

一种用于小鼠脊髓损伤挫伤模型的自动打击器

纪志盛¹, 罗剑贤¹, 王珂¹, 伍平¹, 方尔婷², 徐若昕², 王思淼³, 许曦文⁴, 梁富强⁴

(1.暨南大学附属第一医院, 广东广州 510632; 2.暨南大学基础医学与公共卫生学院, 广州 510632; 3.暨南大学国际学院, 广州 510632; 4.暨南大学口腔医学院, 广州 510632)

摘要: 车祸和跌倒等创伤性损伤导致的脊髓损伤会造成永久性脊髓功能障碍。脊髓挫伤模型与大多数脊髓损伤病人有相似的病理过程。通过制备准确、可重复和方便的脊髓损伤动物模型对研究脊髓损伤至关重要。我们提出了一种新型的小鼠脊髓挫伤装置——广州暨南大学智能脊髓损伤系统, 通过激光传感器与自动化移动平台和先进软件相结合, 准确生成不同程度脊髓损伤的模型。我们使用该装置制备了不同程度的脊髓损伤小鼠模型, 评估了它们的 BMS 小鼠量表评分, 并进行了行为学证明其准确性和可重复性。

关键词: 脊髓损伤; 脊髓挫伤模型; 小鼠; 动物模型。

An automated Impactor for Contusive Spinal Cord Injury Model in Mice

Ji Zhisheng¹, Luo Jianxian¹, Wang Ke¹, Wu Ping¹, Fang Erting²,

Xu Ruoxin², Wang Simiao³, Xu Xiwen⁴, Liang Fuqiang⁴

(1. Jinan University, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong Province, 510632, China; 2. Jinan University, School of Medicine, Guangzhou, 510632, China; 3. Jinan University, International School, Guangzhou, 510632, China; 4. Jinan University, School of Stomatology, Guangzhou, 510632, China)

Abstract: Spinal cord injury (SCI) caused by traumatic injuries such as car accidents and falls can cause permanent spinal cord dysfunction. The spinal cord contusion model has a similar pathological process to most spinal cord injury patients. It is crucial to study spinal cord injury by preparing accurate, reproducible, and convenient animal models of spinal cord injury. We propose a new mouse spinal cord contusion device - Guangzhou Jinan University Intelligent Spinal Cord Injury System, which combines laser sensors with automated mobile platforms and advanced software to accurately generate models of different degrees of spinal cord injury. We used this device to prepare mouse models of different degrees of spinal cord injury, assessed their BMS mouse scale scores, and performed behavioral studies to demonstrate its accuracy and reproducibility.

Keywords: spinal cord injury, contusive spinal cord injury model, mice, animal model

前言:

脊髓损伤通常导致损伤节段下方的永久性脊髓功能障碍。它主要是由物体撞击脊柱和脊柱过度伸展引起的,如交通事故和跌倒¹。由于脊髓损伤的有效治疗方案有限,使用动物模型阐明脊髓损伤的发病机制将为研究治疗方法提供理论支持。由撞击脊髓引起的脊髓损伤的挫伤模型具有与大多数临床脊髓损伤病例相似病理的发展^{2,3}。因此,制作准确、可重复和方便的脊髓损伤挫伤动物模型具有重要意义。

