

脑性瘫痪动物模型造模方法研究进展*

何 琪, 邵先桃[△], 张星贺, 董美辰

(云南中医学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 由于儿童脑性瘫痪的发病原因及机制复杂、多样, 而稳定的动物模型是研究脑性瘫痪的基础, 为更好的选择适用的动物模型造模方法, 笔者查阅了对近 10 年来国内外关于脑瘫模型的相关文献, 从常用动物模型的制作和评估方法两方面进行综述, 以期儿童脑瘫的研究提供参考。

关键词: 脑性瘫痪; 动物模型; 造模方法

中图分类号: R742.3

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2015)06-0097-04

脑性瘫痪(Cerebral palsy, CP)简称脑瘫, 是一组持续存在的中枢性运动和姿势发育障碍、活动受限症候群, 这种症候群是由于发育中的胎儿或婴幼儿脑部非进行性损伤所致。患儿还常伴发许多其他的障碍, 如感觉、知觉、认知、交流、和行为障碍, 以及癫痫和继发性肌肉、骨骼问题^[1]。在发达国家新生儿 CP 发病率为 2‰, 甚至更高^[2], 我国脑瘫发病率有逐年增多的趋势^[3]。CP 不仅严重影响了患儿的正常生长发育、社会交往、学习和生存的能力, 而且造成了家庭和社会的经济负担, 是一个重大的卫生经济问题。目前 CP 的发病机制尚未完全, 也无相应的有效的治疗策略。为了对该 CP 进行有效的预防和诊断治疗, 研究并明确 CP 发生发展机制至关重要, 而有效而实用的 CP 动物模型的制备是前提。因此, 本文从 CP 动物模型的制作和评估方法两方面进行综述。

1 CP 模型动物的选择

目前, 国内外报道的运用于 CP 模型的动物主要有羊、猪、兔和鼠等。脑白质损伤(White matter injury, WMI)是脑损伤的主要病理变化之一, 能导致髓鞘损伤和神经纤维不能髓鞘化等, 从而导致 CP 患儿慢性神经功能障碍^[4], 发育中的大脑在缺氧缺血时特别容易形成脑白质的损伤, 而胎羊的脑白质发育在生理和解剖方面与人类有很多共通之处, 从而为研究复杂的人类脑损伤的病理生理过程提供了途径^[5]。

新生猪在生长发育、血液循环、新陈代谢等各方面与新生儿相似。相关研究发现, 新生猪在出生 7d 内, 大脑的发育成熟度与人类新生儿相近, 在磁共振频谱分析上, 新生猪的波峰特点也与人类新生儿相吻合, 因此我们可以选用新生猪来作为实验动物, 模拟人类新生儿大脑缺氧缺血性时的病理变化^[6]。

大鼠神经解剖与人类极为接近^[7], 且鼠的大小合适、繁殖能力强、抗感染能力强、实验方便和比较经济; 大鼠脑组织体积小, 便于取材, 进行病理切片的观察, 同时, 大鼠情绪反应较为敏感, 便于进行神经行为学观察。由于胎羊和新生猪等大型动物不易获得、易死亡、费用昂贵和饲养条件受到限制等原因, 目前大多选用鼠做为实验 CP 模型动物。

2 CP 模型造模方法

小儿 CP 的病因常被总结为窒息、早产和核黄疸等因素^[8]。目前 CP 模型的造模方法基本可分为颈总动脉结扎法、宫内感染法、神经毒素法、宫内缺氧缺血法等。

2.1 颈总动脉结扎法

缺氧缺血是 CP 发生的常见病因。典型的缺氧缺血 CP 模型的操作有: 参照 Adem 等^[9-10]的建模方法, 使用出生满 7d 的健康 Wistar 幼鼠进行模型制备, 首先吸入异氟醚麻醉后, 用浓度为 75%乙醇消毒颈部皮肤, 在手术显微镜下于颈正中行一长约 0.5cm 的纵行切口, 然后分离皮下组织和浅筋膜等,

* 基金项目: 国家自然科学基金(81460748)

收稿日期: 2015-09-21

作者简介: 何琪(1991-), 女, 湖北武汉人, 在读硕士研究生, 主要从事推拿防治小儿脑瘫的基础与临床研究。

[△]通信作者: 邵先桃, E-mail: taixiantao@163.com

颈总动脉位于右侧颈动脉三角内,在找到颈动脉和伴行的迷走神经后,将其小心分离,接着以丝线双重结扎右侧颈总动脉并离断,最后缝合颈部皮肤切口。术后麻醉恢复 2h 后,将模型幼鼠放置在由 8% O_2 和 92% N_2 的混合气体造成的缺氧环境中,时间为 2h。随后在不同的时间点对实验动物采用动物行为学试验如平衡木试验和足印分析等,运动诱发电位及病理检测等来验证 CP 模型。缺氧可导致脑血流增加,但白质区不如灰质区明显,脑血流量增加导致代偿能量利用,因此缺氧可导致严重的脑白质损害。在胚胎早期缺血可引起脑发育畸形,胚胎后期可发生破坏,如孔洞脑、脑软化症和无脑性脑积水等,缺氧缺血发生在围生期可造成脑梗死、脑出血等严重损伤。

