

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2018.06.005

· 专题 ·

大鼠脊髓损伤后胃肠动力的 X 线研究

蔡畅, 李建军, 高峰, 杨明亮, 杜良杰, 杨德刚, 刘长彬, 李大鹏, 张文豪, 徐珮珮

1. 首都医科大学康复医学院, 北京市 100068; 2. 中国康复研究中心北京博爱医院, 脊柱脊髓神经功能重建科, 北京市 100068; 3. 北京脑重大疾病研究院神经损伤与修复研究所, 北京市 100068; 4. 北京市神经损伤与康复重点实验室, 北京市 100068

通讯作者: 李建军. E-mail: crrc100@163.com

基金项目: 1. 国家自然科学基金面上项目 (No. 81271366); 2. 北京市科技计划重大项目 (No. D161100002816004); 3. 首都卫生发展科研专项重点攻关项目 (No. 首发 2018-1-6011)

摘要

目的 探索大鼠脊髓损伤所致神经源性肠功能障碍的肠道功能动态改变。

方法 24 只雌性 Sprague-Dawley 大鼠分为对照组 ($n=12$) 和脊髓损伤组 ($n=12$)。采用动脉瘤夹 (标定力为 70 g) 钳夹 60 s 制作 T₁₀ 脊髓损伤模型; 对照组只暴露硬脊膜。分别于造模前和造模后 4 周, X 线造影观察肠道功能的动态改变, HE 染色观察结肠病理改变。

结果 与对照组相比, 脊髓损伤组胃排空及肠道传输功能明显降低 ($P<0.05$)。

结论 采用动脉瘤夹能成功复制大鼠脊髓损伤模型。大鼠脊髓损伤后出现神经源性肠功能障碍, 胃排空及肠道传输功能明显减弱。

关键词 脊髓损伤; 神经源性肠功能障碍; X 线; 大鼠

Gastrointestinal Motility after Spinal Cord Injury in Rats: An X-ray Study

CAI Chang, LI Jian-jun, GAO Feng, YANG Ming-liang, DU Liang-jie, YANG De-gang, LIU Chang-bin, LI Da-peng, ZHANG Wen-hao, XU Pei-pei

1. Capital Medical University School of Rehabilitation Medicine, Beijing 100068, China; 2. Department of Spinal and Neural Function Reconstruction, Beijing 100068, China; 3. Center of Neural Injury and Repair, Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100068, China; 4. Beijing Key Laboratory of Neural Injury and Rehabilitation, Beijing 100068, China

Correspondence to LI Jian-jun. E-mail: crrc100@163.com

Supported by National Natural Science Foundation of China (General) (No. 81271366), Beijing Science and Technology Program (Major) (No. D161100002816004) and Capital Health Development Research Project (No. 首发 2018-1-6011)

Abstract

Objective To study the dynamic changes of the intestinal function of neurogenic bowel dysfunction rats caused by spinal cord injury using X-ray radiography.

Methods Twenty-four female Sprague-Dawley rats were divided into control group ($n=12$) and spinal cord injury group ($n=12$). The T₁₀ spinal cord injury model was established using aneurysm clip (70 grams calibration force) for 60 seconds. The control group exposed the dura only. X-ray Barium was used to observe the dynamic changes of intestinal function, and HE staining was used to observe the pathology of the colon before and four weeks after modeling.

Results Compared with the control group, gastric emptying and intestinal transit function significantly reduced in the spinal cord injury group ($P<0.05$).

Conclusion The spinal cord injury model can be successfully duplicated with aneurysm clip in rats; neurogenic bowel dysfunction occurs after spinal cord injury, gastric emptying and intestinal transit function are weakened.

Key words: spinal cord injury; neurogenic bowel dysfunction; X-ray; rats

[中图分类号] R651.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2018)06-0645-05

[本文著录格式] 蔡畅, 李建军, 高峰, 等. 大鼠脊髓损伤后胃肠动力的 X 线研究[J]. 中国康复理论与实践,

作者简介: 蔡畅(1990-), 女, 汉族, 河北保定市人, 硕士研究生, 主要研究方向: 脊柱脊髓损伤康复。

<http://www.cjrtponline.com>

2018, 24(6): 645-649.