自1911年Allen发明第一个脊髓损伤动物模型以来,在开发脊髓损伤动物模型的仪器方面取得了重大进展^{4,5}。根据损伤机制,脊髓损伤模型可分为挫伤、压迫、牵张、脱位、横断或化学损伤⁶。其中,利用外力移位和损伤脊髓的挫伤模型最接近大多数脊髓损伤患者的临床病因。因此,挫伤模型已被许多研究人员用于脊髓损伤研究^{3,7}。如今各种仪器被用于开发脊髓损伤挫伤模型。纽约大学-多中心动物脊髓损伤研究(MASCIS)撞击器通过重量下降装置产生脊髓损伤挫伤⁸。然而,当MASCIS的冲击杆掉落并撞击脊髓时,可能会发生多处损伤,这影响了脊髓损伤模型的损伤程度。此外,实现机械精度以确保仪器的准确性和制造模型的可重复性也是一项挑战。无限视野冲击器通过控制施加在脊髓上的力而不是重力的跌落来引起挫伤¹⁰。它使用连接到传感器的计算机来直接测量冲击器和脊髓之间的冲击力。当达到阈值时,冲击器立即缩回,从而避免重量反弹并提高精度^{10,11}。然而,使用这种精细运动模式造成损伤可能会导致不一致的损伤和功能缺陷⁶。俄亥俄州立大学(OSU)设备通过电磁驱动器以瞬态速率压缩脊髓背表面^{12,13}。这种装置类似于无限地平线冲击器,因为它使用短距离按压来造成脊髓损伤。然而,它有各种限制,因为零点的初始确定将由于脑脊液的存在而导致错误^{6,14}。总之,有许多仪器可以用于脊髓挫伤动物模型,但它们都有一些局限性,导致动物模型的准确性和再现性不足。因此,为了更准确、方便、可重复地建立小鼠脊髓损伤挫伤模型,需要一种自动化、智能化的脊髓损伤冲击器。

我们提出了一种新型的脊髓损伤冲击器,广州暨南大学智能脊髓损伤系统(图1),用于制作脊髓损伤挫伤模型。该设备使用激光测距仪作为定位设备,并结合自动移动平台,根据设定的打击参数(包括打击速度、打击深度和停留时间)自动进行打击。自动化操作减少了人为因素,提高了动物模型的准确性和重复性。

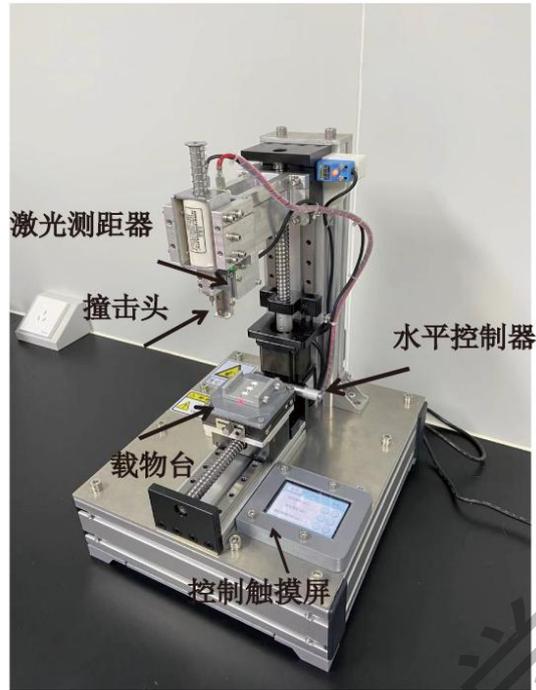


图 1 广州暨南大学智能脊髓损伤系统

固定脊柱固定器，将鼠标固定在载物台上。通过触摸屏设置冲击参数。使用横向微驱动器调整载体的横向位置，并使用触摸屏调整正面位置。激光测距仪确认冲击位置并测量冲击高度，以便撞击头按照设定的冲击位置和深度进行精确撞击。

操作步骤：

1 动物麻醉和 T10 椎板切除术

1.1 本研究使用 8 周龄雌性年轻成年 C57/6J 小鼠。腹腔注射 3% 三溴乙醇（200 μ L/20g）麻醉小鼠。检查疼痛反射丧失是否表明麻醉成功。

1.2 用剃须刀剃掉小鼠背部的毛发，露出皮肤，用碘伏消毒皮肤两次。

1.3 用手术刀在背部皮肤上做 2.5 cm 的纵向切口，并用镊子在 T9-T11 水平处暴露脊柱。

1.4 使用脊柱固定器双侧固定 T10 平面，确保脊柱固定稳定。剥离椎旁肌肉，并使用微型磨钻去除棘突和椎板，露出 T10 节段的脊髓。

2 使用撞击器的挫伤 T10 脊髓

2.1 将脊柱固定器放入撞击器中，并固定。

2.2 使用操作触摸屏（图 2A），设置损伤参数，包括撞击速度（1 m/s）、撞击深度（三组不同的小鼠分别为 0.5 mm、0.8 mm 和 1.1 mm）和停留时间（500 ms）。

