

大鼠经寰枢椎蛛网膜下腔置管法与传统置管法的比较

陈锐 王华 江伟

(上海交通大学医学院附属第六人民医院麻醉科, 上海 200233)

【摘要】 目的 介绍一种新型大鼠蛛网膜下腔置管法, 并比较几种常见的鞘内置管方法, 为脊髓水平的神经生理实验及疼痛研究提供更有效方案。方法 选择90只230~250g雄性SD大鼠, 随机分为Yaksh组、寰枢椎(AA)组和尾置管(L)组, 分别从枕骨大孔、寰枢椎间隙、腰5-6椎间隙置管至蛛网膜下腔。三组模型建立后, 观察大鼠置管后死亡率、肢体瘫痪率及体重变化情况, 并测定其缩足反应阈值(PWT)、甩尾反应潜伏期(TF)和吗啡镇痛效果。对比三组间是否有差异。结果 置管后AA组和L组发生死亡和肢体瘫痪的百分率明显低于Yaksh组; 且体重恢复情况明显优于Yaksh组; 术后7d内, AA组大鼠的PWT值和TF值与术前基础值相比最为接近; 吗啡镇痛实验说明AA组置管方法与其他组相比并无差异。结论 大鼠经寰枢椎蛛网膜下腔置管方法具有死瘫率低、身体恢复快、对后续实验影响小等优点, 是一种较好的新型鞘内置管方法。

【关键词】 鞘内置管; 寰枢椎; 动物模型

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013) 07-0032-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.007.008

Comparison of the atlantoaxial subarachnoid catheterization in rat with the traditional catheterization

CHEN Rui, WANG Hua, JIANG Wei

(Department of Anesthesiology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School Of Medicine, Shanghai 200233, China)

【Abstract】 Objective To establish a new catheterization of the spinal subarachnoid space in rats and to compare the difference between different types of intrathecal catheterization, which can be used for the research on neurophysiology and pain treatment. **Methods** ninety male SD rats weighing 200-250g were randomly divided into three groups with thirty animals in each group: Yaksh group, atlas and axis group (AA group) and lumbar group (L group). After the models were established, we observed the percentage of death and paralysis of limbs and body weight changes; we also measured paw withdrawal threshold (PWT), tail flick latency and analgesic effect of morphine. **Results** The percentage of death and paralysis of limbs in AA group and L group were obviously lower than Yaksh group, and the weight recovered faster than Yaksh group. Within 7 days of catheterization, PWT and the tail flick latency of AA group was closest to baseline. Morphine analgesic experiment showed there was no difference among the three groups. **Conclusion** The atlantoaxial catheterization model of the spinal subarachnoid space is characterized by its higher duplicability and less injury, which was a good intrathecal catheterization model.

【Key words】 Intrathecal Catheterization; Atlantoaxial; Animal Model

[基金项目]国家自然科学基金—青年支持(81100825)。

[作者简介]陈锐(1988-),女,硕士生,疼痛相关基础研究, cryourfriend@163.com.

[通讯作者]江伟(1961-),男,教授,博士生导师,麻醉药理学及疼痛相关基础研究, jiangw@sjtu.edu.cn.

鞘内置管法是脊髓水平研究神经生理活动和疼痛治疗的主要方法。自 1976 年 Yaksh 等创建蛛网膜下腔置管的动物模型以来^[1], 目前已经有多种置管方法用于长期蛛网膜下腔给药处理^[2,3]。然而这些方法多数存在对大鼠创伤大、置管后死亡率及肢体瘫痪率高等缺点, 因此建立一种简单、效率高的大鼠鞘内置管方法是十分必要的。本文介绍一种新型鞘内置管方法—经寰枢椎蛛网膜下腔置管, 同时与经枕骨大孔和腰椎间隙蛛网膜下腔置管的两种经典置管方法相比较, 观察三种方法术后死亡、运动功能障碍、体重变化、利多卡因测试、缩足反应阈值、甩尾反应潜伏期及鞘内注射吗啡的镇痛情况, 以验证本方法是否能为神经生物学和疼痛研究提供更好的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PE-10 导管(内径 0.28mm, 外径 0.61mm, 美国); Von Frey 纤维丝(Stolting, 美国); 电热恒温水槽 DK-8B 型(上海精宏实验设备有限公司); 25 μ L 微量注射器(上海光正医疗仪器有限公司); 盐酸吗啡注射液(青海制药厂)。

1.2 实验动物与分组

90 只 230 ~ 250g SPF 级雄性 SD 大鼠, 由上海市第六人民医院实验动物中心提供。动物生产许可证号码为【SCXK(沪)2008-0016】, 使用许可证号码为【SYXK(沪)2011-0128】。大鼠随机分为 Yaksh 组, 寰枢椎(AA)组和尾置管(L)组, 每组 30 只。

