

血脊髓屏障模型的制作技术与方法研究进展

敖丽¹ 周逸敏^{1,2} 张俐^{1△}

[关键词] 血脊髓屏障;动物模型;脊髓损伤;综述

[中图分类号] R651.2 [文献标志码] A [文章编号] 1005-0205(2021)09-0085-04

血脊髓屏障是存在于血液和脊髓之间中枢神经系统所特有的屏障结构,由无孔毛细血管内皮细胞、基底细胞、周细胞、以及星形胶质细胞和紧密连接蛋白构成^[1-2]。当脊髓受到损伤时,血脊髓屏障也可能随之受损。血脊髓屏障被破坏会造成脊髓组织水肿、缺血缺氧和血浆内的各种分子无选择性的进入脊髓实质,造成严重的继发性脊髓损伤,导致患者生活自理能力下降甚至丧失^[3]。因此,尽早修复血脊髓屏障,改善脊髓微环境,是防治继发性脊髓损伤的关键。目前对于血脊髓屏障的研究主要是通过建立脊髓损伤模型或血脊髓屏障体外细胞模型,探讨血脊髓屏障的作用机制,从而找到相应的治疗对策。本研究通过查阅近年相关文献,整理分析常见血脊髓屏障模型的制作技术、使用方法及优缺点,拟为血脊髓屏障模型及脊髓损伤的相关研究提供参考。

1 急性钳夹型脊髓损伤模型

急性钳夹型脊髓损伤模型是一种通过使用外界器械对脊髓进行压迫导致损伤的模型。其主要制作方法是先切除动物脊髓周边椎板,使脊髓完全暴露,然后使用动脉瘤夹或者微血管夹施加一定的压迫力压迫脊髓,并压迫一定时间,待脊髓造成损伤后即模型建立成功^[4],此模型可通过调节钳夹部位、改变钳夹力度以及持续时间造成不同程度的损伤,以模拟临床上脊髓不同的受压因素。

钳夹部位的选择除了损伤节段不同外,主要有腹背侧钳夹和侧方钳夹(垂直于脊髓方向夹闭脊髓),腹背侧钳夹是指将动脉夹的两端分别置于脊髓腹侧和背侧,使脊髓前后侧形成一定的压力,从而造成钳夹损伤,魏卫兵等^[5]分别以大鼠脊髓的 T₈~T₁₂ 节段为损伤中心,充分剥离并修整两侧椎板,使硬脊膜清晰暴露,用微血管夹钝性端穿过硬脊膜与前方椎体之间,确

保其完全穿过并能完全夹闭脊髓时,释放微血管夹,钳夹持续 20 s 后释放,可见脊髓上有明显血肿痕迹,通过下肢功能评分以及爬网格试验证实该法成功构建了不同程度的脊髓损伤模型,并发现 T₁₀ 节段的脊髓损伤模型是最佳选择。秦慧慧等^[6]以 T₁₁ 脊髓节段为中心,行椎板切除术暴露脊髓,采用改良动脉夹并垂直于脊髓 T₁₁ 处两侧放置,瞬间释放动脉夹,持续 30 s 后取下,可见钳夹处明显充血、水肿,且下肢出现标志性的痉挛及颤动。夹闭时间的不同,亦会导致不同程度的脊髓损伤。此外,不少研究者也会采用不同钳夹力度进行实验,如 Führmann 等^[7]利用一种改良版动脉瘤夹用 21 g 的力钳夹住脊髓表面 1 min,使其造成脊髓损伤,用来研究神经上皮细胞与硫酸软骨素酶 ABC 联合治疗对脊髓损伤后的组织再生效果。Soubeyrand 等^[8]采用动脉瘤夹施加 35 g 的力度去钳夹脊髓表面 60 s 以构建大鼠脊髓损伤模型,用于研究脊髓损伤后的出血情况。不同研究者对于钳夹时间和力度的选择可能不相一致^[9-11],缺乏统一的标准,徐伟龙等^[12]通过整合并分析比较了国内外有关钳夹法创建急性钳夹型脊髓损伤大鼠模型的文章,总结出急性钳夹型脊髓损伤最佳模型——用 30 g 动脉瘤夹急性压迫脊髓 60 s 作为创建急性钳夹型脊髓损伤动物模型的造模方式。

急性钳夹型脊髓损伤模型优点是能较好模拟临床脊髓损伤后症状,比如椎体脱位、椎体移位、椎管内出血等病变造成的挤压型脊髓损伤,且该模型稳定,易复制,可控性高,其试验指标亦相对稳定,适用于脊髓损伤的基础研究^[13]。但其作用力的大小一般不易掌握,包括挤压瞬时准确施加的力以及和硬脊膜接触瞬间的速度都无法测定,未知数较高,且腹背侧钳夹法因切除过多椎体骨质,易损伤硬脊膜侧壁静脉,导致出血过多,大鼠死亡率升高^[13-14]。