2.3 通过移动平台将激光测距仪对准暴露的脊髓中心。(图 2B)

2.4 点击触摸屏上的准备按钮(图 2C)。冲击头将根据设置参数自动调整到特定高度。载物台自动移动冲击头下方的脊髓冲击部位。

2.5 手动按压冲击头,进一步确定冲击部位。单击“开始”按钮,冲击头将根据设定的参数撞击脊髓。

2.6 将小鼠从装置中取出,并在显微镜(20X)下观察,以确定脊髓损伤(图 3)。为了确定模型制备成功,观察局部充血、塌陷和脊髓膜破裂情况。

2.7 用 3-0 缝线逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤。把小鼠放在一个温暖的盒子里,等待它们康复。

3 术后护理

3.1 皮下注射庆大霉素,每天 3 次。每 8 小时手动排空一次膀胱,直到膀胱排尿功能恢复。

3.2 术后 14 天,拆除缝合线。

4 脊柱损伤的测试效果

4.1 小鼠术后第一天开始记录 BMS 评分。

4.2 术后第 30 天,进行动物行为实验,包括 Catwalk 步态分析、足失误和转棒实验。

4.3 使用 SPSS 软件进行统计分析。将数据表示为平均值±平均值标准误差(SEM),并使用单因素方差分析进行比较; $p < 0.05$ 被认为有统计学差异。



图 2 操作触摸屏

(A) 在参数页面中,可以设置损伤参数,包括撞击速度(0.5 -2.0 m/s)、撞击深度(0 -3 mm)和停留时间(500 -2 ms)。(B) 在移动页面中,可以设置撞击头和脊柱固定器位置的高度。(C) 在准备页面中,单击准备按钮将导致冲击头和载物台根据设置的参数自动调整到特定位置。通过点击启动按钮,撞击头将根据设定的参数撞击脊髓。