CITED AS: Cai C, Li JJ, Gao F, et al. Gastrointestinal motility after spinal cord injury in rats: an X-ray study [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2018, 24(6): 645-649.

脊髓损伤可造成严重的躯体感觉、运动功能障碍，还可引起泌尿系统、消化系统等内脏功能紊乱，导致严重并发症^[1-2]。超过 30% 的脊髓损伤患者认为神经源性肠功能障碍 (neurogenic bowel dysfunction, NBD) 比膀胱功能障碍和性功能障碍更严重^[3]。NBD 主要症状包括大便失禁、便秘和排便障碍^[4]，对患者的社会活动和生活质量产生极其严重的影响^[5]。然而目前关于 NBD 的研究报道较少，且没有关于脊髓损伤后肠道功能动态变化的相关研究。

本研究尝试建立大鼠脊髓损伤模型，并参考 Cabezos 等^[6-8]使用的 X 线造影方法，在清醒的大鼠中观察脊髓损伤前后胃肠道传输功能的动态变化，探索 NBD 肠道功能变化的新方法并初步探讨 NBD 的发生、发展规律，为进一步丰富和完善 NBD 发生发展过程及制定有效的治疗方法提供必要的方法学依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

24 只 SPF 级健康雌性 Sprague-Dawley 大鼠，由北京维通利华公司提供，许可证号 SCXK(京)2009-0017，体质量(220±10) g。在标准透明笼(60×40×20 cm)中单笼饲养，室内温度 23℃ 左右，湿度 35%~45%，置于 12 h 光照/12 h 黑暗循环的环境中。所有大鼠均定时定量进食，自由饮水，各种试验干预措施均符合首都医科大学动物伦理协会的要求，伦理审查号 AEEI-2015-079。

1.2 主要试剂与仪器

青霉素：华北制药股份有限公司。硫酸钡：青岛红蝶新材料有限公司。数字 X 线设备：西门子公司。Image-lab 图像分析系统：美国伯乐公司。

1.3 分组和造模

将大鼠分为对照组(n=12)和脊髓损伤组(n=12)，饲养 2 周后开始制作脊髓损伤模型。

术前禁食不禁水 12 h。大鼠异氟烷气体吸入麻醉，诱导麻醉浓度 3%~4%，维持麻醉浓度 1%~2%，流量 0.2~0.3 L/min。大鼠全身肌肉松弛，钳夹肢体不回缩时麻醉成功。大鼠背部备皮，俯卧位将四肢固定于手术操作台，以突出的第 10 胸椎作为骨性标志定位至 T₁₀ 节段脊髓(对应 T₈)，行后正中切口，长约 2 cm，

分离椎旁肌肉后暴露 T₇~T₉ 棘突，剪断两侧的韧带，小心咬除 T₈ 棘突及椎板，暴露硬膜囊并保证其完整，垂直于脊髓纵轴缓慢置入动脉瘤夹(标定力为 70 g)，待动脉瘤夹横跨脊髓后松开止血钳并释放动脉瘤夹，钳夹脊髓持续 60 s 后取出动脉瘤夹^[9]，被钳夹处脊髓表面充血、水肿或出血，大鼠尾巴立即痉挛性摆动，双下肢强直阵挛，麻醉苏醒后大鼠双下肢弛缓性瘫痪，证明所制作的脊髓损伤模型成功，间断分层缝合。

对照组仅暴露硬脊膜后关闭伤口。

术后每天予青霉素 40 万 U 皮下注射，连续 3 d。每 12 小时进行一次膀胱按压，辅助排尿，挤压直肠辅助排出大便，同时按摩和被动活动双下肢防止压疮和血栓形成。