2 体外血脊髓屏障模型

体外血脊髓屏障模型是一种将脊髓细胞与混合胶质细胞在体外培养建立的模型,该模型是一种新型的血脊髓屏障模型,目前常用于研究血脊髓屏障通透性及改善脊髓微环境等相关课题^[15]。其主要的制作方法是将混合的胶质细胞与来自原代大鼠的脊髓微血管

基金项目:国家自然科学基金项目(82074474)

福建省卫生教育联合攻关计划项目(2019-WJ-30)

¹ 厦门医学院(福建 厦门,361023)² 长春中医药大学

△通信作者 E-mail:ZHANGLIL626@163.com

内皮细胞共同培养,当细胞融合度达到 95% 后进行消化,重悬后取 1 mL 密度为 5×10^4 个/mL 的混合培养细胞接种在 12 孔板的 Transwell 下室,作为滋养层;接着取 200 μ L 的脊髓微血管内皮细胞接种到上室,建立起一个为上下双层细胞的共培养体系。贴壁之后需要每 2 d 换 1 次液。常规培养大概 7 d 后,Transwell 嵌套内的脊髓微血管内皮细胞便可以形成内皮细胞屏障样组织,可以模拟出 BSCB 组成细胞之间的相互作用,即成功构建体外 BSCB 模型^[17-18]。

目前构建血脊髓屏障的体外模型主要有两种,一种是体外血脊髓屏障模型,另一种是体外血脊髓屏障缺氧模型。第二种模型是在第一种模型基础上利用一些化学试剂或者特殊处理建造的,但是两种模型几乎都是同时出现在一个实验中作为对照。李在旺等^[16-17]通过建立体外血脊髓屏障缺氧模型(利用二氧化碳先缺氧再复氧的方法)来研究表皮生长因子受体抑制剂对氧剥夺/复氧诱导的血脊髓屏障损伤的保护作用。曹阳等^[18-19]运用在体外血脊髓屏障模型的基础上添加氯化钴构建体外血脊髓屏障缺氧模型的方法,研究 MicoRNA-125a-5p 在缺氧损伤后,核 HO-1 调节血脊髓屏障通透性中的作用。孙瑞等^[20]利用体外血脊髓屏障模型进行低氧处理后,研究 miR-429 对体外血脊髓屏障通透性的影响。

体外血脊髓屏障模型优点主要在于:1)可以较好的模拟血脊髓屏障的组成结构,与人体血脊髓屏障高度相似;2)不必使用动物,减少动物自身个体差异以及种属差异带来的实验误差;3)减少实验动物的使用能节约实验成本,缩短实验周期。但是也有一些缺点:1)在分离培养出稳定的脊髓血管内皮细胞之前,造模时需要用脑血管内皮细胞代替脊髓血管内皮细胞;2)虽然双细胞共同培养(内皮细胞和胶质细胞)在解剖学上接近体内情况,但理论上将内皮细胞、星形胶质细胞以及周细胞共同培养建立的模型,才更加符合体内的血脊髓屏障结构^[21-22];3)做低氧或者缺氧处理时使用的化学物质多半对人体有伤害(例如氯化钴属于有毒物质),使用时务必多加小心;4)由于体外细胞模型和体内血脊髓屏障微环境的差异,在研究血脊髓屏障实际转运机制方面可能存在缺陷,需要研究者综合考虑。

3 脊髓损伤动物打击模型

坠落打击法是脊髓损伤中使用度较高的造模方法,是一种利用器械对暴露脊髓进行坠落打击而造成脊髓损伤而构建的模型,诸多学者都是使用该模型进行脊髓损伤及血脊髓屏障的研究。目前主要的制作技术和方法是提前术区备皮,先使用 10% 的水合氯醛(0.3 mL/100 g)采取腹腔注射方式麻醉 SD 大鼠后,碘伏消毒术区并用手术刀在脊髓正中位置逐层切开皮肤,钝性分离肌肉组织后用椎板撑开器将 $T_8 \sim T_{10}$ 节段椎板充分暴露在外,接着将该椎板剔除,在脊髓组织

充分暴露后,使用脊髓打击器将一定重量的砝码从一定的高度自由落体在以 $T_8 \sim T_{10}$ 节段的范围。当出现打击过程脊膜保持完整、 T_{10} 节段脊髓血管水肿充血、双下肢出现痉挛性抽搐以及尾部出现摆动的结果时,表示造模成功^[23-26]。