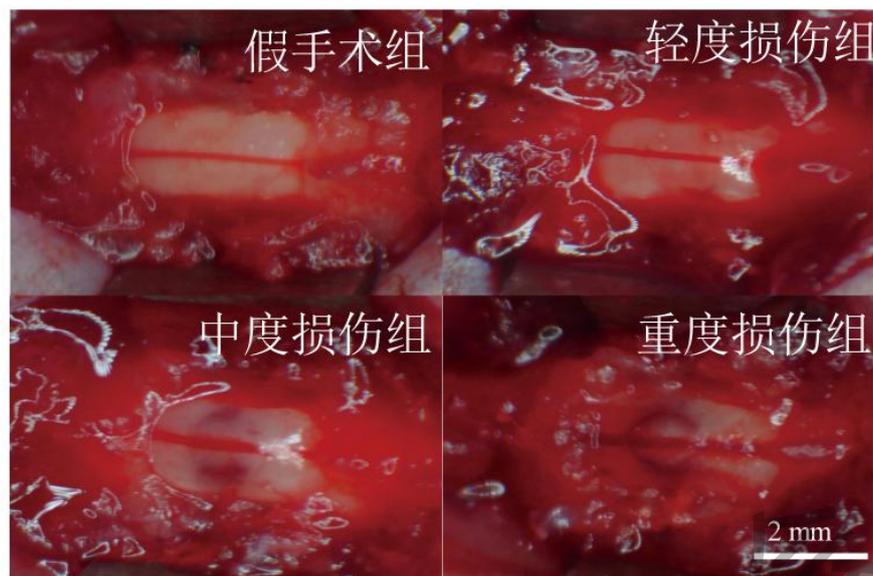


图3 损伤后的脊髓

(A) 假手术组。脊柱固定器固定 T10 椎骨，椎板切除术后暴露脊髓，不进行损伤。(B) 轻度损伤组。脊髓被撞击 0.5 毫米深度后，脊髓受轻伤，有少量充血。(C) 中度损伤组。脊髓被撞击 0.8 毫米深度后出现明显充血。(D) 重度损伤组。脊髓被撞击 1.1 毫米深度后，脊髓损伤严重，出现大量淤血。

5 结果

如上所述，对 24 只雌性小鼠（8 周龄）进行椎板切除术。假手术组（ $n=6$ ）小鼠未进行脊髓损伤，其余小鼠包括轻度损伤组（ $n=6$ ）、中度损伤组（ $n=6$ ）和重度损伤组（ $n=6$ ），进行不同深度的脊髓撞击。定期记录 BMS 评分至术后 1 个月（图 4）。不同组小鼠术后 BMS 评分存在显著差异。1 个月后，轻度损伤组的小鼠术后评分为 4 至 6 分，恢复至与假手术组相似的水平，中度损伤组的小鼠恢复到 4 至 6 分，而重度损伤组的小鼠几乎没有恢复。1 个月后，进行动物行为实验，包括足失误、转棒和 CatWalk 实验。在足失误实验中（图 5A），轻度损伤组和假手术组之间后肢足失误率没有显著差异。然而，中度损伤组与所有其他组有显著差异。重度损伤组小鼠的后肢失误率为 100%，因为后肢无法支撑地面，与其他组有显著差异。在转棒实验中（图 5B），我们记录了不同组小鼠跌落的时间。中度损伤和重度损伤组均与其他组显著不同，但假手术组与轻度损伤组具有相似的结果。在 CatWalk 实验中（图 6），我们记录并分析了不同组小鼠的规律指数和后肢最大接触面积。不同组间小鼠的规律指数和后肢最大接触面积均存在显著差异，提示不同脊髓损伤深度的小鼠后肢运动功能存在显著差异。因此，使用所开发的撞击器可以制备不同程度脊髓损伤的小鼠模型。

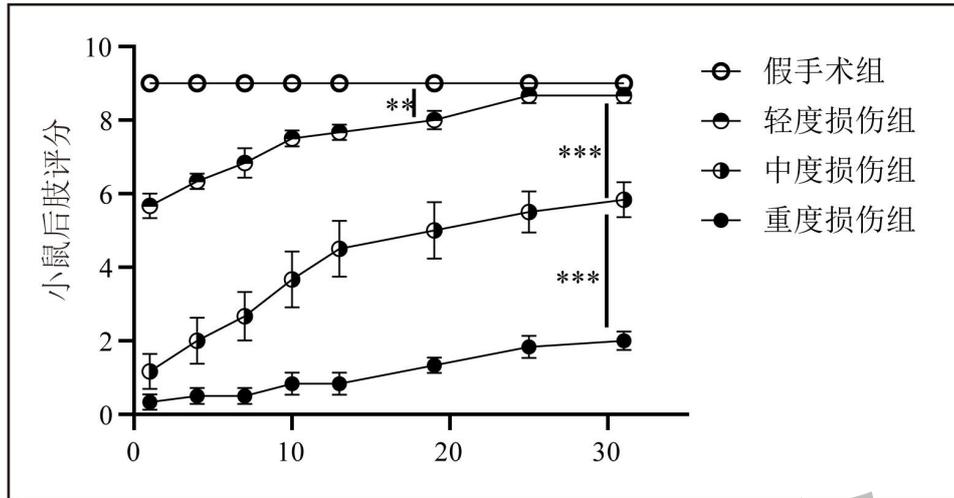


图4 小鼠BMS评分

记录术后第一天至术后一个月的小鼠BMS评分 (n=6/组)。使用单因素方差分析进行比较时, *p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001

