

· 论 著 ·

兔持续性牵张脊髓损伤对脑脊液 TNF- α 的影响吴 岳, 邹国耀[△], 夏计划, 张 翔

(桂林医学院附属医院脊柱骨病外科, 广西桂林 541004)

摘 要:目的 建立兔持续性牵张脊髓损伤动物模型, 探讨脑脊液中 TNF- α 的变化及其意义。方法 将 24 只健康兔子随机分为 4 组。A 组为正常对照组; B 组为假手术组, 术中仅安装内固定; C、D 组分别牵张 L_{1/2} 小关节突叠合距离的 25%、50% 长度, 安装内固定以维持牵张距离。测定各组术前及术后 10 min、2 h、24 h、7 d 脑脊液中 TNF- α 的含量; 对各组术前、术后 8 h、1 d、3 d、7 d 进行后肢运动功能 Tarlov 评分。结果 C、D 组脑脊液中 TNF- α 的含量在早期随着牵张距离的增加而升高, 术后 10 min 脑脊液中 TNF- α 的含量分别为 (134.95 $\pm$ 19.36)、(155.68 $\pm$ 10.63) pg/mL, 术后 2 h 分别为 (158.13 $\pm$ 14.67)、(181.50 $\pm$ 16.98) pg/mL, 与同组术前、术后 24 h、术后 7 d 及 A、B 组同时间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 后肢运动功能的丧失与脊髓牵张程度有相关性, A、B 组牵张术后运动功能无变化, C、D 组术前运动功能评分为 (5.00 $\pm$ 0.00) 分, 术后 8 h 分别为 (4.17 $\pm$ 0.41)、(3.67 $\pm$ 0.52) 分, 与同组术前、术后 1、3、7 d 及 A、B 组同时间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 脊髓损伤早期脑脊液中 TNF- α 含量的变化可作为评估脊髓损伤程度及后肢运动功能的一个指标。

关键词: 肿瘤坏死因子 α ; 脊髓损伤; 脑脊液; 牵张; 兔

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.27.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)27-2807-03

Changes of tumor necrosis factor- α after spinal cord injury induced by persistent stretch in cerebrospinal fluid of rabbits

Wu Yue, Zou Guoyao[△], Xia Jihua, Zhang Xiang

(Department of Spinal Surgery, Affiliated Hospital, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi, 541004, China)

Abstract: **Objective** To establish the animal model of persistent tractive spinal cord injury in rabbits and to investigate the changes of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cerebrospinal fluid and its significance. **Methods** Totally 24 healthy rabbits were randomly divided into 4 groups: group A (control group), group B (sham-operated group, only installing internal fixation) and group C, D (stretching 25%, 50% of transverse diameter of L_{1/2} articular surface and installing internal fixation). The level of TNF- α in cerebrospinal fluid was detected before operation and at 10 min, 2 h, 24 h, 7 d after operation. The hindlimb motor function in all groups was evaluated by using the Tarlov scoring before operation and at 8 h, 1 d, 3 d, 7 d after operation. **Results** The level of TNF- α in the group C and D had obvious difference with the stretch distance increase in early postoperation. The contents of TNF- α in the group C and D were (134.95 $\pm$ 19.36) pg/mL and (155.68 $\pm$ 10.63) pg/mL at postoperative 10 min, and (158.13 $\pm$ 14.67) pg/mL and (181.50 $\pm$ 16.98) pg/mL at postoperative 2 h. Compared with before operation, postoperative 24 h, 7 d in the same group and the same time points in the group A and B, differences showed statistical significance ($P < 0.05$). The lose of hindlimb motor function was correlated with the traction degrees of spinal cord. The motor function of hindlimb in the group A and B without traction had no change. The Tarlov scores of the hindlimb motor function in the group C and D were 5.00 $\pm$ 0.00 before operation and 4.17 $\pm$ 0.41 and 3.67 $\pm$ 0.52 at postoperative 8 h. Compared with before operation, postoperative 1, 3, 7 d in the same group and the same time points in the group A and B, differences were statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$ respectively). **Conclusion** The change of the TNF- α level in cerebrospinal fluid in early spinal cord injury could be used a marker to evaluate the degree of spinal cord injury and the hindlimb motor function.

