml)	BC(ml/mmHg)
空白组	11	33.510 \pm 6.473	1.247 \pm 0.459	0.044 \pm 0.017
模型组	9	12.816 \pm 0.291 ^a	4.032 \pm 0.253 ^a	0.316 \pm 0.021 ^a

与空白组比较,^a $P < 0.01$

2.3 造模术后第 19、23、28 天模型 A、B、C 组尿流动力学检测结果比较 模型组大鼠行造模手术后第 19 天、23 天、28 天尿流动力学检测结果显示:3 组间大鼠膀胱 LPP、MCC 及 BC 比较其差无统计学意义,见表 3。

表 3 模型组 A、B、C 组大鼠 3 个阶段尿流动力学指标比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	漏尿点压力	膀胱最大容量	顺应性
		LPP(mmHg)	MCC(ml)	BC(ml/mmHg)
模型组 A 组	9	12.816 \pm 0.291	4.032 \pm 0.253	0.316 \pm 0.021
模型组 B 组	8	12.256 \pm 0.388	4.105 \pm 0.275	0.336 \pm 0.021
模型组 C 组	8	13.514 \pm 0.400	4.351 \pm 0.287	0.323 \pm 0.021

3 讨论

SCI 后的 NB 是脊髓损伤患者严重的并发症,围绕脊髓损伤后 NB 的康复研究是近年来临床和实验研究的热点^[10-11]。脊髓圆锥作为排尿反射的低位中枢,其受损可导致排尿反射弧中断,逼尿肌反射消失,继发逼尿肌的收缩能力下降,临床表现为尿液充盈膀胱后不能正常排出,引起膀胱容积增大、顺应性降低,最终表现为排尿困难、尿潴留为主要特点的神经源性膀胱功能障碍。此类膀胱储尿和排尿功能均受到严重损害,残余尿量多,尿路感染率高达 83%,极易引起肾脏损害^[12-13]。目前,对于脊髓损伤后 NB 的绝大多数的

动物模型研究都集中在骶上水平,对于骶髓水平损伤的临床及实验研究较少。

选择横断大鼠脊髓骶髓水平需要考虑到其神经控制系统及其脊髓骶段解剖位置与人的差异性。膀胱的低级神经中枢主要为交感神经、副交感神经。其中交感神经支配膀胱顶部、颈部以及尿道,松弛逼尿肌和紧张尿道括约肌以达到贮尿目的。副交感神经兴奋则膀胱逼尿肌紧张尿道括约肌放松,使尿液排出。副交感神经低级中枢位于骶段 S₂₋₄ 水平,对应大鼠椎体 L₂₋₄ 的任意部位。建立骶段完全性损伤可选择横断大鼠 L₂₋₄ 椎体下的脊髓,该段受损后即可造成骶副交感神经-膀胱丛抑制,继而出现逼尿肌收缩无力而产生尿潴留^[14]。本实验参考相关研究选取大鼠 L_{2/3} 椎间隙下的脊髓进行横断^[5,6,15],结果显示:术后第 18 天模型组大鼠光镜下逼尿肌肌纤维萎缩、兼间质结构填充增多、排列紊乱;尿流动力学检测结果可见模型组大鼠膀胱漏尿点压力显著降低,膀胱容量、膀胱顺应性增加,逼尿肌收缩无力,漏尿点压力降低,尿液潴留,膀胱容量增大。形态学改变及尿流动力学检测结果与相关研究结果一致,证实模型复制成功^[5]。

脊髓损伤后的各种并发症的发生率高,良好地控制并发症对于保证动物模型质量十分重要。本实验中我们观察到大鼠后 1~8d、13~18d 分别出现了并发症的高峰期,因脊髓横断术本身的创伤及术后脊髓休克期所致的运动系统及各内脏功能的障碍导致了第一期并发症的高峰,之后大鼠术后创伤基本修复,部分大鼠脱离脊髓休克期,神经功能得到一定程度的恢复,并发症发生率随之降低。从并发症的发生率来看,血尿和尿路感染的综合发生率高达 36.67%,占并发症总发生率 53.34% 的一半以上,早期的护理方案主要采用 Crede 手法排尿,避免膀胱过度充盈后出现血管的破裂,本实验中,除了规律的手法排尿之外,同时规律地控制大鼠的饮水,将二者结合起来(分三次排尿、饮水,给水约 10ml/次/只),与前期研究相比较,进一步降低了并发症的发生率^[5,7]。在脊髓休克期期间,采用常规饮食的方法,大鼠不能自主控制进食量,常因过量进食导致腹泻、腹胀等较为严重的肠道并发症,故本实验在早期减少大鼠常规进食量,适当补充葡萄糖水以减小胃肠消化负荷,待大鼠脊髓休克期结束、运动功能提高后,逐渐恢复其常规饮食。本研究中,肠道并发症的发生率仅为 10%。

目前对于骶髓损伤后 NB 膀胱大鼠模型成功的判定并无确切的标准,骶段脊髓损伤后大鼠在脊髓休克期以及脊髓休克期后,膀胱功能障碍均表现为尿潴留状态,客观上为模型成功与否的判定带来了一定的困难。采用形态学、尿流动力学等客观的检测方法,结合大鼠

