

• 基础研究 •

两种新生儿缺血缺氧性脑病模型建模方法的比较

骆健明 庄明华 刘明发 白晔

[摘要] 目的 比较两种新生儿缺血缺氧性脑病(HIE)模型建模方法的差异,探讨麻醉和动物缺血缺氧间期对 HIE 动物模型的影响。方法 采用 7 d 龄 SD 乳鼠建立 HIE 模型。传统组动物乙醚麻醉后结扎左侧颈总动脉,休息 2~3 h,同时入 37℃水溶闭缺氧箱,持续充以 8%氧+92%氮的混合气体,气流量 1 L/min,维持 2.5 h。改进组动物动脉结扎手术前动物不予麻醉,且术后动物不作休息立即进行缺氧。比较建模过程中两组动物的存活情况;光镜下观察建模后 3 d 两组动物左侧大脑半球的病理变化情况,并比较两组动物病理总评分的差异。结果 改进组建模过程中所有动物未见死亡,传统组建模过程中 6 只动物死亡($P<0.025$)。建模后 3 d,改进组动物脑组织变性、坏死显著,病理总评分 550 分,传统组大部分动物脑组织未见明显病变,总评分 130 分($P<0.01$)。结论 传统 HIE 建模方法动物在建模过程中死亡率高,而存活的模型动物病理变化却不确切。改进的 HIE 建模方法模型动物个体之间均衡性好,脑部病变确切,建模过程中动物死亡率低,值得推广。

[关键词] 缺氧性脑病;动物模型;建模;大鼠

Comparison of two methods of building the hypoxic-ischemic encephalopathy model LUO jian-ming, ZHUANG ming-hua, LIU ming-fa, et al. Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong, China

[Abstract] Objective To compare the difference between the two methods in building the hypoxic-ischemic encephalopathy model, and to investigate the effect of anaesthesia and the hypoxic-ischemic intermission on the HIE model. Methods 7-day postnatal SD rats were used to build the HIE models. In the traditional group, rats were exposed to 8% O₂ for 2h 2~3 h after left carotid artery ligation followed aether anaesthesia. However, rats in the improved group received hypoxia immediately after operation without previous anaesthesia. The quantity of the dead rats in two groups was counted. The morphologic changes in the brain 3 days after the hypoxic-ischemic insult were observed, and the grades of the total brain pathological evaluations of two groups were compared. Results None of the animals died in the improved group, but 6 died in the traditional group. Remarkable degeneration or necrosis was detected in the ipsilateral cerebral cortex and hippocampus in the improved group, but not detected in most of the rats in the traditional group. The total grade of brain pathological evaluation in the traditional group was 130, significantly lower than that in the improved group, which was 550($P<0.01$). Conclusion The improved approach show the advantage of low mortality and credible pathological change to build the HIE model compare with the traditional methods.

[Key words] hypoxic-ischemic encephalopathy; animal model; modeling; rat

中图分类号:R722.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)07-0548-02

[本文著录格式] 骆健明,庄明华,刘明发,等.两种新生儿缺血缺氧性脑病模型建模方法的比较[J].中国康复理论与实践,2005,11(7):548-549.

新生儿缺血缺氧性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿期危害最大的常见病。HIE 动物模型是研究新生儿缺血缺氧性脑病的基础。本课题组经过多次实验发现,传统的 HIE 模型在建模过程中动物的死亡率较高,病理结果不够稳定。近年来有学者在传统的建模的过程中省去了麻醉的步骤和动物手术后的休息时间(缺血缺氧间期)。本文对这两种建模方法作一比较。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 新生 7 d SD 乳鼠共 40 只,雌雄不拘,体重 10~14 g,由上海希普尔-必凯实验动物中心提供。随机分为传统组和改进组各 20 只。

1.2 造模方法

1.2.1 传统组 乳鼠无水乙醚吸入麻醉,动物安静后置于左手掌内,右手持眼科剪剪开胸腺至胸骨上窝颈正中皮肤,长约 5 mm,分离皮下组织,于胸锁乳突肌内

侧与颈前肌交界的三角区域内分离左颈总动脉,用 0 号丝线结扎动脉两端,并从中剪断血管,6/0 丝线缝合切口。手术总时间约 1 h。术后 2~3 h,所有动物同时入 37℃水溶闭缺氧箱(购于上海儿科医学研究所),持续充以 8%氧+92%氮的混合气体,气流量 1 L/min,维持 2.5 h,室温 24℃。