1.3 大鼠鞘内置管模型的制作

1.3.1 导管制备

导管均使用 PE10 导管制备, Yaksh 组和 AA 组每段长 12cm, L 组每段长 8cm。将导管穿入引导钨丝防止压闭官腔, Yaksh 组和 AA 组在导管 7.5cm 处, L 组在导管 2cm 处用火焰快速加热导管后轻压迫导管, 形成扁平小球用于固定。抽出引导钨丝, 注入生理盐水后选取没有泄露的导管封闭后用于实验。

1.3.2 麻醉及手术方法

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50mg/kg) 麻醉后俯卧位固定四肢, 常规消毒。

经枕骨大孔蛛网膜下腔置管(Yaksh 组): 将大鼠头部垫高, 沿两耳中点连线上下切开皮肤 2 ~ 3 cm, 逐步分离皮下组织直至暴露寰枕膜并挑破, 见

有脑脊液流出, 将准备好的导管置入腰膨大位置(导管小球处)。固定导管, 缝合肌肉皮肤。

经寰枢椎蛛网膜下腔置管(AA 组): 将大鼠头部垫高, 沿两耳中点连线上下切开皮肤 2 ~ 3 cm, 逐步分离皮下组织直至暴露寰椎和枢椎。刮开寰枢椎间的筋膜和韧带, 暴露出脊髓, 用 2 mL 注射器针头轻轻挑破蛛网膜, 见脑脊液涌出, 将准备好的导管顺破膜孔置入到导管小结处。固定导管, 缝合肌肉皮肤。

经腰椎蛛网膜下腔置管(L 组): 采用 Milligan^[2]和 Jasmin^[3]改进的方法, 沿大鼠脊柱 L5-L6 处做一纵形正中皮肤切口, 约 3 ~ 5 cm, 用 20 mL 注射器针头缓慢穿入 L5/L6 椎间隙, 直到大鼠出现一过性甩尾或后肢抽动, 表示针头已穿过硬膜。此时将针头压低, 与脊柱成 20 ~ 30°, 将导管通过针头送入蛛网膜下腔, 直至送到导管小球处为止, 固定导管, 缝合肌肉皮肤。

置管后 1d 检查各组大鼠的生存率及是否有运动功能障碍, 选取均为阴性的大鼠经导管注射 10 μ L 20 mg/mL 利多卡因, 注射后 30 s 内出现后肢运动麻痹说明置管位置正确, 用于后续实验。

1.4 大鼠缩足反应阈值的测定

实验大鼠自置管前开始用 Von Frey 纤维丝以 up-down 法^[4]推算大鼠的缩足反应阈值(PWT, paw withdrawal threshold)。观察置管后其机械痛域是否发生变化。用一组强度呈对数递增(2.0 ~ 26.0 g)的 Von Frey 纤维丝垂直刺激大鼠后足底中部, 持续时间 6s, 每次间隔 15s, 大鼠出现缩足或舔足行为为阳性反应, 否则为阴性反应。

1.5 大鼠对热甩尾反应潜伏期的测试

实验大鼠自置管前开始用热水浴测试大鼠的甩尾潜伏期(tail flick frequency, TF), 观察置管其热痛域是否发生变化。将大鼠的尾巴置入 46°C 热水浴中 3 cm, 大鼠尾巴抽动时记录时间, 截止时间为 30 s。每次间隔 5 min, 测试 3 次取平均值。

1.6 吗啡镇痛功能的测试

实验大鼠置管 7 d 后分别给予吗啡 5 μ g、10 μ g、15 μ g, 用热水浴实验检测各组大鼠对吗啡的镇痛作用反应是否有差异。

1.7 统计分析

采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理, 所有计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。50% PWT 的比较同组内不同时点间比较采用 Kruskal-Wallis 检

验;组间比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验。其余均采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 置管后死、瘫率及注射利多卡因有效率

AA 组和 L 组的死亡、瘫率与 Yaksh 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而三组的利多卡因测试结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 置管后情况
Tab.1 Results of catheterization

