

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.15.002

文章编号: 1005-8982(2019)15-0007-05

小鼠经腰段鞘内置管的建立方法

徐静¹, 孙彩霞², 张进², 陆培春¹, 蒋锦¹, 苏兆亮³

(1. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学附属医院 麻醉科, 江苏 镇江 212001; 3. 江苏大学医学院 免疫学研究所, 江苏 镇江 212013)

摘要: 目的 介绍改良的小鼠经腰段鞘内置管的方法, 旨在为神经学和疼痛学研究提供更安全、方便、高效的小鼠鞘内置管技术。**方法** 60只雄性昆明小鼠, 随机分为改良组和Wu方法组, 分别接受经改良和传统的Wu方法行小鼠鞘内置管术, 记录两组小鼠导管泄漏率、瘫痪率、死亡率、置管成功率, 以及热尾潜伏期(TFL)、50%机械缩足阈值(MWT)、导管滑脱率。解剖脊髓观察脊髓损伤情况及置管情况。**结果** 两组小鼠在死亡率、TFL、50%MWT方面比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 改良组与Wu方法组比较, 成功率提高, 瘫痪率、导管泄漏率、导管滑脱率降低($P<0.05$)。**结论** 改良的鞘内置管方法较传统的Wu方法更加安全易行。

关键词: 鞘内置管; 小鼠; 蛛网膜下腔; 硬膜外导管

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Establishment of a novel intrathecal catheterization in mice lumbar spinal subarachnoid space

Jing Xu¹, Cai-xia Sun², Jin Zhang², Pei-chun Lu¹, Jin Jiang¹, Zhao-liang Su³

(1. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China; 2. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China; 3. Department of Immunology, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: Objective To introduce a modified method of catheterization in mice lumbar subarachnoid space with better safety, convenience and efficiency. **Methods** Male Kunming mice were randomly divided into two groups ($n=30$): the modified group and the Wu group. Mice received intrathecal catheterization. Catheter leakage rate, paralysis rate, mortality, and success rate, tail flick frequency, 50% mechanical withdrawal threshold, catheter slip rate, and spinal cord catheterization condition after dissecting spinal cord were recorded. **Results** There was no statistically significant difference in mortality, tail flick frequency, 50% mechanical withdrawal threshold between the two groups ($P>0.05$). The success rate was significantly improved while paralysis rate, the catheter leakage rate and the catheter slip rate were decreased obviously when compared with the Wu group ($P<0.05$). **Conclusions** The novel intrathecal catheterization method is safe and easy to handle.

Keywords: intrathecal catheterization; subarachnoid space; epidural catheter

鞘内置管术对脊髓水平的药理和生理机制研究必不可少, 特别是在疼痛学研究中^[1-2], 可以确保低剂量药物在蛛网膜下腔长期慢性作用于脊髓, 无需考虑

药物血脑屏障的渗透性和对其他脏器的毒性作用^[3-5]。2004年WU等^[6]介绍经小鼠腰段蛛网膜下腔长期置管的方法, 2010年翁曲莹等^[7]在此基础上进一步改善、