Key words: tumor necrosis factor- α ; spinal cord injuries; cerebrospinal fluid; stretch; rabbit

随着脊柱手术量的增长, 尤其在脊柱侧弯等矫形手术中, 对脊髓进行牵张性是不可避免的, 极易造成医源性脊髓牵张性损伤^[1]。TNF- α 被认为在局部炎症放大效应中具有重要意义^[2]。本实验是在持续性牵张脊髓损伤动物模型的基础上, 在预计的时间点检测实验兔脑脊液中 TNF- α 含量的变化, 及其对后肢运动功能的影响。旨在进一步探讨 TNF- α 在持续性牵张脊髓损伤模型中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物为 4~5 个月龄的健康新西兰兔子 24 只, 体质量为 2.0~2.5 kg, 雌雄不限 (由桂林医学院实验动物中心提供)。进行随机编号后分为 A、B、C、D 4 组, 每组各

6 只。

1.2 方法

1.2.1 自行设计四点牵张器 细螺纹旋转持续性撑张, 牵张器牵张部件为四点同步牵张, 对牵张距离能精细把握, 见图 1~3。

1.2.2 手术方法 用戊巴比妥钠 (30~45 mg/kg) 经兔耳背的耳缘静脉注射麻醉。于背部 T₁₂~L₃ 平面做正中切口。切开皮肤、皮下组织后, 分离椎体旁肌肉等组织, 暴露脊柱附件及椎体两侧。在 L_{1,2} 椎体后侧翼状突根部钻穿到对侧, 置入长度及大小合适的克氏针, 然后用自制撑开装置夹持克氏针两端进行牵张, 每次撑开 2.5 mm 在 30 s 内完成, 两次撑开时间间隔

表 1 各组术前、术后各时间点脑脊液中 TNF-α 含量的比较(̄x±s,pg/mL)

组别	术前	术后 10 min	术后 2 h	术后 24 h	术后 7 d
A 组	98.63±14.49	106.66±9.71	113.33±8.10	104.43±11.54	92.91±9.82
B 组	95.91±8.35	102.87±9.24	110.99±6.98	97.85±7.09	103.32±16.72
C 组	112.30±19.01	134.95±19.36*#	158.13±14.67*#	99.72±12.84	103.41±16.00
D 组		155.68±10.63*#	181.50±16.98*#		

*:P<0.05,与同组术前、术后 24 h、术后 7 d 比较;#:P<0.05,与 A、B 组同时时间点比较。

表 2 各组术前、术后各时间点 Tarlov 评分比较(̄x±s,分)

组别	术前	术后 8 h	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d
A 组	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00
B 组	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00
C 组	5.00±0.00	4.17±0.41*	4.33±0.52*△	4.50±0.55*△	4.67±0.52*△△
D 组	5.00±0.00	3.67±0.52**	3.50±0.55**△	3.33±0.52**△△	3.50±0.55**△

*:P<0.05,**:P<0.01,与同组术前及 A、B 组同时时间点比较;△:P<0.05,△△:P<0.01,与同组术后 8 h 比较。

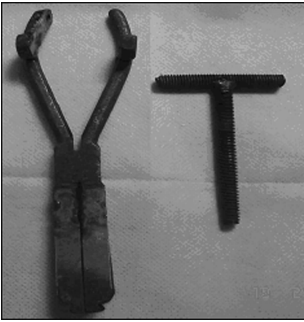


图 1 牵张器组成部件



图 2 组合后牵张器整体外观

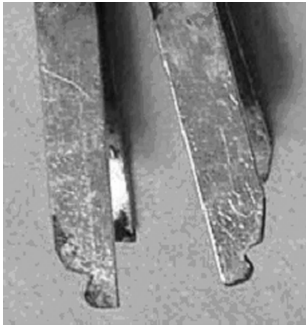


图 3 牵张器牵张部件

5 min。C、D 组分别牵张 L_{1/2} 小关节突叠合距离的 25%、50% 长度。在椎体两侧安装内固定以维持撑开程度,最后用不锈钢丝捆绑固定。A 组为正常对照组,不进行手术;B 组术中仅安装内固定而不进行牵张。4 组在同等麻醉处理及饲养条件下取标本。