但是也有部分报道称该方法更易引起灰质的损伤而非白质,进而提出了双侧颈总动脉切断的模型,然而,双侧颈总动脉结扎的动物存活率低于单侧颈总动脉结扎的存活率^[11]。单侧颈总动脉结扎法经过多番验证被认为是一种可靠且稳定的模型^[12]。

2.2 宫内感染法

WMI 是早产儿脑损伤最常见的类型,脑白质损伤产生的原因复杂,但炎症反应在脑白质损伤中产生的作用在近几年来受到较大重视^[13]。近年来,大量研究表明围产期感染,如绒毛膜羊膜炎和胎儿血管炎不仅是早产的重要原因,同时与早产儿脑损伤的发生密切相关^[14]。采取孕鼠腹腔内或子宫颈内注射脂多糖,以建立 CP 模型,最为常见,应用最广泛。

2.2.1 腹腔内注射法

李晓婕等^[15]将国外学者的腹腔内注射建立 CP 模型的方法加以改进,主要步骤有:将 24 只 Wistar 孕鼠分为 2 组,实验组 16 只,对照组 8 只,实验组每天注射 1 次脂多糖,每次为 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$,连续注射 2d,对照组则腹腔注射同剂量的生理盐水。观察孕鼠的分娩时间并记录新生鼠出生体重,凡早于孕 22d 出生的新生鼠均视为早产鼠,待新生鼠出生后立即处死分娩后的母鼠,取其子宫和胎盘,通过做 HE 染色观察宫内感染情况来验证 CP 模型是否成功。

2.2.2 子宫颈内注射法

邱洪斌等^[16]复制 CP 模型的方法是:模型动物选用成熟 Wistar 大鼠,孕鼠在受孕第 10 天、第 15 天及第 20 天分别代表妊娠早、中、晚的不同时段,对其分组后给药,给药时先乙醚吸入麻醉孕鼠,再

用阴道扩张器暴露孕鼠子宫颈,将 0.1mL 脂多糖溶液用 1mL 注射器注射到子宫颈肌肉内(脂多糖溶液浓度为 0.1mg/kg 孕鼠体重称取脂多糖溶于 0.1mL 生理盐水中),注射时不可将液体注入子宫腔内,同时确保操作熟练度,每只孕鼠操作时间不得超过 2min。

2.2.3 腹腔注射脂多糖合并缺氧法

高峰等^[17]的 CP 建模方法:选用受孕 17d Wistar 孕鼠经腹腔注射脂多糖,剂量为 0.4mg/(kg·d),于注射 12h 后将孕鼠置于由 8% 氧气和 92% 氮气构成的缺氧环境中缺氧 2~2.5h,待孕鼠恢复 4h 后,再次腹腔注射同剂量脂多糖,最后放回笼中饲养,等待孕鼠自体分娩后将生下的乳鼠和母鼠同笼饲养。Hu 等^[18]采用腹腔注射脂多糖宫内感染合并全身缺氧的方法建立一种微创伤、简单易行、成功率高、逼真模拟人类胎儿在围产期缺血缺氧过程的 CP 动物模型。

2.3 神经毒素法

胆红素血症时,胆红素通过血脑屏障,损害中枢神经系统,病变特点在脑基底核、海马、视丘下核和齿状核等被感染成亮黄或深黄色。镜下观察上述部位的神经细胞核小胶质细胞不同程度变性,大量神经元丢失和神经胶质细胞增生替代。孙叶强等^[19]的 CP 建模方法是:给 2 组实验组仔兔分别腹腔注射胆红素 100 mg/kg、300 mg/kg,正常组及给药后的实验组由母兔自然哺育 45d。通过神经学检查和病理学检查,发现其中部分仔兔有明显运动姿势异常,其病理改变也同人类相似,提示腹腔注射胆红素 300 mg/kg 能造成仔兔脑损伤并致 CP。

2.4 宫内缺氧缺血法

宫内缺氧缺血法是近几年研究的较多的方法之一,模型动物多选用健康新西兰白兔,Drobyshevsky 等^[20]的方法是选用妊娠 22d 的新西兰白兔,使用芬太尼(75 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}^{-1}$)和氟哌利多(3.75mg/kg·h⁻¹)静脉复合麻醉,随后用 0.75% 布比卡因腰麻,沿着左侧腹股沟中点切开皮肤,分离股动脉和其他软组织后,在股动脉上做一纵行切口,由此插入一球囊导管,进入下行的主动脉至上段子宫颈动脉。期间用直肠温度探头监测体温。气囊充气 40min,导致子宫缺血和随后的宫内胎兔全脑缺氧缺血。待缺氧缺血期结束时,将气囊放气,造成子宫灌注和胎儿脑组织再灌注的复氧期,最后取出导管,修复股动脉,使其恢复。