收稿日期: 2018-11-07

[通信作者] 孙彩霞, E-mail: suncaixia_zj@126.com; Tel: 13952854371

简化置管方法,但仍存在成功率低、损伤大等缺点。本研究发现使用硬膜外导管和改良后的穿刺引导针能明显改善上述情况,现报道如下。

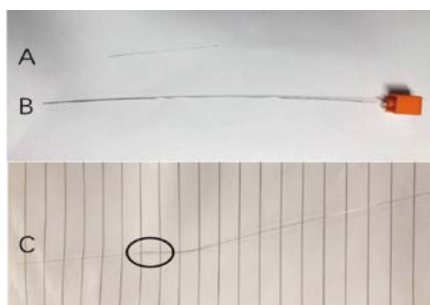
1 材料与方法

1.1 实验动物分组及材料

60 只昆明雄性小鼠,6~8 周龄,由江苏大学动物实验中心提供,按随机数字表法分为改良组和 Wu 方法组,每组 30 只。VonFrey 纤维丝(美国 Stolting 公司),25 μ l 微量注射器(盐城市城南新区科盾办公用品经营部),显微手术器械(江苏大学附属医院),电热恒温水槽(上海精密仪器仪表公司),硬膜外导管、穿刺针(无锡市通达医疗电器有限公司),针灸针(北京珞亚山川医疗器械有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 穿刺引导针制备 改良组:使用的针灸针前端针身(直径 0.16 mm,长 4.0 cm)与腰麻针(直径 0.23 mm,长 10 cm)相接(激光焊接),制成总长约 14 cm 的改良穿刺针。Wu 方法组:采用直径约 0.12 mm 的钨丝。见图 1。



A: 剪断的针灸针前端尖身; B: 腰麻枕芯; C: 焊接后的改良穿刺针

图 1 穿刺引导针示意图

1.2.2 导管制备 取外径 1.0 mm 的硬膜外导管 4 cm,均匀拉长至 8 cm,外径约 0.7 mm 导管,再将前端 2 cm 在热水浴中均匀拉长至 4 cm,总长为 10 cm,前端长 4 cm,外径约 0.3 mm,后端长 6 cm,外径约 0.7 mm,用微量注射器定容腔容积约 5 μ l 左右,多余部分从粗端剪去。改良组:采用翁法^[7]以 Parafilm 膜剪成细长段缠绕导管,绕成 3 个小球以固定和定位,第 1 个小球距离导管细端约 1.8~2.0 cm,在距离导管粗端约 2.5~3.0 cm 处缠绕第 2 个小球,距第 2 个小球 0.3~0.5 cm 最靠近导管粗端处缠绕第 3 个小球。Wu 方法组:为避免管腔塌陷先将直径 0.12 mm 的钨丝穿入改良后

的导管,分别在距导管粗端 2.5 cm 和导管细端 2.0 cm 处通过火焰迅速加热轻压以形成两个直径约 1.5 mm 的小球,用于固定和定位,最后抽出钨丝备用。

1.2.3 麻醉及手术方法 改良组:小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 75 mg/kg,麻醉后取俯卧位固定四肢,两侧髂棘连线与脊柱交界点定位 L₆ 棘突,以 L₅~L₆ 为手术中心,沿脊柱做 1 个约 1 cm 的纵行切口,用 1 ml 注射器针头(外径 0.45 mm)穿破椎体表面肌肉,进针约 2 mm 即可拔出针头,将改良的穿刺引导针插入已制备好的导管,引导针前端露出约 1 mm 针身,使针身与脊柱成 20~30° 角度向头侧进针,进针深度约 4 mm 左右,当小鼠出现一过性甩尾或后肢抽动表示已穿破硬脊膜,将引导针后退约 1~2 mm 以免损伤脊髓,将导管在穿刺针的引导下继续缓慢向蛛网膜下腔头端置管至导管上第一个小球处,在小球上下用 5-0 慕丝线分别于椎旁肌肉结扎固定,缝合切口。在颈部做第 2 个切口,钝性分离皮下组织以形成两切口之间纵行通道,导管粗端通过此通道送出颈部切口,与固定第 1 个小球的方法相同,在皮下肌肉固定第 2 个小球,皮外固定第 3 个小球,最后缝合颈部皮肤切口时再次缠绕小球上下 2 次固定。热凝封闭导管。Wu 方法组:用相同方法麻醉固定小鼠,以脊柱 L₅~L₆ 间隙为中心做 1 个约 2 cm 的纵行切口,左手抓紧骨盆髂棘处以固定及定位,右手使用 23 G 针头刺破椎体表面的肌肉,内置钨丝的导管以与脊柱成 20~30° 的方向沿着针头走形形成的通道置入,如突然出现甩尾或后肢抽动等穿破硬脊膜的特征,即将内置的导丝向后退 2 cm 以防止钨丝损伤脊髓,导管向前置到约腰膨大的位置后,将第 1 个小球与浅层肌肉缝合固定。在颈部做第 2 个切口,导管粗端通过两切口之间钝性分离出来的通道送出颈部切口,在切口处皮下肌肉固定第 2 个小球。缝合切口,热凝封住导管末端。