脊髓损伤动物打击模型应用广泛,但是根据具体实验所需要的数据会有不同的打击方法、力度或高度。彭程等^[25]通过改良版 Allen's 打击法用 10 号克氏针在 3 cm 高处自由落体击中 T_{10} 节段脊髓,以此模型研究 miR-126 对大鼠急性脊髓血管损伤的作用机制。范筱等^[27]对大鼠 $T_9 \sim T_{11}$ 椎板完全剥离,暴露脊髓后,采用 MASCIS 脊髓打击器对 T_{10} 节段(参数设置为高 12.5 mm,质量 10 g)进行打击,以此探讨小胶质细胞 P2X7 受体在 NLRP3 炎性体依赖性炎症中调节脊髓损伤后神经炎症的机制。张谢等^[28]在打击器平台上用 1.5 N 的打击力度撞击 T_9 节段建立模型,以研究 bFGF 对大鼠血脊髓屏障损伤修复的促进作用。

此模型的优点主要在于:1)所需器材简单易得,方法简便;2)广泛应用于脊髓损伤研究中;3)判断造模成功与否的条件可靠简略。缺点:1)需有较好的手术操作经验与技术;2)对无菌环境的要求偏高,容易引起术后感染,注意防止泌尿道感染、肠梗阻、褥疮等并发症^[26];3)打击的力度不好掌握,操作不当可能给大鼠造成二次打击,可能需要多次预试验才能确定自己实验时所需的最终要求。

4 大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型

大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型是近年来研究血脊髓屏障的较为推崇的模型,是一种借助外力先将大鼠脊髓血管夹闭致其缺血,再进行灌注的损伤模型。其主要的制作方法与技术为先即根据大鼠的体格使用 10% 的水合氯醛(3 mL/kg)进行腹腔注射麻醉,再将大鼠胸腹部备皮、碘伏消毒,用静脉留置针沿着右侧股静脉穿刺置管固定并采取右侧卧位,沿着右侧肋缘逐层分离暴露出其肾脏和肠管,并将周围组织推移至左侧,使腹主动脉被分离暴露出。用无创血管夹夹闭肾动脉分支上的腹主动脉,让其缺血 30 min 后取出血管夹恢复血流,最后逐层关闭腹腔^[30]。

此模型在临床应用时,通常还需加入预处理或者后处理,为的是保证实验动物的存活以及保证实验能完整进行。张丽敏等^[29]是根据改良的 Zivin 法^[27]用右美托咪定后处理后构建的脊髓缺血再灌注损伤模型来研究血脊髓屏障的影响和 Caspase-3、IL-1 β 的表达。而秦美满等^[31]则是采用在肩胛下的第二、三肋骨区进行夹闭之前先进行电针预处理的方法建造大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型,进而研究建模后对血脊髓屏障的影响。

此模型的好处在于:1)后期可使用改良的 Tarlov 评分标准^[32]进行评分,使实验结果更准确;2)使用右

美托咪定可以保护大鼠缺血后大脑、脊髓等器官^[33-35]；3)使用药物后处理在临床上使用更广泛，因此此模型更具存在价值及使用意义。不足之处主要是：1)右美托咪定药物可能对模型引起的副作用尚不可知，存在一定的风险性和不确定性^[29]；2)掌控好缺血时间，以减少大鼠死亡率。

从以上研究资料来看，不同方法构建的实验模型具有不同的特点，且各自都有优缺点和适用范围，为了获得理想的结果，应尽可能根据不同的实验目的和要求选择最佳的造模方法和评价指标，操作尽量简单，且成模率高，符合临床中血脊髓屏障发病机理的实验模型。其次，随着现代的社会进步，脊髓损伤的发病率逐年升高，而现有的血脊髓屏障损伤模型依然存在种类少，鉴定标准参差不一，缺乏统一性等问题，研究较为贫瘠。因此，如何在原有的模型基础上找到更简便有效、经济实用、可复制且稳定性高的血脊髓屏障模型，是研究其损伤的先决要素，并为今后血脊髓屏障损伤或脊髓损伤的基础研究及临床诊疗提供一定的思路。

