

· 综述 ·

光化学法诱导脊髓损伤动物模型的建立及评估

王熠钊 黄晓琳

建立一个适宜的脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 动物模型, 是研究脊髓的损伤机制及治疗的基础。自 1911 年 Allen 首次用重物打击 (weight drop, WD) 法复制出 SCI 模型之后, 人们又相继应用不同方法研制了多种动物模型。光化学法利用了光敏材料与光接触后发生的光化学反应, 光化学反应物可造成血管内皮细胞水肿和损伤, 同时引起血小板活化聚集, 与纤维蛋白一起导致血栓形成, 从而使局部组织发生缺血性坏死。1985 年, Watson 等最早将光化学法用于大鼠脑梗死模型的建立^[1,2], 之后, Prado 等^[3]和 Watson 等^[4,5]又应用光化学法建立了不同程度的 SCI 模型。经过十几年的不断改进, 光化学法因其较好的可控性而日益受到人们的重视。

光化学 SCI 模型的建立方法及特点

Watson 最早建立的光化学 SCI 模型, 采用 560 nm 的冷光直接照射于大鼠暴露的脊髓表面, 使预先注射于体内的玫瑰红发生化学反应, 导致脊髓的微小血管损伤^[4]。此后, 人们对光照条件、玫瑰红的用量及方法作了改进。Ruben 等^[6]暴露大鼠损伤段脊椎, 咬除后侧椎板并去除光照部位硬脊膜后, 将浓度为 1.5% 的玫瑰红溶液滴于暴露的脊髓表面, 10 min 后将脊髓表面未被吸收的玫瑰红洗去再行照射; 照射光源采用 100 W 的卤素灯, 光照强度为 95 k Lux, (Lux 为光照度, 即每平方米的流明值, 表示单位面积上受到的光通量); 用直径 5 mm 的光导纤维将冷光导出, 在距暴露脊髓 10 cm 处照射 2.5 min。Gaviria 等^[7]用光化学法建立小鼠 SCI 模型时, 经静脉注射玫瑰红; 他们将损伤部位的椎板咬除, 但保留了完整的硬脊膜, 根据损伤程度不同用 560 nm 的冷光照射 3 ~ 8 min。von Euler 等^[8]只是尽量去除光照部位椎体的软组织, 但保留了完整的椎板; 动物预先接受 32.5 mg/kg 体重的玫瑰红静脉注射; 照射光源采用波长为 515.4 nm 的氩离子激光, 输出功率为 0.16 W, 照射宽度为 300 μm ; 照射过程中, 动物持续静脉注射玫瑰红 3.25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 以保持血药浓度。

以上各种方法的不同之处主要为光照时是否需要咬除椎板甚至去除硬脊膜, 玫瑰红是静脉注射或是局部应用等, 造成这些差别的主要原因是冷光源的不同。早期冷光源主要采用各种卤素灯, 其照射光的波谱较宽, 而玫瑰红的最大吸收波长为 562 nm, 需要用该波长或其附近波长的光来引发光化学反应。如果照射光的波谱过宽, 能被光敏剂吸收, 引发光化学反应的能量就较小, 因此常常需要咬除椎板以增加光照强度, 或是去除硬脊膜后将玫瑰红溶液直接滴于脊髓表面以增加玫瑰红的局部浓度。但是这些方法对动物有较大的损伤, 于是研究者们对冷光源作了改进, 将氩离子激光作为照射光源。氩离子

激光的波长为 515.4 nm, 较接近玫瑰红的吸收波长, 且氩离子激光能量较大, 更利于透过椎板, 因此不必咬除椎板而直接照射, 这一改进大大减轻了对动物的损伤并简化了造模方法。此外必须注意的是, 高能量的光和热本身可能对脊髓组织和血管等具有一定的损伤作用, 应利用风扇或液体冲洗对其光照局部降温, 以突出光化学作用, 减小光和热的损伤作用。