1.4 检测方法

1.4.1 肠道传输功能测定

造模前和造模后 4 周，每只大鼠予硫酸钡悬浮液(2 g/ml, 22℃) 2.5 ml 灌胃。将大鼠放置在可调整的自制透明塑料管内并将其固定于俯卧位，此塑料管大小适中，可使其不能移动、转身或逃脱。在造影剂给药后即刻、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 和 24 h，使用数字 X 线设备(60 kV, 7 mA)获得肠道的平面 X 光片并用 Image-lab 图像分析系统进行图像分析，曝光时间 0.06 s。

在实验开始之前训练大鼠适应 X 光室，使其不会因为环境改变而出现明显的胃肠动力改变。为了减轻密闭环境所造成压力，每次 X 线造影后立即释放大鼠(固定持续 2~3 min)。

根据图像定量评分方法分析胃肠运动功能。见表 1。每个器官(胃、小肠、盲肠和结直肠)最高分 12 分，每一分项最高 4 分。

表 1 胃肠功能评分^[6]

评分	器官显影区的百分比	显影强度	显影的均匀性	器官轮廓的清晰度
0	无显影			
0~1	<25%	模糊	不均匀	不太清晰
2	25%~50%	轻度	均匀	清晰
3	50%~75%	中度	——	——
4	75%~100%	重度	——	——

评分是由多名训练有素的研究员以单盲方式进行的。

1.4.2 结肠 HE 染色

造模后 4 周, 将大鼠麻醉(方法同前)后, 仰卧固定, 剪开胸骨, 暴露纵膈, 经左心室插穿刺针至升主动脉后, 剪开右心耳, 0.9%NaCl 液 250 ml 经穿刺针快速滴注 5 min, 待右心耳流出液清亮; 40 g/L 多聚甲醛经穿刺针灌注固定 30 min。大鼠肢体僵硬后, 停止灌注, 将腹部切开, 距盲肠 2~3 cm 处迅速切取结肠, 沿纵轴切开, 生理盐水洗涤肠内容物。放入 10% 福尔马林中固定, 石蜡包埋, 连续切片, 片厚 4 μm , 常规 HE 染色。光学显微镜观察。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述。采用独立样本 t 检验比较两组肠道钡餐评分的差异性。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

所有实验大鼠均未出现死亡。术后约 10 d 伤口愈合。对照组精神状态佳, 自主活动良好, 饮食和大小便正常。脊髓损伤组双下肢瘫痪, 活动量明显减少; 除尿潴留外, 大便排出困难, 干结粪便嵌顿在直肠内, 需挤压直肠辅助排便。

2.2 脊髓损伤前胃肠运动功能变化

脊髓损伤前, 胃在灌入造影剂后立即开始排空, 灌胃 4 h 后已经基本完全排空。小肠 0 h 开始显影, 在灌入造影剂后 1 h 时显影更充分。结肠在灌入造影剂后 1~2 h 开始显影, 并且在 4 h 左右完全显影。在某些情况下, 在灌胃 4 h 时可见粪便颗粒, 6 h 时粪便显影更为明显。在 24 h 时, 胃、小肠以及结肠显影均不再明显。见图 1。对大鼠造模前所得 X 线图像进行定量

评分, 所得结果见图 2。

2.3 脊髓损伤后 4 周胃肠道运动功能变化

大鼠脊髓损伤后 4 周的 X 线图像见图 3。各器官在不同时间点均有不同程度的排空减慢。

2.3.1 胃

与对照组相比, 脊髓损伤组胃排空速度减慢 ($P < 0.05$)。钡餐灌胃后 4 h, 脊髓损伤组胃排空明显延迟, 且胃排空时间从 6 h 延迟至 8~24 h。见图 4。

2.3.2 小肠

两组均在灌胃钡餐后 1 h 观察到小肠中的最大显影强度。钡餐灌胃后 6 h, 脊髓损伤组小肠排空速度显著减慢 ($P < 0.001$)。且小肠排空时间从 8 h 延迟至 8~24 h 完全排空。见图 5。