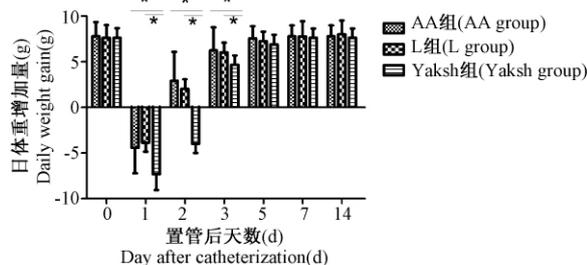
组别 (Group)	置管后死亡、瘫痪率 (The mortality and paralyzed rate of catheter)	注药有效率 (The injection efficiency)
Yaksh 组	10/30 (33.3%)	19/20 (95%)
AA 组	3/30 (10%)*	26/27 (96.3%)
L 组	4/30 (13.3%)*	24/26 (92.3%)

注: AA 组、L 组与 Yaksh 组比, * $P < 0.05$ 。

Note: AA group and L group compare with Yaksh group, * $P < 0.05$ 。

2.2 大鼠体重变化情况

三组大鼠置管后第 1 天体重均下降,且 AA 组下降最明显 ($P < 0.05$);第 2、3 天 AA 组和 L 组大鼠体重恢复情况优于 Yaksh 组 ($P < 0.05$);5 d 后大鼠日体重变化差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: AA 组、L 组与 Yaksh 组比, * $P < 0.05$ 。

图 1 大鼠体重变化情况

Note: AA group and L group compare with Yaksh group, * $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Weight changes in rats

2.3 大鼠缩足反应阈值变化情况

置管后 7 d 内,三组大鼠的 PWT 值处于波动状态,7 d 后大鼠 PWT 值稳定后,AA 组的 PWT 值与置管前基础值最接近,说明寰枢椎置管方法对大鼠的缩足反应阈值影响较小。

2.4 大鼠甩尾反应潜伏期变化情况

置管后 7 d 内,大鼠的 TF 值均出现轻微的变化,至 7 d 后大鼠 TF 值稳定后,可见 AA 组和 Yaksh

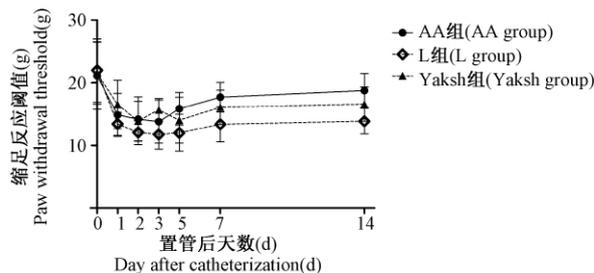
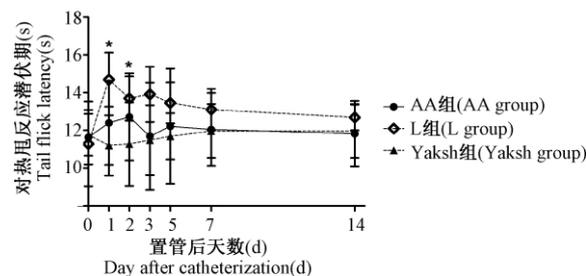


图 2 大鼠缩足反应阈值变化情况

Fig. 2 PWT changes in rats

组的 TF 值与置管前基础值相比最为接近。



注: L 组与 Yaksh 组比, * $P < 0.05$ 。

图 3 大鼠甩尾反应潜伏期变化情况

Note: L group compares with Yaksh group, * $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Tail flick frequency changes in rats

2.5 吗啡镇痛实验

同时给予相同剂量的吗啡,三组大鼠的 TF 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$),且均随吗啡剂量的增加出现吗啡耐受现象。说明 AA 组大鼠对吗啡的镇痛效果与其他组相比并无统计学差异。

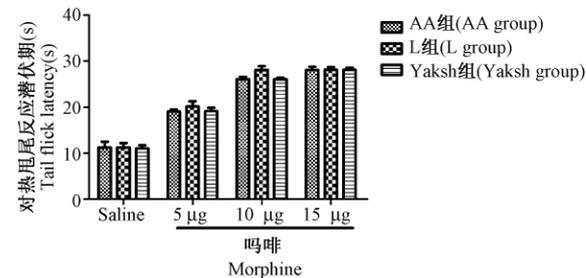


图 4 鞘内注射吗啡对大鼠甩尾反应潜伏期的影响

Fig. 4 The effect of Morphine to tail flick frequency in rats

3 讨论

鞘内置管是动物实验中脊髓水平的药物治疗和脑脊液采集的一种便捷途径;该模型的制作对神经生理、药理及疼痛治疗等方面的研究具有重要意义。然而目前大多数大鼠鞘内置管模型存在脊髓损伤、术后体重减轻等缺点,这对于实验结果造成