1.2.2 改进组^[1] 乳鼠不麻醉,清醒状态下仰卧于手术板上,用医用透气胶布固定四肢和头部,动脉结扎过程和传统模型组相同。每只动物分别标记,术后立即放入缺氧箱,缺氧时间达 2.5 h 后分别开箱取出。其他方法均和传统组相同。缺氧过程用测氧仪持续监测,确认箱内氧气浓度维持在 8%。

1.3 病理观察 两组建模后存活的动物均于缺血缺氧后 3 d 乙醚麻醉并称重后剪开胸腔,心脏内灌注 PBS 5~10 ml,然后灌注 4%多聚甲醛 5~10 ml,断头取脑,用相同的固定液固定过夜,常规脱水、石蜡包埋、切片(片厚 2 μm),HE 染色。观察每只大鼠左脑连续 5 张切片的病理变化情况,计算 5 张切片脑部的病理变化总和作为该大鼠的病理评分。病理评分标准^[2]:正常(1 分),胶质细胞增生(2 分),点状变性(3 分),点状坏死(4 分),灶状变性(4 分),灶状坏死(5 分),片状

基金项目:广东省科技计划项目(2003c33902)。

作者单位:515041 广东汕头市,汕头大学医学院第二附属医院神经外科。作者简介:骆健明(1978-),男,广东河源市人,硕士,医师,主要研究方向:中枢神经系统损伤的修复。

变性(5 分),片状坏死(6 分),弥漫性变性(6 分),弥漫性坏死(7 分)。

1.4 统计学方法 两组动物死亡率比较采用 χ^2 检验,左脑病理总评分比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 行为观察 传统组:缺氧 10 min 后动物躁动不安,呼吸急促;40~60 min 后活动明显减少,一些动物呼吸转为浅慢,全身苍白,躯体僵直,很快动物死亡;1.5 h 后 45% 出现嗜睡、激惹现象,未出现拖腿及旋转运动。改进组:缺氧 5 min 动物躁动不安,翻滚,肢体快速颤动,偶有抽搐;15 min 后动脉结扎侧皮肤出现紫绀,以嘴唇及耳廓尤为显著,同时呼吸加深加快,25~30 min 后 95% 动物站立不稳,爬行时右后肢托步并固定向左侧旋转;1 h 后大部分出现嗜睡、激惹现象。模型动物在饲养过程中体重增长缓慢,个别动物体重不增甚至减轻;所有模型动物左眼延迟睁眼,睁眼后眼裂较对侧小。

2.2 病理观察 改进组有 16 只动物左侧皮层(枕顶叶为主)出现萎缩,软化灶形成,部分有脑室扩张和空洞形成。传统模型组大体标本未见明显异常。HE 染色光镜下观察,改进组动物脑组织变性、坏死较显著(封三图 2.1~图 2.2),病变主要集中在左侧枕顶叶皮层和海马的 CA1、CA3 区。其中 11 只以坏死为主,表现为病变局部细胞数目稀少,体积缩小,细胞间质结构模糊或消失,嗜伊红染色变淡,坏死细胞核固缩、裂解;8 只以变性为主,表现为胞浆嗜伊红染色增强或呈细网状改变;1 只部分区域胶质细胞增生;6 只在左侧枕叶皮层可同时观察到变性和坏死现象。传统组 7 只脑组织结构层次清晰,细胞轮廓正常,核居中,核仁清楚;4 只脑组织呈点状变性;1 只脑组织点状坏死;2 只可见胶质细胞增生。

传统组左脑半球病理总评分 130 分,其中变性总评分 45 分,坏死总评分 20 分,胶质细胞增生总评分 30 分,正常总评分 35 分,平均(9.29±5.14)分;改进组左脑半球病理病理总评分 550 分,其中变性评分 190 分,坏死评分 335 分,胶质细胞增生评分 10 分,正常评分 0 分,平均(13.28±5.36)分($P<0.01$)。

2.3 存活率比较 改进组在缺氧结束后未见动物死亡。传统组缺氧结束后 6 只动物死亡,其中结扎动脉过程中死亡 2 只,缺氧过程中死亡 4 只。存活率有显著性差异($P<0.025$)。