2.3.3 盲肠

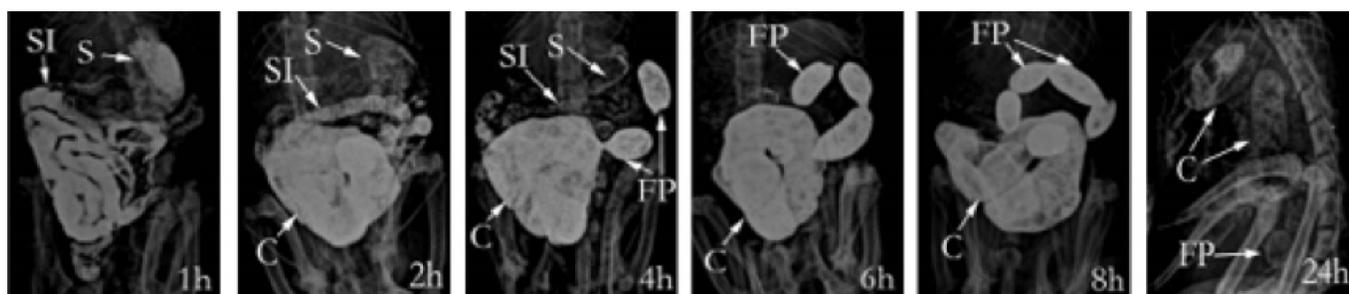
两组均在灌胃后 1 h 开始显影, 2 h 达到最大评分。脊髓损伤组盲肠排空速度小于对照组, 对照组大鼠在 24 h 基本完成盲肠排空, 而脊髓损伤组在灌胃后 24 h 还能未完全排空 ($P < 0.001$)。见图 6。

2.3.4 结直肠

两组均在灌胃后 2 h 开始显影, 4 h 达到最大评分。脊髓损伤组结直肠的排空速度小于对照组, 对照组大鼠在 24 h 基本完成结直肠排空, 而脊髓损伤组在灌胃后 24 h 还能未完全排空 ($P < 0.001$)。见图 7。

2.4 结肠 HE 染色

脊髓损伤组肠壁萎缩, 黏膜糜烂、水肿。炎性细胞大量浸润, 腺体减少, 肌层较薄以及轻度间质水肿。肠绒毛破坏, 上皮细胞坏死, 大量渗出, 肠绒毛高度下降, 数量减少。见图 8。



注: S, 胃; SI, 小肠; C, 盲肠; FP, 结肠直肠中的粪便颗粒

图 1 大鼠造模前胃肠运动功能的 X 线图像

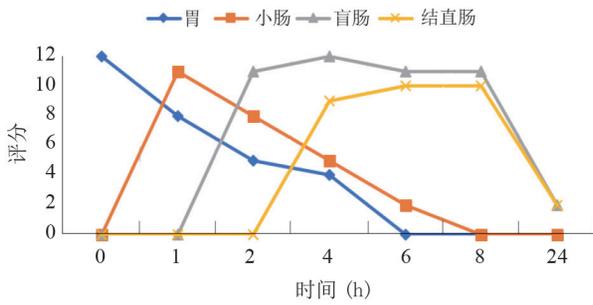


图2 大鼠造模前各器官定量评分曲线

3 讨论

本研究使用非侵入性的X线造影法评估脊髓损伤后胃肠道传输功能动态变化,发现胃、小肠、盲肠、结直肠分别在不同时间点发生传输延迟,表明脊髓损伤后胃排空和肠道传输功能减弱,传输时间延长。

脊髓损伤后肠道失去神经支配,肠道蠕动频率降低,幅度下降,传输时间延长,直肠肛门协调性紊乱,表现为排便困难、大便失禁等症状,是影响患者日常生活质量和身心健康的重要因素^[10-11]。