很大的偏差。

Yaksh 等^[1]首先创建了蛛网膜下腔置管的动物模型,其建立解决了以往置管模型的一系列问题,包括多次给药时需要反复穿刺、难以确定药物是否注射入蛛网膜下腔等。但此种方法术后死瘫率较高。有文献^[5]报道称,术后死亡通常发生在 30 min 内,解剖动物发现死亡多为脊髓受压或损伤所致。也有文献^[6]报道 Yaksh 法置管后一周大鼠平均体重均降低,因此人们开始寻找更有效的置管方法。吴世民等^[7]提出了新型大鼠鞘内置管模型的制作方法,于 L₃₋₄ 间隙鞘内置管,结果发现与 Yaksh 法相比,该模型术后肢体发生瘫痪率明显降低,且注药后的起效时间、有效时间和有效百分率均无差异。随后翁莹琪等^[8]又将吴世民的方法加以改进,提出了改良小鼠腰段蛛网膜下腔置管法。

本实验数据显示经寰枢椎蛛网膜下腔置管法与 Yaksh 法相比可以明显降低术后死瘫率;且体重恢复较快;与腰椎置管法相比对行为学(PWT 值和 TF 值)影响较小且不影响药效。

综上所述,经寰枢椎蛛网膜下腔置管法既有效解决了 Yaksh 法术后死瘫率高等问题,且与腰椎置管法相比又可以明显改善术后并发症,提示其可作为一种安全有效的新型鞘内置管方法。

参考文献:

- [1] Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space [J]. *Physiol Behav*, 1976, 17(6): 1031-1036.
- [2] Milligan ED, Hinde JL, Mehmert KK, et al. A method for increasing the viability of the external portion of lumbar catheters placed in the spinal subarachnoid space of rats [J]. *J Neurosci Methods*, 1999, 90(1): 81-86.
- [3] Jasmin L, Ohara PT. Long-term intrathecal catheterization in the rat [J]. *J Neurosci Methods* 2001, 110(1-2): 81-89.
- [4] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [5] Poon YY, Chang AY, Ko SF, et al. Catheterization of the thoracic spinal subarachnoid space in mice [J]. *J Neurosci Methods* 2011, 200(1): 36-40.
- [6] Serpell MG, DeLeo JA, Coombs DW, et al. Intrathecal catheterization alone reduces autotomy after sciatic cryoneurolysis in the rat [J]. *Life Sci*, 1993, 53(25): 1887-1892.
- [7] 吴世民, 张咸伟. 大鼠鞘内置管模型的制作 [J]. *中国现代医生* 2008, 46(15): 118-119.
- [8] 翁莹琪, 郭曲练, 王锴, 等. 改良小鼠腰段蛛网膜下腔置管法 [J]. *实验动物与比较医学* 2010, 30(2): 136-140.

(修回日期)2013-04-22

(上接第 24 页)

- [4] Van Gele M, Geusens B, Speeckaert R, et al. Development of a 3D pigmented skin model to evaluate RNAi-induced depigmentation [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(9): 773-775.
- [5] 张敏, 李春阳, 王克玉, 等. 不同中波紫外线对豚鼠皮肤色素沉着及 α -黑素细胞刺激素表达的影响 [J]. *山东大学学报(医学版)* 2011, 49(3): 59-63.
- [6] 刘荣, 孙建宁, 郭亚健. 化妆品原料美白功效动物评价应用研究 [J]. *中国美容医学* 2011, 20(8): 1259-1262.
- [7] Park H Y, Wu C, Yonemoto L, et al. MITF mediates cAMP induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes [J]. *Bio Chemical Journal*, 2006, 395(3): 571-578.
- [8] Schiaffino MV. Signaling pathways in melanosome biogenesis and Pathology [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(7): 1094-1104.
- [9] Newton R, Cook A, Roberts D, et al. Post-transcriptional regulation of melanin biosynthetic enzymes by cAMP and resveratrol in human melanocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127, 2216-2227.
- [10] Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, et al. Endothelin-1

synthesis reduced by red wine [J]. *Nature*, 2001, 414: 863-864.

- [11] Schiaffin MV. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(7): 1094-1104.
- [12] Bastianetto S, Dumont Y, Duranton A, et al. Protective Action of Resveratrol in Human Skin: Possible Involvement of Specific Receptor Binding Sites [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(9): e12935.
- [13] Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration [J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10: 4066-4087.
- [14] Smit N, Vicanova J, Pavel S. The Hunt for Natural Skin Whitening Agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10: 5326-5349.
- [15] Buonocore D, Lazzaretti A, Tocabens P, et al. Resveratrol-procyanidin blend: nutraceutical and antiaging efficacy evaluated in a placebo-controlled, double-blind study [J]. *Clinical Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2012, 5: 159-165.

(修回日期)2013-03-26