光化学 SCI 模型的神经行为学改变

Prado 等^[3]观察到, 大鼠接受损伤手术后运动功能严重受损, 但在短时间 (30 s 或 1 min) 光照后, 其运动功能在术后 8 周内有所恢复; 而给予较长时间 (5 min 或 10 min) 的光照, 大鼠的运动功能则难以恢复。大鼠在损伤手术后 3 ~ 5 d 内会有弛缓性瘫痪发生, 但随后会有所好转^[9]。Ruben 等^[6]和 Garcia-alias 等^[10]观察到, 光化学诱导的 SCI 大鼠的 Basso-Beattie-Bresnehan 评分明显减少; 损伤后大鼠进行斜板试验显示, 斜板角度有所减小。Garcia-alias 等^[11]还研究了大鼠的感觉功能, 通过检测大鼠后肢对热刺激的反应, 发现损伤大鼠所需反应时间明显增加。Hao 等^[12]用光化学法损伤大鼠第 10 胸椎后, 动物出现了自发性疼痛, 会对一些无害的搔抓和按压产生疼痛反应, 表现激动并且尖叫, 且疼痛的持续时间和强度与照射时间的长短无关; 这种疼痛即使用大剂量的吗啡也不起作用, 但用 γ -氨基丁酸 B (γ -aminobutyric acid-B, GABA-B) 受体激动剂却能有效地缓解, 提示可能是脊髓内的 GABA-B 系统功能障碍导致了动物的自发性疼痛。

光化学 SCI 模型的病理改变

Prado 等^[3]在 1987 年用光化学法诱导大鼠 SCI 时就发现, 光照时间的长短与动物脊髓病理改变的严重程度呈正比; Cameron 等^[9]随后观察了大鼠 SCI 后 28 d 的情况, 病理学观察结果显示, 空洞的体积在损伤后 7 d 可达到最大, 范围可从脊髓后角一直到达脊髓第 8 层, 只残留脊髓腹侧和两侧的某些传导纤维。Verdu 等^[13]观察到, 随着光照时间的延长, 脊髓内空洞的体积亦有增加, 范围可从脊髓背索一直到达脊髓后角、背外侧索和腹外侧索, 同时还伴有相应灰质的变性坏死。

光化学诱导 SCI 是一个渐进的病理过程。Bunge 等^[14]观察了大鼠脊髓从损伤后第 2 天至第 17 个月间共 16 个时间点的病理改变, 发现在脊髓光化学损伤后形成了两种空洞。最初的光化学反应损伤脊髓后, 产生的血栓使其周围区域坏死, 形成所谓的“损伤性空洞”, 该空洞长 6 mm, 最宽的部分可以横跨脊髓, 深度可从背面一直到达中央管; 到第 8 周, 损伤性空洞已经明显减小, 内部填充了散在的巨噬细胞、血管以及被施旺细胞所包被的轴突等, 部分空腔边界由星形胶质细胞构成, 这些星形胶质细胞面向空腔的一侧, 高度不规则, 且有基膜包被; 到损伤后第 6 个月, 可以看到体积较大、边界平滑, 且没有基膜的