1985年Meshkinpour等^[12]研究大鼠脊髓横断之后静息结肠运动活动的变化,结果表明,结肠运动受到脊髓休克的影响,并可能导致结肠运动减弱。2001年Gondim等^[13]通过管饲法在清醒大鼠中研究脊髓横断损伤后胃排空、肠道转运,结果表明,脊髓横断损伤抑制胃排空和肠道转运。2015年韩芸峰等^[14]通过炭末灌胃研究脊髓损伤后NBD,发现脊髓损伤后大鼠肠道推进率降低。本实验研究结果与之前的相关研究结果相一致,说明通过X线方法定量评估肠道传输功能的动态变化具有可信度及可行性。

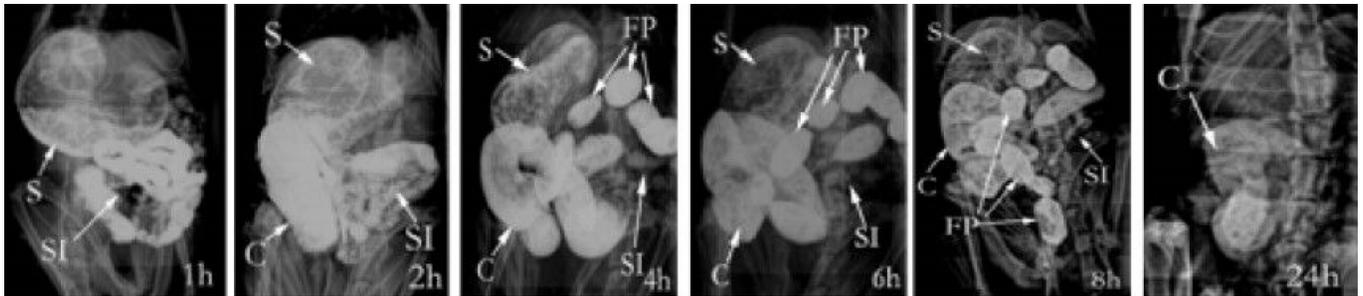
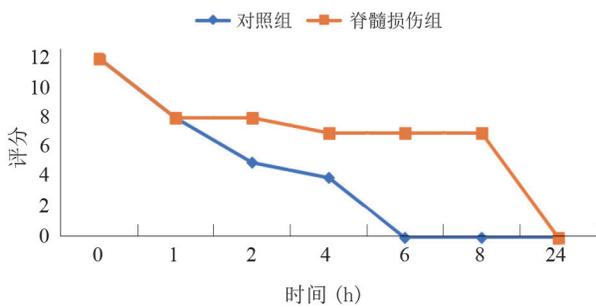
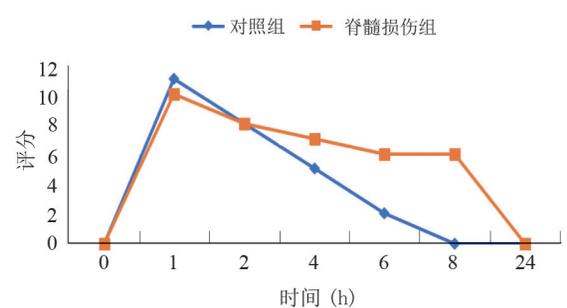


图3 大鼠脊髓损伤后4周胃肠运动功能的X线图像



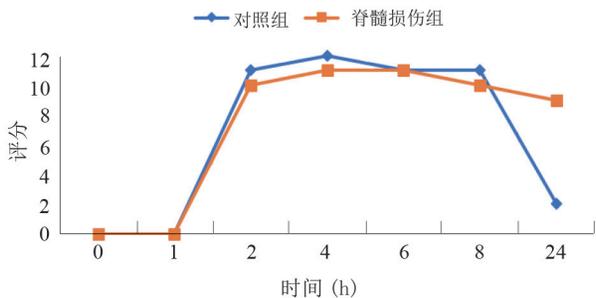
注: 1 h, $t=-0.351, P=0.729$; 2 h, $t=-3.419, P=0.003$; 4 h, $t=-2.502, P=0.021$; 6 h, $t=-2.390, P=0.026$; 8 h, $t=-4.406, P<0.001$; 24 h, $t=-1.417, P=0.171$