3 讨论

建模过程应尽量与人类发病过程相似,才能很好地模拟人类疾病的发生。传统 HIE 模型是在动物麻醉的基础上建立的,这与临床上新生儿缺血缺氧性脑病发生时的情况不同。麻醉剂对动物的生理有重要影响:一方面,麻醉剂对神经元有保护作用^[3-4],并能持续较长的时间,其机制可能与降低脑温、抑制谷氨酸的释放、拮抗 NMDA 受体^[5]等有关,这可能是导致传统组

动物脑内病理变化不显著的原因之一;另一方面,麻醉抑制呼吸^[6],且麻醉深度难于掌握,如麻醉过度,动物在手术过程常因低氧血症和 CO_2 潴留而死亡。本实验传统组动物术后休息时间为 2 h,此时部分动物尚未完全清醒,呼吸状况尚未得到恢复,因而对缺氧的耐受性较差,容易在缺氧过程中死亡。因新生鼠活力较差,改进组动物在非麻醉状态下进行手术,经胶布确切固定后能顺利完成整个手术操作,并未影响手术效果及速度,而且术后动物仍然能保持足够的活力以耐受接下来的缺氧过程,因而是可行的。

在传统建模过程中,如果要避免麻醉对动物的影响,就要求动物手术后的休息时间(缺血缺氧间期)较长,待麻醉药的作用完全消失之后才能进行下一步的实验,这与临床所见人类围产期缺血缺氧的自然病程不够符合。而且,如果缺血缺氧间期过长最终动物脑部的病理损伤程度将不明显,因为在缺血早期,脑血管发生痉挛,动脉结扎侧脑血流减少,脑细胞将遭受缺血损害。然而随着时间的推移,乙酰胆碱酶等的活性逐渐升高^[7-8],对脑组织具代偿、保护作用;缺血后一氧化氮等物质的释放也使痉挛的脑血管逐渐舒张^[9],使缺血侧脑血流逐渐通过脑底动脉环获得充分的代偿。

改进组中每只动物结扎动脉后立即投入箱中缺氧,每只动物分别计时,缺氧时间到达后分别取出,保证每只动物缺氧时间相同;测氧仪监测结果显示,反复的开箱操作并未影响箱内的氧浓度。传统组所有动物同时放入缺氧,造成每只动物术后休息时间不一,导致先行结扎的动物由于麻醉药的影响已消失,较容易存活,但病理变化不显著;而后结扎的动物尚未脱离麻醉期,容易在缺氧过程中死亡。

从本文比较的结果看,麻醉和动物缺血后的休息时间对动物的影响很大,甚至关系到建模是否成功,不容忽视。

[参考文献]

- [1] 陈惠金,周建德,周泽汉,等.新生大鼠脑缺血缺血损伤模型的制备[J].上海实验动物科学,1999,19(3):159-160.
- [2] 陈惠金,张忠德,周建德.脑缺血缺血损伤新生大鼠的脑形态学研究及病理量化评分[J].上海医学,2000,23(11):682-684.
- [3] Drummond JC. Brain protection during anesthesia[J]. Anesthesiology, 1993, 79(5):877.
- [4] Weber ML, Taylor CP. Damage from oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is prevented by tetrodotoxin, lidocaine and phenytoin without blockade of action potentials[J]. Brain Res, 1994, 664(1-2):167-177.
- [5] Verhaegen M, Iaizzo PA, Todd MM. A comparison of the effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane on cerebral energy stores at the time of ischemic depolarization[J]. Anesthesiology, 1995, 82(5):1209-1215.
- [6] 卜碧涛,王伟,张苏明.大鼠脑缺血模型制作过程中麻醉方法的选择与应用[J].同济医科大学学报,1998,27(3):202-205.
- [7] Ott EO, Abraham J, Meyer JS, et al. Disordered cholinergic neurotransmission and dysautoregulation after acute cerebral infarction[J]. Stroke, 1975, 6(2):172-180.
- [8] 王秋桂,陈业文,何丽娅,等.大鼠颈总动脉闭塞性休克时对海马结构 SOD、MDA、ACHE 水平影响的研究[J].咸宁医学院学报,1998,12(4):212-215.
- [9] Kinouchi H, Kamii H, Mikawa S, et al. Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: a study using SOD-1 transgenic mice[J]. Cell Mol Neurobiol, 1998, 18(6):609.

(收稿日期:2005-02-02)