

常见坐骨神经损伤模型建立和行为学评价方法的研究进展

梁宇¹⁾, 臧成昊²⁾, 马微¹⁾, 刘洁¹⁾, 刘伟¹⁾, 张丝嘉¹⁾, 李力燕¹⁾

(1) 昆明医科大学神经科学研究所, 云南昆明 650500; 2) 云南省第一人民医院普外二科, 云南昆明 650032)

[摘要] 坐骨神经损伤是一种常见的周围神经损伤。在动物实验中, 常用制作简单、重复操作性强的坐骨神经损伤模型来模拟一般的急性周围神经损伤和周围神经损伤性神经病理性疼痛。其中, 坐骨神经挤压损伤模型、横断损伤模型和周围神经损伤性神经病理性疼痛模型较为常见, 常用来复制临床中不同程度的周围神经损伤, 并运用多种的行为学方法评估损伤后运动及感觉功能恢复情况。综述以上常用模型的制作方法和行为学评价方法, 为周围神经损伤、修复机制和药物筛选等研究提供动物模型制作和行为学评价方法参考。

[关键词] 坐骨神经损伤; 动物学; 行为学; 神经电生理

[中图分类号] R332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2021)1B-0128-04

A Review on Establishment of Sciatic Nerve Injury Model and Behavioral Evaluation Methods

LIANG Yu¹⁾, ZANG Cheng-hao²⁾, MA Wei¹⁾, LIU Jie¹⁾, LIU Wei¹⁾, ZHANG Si-jia¹⁾, LI Li-yan¹⁾

(1) *Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500*; 2) *Dept. of General surgery, The 1st People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032, China*

[Abstract] Sciatic nerve injury is a common peripheral nerve injury. In animal experiments, simple and repeatable sciatic nerve injury models are commonly used to simulate acute peripheral nerve injury and neuropathic pain caused by peripheral nerve injury. Among them, sciatic nerve constriction injury model, cross-sectional injury model and peripheral nerve injury neuropathological pain model are more common, which are often used to replicate different degrees of peripheral nerve injury in clinical settings. A variety of behavioral methods were used to evaluate the recovery of motor and sensory functions after injury. In this paper, we reviewed the development of animal models, behavioral evaluation methods of the these commonly used models, which provides a valuable reference for animal model development and behavioral evaluation methods for the study of peripheral nerve injury, repair mechanism and drug screening.

[Key words] Sciatic nerve injury; Zoology; Behavior; Neuroelectrophysiology

在中国, 由于交通事故、运动或手术造成的机械性周围神经损伤患者每年增加 600 000 至 900 000 人。病因通常是神经组织的牵引、压迫和锐伤, 常见的一系列病理改变如神经肿胀、神经传导中断、损伤远端变性等^[1], 导致了感觉和功能障碍, 造成患者生活质量下降。周围神经损伤后的

再生和修复, 主要取决于神经元胞体的存活、神经远端的存在、轴突进入相应的内膜管以及与正确的靶器官重新建立连接。今年的动物模型研究表明, 神经营养因子可以促进周围神经系统神经元的发育和再生, 保护受损的神经功能。故理想的周围神经损伤动物模型制作和行为学评价方法具有重要作

[收稿日期] 2020-12-11

[基金项目] 云南省创新团队基金资助项目 (2019HC022)

[作者简介] 梁宇 (1993~), 女, 辽宁沈阳人, 在读硕士研究生, 主要从事神经系统的发育、损伤与修复研究工作。

[通信作者] 李力燕, E-mail: kmliyan@163.com

用, 是进行周围神经损伤及再生修复相关研究的基础。

坐骨神经损伤是常见的周围神经损伤。受外界直接或间接力量导致的周围神经干或其分支发生的损伤属于周围神经损伤中的下肢神经损伤。临床表现为: 酸痛、活动受限、自主运动消失、外观畸形、肌肉麻痹、痛觉及温觉障碍、皮肤粗糙、出汗减少等^[2]。坐骨神经是体内最长的神经, 自脊髓下部起、延长至臀部和腿部, 包括运动和感觉纤维。因此在动物实验中, 笔者以选择操作流程比较方便, 而且具有大量实验操作经验、建模方法稳定、重复性强的坐骨神经损伤模型来模拟和复制常见的周围神经损伤。其中, 坐骨神经挤压损伤模型、横断损伤模型和神经病理性疼痛模型较为常见。本文对常见的周围神经损伤模型制作和常用行为学评估方法进行总结。