图4 大鼠脊髓损伤后4周胃定量评分曲线



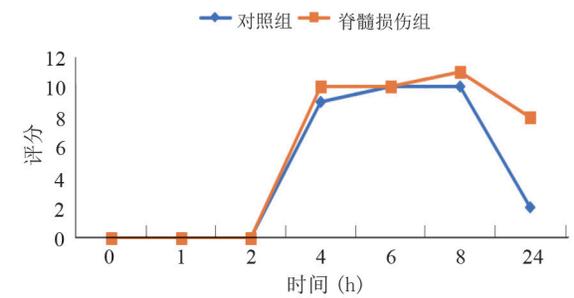
注: 1 h, $t=1.873, P=0.073$; 2 h, $t=-1.908, P=0.068$; 4 h, $t=-2.070, P=0.049$; 6 h, $t=-6.470, P<0.001$; 8 h, $t=-4.105, P<0.001$; 24 h, $t=-1.863, P=0.074$

图5 大鼠脊髓损伤后4周小肠定量评分曲线



注: 2 h, $t=3.530, P=0.002$; 4 h, $t=-0.959, P=0.347$; 6 h, $t=-2.356, P=0.027$; 8 h, $t=-1.857, P=0.076$; 24 h, $t=-10.828, P<0.001$

图6 大鼠脊髓损伤后4周盲肠定量评分曲线



注: 4 h, $t=4.051, P<0.001$; 6 h, $t=2.222, P=0.036$; 8 h, $t=3.139, P=0.004$; 24 h, $t=-12.360, P<0.001$

图7 大鼠脊髓损伤后4周结直肠定量分析评分曲线

<http://www.cjrtponline.com>

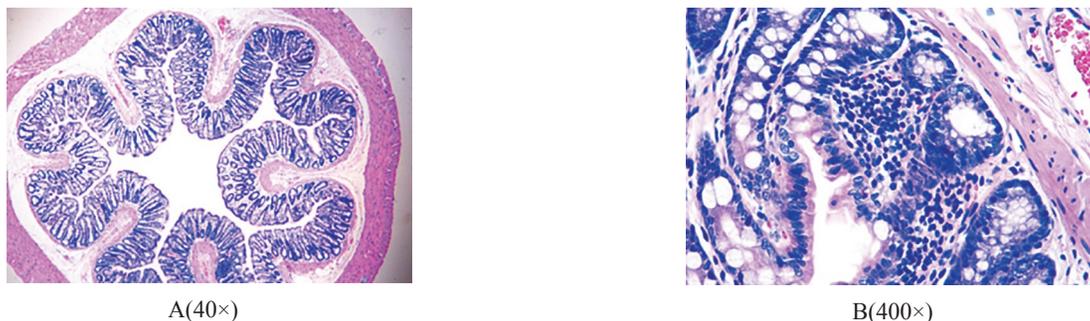


图8 结肠HE染色

在脊髓损伤后的肠道功能研究中, 肠道推进试验、粪便粒数、粪便含水率测定、放射影像、核素显像、酸碱指示剂是研究肠道运动功能的常用方法^[15-17]。与这些方法相比, 本研究不需要使用麻醉剂, 将清醒的大鼠固定于塑料管中 2~3 min 进行 X 线拍照, 可避免麻醉剂对胃肠蠕动的干扰。实验前对大鼠进行适应训练, 训练后大鼠可自行进入塑料管中, 可避免密闭环境对肠道传输功能的干扰。总之, 本研究采用的 X 线造影方法不需要麻醉, 方法简便易行, 具有非侵入性, 且能够定量地反映肠道功能的动态变化, 对脊髓损伤后 NBD 的功能变化评估更加精确。除此之外, 本方法可以评估脊髓损伤后胃肠道不同器官的动态变化情况, 也可以为相关治疗方法的研究提供方法学依据。

