

DSA 技术在恒河猴脑脊液动态采集中应用

焦河^① 王凤英^{①*} 王滔^②

① 四川大学华西医院 成都 610041; ② 成都高新海尔森医院 成都 610041

摘要:探索数字减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA)插管技术在恒河猴(*Macaca mulatta*)脑脊液动态采集中的应用。将 28 只恒河猴作为实验动物,随机分为实验组和对照组,每组 14 只,经左前肢静脉推注 3% 戊巴比妥钠溶液全麻后,常规剔除背部脊柱周围体毛、消毒,实验组从穿刺开始就在 DSA 技术下行腰椎间隙穿刺,对照组直接行腰椎间隙穿刺,将硬膜外麻醉导管经腰椎蛛网膜下腔送至枕大池并埋置泵。对不同穿刺方法的结果数据进行 χ^2 检验;神经功能参照改良 Tarlov 评分标准,切口采用改良的切口愈合等级评分标准。实验组经腰椎间隙穿刺蛛网膜下腔全部成功;对照组 8 只穿刺成功,6 只穿刺失败;所有动物埋置泵均能从泵中采集到无色透明的脑脊液;术后恒河猴均于当天恢复正常。在 DSA 技术下经腰椎间隙穿刺蛛网膜下腔并埋置泵,成功率高,操作简便、安全性好,可行性强;通过埋置的泵采集脑脊液,快速省时,可实现在动物清醒时、全生理状态下对脑脊液进行动态多次采集,有助于提高非人灵长类实验动物的福利,由于采样导管置于枕大池,采集到的脑脊液样品质量有保证,可用于研究缺血性脑卒中发生机制,满足检验需要,具有一定的实用价值。

关键词: 恒河猴; 腰椎穿刺术; 脑脊液

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2017) 04-702-06

Application of DSA Technique in Dynamic Acquisition of Cerebrospinal Fluid in Rhesus Macaque

JIAO He^① WANG Feng-Ying^{①*} WANG Tao^②

① West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041; ② Chengdu High-Tech Haiersan Hospital, Chengdu 610041, China

Abstract: The aim of the present study was to explore the application of digital subtraction angiography (DSA) intubation technique in the dynamic acquisition of cerebrospinal fluid in Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*). A total of 28 monkeys were randomly divided into two groups: experimental group and control group, 14 individuals each. Each monkey was injected with 3% pentobarbital sodium solution through left anterior limb vein for general anesthesia, and then hairs on the back around the spine were eliminated after disinfection. In the experimental group, lumbar puncture was started with the DSA targeting, and the control group lumbar puncture was directly performed. The epidural anesthesia catheter was sent from the lumbar

基金项目 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(No. 2012AA020702);

* 通讯作者, E-mail: wangfy028@163.com;

第一作者介绍 焦河,男,主管技师;研究方向: DSA 影像技术及动物影像技术; E-mail: jiaoh028@163.com.

收稿日期: 2016-07-19, 修回日期: 2016-11-27 DOI: 10.13859/j.cjz.201704021

subarachnoid space to the occipital cistern, in which the pump was buried for all 28 monkeys. The data were analyzed with Chi-square test. Modified Tarlov reference criteria were used for neural function evaluation, and a modified incision healing grade standard was also used for healing evaluation, using Spss17.0 software for data analysis. In the control group, we obtained 8 cases of success and 6 cases of failure, with no cerebrospinal fluid outflow in all animals. In the experimental group, the lumbar puncture was successful. All the pumps were able to collect colorless and transparent cerebrospinal fluid. After surgery, all the Rhesus Macaque were returned to normal on the same day. With DSA intubation technique, the operation is simple, safe, and feasible with high success of cerebrospinal fluid collection. By embedding the pump, quick and repeated acquisition of cerebrospinal fluid can be realized when the animals are awake and in full physiological state, which will help to improve the welfare of nonhuman experimental primate animals. Sampling catheters are placed in the cisterna, which will guarantee the quality of collected cerebrospinal fluid, the convenience of studying pathogenesis of ischemic stroke, thus this approach has a certain practical value.