1 常用坐骨神经损伤的模型制备

1.1 坐骨神经挤压伤模型

在建立模型之前, 大鼠充分给水, 不给予食物 24 h。开始造模过程: 首先腹腔注射 10% 氯醛 (3×10^{-3} mL/kg), 在等待期间观察到角膜反射消失、呼吸顺畅、肌肉松弛和刺激大鼠足底没有反应^[3]即为麻醉成功的标志。然后取俯卧位固定, 常规准备, 备皮后用碘伏进行消毒。在股骨结节下方 0.5 cm 处, 纵向切开皮肤, 依次切开皮肤和皮下组织, 将坐骨神经与股骨头肌、半腱肌、半腱肌间隙分离。采用 Hasegawa^[4]和王炜^[5]制作的坐骨神经钳夹损伤模型的改进方法, 分离坐神经后, 钳子垂直夹住坐骨神经, 扣满 3 扣、持续 5 s, 然后松开。同样的操作重复 3 次, 每次间隔 10 s, 造成宽度为 2 mm 的挤压伤。测量压迫压力 5 kg 后, 将神经送回原来的位置。用生理盐水冲洗后, 将皮肤逐层缝合, 所有的钳夹操作都由一人完成, 尽力排除其他因素对于实验结果的影响。

1.2 坐骨神经横断模型

参考并改进邵水金^[6]的建模方法, 制作坐骨神经横断损伤模型。经常规准备和消毒后, 玻璃细针游离坐骨神经, 在股骨结节下方 0.5 cm 处切断坐骨神经, 断端吻合以维持无张力状态。取缝合针, 四周缝合, 每周 1 针, 共 4 针, 然后用碘伏再次消毒, 最后进行逐层缝合。这种方法模拟了神经断裂的情况, 是目前最严重的一种神经损伤。目前对该类型的研究较多, 为后续提供更有效的治疗病例奠定了坚实的动物实验基础。

1.3 坐骨神经分支选择损伤模型

采用 Decosterd 和 Woolf^[7]的方法来制作坐骨神经分支损伤模型。常规手术在大鼠后肢上缘切开皮肤, 分离肌肉, 暴露坐骨神经主干及其下支—胫神经、腓总神经和腓肠神经, 结扎并切断胫神经和腓总神经, 保存腓肠神经。

1.4 周围神经损伤性神经病理性疼痛模型

慢性坐骨神经缩窄损伤 (chronic constriction injury, CCI) 和脊神经结扎^[8] (spinal nerve ligation, SNL), 以及保留性神经损伤^[9] (spared nerve injury, SNI) 模型是常用的神经病理性疼痛模型。Bennett^[10]提出的 CCI 模型已广泛应用于疼痛领域。建造 CCI 模型时, 俯卧位捆绑大鼠, 在后肢上部切皮进行肌肉分离。制作方法: 暴露坐骨神经干, 用 4~0 铬线在神经干周围制作 4 个轻度结扎环。适宜的结扎强间隔为 1 mm, 以引起小腿肌肉轻度震颤为宜。

制作 SNL 模型时, 方法在大鼠 L4~S1 水平切断一侧椎旁肌, 去除 L6 椎体横突, 进行分离 L4~L6 脊神经操作, 后续紧密结扎 L5、L6 脊神经, 或仅结扎 L5 脊神经, 术后步态异常, 除轻度外翻外, 无其他异常改变。该模型尽可能消除了 Bennett-Xie 提出的 CCI 模型中由结扎部位和结扎强度引起的实验误差。脊髓损伤节段与非损伤节段的完全分离有利于比较研究损伤脊髓节段与非损伤脊髓节段的初级传入是否或如何参与疼痛的发生和持续性^[11]。

2 行为学评价方法

2.1 坐骨神经功能指数 (SFI)

首先制作足迹行走暗箱, 长 50 cm、宽 5 cm 和高 10 cm, 放置与箱底等大的纸在盒子的底部^[12]。油墨充分印刷染色足趾后, 使大鼠从暗盒的一侧向对面, 取出纸张, 晾干测量, 选择双侧 3~4 个清晰的印迹, 扫描图像, Image J 处理软件对图像进行分析, 然后根据 Bain 公式计算坐骨神经功能指数 (SFI)。 $SFI = -38.3 (EPL - NPL) / NPL + 109.5 (ETS - NTS) / NTS + 13.3 (EIT - NIT) / NIT - 8.8$, 上述公式中正常足 (N)、损伤足 (E), NTS 为健侧足趾宽度, NPL 为健侧足印长度, ETS 为术侧足趾宽度, EPL 为术侧足印长度, IT 为中间足趾宽度。坐骨神经功能指数 SFI=0 时为正常, SFI=-100 时为完全损伤。

2.2 T 型台步态分析

使用 T 型台 XT10.6 系统 (Noldus Inc., 荷兰)