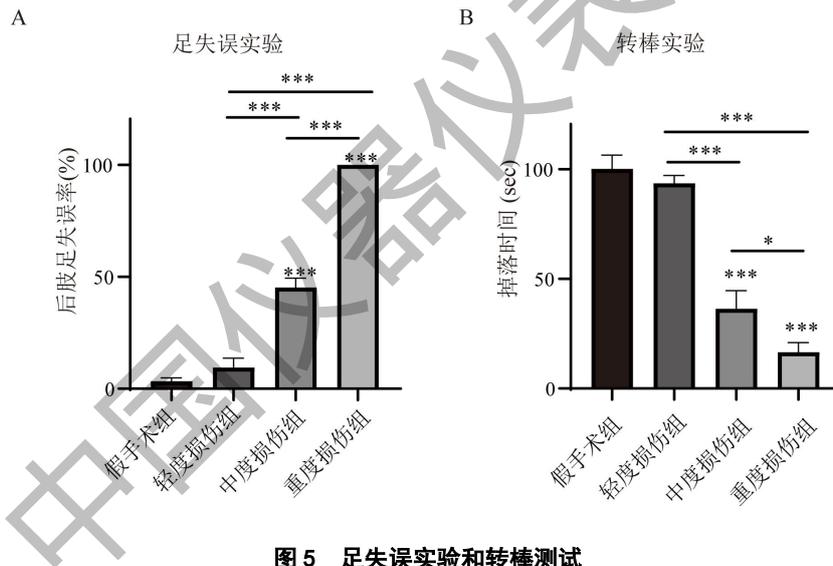


图5 足失误实验和转棒测试

(A) 不同程度脊髓损伤的小鼠后肢足失误率 (n = 6 /组)。 (B) 比较不同程度脊髓损伤的小鼠 (n = 6 /组) 在加速旋转棒过程中跌落的时间。与使用单因素方差分析进行比较, * p < 0.05, *** p < 0.001。