Key words: Rhesus Macaque, *Macaca mulatta*; Lumbar puncture; Cerebrospinal fluid

脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 主要由侧脑室脉络丛产生, 是充满在各脑室、蛛网膜下腔和脊髓中央管内的无色透明液体 (Levy 2010), 其性质与血浆和淋巴液相似, 略带黏性, 对中枢神经系统起着支持、营养的作用 (Oreskovic et al. 2010)。而腰椎穿刺测定脑压和脑脊液化验, 是中枢神经系统感染性疾病及蛛网膜下腔出血等神经系统疾病不可缺少的检查, 也是中枢神经系统疾病临床诊断的重要手段, 对研究其病因和病理机制以及神经系统药理学具有重要作用 (杨之兰等 2015)。研究药物是否能有效通过血脑屏障, 可以通过检测药物在脑脊液中的含量来探索 (Huang et al. 2008)。目前脑脊液的采集方式多为一次性采集, 且动物模型以大鼠 (*Rattus norvegicus*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 为主 (张升等 2011), 在动物清醒、全生理状态下对无血性脑脊液进行动态多次采集报道甚少。本研究应用数字减影血管造影 (digital subtraction angiography, DSA) 技术插管、埋泵, 实现恒河猴 (*Macaca mulatta*) 在清醒、全生理状态下动态多次采集脑脊液, 可以满足研究恒河猴缺血性脑卒中的发生机制所需, 为神经系统其他疾病机制的研究和神经精神类药物在脑脊液中时曲线的评价等提供了非常好的支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

恒河猴 28 只, 雄性, 体重 4 ~ 7 kg, 年龄 3 ~ 6 岁, 购自四川格林豪斯生物科技有限公司。随机分为实验组和对照组两组, 每组 14 只, 穿刺前禁食水 8 h。

1.2 方法

1.2.1 腰椎穿刺术 将恒河猴按 1 ml/kg 剂量用 3% 戊巴比妥钠溶液 (批号 CAS Number: 57-33-0, MDL number: MFCD00070198, 美国 Sigma 公司) 注射麻醉后, 侧卧于 DSA 手术检查台 (飞利浦大型平板数字减影血管造影机, DSA-FD20) 上。体位正确与否, 常为穿刺成功与否的重要环节。消毒后的恒河猴尽量屈颈、后肢屈曲贴近腹部, 脊柱前屈, 整个身体呈“C”形, 充分打开椎间隙 (高启贤等 1997)。常规剔除背部脊柱周围体毛并铺盖 5% 艾利克 (聚维酮碘溶液) 消毒铺巾 (图 1)。实验组在 DSA 透视下选择 L5 与 L6 或 L6 与 L7 间隙作为穿刺点 (图 2), 用 AS-E 18# 一次性麻醉穿刺包 (鲁食药监器械生产产品) 通过 DSA 直视穿刺针斜面与动物矢状面平行, 同时缓慢刺入椎间隙, 出现落空感后, 在 DSA 下将穿刺针斜面旋转至与身体纵轴垂直, 并使斜口朝向头部,



图 1 侧卧位相对固定、消毒

Fig. 1 Lateral position is relatively fixed, and the animal is disinfected

取出硬膜外套管针的针芯，观察脑脊液流出情

况；对照组凭经验同样选择 L5 与 L6 或 L6 与 L7 间隙作为穿刺点穿刺，观察脑脊液流出情况。

1.2.2 微导丝的应用 硬膜外麻醉导管定位准确，必须要知道导管远端的位置，而麻醉导管本身在 DSA 下不具备显像能力，必须要借助一个能进入麻醉导管的特殊材料微导丝(美国 COOK 公司，型号：TPMG-16C-180-TC45-FLX12，批号：E3415442)，微导丝是一种复合金属材质，在 DSA 透视下具有一定显像能力，根据在 DSA 下微导丝的尖端位置确定麻醉导管远端的位置，从而定位到采集脑脊液的具体位置——枕大池(图 3)。

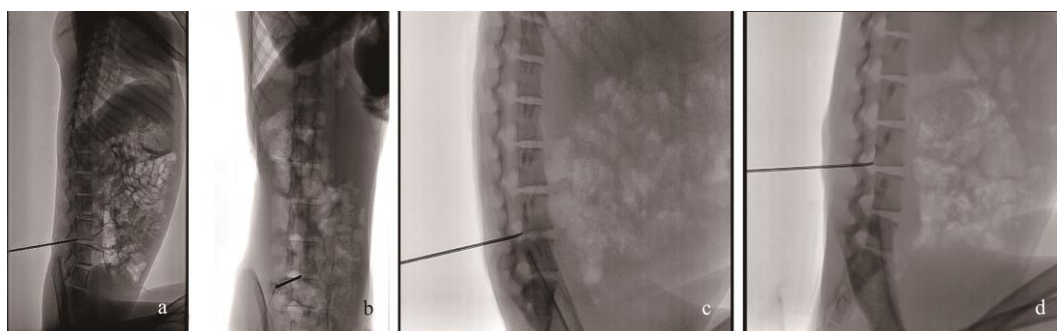


图 2 穿刺点的选择

Fig. 2 Selection of puncture point

a. L5 与 L6 间隙，侧位； b. L5 与 L6 间隙，正位； c. L6 与 L7 间隙，侧位； d. L5 与 L6 间隙，侧位。

a. The L5 and L6 clearance, lateral position; b. The L5 and L6 clearance, anteroposterior; c. The L6 and L7 clearance, lateral position; d. The L5 and L6 clearance, lateral position.