1.3 观察指标

1.3.1 导管泄漏率 术前在导管粗端连接微量注射器,推注生理盐水,如观察到除导管细端出口之外的地方有液体渗漏,则表明存在导管泄漏,分别统计两组导管泄漏的数量,剔除泄漏的导管。

1.3.2 瘫痪率与死亡率 置管后第 1 天,分别统计两组小鼠术后单侧或双侧瘫痪和死亡只数,计算瘫痪率和死亡率。挑选出阴性的小鼠用于后续实验。

1.3.3 置管成功率 使用微量注射器依次抽取生理盐水 5 μ l,空气 1 μ l,2% 利多卡因 5 μ l,计 11 μ l 全

部通过导管注入, 以使 5 μ l 的药物能全部推入鞘内。若给药后 10 ~ 15 s 内小鼠出现持续 10 ~ 12 min 的下肢瘫痪即为置管成功。计算两组小鼠置管成功的只数, 计算成功率。选择成功的小鼠用于后续实验。

1.4 热甩尾潜伏期

在置管前至置管后 7 d, 每天分别将两组小鼠尾端 1/3 置入 48℃ 恒温热水浴中, 记录小鼠出现甩动尾巴或缩出水面的时间, 浸于水中时间最大不超过 15 s 以防止烫伤。每只小鼠测 3 次取其平均值, 每次间隔时间为 10 min, 记录小鼠的热甩尾潜伏期 (the tail-flick latency, TFL)。

1.5 50% 机械缩足反应阈值

在置管前至置管后 7 d, 在安静环境下, 采用 Up and Down 法^[8]将 VonFrey 纤毛垂直刺激小鼠足底皮肤, 每次刺激间隔至少 30 s, 纤毛最大折力为 2.0 g, 超过此值时记为 2.0 g, 根据刺激的纤毛力度及小鼠的缩足反射推算 50% 机械缩足反应阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)。

1.6 脊髓形态和导管位置

在结束所有行为学检查之后, 将 1% 亚甲蓝 5 μ l

注入导管后处死小鼠, 切开腰段皮肤观察导管所在位置有无滑脱, 统计各组的导管滑脱率, 分离取腰段脊髓, 在显微镜下观察脊髓形态和导管位置。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料以率 (%) 表示, 比较采用 χ^2 检验, 多时间点的比较采用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 置管后两组观察指标的比较

改良组与 Wu 方法组比较, 导管泄漏率和术后瘫痪率减少 ($P < 0.05$), 死亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。改良组置管成功率与 Wu 方法组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 改良组增加。两组小鼠显微镜下脊髓形态无差异, 改良组导管滑脱率与 Wu 方法组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 改良组下降。见表 1。

2.2 TFL 比较

改良组与 Wu 方法组小鼠在置管前至置管后 7 d 内

表 1 置管后两组观察指标的比较 (n=30, %)

组别	导管泄漏率	术后瘫痪率	术后死亡率	置管成功率	导管滑脱率
改良组	0.0 (0/30)	3.3 (1/30)	3.4 (1/29)	96.4 (27/28)	0.0 (0/27)
Wu 方法组	13.3 (4/30)	20.0 (6/30)	8.3 (2/24)	77.3 (17/22)	17.6 (3/17)
χ^2 值	4.286	4.043	0.587	4.281	5.113
P 值	0.038	0.044	0.444	0.039	0.024

各时间点 TFL 值的比较采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的 TFL 值无差异 ($F = 2.741, P = 0.103$); ②两组的 TFL 值无差异 ($F = 7.165, P = 0.055$); ③两组的 TFL 值随时间变化趋势无差异 ($F = 0.258, P = 0.826$)。见图 2 和表 2。

2.3 50% MWT 比较

改良组与 Wu 方法组小鼠在置管前至置管后 7 d 内各时间点 50% MWT 比较, 采用重复测量设计的方

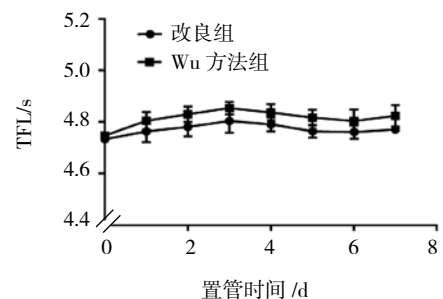


图 2 小鼠置管前至置管后 7 d 甩尾反应变化趋势 (n=30, $\bar{x} \pm s$)