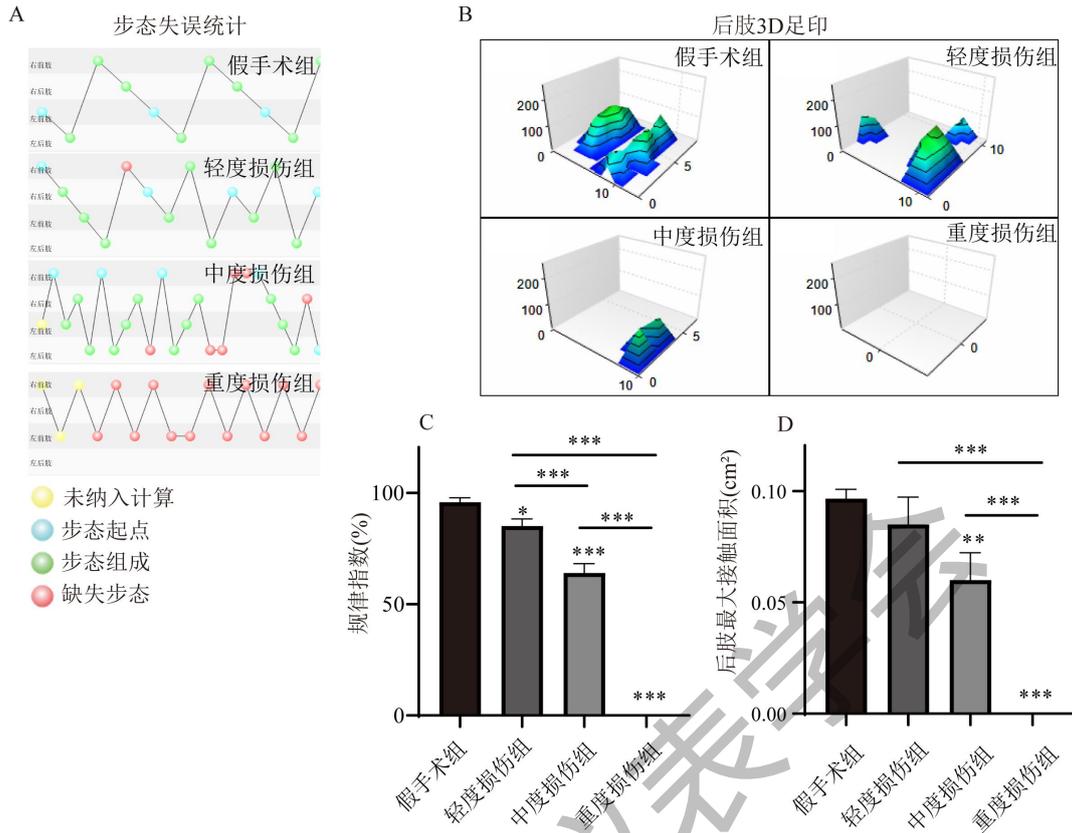


图6 CatWalk步态分析

(A, C) 不同程度脊髓损伤小鼠的规律指数 (n=6/组)。 (B, D) 使用 CatWalk 软件分析后肢最大接触面积 (n=6/组)。使用单因素方差分析进行比较, ** p < 0.01, *** p < 0.001。

参考文献:

[1]Venkatesh, K., Ghosh, S. K., Mullick, M., et al. Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. *Cell Tissue Res.* 2019.377 (2), 125-151.

[2]Chiu, C. W., Cheng, H. & Hsieh, S. L. Contusion Spinal Cord Injury Rat Model. *Bio Protoc.* 2017.7 (12), e2337.

[3]Thygesen, M. M., Guldbæk-Svensson, F., Rasmussen, M. M. ,et al. Contusion Spinal Cord Injury via a Microsurgical Laminectomy in the Regenerative Axolotl. *J Vis Exp.* 2019 .(152).

[4]Anderson, T. E. A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. *J Neurosci Methods.* 1982.6 (4), 327-333,.

[5]Allen, A. R. SURGERY OF EXPERIMENTAL LESION OF SPINAL CORD EQUIVALENT TO CRUSH INJURY OF FRACTURE DISLOCATION OF SPINAL COLUMN: A

- PRELIMINARY REPORT. *Journal of the American Medical Association*. 1911. (11), 878-880.
- [6]Cherian, T. , Ryan D J, Weinreb J H, et al. Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord*. 2014.**52** (8), 588-595,.
- [7]Yan, R , Li E, Yan K, et al. A modified impactor for establishing a graded contusion spinal cord injury model in rats. *Ann Transl Med*. 2022.**10** (8), 436,.
- [8]Gruner, J. A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1992.**9** (2), 123-126; discussion 126-128.
- [9]Ghnenis, A. B, Jones C, Sefiani A, et al. Evaluation of the Cardiometabolic Disorders after Spinal Cord Injury in Mice. *Biology (Basel)*. 2022.**11** (4).
- [10]Scheff, S. W., Rabchevsky, A. G., Fugaccia, I., et al. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *J Neurotrauma*. 2003.**20** (2), 179-193.
- [11]Hong, Y. R, Lee E H, Park K S, et al. Ultrasound stimulation improves inflammatory resolution, neuroprotection, and functional recovery after spinal cord injury. *Sci Rep*. 2022.**12** (1), 3636.
- [12]Noyes, D. H. Electromechanical impactor for producing experimental spinal cord injury in animals. *Med Biol Eng Comput*. 1987.**25** (3), 335-340.
- [13]Stokes, B. T., Noyes, D. H. & Behrmann, D. L. An electromechanical spinal injury technique with dynamic sensitivity. *J Neurotrauma*. 1992.**9** (3), 187-195.
- [14]Pearse, D. D, Lo T P, JR., Cho K S, et al. Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2005.**22** (6), 680-702.