1.2.3 留取标本 采集脑脊液时,使兔头尽量向胸前屈曲,用手触摸枕骨隆突与第 1 颈椎之间的枕骨大孔^[3-4],左手固定兔头,右手持 1 mL 注射器由枕骨大孔处垂直刺入 1 cm 左右抽取清亮的脑脊液。抽取的时间为术前及术后 10 min、2 h、24 h、7 d。脑脊液用 Eppendorf 管收集^[5],进行编号后置入 -80 ℃ 冰箱备用。

1.2.4 实验试剂 TNF-α ELISA 试剂盒中的 TNF-α 抗体及标准品由美国 A&D 公司提供,其他实验试剂购自研域(上海)化学试剂有限公司。

1.2.5 运动功能评价 采用 Tarlov 评分^[6],于术前及术后 8 h、1 d、3 d、7 d 评价各组动物后肢运动功能情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。实验数据以 ̄x±s 表示,脑脊液数据经单因素方差分析(ANOVA)中的 SNK-q 检验进行组间两两比较。运动功能评分数据运用非参数 Friedman 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

C、D 组兔脑脊液中 TNF-α 的含量在术后 10 min、2 h 随着牵引距离的增加而升高,与同组术前及术后 24 h、7 d 比较,差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。各组术前、术后各时间点 Tarlov 评分比较,见表 2。B 组兔内固定术后的 X 线表现见图 4、5。



图 4 内固定术后正位片



图 5 内固定术后侧位片

3 讨 论

有研究表明,TNF-α 在中枢神经系统损伤的早期阶段最先增高^[7-8],在细胞的增殖、分化及凋亡中发挥很重要的影响。TNF-α 主要由单核巨噬细胞产生^[9-10],能诱导正常细胞的凋亡,与许多疾病的发生及转归的关系密切^[11-12],是决定疾病临床表现及预后的重要因素。检测脑脊液中 TNF-α 含量的变化,对预判脊髓损伤的程度具有重要意义。从表 1 中可以看出,随着牵张距离的加大,脑脊液中 TNF-α 的含量开始升高,在实验的早期比较明显,并且具有统计学意义;术后 24 h TNF-α 的变化幅度明显降低。表明脑脊液中 TNF-α 的变化与牵张距离成正比,牵张造成的脊髓炎症反应主要在早期阶段^[13]。有学者认为,TNF-α 是在中枢神经系统损伤早期最早释放的细胞因子,在损伤的早期即可进行检测^[8]。TNF-α mRNA 在脊髓损伤后 3 h 迅速上调,6 h 到达高峰^[14];损伤后第 7

天表达减弱并随时间延长而接近正常。所以早期对 TNF- α 进行检测,可以作为预判脊髓损伤程度的一个参考指标。

实验发现,在动物模型造模结束后 10 min,脑脊液中 TNF- α 的含量开始发生变化,术后 2 h 检测其含量最高,D 组因牵张损伤的程度较 C 组严重,故在术后 2 h TNF- α 含量高于 C 组。后肢运动功能在 TNF- α 含量的高峰期时开始丧失,C 组的 Tarlov 评分在术后 8 h 最低,而 D 组在术后 3 d 最低。表明早期 TNF- α 含量的变化可以评估脊髓损伤后运动功能的丧失程度,从而间接反映脊髓损伤的程度及损伤持续的时间。从表 2 可知,后肢运动功能的丧失程度与牵张距离呈正比^[15-17],与早期 TNF- α 含量的变化反映出的结论一致。

本实验通过在早期检测脑脊液中 TNF- α 含量及对后肢进行运动功能 Tarlov 评分相结合,探讨其变化与脊髓损伤程度的关系。本结果表明,随着牵张距离的加大,会引起脊髓损伤的程度增加,实验兔脑脊液中 TNF- α 含量的升高及加剧兔子后肢运动功能的丧失;脑脊液中 TNF- α 的含量在损伤的早期变化比较明显。因此,脊髓损伤早期脑脊液中 TNF- α 含量的变化可作为评估脊髓损伤程度及后肢运动功能的一个指标。

参考文献:

[1] 余洪俊,费军,刘宏亮,等. 不同程度脊髓牵拉损伤体感诱发电位的变化[J]. 重庆医学,2008,37(19):2164-2165.