参考文献

- [1] BARTANUSZ V, DSC D J, ALAJAJIAN B B, et al. The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications[J]. *Annals of Neurology*, 2011, 70(2): 194-206.
- [2] KUMAR H, ROPPER A E, LEE S H, et al. Propitious therapeutic modulators to prevent blood-spinal cord barrier disruption in spinal cord injury[J]. *Molecular Neurobiology*, 2016, 54(5): 1-13.
- [3] 邢晓辉. 血-脊髓屏障与临床疾病的关系[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2014, 19(2): 91-93.
- [4] 刘海峰, 王斌, 赵斌. 急性机械性脊髓损伤动物模型研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(4): 551-556.
- [5] 魏卫兵, 周祥兴, 周宾宾, 等. 构建不同脊髓损伤节段模型大鼠下肢功能恢复的评价[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(7): 1073-1077.
- [6] 秦慧慧, 王文春, 葛杜鹃, 等. 改良钳夹型脊髓损伤大鼠模型的建立及神经功能评价[J]. *西南军医*, 2014, 16(1): 1-4.
- [7] FÜHRMANN T, ANANDAKUMARAN P N, PAYNE S L, et al. Combined delivery of chondroitinase ABC and human induced pluripotent stem cell-derived neuroepithelial cells promote tissue repair in an animal model of spinal cord injury[J]. *Biomed Mater*, 2018, 13(2): 024103.
- [8] SOUBEYRAND M, BADNER A, VAWDA R, et al. Very high resolution ultrasound imaging for real-time quantitative visualization of vascular disruption after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(21): 1767-1775.
- [9] 张丽河, 洪毅, 王方永, 等. 脊髓损伤急性期内源性酮体增加对脊髓损伤大鼠的保护作用研究[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2018, 11(9): 697-703.
- [10] 孙年怡, 熊兴娟, 何宇, 等. 隔日限食疗法可促进钳夹型脊

- 髓损伤模型大鼠运动功能的恢复[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(4): 564-569.
- [11] 石勇, 霞晓燕. NGF 过表达质粒修饰 BMSCs 移植促进大鼠急性脊髓损伤修复[J]. *实用骨科杂志*, 2020, 26(8): 707-711.
- [12] 徐伟龙, 左媛, 辛大奇, 等. 急性钳夹型脊髓损伤模型大鼠造模方式的选择: 一项网状 Meta 分析[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(23): 3767-3772.
- [13] 魏荣志, 王玉珏, 闫景龙. 大鼠脊髓损伤模型研究进展概述[J]. *神经损伤与功能重建*, 2020, 15(5): 274-277.
- [14] 齐英娜, 谭明生. 脊髓损伤动物模型的研究现状[J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26(10): 927-929.
- [15] LI X, LUO D, HOU Y, et al. Sodium tanshinone IIA silicate exerts microcirculation protective effects against spinal cord injury in vitro and in vivo[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(10): 1-16.
- [16] 李在望, 姜冬梅, 韩晶, 等. 表皮生长因子受体抑制剂对氧糖剥夺/复氧诱导的血脊髓屏障损伤的保护作用研究[J]. *神经损伤与功能重建*, 2021, 16(2): 63-66.
- [17] CAI X J, ZHAO J J, YI L, et al. The microenvironment following oxygen glucose deprivation/re-oxygenation-induced BSCB damage[J]. *Brain Research Bulletin*, 2018, 143: 171-180.
- [18] 曲林, 李刚, 毕云龙, 等. 缺氧损伤后血红素加氧酶 1 截短体(HO-1C Δ 23)上调 miR-125a-5p 降低血脊髓屏障的通透性[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(8): 725-731.
- [19] WANG J, NIE Z, ZHAO H, et al. MiRNA-125a-5p attenuates blood-spinal cord barrier permeability under hypoxia in vitro[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(1): 25-34.
- [20] 孙瑞, 于德水. 抑制 miR-429 促进 ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 蛋白表达改善血脊髓屏障通透性的体外实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2020, 34(9): 1163-1169.
- [21] MALINA C K, COOPER I, TEICHBERG V I. Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness[J]. *Brain Research*, 2009, 1284: 12-21.
- [22] SCHIERA G, BONO E, RAFFA M P, et al. Synergistic effects of neurons and astrocytes on the differentiation of brain capillary endothelial cells in culture[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2003, 7(2): 165-170.
- [23] BONAFINA A, FONTANET P A, PARATCHA G, et al. GDNF/GFR α 1 complex abrogates self-renewing activity of cortical neural precursors inducing their differentiation[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(3): 1000-1015.
- [24] 彭程, 黄健华, 孙建忠, 等. miR-126 对急性脊髓损伤大鼠血管的作用及机制研究[J]. *国际骨科学杂志*, 2020, 41(6): 382-388.
- [25] 吴杨鹏, 范筱, 张俐. 急性脊髓损伤动物模型的建立与评估[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(49): 7341-7348.
- [26] 苑文超, 张华, 黄桂成, 等. 大黄对大鼠脊髓损伤后血-脊髓屏障的保护作用[J]. *广东医学*, 2017, 38(10): 1481-1484.
- [27] FAN X, MA W, ZHANG Y, et al. P2X7 receptor (P2X7R) of microglia mediates neuroinflammation by

regulating (NOD)-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome-dependent inflammation after spinal cord injury[J]. Medical Science Monitor; International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2020, 26; e925491.