膀胱功能的表现(如:尿液潴留触诊可见膀胱胀大、大鼠提尾悬空不能自主排尿)可以准确地判断模型成功与否。然而在实际的实验研究中,采用尿流动力学检测的方法需要特定的仪器,且对膀胱功能造成一定的影响,如本实验中选用造瘘的方法行尿流动力学检测则存在创伤较大、操作难度高、难以重复进行等局限。对此,本实验对完全性脊髓损伤所致的大鼠 NB 模型进行了长达 4 周的系统观察,结合膀胱功能临床观察、尿流动力学检测,并总结出判断模型成功的简便参考标准,即:大鼠脊髓损伤术后 18 天度过脊髓休克期,此时触诊大鼠下腹部,若连续 2 天出现膀胱胀大,大鼠提尾悬空后若不能自主排尿,可以确定模型制备成功。

总之,本研究采用改良的脊髓横断法于大鼠第 L_{2/3} 腰椎间隙进行横断,术后进行规范化的护理,较好地控制并发症,并采用膀胱尿流动力学检测及膀胱逼尿肌形态学观察的方法进行验证,成功地复制了脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠模型,为后续的动物实验研究提供了有益的参考。

【参考文献】

- [1] 贺宝荣, 郑博隆. 中国脊髓损伤规范化治疗和修复机制研究概况[J]. 中华创伤杂志, 2020, 36(4): 289-292.
- [2] Bellardita C, Marcantoni M, P Löw, et al. Sacral Spinal Cord Transection and Isolated Sacral Cord Preparation to Study Chronic Spinal Cord Injury in Adult Mice[J]. Bio-protocol, 2018, 8(7): e2784-e2795.
- [3] 刘媛, 龙在云, 李森. 创伤性脊髓损伤动物模型研究进展[J]. 中国临床神经科学, 2020, 28(4): 475-480.
- [4] Shaker H, Mourad M S, Elbialy M H, et al. Urinary bladder hyperreflexia: a rat animal model[J]. Neurourology & Urodynamics, 2003, 22(7): 693-698.
- [5] 张雨辰, 张泓, 艾坤, 等. 大鼠脊髓损伤后神经源性膀胱模型的制备[J]. 中国康复医学杂志, 2014, 29(6): 542-546.
- [6] Wienecke J, Westerdahl AC, Hultborn H, et al. Global gene expression analysis of rodent motor neurons following spinal cord injury associates molecular mechanisms with development of postinjury spasticity[J]. Journal of Neurophysiology, 2010, 103(2): 761-778.
- [7] 许明, 张泓, 刘继生, 等. 完全性骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠模型的建立及尿流动力学分析[J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(8): 869-875.
- [8] 杨静, 代秀, 吴扬, 等. 电针“三阴交”对膀胱造瘘术后功能亢进模型大鼠膀胱功能的调节作用[J]. 中国针灸, 2014, 34(10): 998-1002.
- [9] Shea VK, Cai R, Crepps B, et al. Sensory fibers of the pelvic nerve innervating the rat's urinary bladder [J]. J Neurophysiol, 2000, 84(4): 1924-1933.
- [10] 张海涛. 脊髓损伤后神经源性膀胱患者的康复治疗研究进展[J]. 内科, 2019, 14(6): 696-698, 710.
- [11] 魏新春, 周云, 吴建贤. 等. 电针膀胱经腧穴联合膀胱治疗仪治疗脊髓损伤后神经源性膀胱的临床疗效观察[J]. 中国康复, 2021, 36(7): 396-400.
- [12] Jeong SJ, Cho SY, Oh SJ. Spinal cord/brain injury and the neurogenic bladder[J]. Urol Clin North Am, 2010, 37(4): 537-546.
- [13] 张秀, 华文洁, 李素. 脊髓损伤神经源性膀胱患者尿路感染相关危险因素的回溯性研究[J]. 中国康复, 2021, 36(4): 208-212.
- [14] 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.
- [15] 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.

· 外刊拾粹 ·

社会融合和认知状况

研究表明,增强社会联系和人际关系与降低死亡率有关。这项研究使用来自美国老年人的多种族队列数据,旨在更好地理解社会融合和认知功能之间的关系。数据来自 Kaiser 健康老龄化和多元化生活经历数据库(KHANDLE),该数据库纳入了在加州旧金山湾和萨克拉门托地区的社区居住的老年人。受试者中,亚裔、黑人、拉丁裔和白人参与者的比例大致相同,受教育程度各异。数据的收集使用 Berkman-Syme 社会网络指数以及西班牙语和英语的神经心理评估量表(SENAS)。研究对象为 1343 名成年人,平均年龄为 75.4 岁。亚裔的平均社会融合分数为 3.6 (SD=1.2),黑人为 3.4 (SD=1.3),拉丁裔为 3.3 (SD=1.2),白人为 3.5 (SD=1.3),各组之间没有显著差异。一项横断面分析显示,较高的社会融合分数与较好的基线认知分数有关,在不同的种族或民族群体中没有看到明显的差异。没有发现社会融合与认知变化的预估速度有关。结论:这项研究表明,更大程度的社会融合,尤其是与密友的频繁互动,与更高的基线认知分数相关。

(张迪译,徐阳、朱璐审)

Calmasini C, et al. Association of Social Integration with Cognitive Status in a Multi-Ethnic Cohort: Results from the Kaiser Healthy Aging and Diverse Life Experiences Study. J Geriatr Psychiat and Neurol. 2022, Jan25; 8919887211070259. doi:10.1177/08919887211070259.

中文翻译 由 WHO 康复培训与研究合作中心(武汉)组织
本期由中国医科大学附属盛京医院 张志强教授主译编