然而, 本实验的研究周期较短, 未对 NBD 的肠道传输功能的动态变化进行长期观察; 且没有对胃肠道所有器官进行病理组织检测。未来应将胃肠道的功能变化与病理学结果相结合, 进一步探讨 NBD 的发生发展过程。

综上所述, 放射摄影技术不具有侵入性, 并能提供胃肠道不同区域大小和形状改变的信息。为 NBD 研究提供了新的工具。

[参考文献]

- [1] 徐青, 高飞, 王磊, 等. 脊髓损伤后肠道功能障碍: 美国临床实践指南解读[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(1): 83-86.
- [2] Hocevar B, Gray M. Intestinal diversion (colostomy or ileostomy) in patients with severe bowel dysfunction following spinal cord injury [J]. J Wound Ostomy Continence Nurs, 2008, 35(2): 159-166.
- [3] Liu CW, Huang CC, Chen CH, et al. Prediction of severe neuro-genic bowel dysfunction in persons with spinal cord injury [J]. Spinal Cord, 2010, 48(7): 554-559.
- [4] Pan Y, Liu B, Li R, et al. Bowel dysfunction in spinal cord injury: current perspectives [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 69(3): 385-388.
- [5] 张洁, 杨德刚, 李建军, 等. 国际脊髓损伤肠道功能基础数据集最新修订及解读[J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23(10): 1236-1240.
- [6] Cabezas PA, Vera G, Castillo M, et al. Radiological study of gastrointestinal motor activity after acute cisplatin in the rat. Temporal relationship with pica [J]. Auton Neurosci, 2008, 141(1-2): 54-65.
- [7] Vera G, Lópezpérez AE, Martínezvillaluenga M, et al. X-ray analysis of the effect of the 5-HT₃ receptor antagonist granisetron on gastrointestinal motility in rats repeatedly treated with the antitumoral drug cisplatin [J]. Exp Brain Res, 2014, 232(8): 2601-2612.
- [8] Cabezas PA, Vera G, Martín-Fontelles MI, et al. Cisplatin-induced gastrointestinal dysmotility is aggravated after chronic administration in the rat. Comparison with pica [J]. Neurogastroenterol Motil, 2010, 22(7): 797-805.
- [9] 刘小康, 徐建广, 连小峰, 等. 大鼠钳夹式急性脊髓损伤模型的制备与评价[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(14): 1318-1322.
- [10] Preziosi G, Raptis DA, Raeburn A, et al. Autonomic rectal dysfunction in patients with multiple sclerosis and bowel symptoms is secondary to spinal cord disease [J]. Dis Colon Rectum, 2014, 57(4): 514-521.
- [11] 逯晓蕾, 李建军, 杜良杰, 等. 脊髓损伤后肠道功能的变化[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(8): 758-760.
- [12] Meshkinpour H, Harmon D, Thompson R, et al. Effects of thoracic spinal cord transection on colonic motor activity in rats [J]. Paraplegia, 1985, 23(5): 272-276.
- [13] Gondim FA, Rodrigues CL, da Graca JR, et al. Neural mechanisms involved in the delay of gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid after thoracic spinal cord transection in awake rats [J]. Auton Neurosci, 2001, 87(1): 52-58.
- [14] 韩芸峰, 王振宇, 于涛. 大鼠脊髓损伤模型建立及神经源性肠功能障碍的初步评价[J]. 中国临床神经外科杂志, 2015, 20(10): 617-620.
- [15] 朱黎婷, 朱毅. 脊髓损伤神经源性肠道功能障碍的诊断、评价和康复治疗现状[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(12): 1163-1167.
- [16] Media S, Christensen P, Lauge I, et al. Reproducibility and validity of radiographically determined gastrointestinal and segmental colonic transit times in spinal cord-injured patients [J]. Spinal Cord, 2009, 47(1): 72-75.
- [17] Liu GX, Yang YX, Yan J, et al. Glial-derived neurotrophic factor reduces inflammation and improves delayed colonic transit in rat models of dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 19(1): 145-152.

(收稿日期: 2018-05-09 修回日期: 2018-05-18)