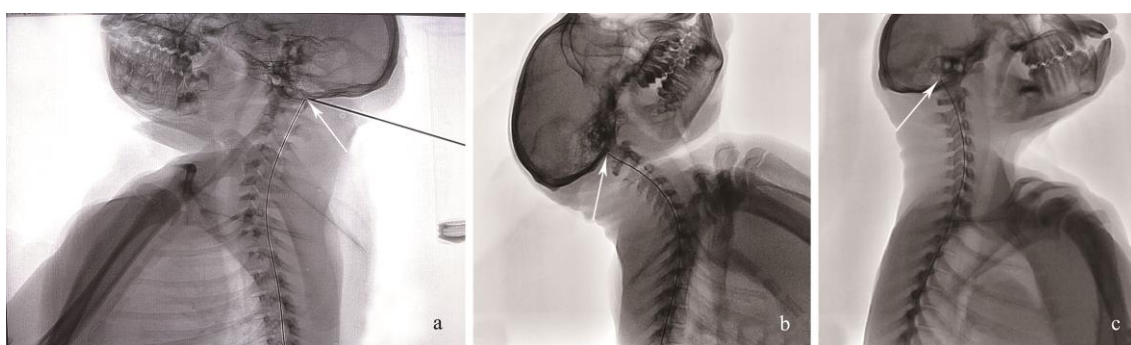


图 3 导管远端位置(枕大池)

Fig. 3 Distal catheter position (Occipital cistern)

箭头指示导管尖端所在位置。

The arrows indicate the location of the catheter tip.

1.2.3 皮下采样接口(泵)的埋置 在穿刺点朝头部 5~10 cm 处,制作切口,分离皮肤和皮下脂肪组织层,形成皮下空间;取出微导丝,将硬膜外麻醉导管引导至切口;然后将采样接口(泵)和硬膜外麻醉导管稳固连接;最后将采样接口(泵)缝合固定在皮下,缝合切口。

1.3 术后检查及评价

28 只恒河猴术后每天观察并记录其行为,包括摄食能力、活动能力、步态,神经损害体征,穿刺局部情况,并对以上指标进行量化,参照改良 Tarlov 评分标准 (Goldsmith et al. 1985) 评价其神经功能 (表 1),改良的切口愈合等级评分标准 (吴在德等 2008) 评价其腰椎穿刺局部情况 (表 2)。

1.4 数据处理

两组实验动物术后在行为学观察、神经功能评分及穿刺点情况的数据使用 SPSS17.0 软件进行分析,数据以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示;两组实验动物穿刺方法用 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种穿刺法比较

对照组 14 例使用直接穿刺法,8 例穿刺成功,退出穿刺针芯后见无色透明的脑脊液从穿刺针中流出,6 例穿刺后无脑脊液流出,成功率为 57%。穿刺失败的 6 例经 DSA 定位引导技术调整针尖深度、方向与位置,见无色透明的脑脊液从穿刺针中流出。实验组 14 例经 DSA 定位引导下全部穿刺成功,退出针芯后均有无色透明的脑脊液从穿刺针中流出,成功率为 100%。2 种穿刺方法经 χ^2 检验,差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 脑脊液采集情况

28 例恒河猴穿刺成功后,将带有微导丝的麻醉导管在 DSA 定位引导下经蛛网膜下腔置管于枕大池,埋置泵于腰背部,术后均能从泵中采集到无色透明的脑脊液。其中,对照组中有 2 例经腰椎间隙穿刺成功后在进入蛛网膜下腔时无脑脊液流出,经 DSA 下进微导丝至导管

表 1 改良 Tarbv 评分表

Table 1 Improved Tarbv score sheet

分级 Classification	具体描述 Specific description	得分 Score
0	后肢无活动,不能负重 There is no activity on the hind legs	0
1	后肢可见活动但不能负重 Visible activity of hind limb but not weight	1
2	后肢活动频繁或有力,不能负重 Hind limb activity is frequent or powerful, cannot load	2
3	后肢可支持体重,能走 1~2 步 Hind limb can support body weight, can walk 1 - 2 step	3
4	可行走,仅有轻度障碍 Can walk, only mild obstacles	4
5	行走正常 Normal walking	5

正常状态下,动物 Tarbv 评分为 5 分。Under normal condition, the animal Tarbv score is 5 points.