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科

通讯作者: 黄晓琳, Email: xiaolin2006@yahoo.com.cn

“继发性空洞”形成,这些空洞不会随时间改变而出现数量及体积的增加。Hao 等^[15]采用光化学法诱导大鼠胸 11 段 SCI,通过激光多普勒血流仪检测脊髓的血流改变情况,结果显示光照时间较短时,SCI 局部血流在 30 min 内会有所恢复,而光照时间较长者则无法恢复。von Euler 等^[8]用甲基酚紫(cresyl violet)对存活组织染色后发现,术后 6 h 损伤较明显,而损伤范围于缺血后的第 3 天趋于稳定;在缺血损伤后第 1 周,神经微丝 200(neurofilament 200, NF200)免疫组化检测结果显示,损伤部位附近的轴突水肿;损伤后第 3 周,神经胶质纤维酸性蛋白(gial fibrillary acidic protein, GFAP)免疫组化检测结果显示,损伤空洞附近有持续性的神经胶质细胞增生;损伤后第 6 周,神经胶质细胞增生更明显,并且在梗死灶周边尚存活的组织内可以看到体积增大的 GFAP 免疫阳性细胞。Verdu 等^[13]观察到,损伤脊髓的 GFAP 及钙结合蛋白的免疫反应性有所增强,并且发现了反应性微胶质细胞,以及 GFAP、蛋白多糖阳性的肥大星形胶质细胞,二者的数量与 SCI 的程度平行;还观察到脊髓经长时间光照后,降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptid, CGRP)阳性细胞的胞体明显减少,而钙结合蛋白阳性细胞的胞体却明显增加;光镜和电镜观察都显示,星形胶质细胞肿胀、肥大,红细胞逸出血管外,以及髓鞘变性。光化学反应损伤脊髓后,脊髓有一定程度的自我修复功能,但不同的轴突对损伤的反应不一样,其中小直径轴突的再生比大直径轴突的再生明显^[16]。von Euler 等^[17]通过轴突的酪氨酸羟化酶及 5-羟色胺免疫组化检测还发现,中枢的下行神经纤维在脊髓缺血损伤的修复过程中扮演了重要角色。

光化学 SCI 模型的细胞学基础

Tseng 等^[18]通过荧光显微镜及荧光测定法,观察了氩离子激光照射玫瑰红在几种培养细胞中的光动力学作用特点,其中内皮细胞单层表现出剂量依赖性的光生物学效应,表现为照射区域细胞收缩。在体情况下氩离子激光照射后出现的血管内皮细胞收缩,以及与非照射区域内皮细胞的脱离,与以上表现十分相似;此外,通过荧光检测还观察到了细胞内成分的改变,这是导致细胞收缩的原因。Saniabadi 等^[19]通过扫描电镜观察到,光化学反应损伤了血管内皮细胞膜,随着光照时间的增加,血管内皮细胞开始皱缩,接着从血管壁脱落,同时血小板聚集形成血栓;静脉注射玫瑰红 1 min 后注射氨基硫醇及巯基丙氨酸,以上反应均可被抑制。因此推测,光化学损伤的机制是通过光化学反应形成的单态氧造成血管内皮细胞损伤,并形成血栓,最终导致组织出现缺血性坏死。

光化学 SCI 模型的电生理学改变

Prado 等^[3]在短时间光照组大鼠身上仅观察到轻微的行为学改变,但各光照组(分别照射 30 s、1 min、5 min 和 10 min)电生理检查结果都有较明显的改变,第 8 周时,光照 30 s 组大鼠的诱发电位已经基本回到正常基线水平,而光照 1 min 组大鼠则未回到基线水平。Ruben 等^[6]和 Garcia-Alias 等^[10,11]发现,损伤 14 d 后大鼠的运动诱发电位(motor evoked potential, MEP)波幅减小,提示部分下行运动传导纤维受损,而 MEP 潜伏期没有明显改变;脊髓体感诱发电位(spinal somatosensory evoked

potential, SSEP)波幅有所减小,潜伏期亦未发现明显改变。为了获得腰段脊髓的功能情况,他们还检测了坐骨神经的 H 反射;当损伤位于腰膨大以上时, M 波的潜伏期和波幅都没有改变,但 H 波波幅有所增加;当损伤位于腰膨大时, M 波和 H 反射的波幅都减小,而潜伏期没有变化。这可能是由于当损伤位于腰膨大以上时,大脑的下行抑制通路受到破坏,使腰膨大部位的运动神经元功能得到释放,从而使 H 波波幅增加;当损伤位于腰膨大时,发出下肢运动冲动的神经元受到损伤,从而使 H 波波幅减小。因此认为,可以通过 H 反射来检测动物模型腰膨大段脊髓是否有损伤。