表 2 两组各时间点的 TFL 比较 (n=30, $\bar{x} \pm s$)

组别	置管前	置管后第 1 天	置管后第 2 天	置管后第 3 天	置管后第 4 天	置管后第 5 天	置管后第 6 天	置管后第 7 天
改良组	4.74 \pm 0.02	4.77 \pm 0.04	4.78 \pm 0.04	4.82 \pm 0.05	4.80 \pm 0.03	4.78 \pm 0.03	4.77 \pm 0.03	4.79 \pm 0.01
Wu 方法组	4.75 \pm 0.02	4.79 \pm 0.04	4.82 \pm 0.03	4.83 \pm 0.03	4.82 \pm 0.03	4.81 \pm 0.03	4.80 \pm 0.05	4.82 \pm 0.04

差分析, 结果: ①不同时间点的 50% MWT 值无差异 ($F=1.506, P=0.206$)。②两组的 50% MWT 值无差异 ($F=5.449, P=0.080$)。③两组的 50% MWT 值随时间变化趋势无差异 ($F=0.114, P=0.997$)。见表 3 和图 3。

表 3 两组各时间点的 50% MWT 比较 ($n=30, \bar{x} \pm s$)

组别	置管前	置管后第 1 天	置管后第 2 天	置管后第 3 天	置管后第 4 天	置管后第 5 天	置管后第 6 天	置管后第 7 天
改良组	1.50 ± 0.03	1.48 ± 0.02	1.48 ± 0.03	1.47 ± 0.02	1.48 ± 0.03	1.49 ± 0.02	1.50 ± 0.02	1.51 ± 0.02
Wu 方法组	1.51 ± 0.02	1.50 ± 0.02	1.50 ± 0.01	1.49 ± 0.03	1.49 ± 0.02	1.50 ± 0.03	1.51 ± 0.03	1.52 ± 0.03

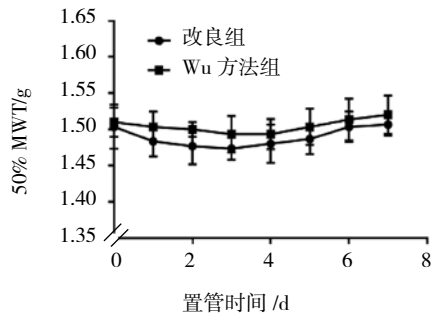


图 3 小鼠置管前至置管后 7 d 50% MWT 变化趋势 ($n=30, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

鞘内置管技术为动物实验长期鞘内给药和采集脑脊液提供极大的便利。目前鞘内给药方式有蛛网膜下腔穿刺和鞘内置管两种, 蛛网膜下腔穿刺有方便快捷、简便易行等优点^[9-10], 但其有明显的局限性: ①穿刺过程中可出现脊髓、神经损伤, 不适用于反复持续给药观察的研究。②无法仅凭手感判断注射成功。③给药过程需要制动老鼠导致急性应激反应, 干扰实验结果^[11-12]。而鞘内置管可以长期给药, 且保证药物注射至鞘内, 但众多模型表示置管仍有操作复杂、置管失败、脑脊液漏、脊髓损伤、导管脱落等并发症^[13], 因此探讨简单、安全、方便的鞘内置管技术至关重要。

本研究过程中发现 Wu 法存在以下几点不足: ① PE10 导管拉伸性欠佳, 极易容易拉断, 影响后续操作; ② PE 导管采用火焰快速加热后压迫形成固定定位的小球, 却容易在此过程中损伤导管造成泄漏, 另由于小球过小, 固定处容易滑脱进而造成导管滑脱移位; ③钨丝细软, 使用钨丝作为内置导丝, 在穿过脊柱周围组织时受压而变形弯曲, 另难以冲破坚韧的椎间韧带和硬脊膜, 置入受阻以致置管失败。针对上述情况, 本研究作了相对的改善: ①导管使用硬膜外导管, 虽初始直径较 PE10 粗, 但其拉伸延展性极好, 能达到实验所需直径, 且不易拉断。②导管采用 Parafilm 封口膜