表 2 改良的切口愈合等级评分

Table 2 A modified incision healing rating criteria

分级 Classification	具体描述 Specific description	得分 Score
0	穿刺局部化脓,需切开引流等处理 Puncture local purulent, need to open drainage and other treatment	0
1	穿刺局部有炎症或渗血、漏液,如红肿、血肿、积液硬结等 Puncture local inflammation or bleeding, leakage, such as swelling, hematoma, effusion induration	1
2	穿刺局部愈合优良,无不良反应 Puncture local healing is good, no adverse reaction	2

远端发现其远端转折(图4),微退调整导管尖端方向,顺利进入枕大池。有3例(其中对照组2例,实验组1例)在置入泵准备缝合确认脑脊液抽吸情况时,发现抽吸受阻,负压增大,在 DSA 下进微导丝,微调导管远端方向和位置,回抽,脑脊液通畅,其原因是在置入泵过程中,导管和泵对接时因旋转了留在体外的导管,导致导管远端方向和位置移位。对照组有2例在腰椎穿刺时有创伤,造成最初的脑脊液稍带血色,后逐渐变成无色透明的脑脊液。有5例动物在术后第3天行脑脊液动态采集时,导管负压增大,致无法采集到脑脊液,拔出导管后观察,导管远端有血液凝固阻塞通道3例,皆为对照组,神经根组织堵塞引流管通道2例,对照组和实验组各1例。

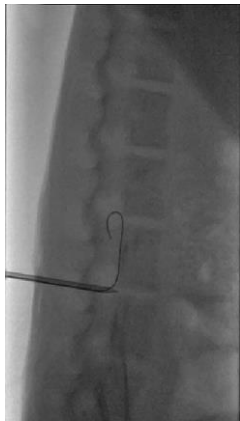


图4 导管远端转折

Fig. 4 Distal end of the catheter

2.4 行为学观察、神经功能评分及穿刺点情况

28只恒河猴均于置管术后1h左右清醒,术中和术后均无死亡,术后生命体征平稳。穿刺术后恒河猴的饮食、活动均于当天恢复正常,两组无显著性差异($P > 0.05$)。术后观察1周,腰椎穿刺点和皮下采样接口(泵)埋置位置伤口愈合良好,改良 Tarlov 评分标准评价其神经功能,显示穿刺前后均无神经损害,两组无显著性差异($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 实验动物脑脊液的采集方法

一类是经颈椎小脑延髓池置管法,需暴露C4~C5椎间隙并切除部分椎板,且手术部分的蛛网膜下腔易发生粘连,影响脑脊液循环及其成分,导管置入时易损伤血管,导致蛛网膜下腔出血(吕田明等2013);第二类是在颅骨上钻孔插管引流脑脊液,这种方法往往适合于一次性采集脑脊液,而再次采集脑脊液时却要再次麻醉动物,在原骨窗处清除骨腊或另开骨窗,重新置管(李惠勉等2000),操作有一定的难度且不易预留和固定导管,同时在暴露颅骨操作过程中,易大量出血,存在人为损伤脑组织、脑脊液外漏等问题,观察结果不够稳定可靠(孙建森等2007),多次穿刺过程中容易误刺到脑干,导致动物立即死亡,死亡率很高(Kelley et al. 2007);本实验在 DSA 定向引导下经腰椎间隙穿刺蛛网膜下腔至枕大池并埋泵,这种方法操作简便,安全性好,可行性强,手术损伤较小,导管定位准确,其成功率几乎为100%;通过埋置的泵采集脑脊液,快速省时,同时采集导管在体内可留置3个月,最频繁的采集可1~2h一次,也有1~2d采集一次,每次采集量0.5~1.0ml。