小结与展望

自光化学法问世以来,在 SCI 模型的制作中广为应用。与其它模型制作方法相比,它具有较好的可重复性,操作的复杂程度亦较低;通过对动物模型的行为学评定、神经电生理检查等,可以对动物模型 SCI 的程度进行量化控制。但目前用于光化学诱导 SCI 模型的动物主要集中在大鼠和小鼠等小型动物,大体型动物应用不多,因此选择适当的大体型动物,成功地制作出不同程度的 SCI 模型,就显得尤为必要,这也将为科研提供更多的选择和便利。

参 考 文 献

- [1] Watson BD, Dietrich WD, Busto R, et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*, 1985, 17:497-504.
- [2] Dorfler-melly J, Schwarte LA, Ince C, et al. Mouse models of focal arterial and venous thrombosis. *Basic Res Cardiol*, 2000, 95: 503-509.
- [3] Prado R, Dietrich WD, Watson BD, et al. Photochemically induced graded spinal cord infarction. Behavioral, electrophysiological, and morphological correlates. *J Neurosurg*, 1987, 67:745-753.
- [4] Watson BD, Prado R, Dietrich WD, et al. Photochemically induced spinal cord injury in the rat. *Brain Res*, 1986, 367:296-300.
- [5] Watson BD, Holets VR, Prado R, et al. Laser-driven photochemical induction of spinal cord injury in the rat: methodology, histopathology, and applications. *Neuroprotocols*, 1993, 3:3-15.
- [6] Ruben LV, Guillermo GA, Joaquim F, et al. FK506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res*, 2005, 81:827-836.
- [7] Gaviria M, Haton H, Sandillon F, et al. A mouse model of acute ischemic spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 2002, 19:205-221.
- [8] von Euler M, Sundstrom E, Seiger A, et al. Morphological characterization of the evolving rat spinal cord injury after photochemically induced ischemia. *Acta Neuropathol*, 1997, 94:232-239.
- [9] Cameron T, Prado R, Watson BD, et al. Photochemically induced cystic lesion in the rat spinal cord. Behavioral and morphological analysis. *Exp Neurol*, 1990, 109:214-223.
- [10] Garcia-Alias G, Verdu E, Fores J, et al. Functional and electrophysiological characterization of photochemical graded spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*, 2003, 20:501-510.
- [11] Garcia-Alias G, Lopez-Vales R, Fores J, et al. Acute transplantation of olfactory ensheathing cells or schwann cells promotes recovery after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res*, 2004, 75:632-641.

- [12] Hao JX, Xu XJ, Aldskogius H, et al. Allodynia-like effects in rat after ischemic spinal cord injury photochemically induced by laser irradiation. *Pain*, 1991, 45:175-185.
- [13] Verdu E, Garcia-Alias G, Fores J, et al. Morphological characterization of photochemical graded spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*, 2003, 20:483-499.
- [14] Bunge MB, Holets VR, Bates ML, et al. Characterization of photochemically induced spinal cord injury in the rat by light and electron microscopy. *Exp Neurol*, 1994, 127:76-93.
- [15] Hao JX, Herregodts P, Lind G, et al. Photochemically induced spinal cord ischaemia in rats; assessment of blood flow by laser Doppler flowmetry. *Acta Physiol Scand*, 1994, 151:209-215.
- [16] Olby NJ, Blakemore WF. Primary demyelination and regeneration of ascending axons in the dorsal funiculus of the rat spinal cord following photochemically induced injury. *J Neurocytol*, 1996, 25:465-480.
- [17] von Euler M, Janson AM, Larsen JO, et al. Spontaneous axonal regeneration in rodent spinal cord after ischemic injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002, 61:64-75.
- [18] Tseng SC, Feenstra RP, Watson BD. Characterization of photodynamic actions of rose bengal on cultured cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35:3295-3307.
- [19] Saniabadi AR, Umemura K, Matsumoto N, et al. Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction. *Thromb Haemost*, 1995, 73:868-872.