[2] Baclmeier BE, Nerlich AG, Weiler C, et al. Analysis of tissue distribution of TNF-alpha, TNF-alpha-receptors and the activating TNF-alpha-converting enzyme suggests activation of the TNF-alpha system in the ageing intervertebral disc[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1096(1):44-54.

[3] 富宏,陶迎红,王学美,等. 经皮穿刺延髓池抽取兔和大鼠脑脊液的方法[J]. 中国比较医学杂志,2006,16(11):684-687.

[4] 马伟,马锋,田建英. 一种简单实用的实用动物中药脑脊液采集方法[J]. 宁夏医学院学报,2007,29(4):436-437.

[5] 华峰,刘军,黄野,等. 连续、无血污染的兔脑脊液的采集[J]. 南京医科大学学报,2008,28(2):263-264.

[6] Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function[J].

Science, 1996, 273(5274):510-513.

[7] 苗巍巍,杨有庚,程杰平,等. 肿瘤坏死因子- α 在大鼠急性脊髓损伤中的表达[J]. 中国老年学杂志,2009,29(5):535-537.

[8] Mc Coy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease[J]. J Neuroinflammation, 2008, 45(5):1-13.

[9] 皮志禹. 病毒性心肌炎患者血清一氧化氮、IL-1 β 与肿瘤坏死因子含量的测定及意义[J]. 重庆医学,2008,37(11):1258-1259.

[10] 催洁,王景周,宋钦,等. 脑出血大鼠脑水肿与血浆肿瘤坏死因子关系的研究[J]. 重庆医学,2007,36(13):1244-1245.

[11] Bertazza L, Mocellin S. Tumor necrosis factor(TNF) biology and cell death[J]. Front Biosci, 2008, 13(1):2736-2743.

[12] 赵伟峰,任先军,邓天琼,等. 兔颈髓牵张性损伤早期脊髓血流变化的特点及意义[J]. 颈腰痛杂志,2004,25(4):237-240.

[13] 段有文,吕刚. 肿瘤坏死因子及中性粒细胞在脊髓继发性损伤中的作用[J]. 中华实验外科杂志,2006,23(6):737-738.

[14] 董锋,林建华,吴朝阳. 骨髓间质干细胞经静脉移植对大鼠脊髓损伤后 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达的影响[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2010,25(8):697-699.

[15] 邹国耀,黄平,邹志远,等. 持续性牵张损伤对兔后肢运动功能及脊髓组织中 SOD 活性、MDA 含量的影响[J]. 山东医药,2011,51(10):31-32.

[16] 黄平,邹国耀,邹志远. 置入内固定装置轻度持续性牵张对兔脊髓的潜在损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(4):695-698.

[17] 吴岳,邹国耀. 牵张性脊髓损伤动物模型制备及评价[J]. 中国组织工程研究,2012,16(2):345-348.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)

(上接第 2806 页)

[9] Michaels AD, Klein A, Madden JA, et al. Effects of intravenous nesiritide on human coronary vasomotor regulation and myocardial oxygen uptake[J]. Circulation, 2003, 107(4):2697-2701.

[10] D'Souza SP, Yellon DM, Martin C, et al. B-type natriuretic peptide limits infarct size in rat isolated hearts via KATP channel opening[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(17):H1592-1600.

[11] Cataliotti A, Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, et al. Brain natriuretic peptide enhances renal actions of furosemide and suppresses furosemide-induced aldosterone activation in experimental heart failure[J]. Circulation, 2004, 109(20):1680-1685.

[12] 关信民,赵强,李彪,等. 低剂量重组人脑利钠肽治疗心肌

梗死后心力衰竭的临床研究[J]. 中国医药指南,2011,9(20):179-181.

[13] Pfisterer M, Buser P, Rickli H, et al. BNP-guided vs symptom-guided heart failure therapy: the Trial of Intensified vs Standard Medical Therapy in Elderly Patients With Congestive Heart Failure (TIME-CHF) randomized trial[J]. JAMA, 2009, 301(4):383-392.

[14] Jourdain P, Jondeau G, Funck F, et al. Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(16):1733-1739.

[15] 杨力生. 应用重组人脑利钠肽治疗充血性心力衰竭 57 例临床疗效观察[J]. 海峡药学,2011,23(4):123-124.

(收稿日期:2011-12-31 修回日期:2012-05-03)