3.2 穿刺技巧

由于蛛网膜下腔外有由疏松结缔组织和静脉丛构成的硬膜外腔,内有富有血管的软脊膜,因此穿刺前要熟悉局部解剖结构,穿刺方向不当、歪斜、太深或太浅都可能导致穿刺失败或损伤周围组织(王忠诚2005),穿刺时,穿刺针垂直刺入恒河猴背部腰椎间隙,当感觉有落空感及动物的后肢跳动时,表明针尖已达蛛网膜下腔(田野等2004),退出针芯,可见清亮脑脊液流出。将带有微导丝的硬膜外导管缓慢送入穿刺针内,当送入约10cm左右后,感觉到导管尖端受阻,DSA下见微导丝远端已到针尖处,逐渐将穿刺针斜面从与动物矢状面平行位置旋转到与动物冠状面平行,同时将暴露在体外的穿刺针向足侧轻轻倾斜,轻进导管明显有突破感时,表明导管远端已进入蛛网膜下腔,

越过了穿刺针尖, 缓慢将带有微导丝的导管送至枕大池, 轻轻退出微导丝, 微导丝尖端会有无色透明的脑脊液点滴, 同时导管内有无色透明的脑脊液缓慢流出。

由于脑脊液中真正含有通透血脑屏障的成分, 因此在对中枢神经系统药效学的研究中采用脑脊液药理学的实验方法就比血清药理学更具说服力, 增加实验结果的可信度(梅建勋等 2000)。本实验在 DSA 技术下经腰椎间隙穿刺蛛网膜下腔并埋置泵采集脑脊液, 避免多次采集脑脊液时再次麻醉、穿刺动物, 将动物所受的伤害和应激降到最低程度(恽时锋等 2010), 通过主动强化训练的方式实现动物在清醒、全生理状态下对脑脊液进行采集(王辉等 2016), 快速省时, 大大降低了脑脊液采样的难度, 减少了劳动力消耗, 相应地减少了实验动物的消耗, 降低了实验动物成本, 从而提高非人灵长类实验动物的福利。由于采样导管置于枕大池, 采集到的脑脊液样品质量有保证, 可用于研究缺血性脑卒中发生机制, 且满足检验需要, 故此方法具有一定的实用价值, 采集的数据结果更有分析意义。

参 考 文 献

- Goldsmith H S, Steward E, Duckett S. 1985. Early application of pedicled omentum to the acutely traumatised spinal cord. *Paraplegia*, 23(2): 100–112.
- Huang H F, Zhang Y, Yang R, et al. 2008. Determination of baicalin in rat cerebrospinal fluid and blood using microdialysis coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 874(1/2): 77–83.
- Kelley D J, Farhoud M, Meyerand M E, et al. 2007. Creating physical 3D stereolithograph models of brain and skull. *PLoS One*, 2(10): e1119.
- Oreskovic D, Klarica M. 2010. The formation of cerebrospinal fluid: nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Research Reviews*, 64(2): 241–262.
- 高启贤, 张慧玲摘译. 1997. 脑脊髓液的采集和化验在诊断价值方面的研究进展. *动物医学进展*, 18(2): 40–42.
- Levy J A: 邵一鸣等译. 2010. 艾滋病病毒与艾滋病的发病机制. 2 版. 北京: 科学出版社, 38–40.
- 李惠勉, 李建章, 姚淑芬. 2000. 一种实用的采集兔脑脊液方法. *解剖学杂志*, 23(5): 488.
- 吕田明, 潘志勇. 2013. 啮齿类动物脑脊液取样技术. *中华临床医师杂志*, 7(24): 11623–11626.
- 梅建勋, 张伯礼, 陆融. 2000. 采用脑脊液药理学方法对中药影响星形胶质细胞神经营养作用的观察. *中药材*, 23(8): 467–470.
- 孙建森, 黎海涛, 应大君. 2007. 监测烧伤实验犬颅内压椎管内置管技术的探讨. *中国比较医学杂志*, 17(3): 174–176.
- 田野, 黎兰芝, 陈强, 等. 2004. 提高腰椎穿刺成功率的体会. *现代医药卫生*, 14(20): 1393–1394.
- 王辉, 郑虹. 2016. 医学实验动物伦理及福利. *实用器官移植电子杂志*, 4(2): 116–120.
- 王忠诚. 2005. 王忠诚神经外科学. 武汉: 湖北科技出版社, 169–170.
- 吴在德, 吴肇汉. 2008. 外科学. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 132.
- 杨之兰, 何东松, 鲁婷婷. 2015. 老年人侧入法与直入法腰椎穿刺比较. *云南医药*, 36(3): 348–349.
- 恽时锋, 田小芸, 董敏, 等. 2010. 医学实验动物福利伦理问题分析. *医学研究生学报*, 23(4): 397–400.
- 张升, 辛艳飞, 顾利强, 等. 2011. Beagle 犬脑脊液 (CSF) 多次采集手术模型的建立. *实验动物科学*, 28(5): 69–71.