评估 SNI 后的步态恢复和运动功能 (Neumann 等人, 2009 年; Vandeputte 等人, 2010 年)^[13]。这项测试包括对每只动物穿过人行道时照亮长边的玻璃地板的踪迹监控。该系统由一条由荧光灯管照明的玻璃跑道组成, 在正常情况下, 内部反射会将光线限制在玻璃表面上。当爪子与玻璃表面相接触时, 光线离开玻璃, 只照亮玻璃 OOR 上相应的接触区域。安装在玻璃板下面的摄像头检测到动物在赛道上的奔跑。信号以每秒 50 个半帧的速度数字化, 经过数据采集、压缩、存储, 最后由 T-Platform 软件程序^[14]进行分析使高速摄像机进入数据采集, 并通过软件对打印过程进行分类。每只动物记录 3 次表现, 分别于术后第 3、7、13 天采集印迹, 获得约 15 个台阶周期进行分析。

2.3 趾展试验

采用趾展试验^[15]评价坐骨神经挤压伤后患肢神经功能的恢复情况。操作过程为: 抓住大鼠尾巴, 待健侧足趾完全伸展时, 对患侧足趾伸展情况进行评分。具体分级标准为: 0 级: 患肢没有足趾伸展; 1 级: 患肢足趾部分伸展; 2 级: 患肢足趾完全伸展, 并且维持伸展状态超过 2 s。操作中注意双侧对比, 每日测试两次且时间间隔小于 45 min。

2.4 斜板试验

两块长方形木板, 一块板为底板, 另一块为转动板, 使用铰链连接的方式链接在一起。其中转动板上平铺一层粗糙胶板垫。转盘水平位时, 将大鼠放在试验中有浅槽的专用橡胶板上, 然后缓慢均匀地增加转盘的倾斜度, 保持头朝上, 使其“车身纵轴”与斜板纵轴平齐。以均匀的速度, 每次抬高 5°。当大鼠停留在平板上时间小于 5 s 时, 记录最大倾斜度作为其功能值, 连续测量 3 次, 然后计算平均值。分别于术后第 7、14、21、28、35 天采用斜板试验评定患肢运动功能。以此来进行大鼠姿势保持能力和抓握能力的测定。

3 机械阈和热痛阈测定

3.1 机械阈测定

本研究采用接触刺激法提取 up-and-down^[16-17], 以测定大鼠后足趾的 50% 缩爪阈值。依次使用呈递增式的力度刺激后肢。开始使用 2 克力量刺激, 如果没有腿部收缩反应, 选择上力量 3.63 g 刺激后趾; 如果有腿部收缩反应, 选择较低力量 1.20 g 刺激后趾。以此类推, 当出现与前一次不同的反应时 (有腿退缩反应为无退腿反应或无腿部收缩反应为收缩反应), 连续依次刺激 4 次, 包含

前 2 次, 共计 6 次, 即可完成 50% 缩爪阈值的测定。如果所需的力大于 15.1 g 或小于 0.45 g, 本侧阈值直接记录为 15 g 或 0.25 g。50% 缩爪阈值的计算使用公式: $50\% \text{ 缩爪阈值} = 10 \log (X) + k \delta$ (X 为最后刺激使用的力度; k 为不同刺激方式的系数, 在表中^[16-17]查找; δ 是指各刺激力度 (log 值) 相邻间距的平均数, 此处 $\delta = 0.224$)。

3.2 热痛测定

操作方法: 将大鼠放在玻璃板上, 对其后趾相应部位进行热辐射照射, 记录照射至缩腿反应的时间, 即缩腿潜伏期。抬腿后, 记录从收腿到后腿下沉的时间, 也就是缩腿的时间。在对缩腿潜伏期进行统计分析之前, 需要将手术侧与非手术侧缩腿潜伏期转化为呈正态分布的差异性评分。差异性评分 = 手术侧缩腿潜伏期 - 非手术侧缩腿潜伏期^[17]。为避免混淆, 除统计缩腿潜伏期外, 其它实验指标均不考虑非手术侧的情况, 只将对对照组和各实验组的指标相比。

4 小结

坐骨神经损伤后可出现运动和感觉功能等障碍。据文献可知, 在坐骨神经损伤模型中, 坐骨神经钳夹损伤模型、横断损伤模型和神经病理性疼痛模型较为常见。根据不同程度神经损伤, 总结多种行为学方法及神经电生理检测方法来评估大鼠周围神经损伤后运动和感觉功能的恢复情况, 及各种造模和行为学评价方法的优缺点。

首先, SFI 是评价坐骨神经损伤和功能恢复的一种常用而可靠的方法^[18]。国外多篇文章报道, 采用足迹分析的方法来评估下肢运动功能的恢复情况。坐骨神经功能指数最早由 De Medinaceli^[19]于 1982 年建立, 随后 Brian^[20]和 Walker^[21]进一步研究, 改进了坐骨神经功能指数的测量方法。