缠绕可固定成所需体积的小球, 且在颈部切口处有两个小球, 分别与切口内外肌肉缝合固定, 即可防止导管被小鼠拔除, 又可防止导管回缩至皮下。③采用中医针灸针直径 0.16 mm, 因其只有 4 cm 长, 故后端与直径 0.23 mm 的腰麻针连接, 前端有针尖, 能同时保证导丝的硬度和前端尖锐, 极大程度地减少穿破椎间韧带和硬脊膜的阻力, 同时减少导丝弯曲变形的概率。但需注意出现穿破硬脊膜的征象后要立即后退导丝, 防止损伤脊髓。

研究中改良组仍有较低的术后瘫痪率及死亡率, 可能在刺破硬膜后没有及时撤回穿刺导丝而损伤到脊髓有关, 在操作熟练后能进一步避免。另本研究最主要的改良点在于使用硬膜外导管、针灸针、腰椎穿刺针, 这些材料易得, 实验结果表明采用改良的导管及导管固定方法可以明显降低导管泄漏率、导管滑脱率, 而改装的穿引导丝前端的针尖能减少穿刺阻力, 增加导丝韧度。改良组较 Wu 方法组可明显提高置管成功率, 降低术后并发症。综上所述, 建立鞘内置管模型的方法是行之有效的。

参考文献:

- [1] 邓亚南, 刘艳芳, 陈建平, 等. 经大鼠腰骶部鞘内置管给药技术的研究[J]. 中国医学创新, 2014, 11(18): 33-35.
- [2] 王刚, 潘韞丹, 郭曲练, 等. 大鼠鞘内微置管材料和方法的改进[J]. 中国医师杂志, 2009, 11(12): 1680-1681.
- [3] MAZUR C, FITZSIMMONS B, KAMME F, et al. Development of a simple, rapid, and robust intrathecal catheterization method in the rat[J]. J Neurosci Methods, 2017, DOI: 10.1016/j.jneumeth.2017.02.001.
- [4] HOU Y, WANG L, GAO J, et al. A modified procedure for lumbar intrathecal catheterization in rats[J]. Neurol Res, 2016, 38(8): 725-732.
- [5] KOPACH O, KROTOV V, VOITENKO N, et al. Atlanto-occipital catheterization of young rats for long-term drug delivery into the lumbar subarachnoid space combined with in vivo testing and electrophysiology in situ[J]. J Neurosci Methods, 2017, DOI: 10.1016/j.jneumeth.2017.08.001.

- [6] WU W P, XU X J, HAO J X, et al. Chronic lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in mice[J]. *J Neurosci Methods*, 2004, 133(1/2): 65-69.
- [7] 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.
- [8] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. 1994, 53(1): 55-63.
- [9] HYLLEN J L, WILCOX G L. intrathecal morphine in mice: a new technique[J]. *Eur J Pharmacol*, 1980, 67(2/3): 313-316.
- [10] MESTRE C, PÉLISSIER T, FIALIP J, et al. a method to perform direct transcutaneous intrathecal injections in rats[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1994, 32(4): 197-200.
- [11] ZHANG Y, FAN K, LIU Y, et al. Cathepsin C aggravates neuroinflammation involved in disturbances of behaviour and neurochemistry in acute and chronic stress-induced murine model of depression[J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(1): 80-91.
- [12] GUTIÉRREZ-MEZA J M, JARILLO-LUNA R A, RIVERA-AGUILAR V, et al. Cytokine profile of NALT during acute stress and its possible effect on IgA secretion[J]. *Immunol Lett*, 2017, DOI: 10.1016/j.imlet.2017.04.016.
- [13] POON Y Y, CHANG A Y, KO S F, et al. An improved procedure for catheterization of the thoracic spinal subarachnoid space in the rat[J]. *Anesth Analg*, 2005, 101(1): 155-160.

(张西倩 编辑)