- [28] 张谢,周华,张宏宇,等. bFGF 促进大鼠血脊髓屏障的修复[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(4): 502-506.
- [29] 张丽敏,陈凤收,李哲,等. 右美托咪定后处理对脊髓缺血再灌注损伤后 Caspase-3、IL-1 β 的表达和血脊髓屏障的影响[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(11): 2013-2018.
- [30] ZIVIN J A, DEGIROLAMI U. Spinal cord infarction; a highly reproducible stroke model[J]. Stroke, 1980, 11(2): 200-202.
- [31] 秦美满,刘萍,李运,等. 电针预处理对脊髓缺血再灌注损伤后血脊髓屏障的影响[J]. 广东医学, 2016, 37(23): 3494-3496.
- [32] TARLOV I M. Acute spinal cord compression paralysis[J].

Journal of Neurosurgery, 1972, 36(1): 10-20.

- [33] MARTIN D, PABLO E, RICARDO G, et al. Protecting the heart from ischemia/reperfusion injury: an update on remote ischemic preconditioning and postconditioning[J]. Current Opinion in Cardiology, 2017, 32(6): 784-790.
- [34] WANG Y Y, LI TONG, LIU Y W, et al. Ischemic postconditioning before percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction reduces contrast-induced nephropathy and improves long-term prognosis[J]. Archives of Medical Research, 2016, 47(6): 483-488.
- [35] ZHAO Z Q, CORVERA J S, HALKOS M E, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion; comparison with ischemic preconditioning[J]. American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology, 2003, 285(2): 579-588.

(收稿日期: 2021-03-16)

(上接第 84 页)

- [49] ORAL O, AKKOC Y, BAYRAKTAR O, et al. Physiological and pathological significance of the molecular cross-talk between autophagy and apoptosis[J]. Histo Histopathol, 2016, 31(5): 479-498.
- [50] PAGLIARINI V, WIRAWAN E, ROMAGNOLI A, et al. Proteolysis of Ambra1 during apoptosis has a role in the inhibition of the autophagic pro-survival response[J]. Cell Death Differ, 2012, 19(9): 1495-1504.
- [51] WIRAWAN E, VANDE WALLE L, KERSSE K, et al. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria[J]. Cell Death Disease, 2010, 1(1): 18.
- [52] SUN Q, GAO W, LOUGHRAN P, et al. Caspase 1 activation is protective against hepatocyte cell death by up-regulating beclin 1 protein and mitochondrial autophagy in the setting of redox stress[J]. J Biol Chem, 2013, 288(22): 15947-15958.
- [53] LAUSSMANN M A, PASSANTE E, DÜSSMANN H, et al. Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of Caspase-8[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(10): 1584-1597.
- [54] YOU M, SAVARAJ N, KUO M T, et al. TRAIL induces autophagic protein cleavage through caspase activation in melanoma cell lines under arginine deprivation[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 374(1/2): 181-190.
- [55] KANG R, ZEH H J, LOTZE M T, et al. The Beclin-1 net-

work regulates autophagy and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(4): 571-580.

- [56] BOOTH L A, TAVALLAI S, HAMED H A, et al. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. Cell Signal, 2014, 26(3): 549-555.
- [57] MARINO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE E H, et al. Self-consumption; the interplay of autophagy and apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(2): 81-94.
- [58] BELL B D, LEVERRIER S, WEIST B M, et al. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(43): 16677-16682.
- [59] CHIPUK J E, MOLDOVEANU T, LLAMBI F, et al. The BCL-2 family reunion[J]. Mol Cell, 2010, 37(3): 299-310.
- [60] WEI Y, PATTINGRE S, SINHA S, et al. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy[J]. Mol Cell, 2008, 30(6): 678-688.
- [61] KUMAR D, SHANKAR S, SRIVASTAVA R K. Rotterlin-induced autophagy leads to the apoptosis in breast cancer stem cells; molecular mechanisms[J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 171.
- [62] CHEN J, XIE J J, JIN M Y, et al. Sirt6 overexpression suppresses senescence and apoptosis of nucleus pulposus cells by inducing autophagy in a model of intervertebral disc degeneration[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 56.

(收稿日期: 2021-01-15)