SFI 是通过运用多种数据的检测对大鼠进足印分析, 因为其结果与大鼠的种系和大小无关, 客观性强, 可以综合评价下肢各肌肉的协调功能。因此, 在坐骨神经行为学评估中, SFI 分析可以用于评估坐骨神经损伤后运动功能恢复情况, 从而反映坐骨神经再生水平^[22]。然而, 坐骨神经损伤后动物坐骨神经功能存在差异, 这可能导致 SFI 在评价坐骨神经功能时存在偏差, 因此通过伸趾试验评价坐骨神经的运动功能可以弥补 SFI 的不足^[23]。

研究神经病理性疼痛时, SNL、CCI、SNI 三种模型都是经常使用的疼痛模型。这三种外周神经损伤后导致神经病理性疼痛的模型在制作上均

有所差别, 本文使用机械阈测定和热痛测定两种不同的测痛方法来测定疼痛模型的致痛效果, 并比较它们的差异。在机械痛效果方面, SNI 产生疼痛过敏和异常的时间最早, 仅对机械刺激敏感, 是一种较理想的疼痛模型。SNI 和 SNL 均是结扎并切断神经干, 损伤确切可靠, 而 CCI 是利用羊肠线产生的无菌炎症来损伤神经干, 损伤有限, 所以 CCI 的 50% 缩爪阈值低于 SNI 和 SNL。上述神经病理性疼痛模型在许多方面不相同, 其多样性发生机制可能反映了临床中不同神经病理性痛的表现多样性。随着时间的发展, 方法及技术在逐步完善, 为今后坐骨神经损伤后的运动和感觉功能修复奠定了坚实的动物实验基础。

综上所述, 理想的周围神经损伤模型应该具备制作简单、可重复、操作性强, 在后续进行行为学方法评估时能排除个体差异性导致实验误差等特点。

[参考文献]

- [1] 金义兵. 临床基础护理精要[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2014: 404-405.
- [2] 卫中庆, 汪宝林. 外科临床处方手册[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2015: 428-429.
- [3] 童松, 熊南翔, 沈建英. 大鼠腹腔麻醉方法的改进[J]. 实验动物科学, 2014, 31(1): 52-54.
- [4] Hasegawa K. A new method of measuring functional recovery after crushing the peripheral nerves in unanesthetized and unrestrained rats [J]. *Experientia*, 1978, 34(2): 272-273.
- [5] 王维, 苑秀华, 王中莉, 等. 坐骨神经损伤模型大鼠神经传导速度及损伤运动神经元内生长相关蛋白 43 表达与磁刺激干预 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(46): 8617-8620.
- [6] 邵金水. 周围神经损伤的针灸疗法 [J]. *现代康复*, 2000, 11(4): 1616.
- [7] Decosterd I, Woolf C J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain [J]. *Pain*, 2000, 87(2): 149-158.
- [8] Ho Kim S, Mo Chung J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat [J]. *Pain*, 1992, 50(3): 355-363.
- [9] Decosterd I, Woolf C J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain [J]. *Pain*, 2000, 87(2): 149-158.
- [10] Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87-107.
- [11] Kim S H, Chung J M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat [J]. *Pain*, 1992, 50(3): 355-63.
- [12] Tseng K, Li H, Clark A, et al. 4-Aminopyridine promotes functional recovery and remyelination in acute peripheral nerve injury [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(12): 1409-1420.
- [13] Guy R, Grynspan F, Ben-Zur T, et al. Human muscle progenitor cells overexpressing neurotrophic factors improve neuronal regeneration in a sciatic nerve injury mouse model [J]. *Front Neurosci*, 2019, 27(13): 151.
- [14] Bain J R, Mackinnon S E, Hunter D A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat [J]. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1989, 83(1): 137-138.
- [15] Ma C H E, Omura T, Cobos E J, et al. Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(11): 4332-4347.
- [16] Dixon W J. Efficient analysis of experimental observations [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1980, 20: 441-462.
- [17] Chaplan S R, Bach F W, Pogrel J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [18] Sta M, Cappaert N L, Brook G A, et al. The functional and morphological characteristics of sciatic nerve degeneration and regeneration after crush injury in rats [J]. *J Neurosci Methods*, 2014, 222(1): 189-198.
- [19] De Medinaceli L, Freed W J, Wyatt R J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. [J]. *Exp Neurol*, 1982, 77(3): 634-643.
- [20] Brain J R, Mackinnon S E, Hunter D A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1989, 83(1): 129-138.
- [21] Walker J L, Evans J M, Meade P, et al. Gait-stance duration as a measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 52(1): 47-52.
- [22] Fricker L, Penna V, Lampert F, et al. A self-made, low-cost infrared system for evaluating the sciatic functional index in mice [J]. *Neural Regeneration Research*, 2016, 11(5): 829-834.
- [23] Bozkurt A, Scheffel J, Brook G A, et al. Aspects of static and dynamic motor function in peripheral nerve regeneration: SSI and CatWalk gait analysis [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 219(1): 55-62.