(修回日期:2006-09-24)
(本文编辑:吴倩)

· 临床研究 ·

脑卒中后抑郁症对患者肢体运动功能和日常生活活动能力康复的影响

李春燕 方岩 杨青松

【摘要】目的 探讨脑卒中后抑郁症对患者肢体运动功能和日常生活活动(ADL)能力康复的影响。**方法** 将 363 例脑卒中患者根据综合医院焦虑/抑郁情绪测定量表(HAD)评分分为抑郁组(HAD≥8 分)71 例,非抑郁组(HAD<8 分)292 例。2 组患者于入院时、发病后 3 个月和 4 个月 3 个时点,分别采用简化 Fugl-Meyer 评分和 Barthel 指数评定其肢体运动功能和 ADL 能力,并进行组间比较。**结果** 抑郁组在病后 3 个月和 4 个月,肢体运动功能和 ADL 能力明显较非抑郁组差,2 组各项评分相比,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 脑卒中后抑郁症影响患者肢体运动功能和 ADL 能力的康复。

【关键词】 脑卒中; 抑郁; 运动功能; 日常生活活动能力

脑卒中是当前危害我国中老年人生命与健康的常见病和多发病,患者病死率高,存活者往往遗留严重的神经功能障碍。脑卒中后抑郁症(poststroke depression, PSD)是脑卒中后常见并发症,一旦发生,可直接影响患者的生存质量及功能康复。本研究对 71 例 PSD 患者病后不同时期肢体运动功能和日常生活活动(activities of daily living, ADL)能力进行评定,探讨 PSD 对患者肢体运动功能和 ADL 能力康复的影响。

资料与方法

一、一般资料

全部病例均为 2000 年 12 月至 2003 年 6 月在我院住院的脑卒中患者,共 363 例。脑卒中的诊断标准依据 1995 年 10 月中华医学会第 4 届全国脑血管病学术会议通过的“各类脑血管病诊断要点”^[1],在发病 48 h 内行头颅 CT 或 MRI 检查证实,并排除死亡、意识障碍、失语、痴呆及原有脑器质性疾病和精神病史者。

二、分组

采用综合医院焦虑/抑郁情绪测定量表^[2](hospital anxiety/depression scale, HAD)对所有脑卒中患者进行评定,总评分≥8 分者诊断为 PSD,作为抑郁组,总评分<8 分者作为非抑郁组。2 组患者一般情况及病情比较,差异均无统计意义($P>0.05$),具有可比性(见表 1)。

三、治疗方法

2 组患者入院后均给予相同的治疗,包括控制血压,应用脱水剂及活血化瘀药物,并辅以相应的康复训练。康复训练包括:(1)肢体各关节的被动运动;(2)良肢位的摆放;(3)翻身练习;(4)搭桥练习;(5)Bobath 式握手训练;(6)坐、站立训练;(7)穿衣、排便训练;(8)吃饭训练;(9)前行、平衡训练;(10)肢体功能训练。以上训练每日 2 次,每次 30 min,共 3 个月。抑郁组患者同时给予 5-HT 再摄取抑制剂帕罗西汀,每次 20 mg,每日 1 次,连用 3 个月。

表 1 2 组患者一般情况比较

组别	例数	性别 (男/女,例)	年龄 (岁)	病变部位(例)			病变性质(例)		发病情况(例)	
				左半球	右半球	后颅凹	出血	梗死	首发	复发
抑郁组	71	46/25	60.3±5.8	42	18	11	19	52	46	25
非抑郁组	292	187/105	59.5±7.1	213	52	27	95	197	231	61

作者单位:476100 商丘,河南省商丘市第一人民医院神经内科