国内的做法也大同小异,王能里等^[21-22]则是在气囊内注入生理盐水,且发现动脉供血阻断的时间越长,随之造成的脑损伤程度也不同。根据雌兔孕期长短的不同,子宫动脉血流阻断时间也要相应改变。孕 26d 的雌兔子宫供血阻断的时间可以长达 35~37min,而孕 29d 的雌兔最佳的阻断动脉供血的时间应该为 25~28min,当时间延长到 40~50min,死胎率可以达到 100%,合理的时间能控制死胎率同时造成理想的脑白质损伤和神经行为学的异常。

2.5 腹腔注射合并缺氧缺血法

Alexandre Savard 等^[23]的模型制备方法是待孕鼠自然生产后,于第 12 天给予乳鼠腹腔注射脂多糖(按 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 稀释于 50 μL 生理盐水中),乳鼠恢复 4h 后异氟醚麻醉进行右侧颈总动脉结扎术,使用加热垫使温度保持在 37 $^{\circ}\text{C}$,回笼休息 30min 后将幼鼠置于 8% O_2 的缺氧空间内 1.5h,温度保持为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。研究发现将腹腔注射脂多糖与缺氧缺血相结合时,能造成更严重的脑损伤,并且当缺氧时间超过 3h 后,乳鼠死亡率达到最高值^[24]。

2.6 其他 CP 模型

除以上几种动物模型外,还有采用电损毁锥体束建立一侧肢体痉挛性 CP 的模型。实验动物选用健康 SD 大鼠,大鼠腹腔麻醉后固定在大鼠脑定位仪上,电极阳极针连接定位仪备用,大鼠头顶备皮,同时鼠尾部插入电极阴极针,在头顶后正中行一约 3cm 的切口,逐层切开,暴露前囟和矢状缝,根据大鼠脑瘫立体定位图定位,用骨钻穿透颅骨,再垂直刺入电极针进行电刺激,随后拔针止血,用骨蜡封住钻孔,最后缝合伤口^[25]。由于动物模型症状不典型或症状持续时间较短,李亮等^[26]采用颅内注射无水乙醇的方法制作痉挛性 CP 模型。这种方法在定位后,使用微量注射器在颅内注射无水乙醇造成模型动物锥体束坏死,研究中发现注射剂量为 15 μL 时效果较好,能较好地模拟痉挛性 CP 的生理病理改变。

3 模型评估方法

现有的模型评估方法主要有动物一般情况评估法、行为学评估法及病理检测法等。

3.1 一般情况观察

模型动物一般情况观察主要包括间断体重测量、幼鼠出生时及后期皮肤颜色、每日活动量等,可以反映模型动物出生及后期的生长情况。

3.2 行为学评估法

动物行为学是判断造模成功与否的重要观察指标,从检测目的来看,基本可分为感觉运动类和学习记忆类。感觉运动类即观察动物运动发育情况,常用方法有平衡木、足印试验、翻身实验、悬吊实验、斜坡实验、旋转试验、圆筒试验、旷场试验等;学习记忆类主要包括水迷宫试验、穿梭试验等^[27-29]。其中运用最多的主要是旷场试验和水迷宫试验,前者用来评估全脑结构的完整性,后者用来评估海马的空间学习和记忆能力^[30]。

3.3 病理切片鉴定法

病理切片是判断造模成功与否最确切的证据。首先对造模成功的模型动物使用 4%多聚甲醛灌注固定,断头剥取脑组织,放入 4%多聚甲醛溶液内固定,换蔗糖溶液至脑组织沉入瓶底,截取所需脑组织制成 5 μm 厚石蜡切片行 HE 染色,分析切片。常可见到的异常是白质与灰质、海马区界限不清,海马区无规整紧实排列的单层神经元细胞层,神经元数量少,发育不成熟等^[31]。

4 小结

研究急性和亚急性的生理和代谢机制的 CP 模型多选用胎羊和新生猪等动物,而啮齿类动物和灵长类动物多被运用于观察长期的神经病理学及行为学的 CP 建模。宫内缺氧缺血法的优点在于不仅能逼真的模拟新生儿在子宫内获得的全脑缺氧缺血性病理损伤,并且能诱发胎兔在神经行为学上的病理性异常改变,但其不足同子宫颈注射脂多糖的方法一样,实验过程复杂,加大了实验的难度和不确定性;腹腔注射脂多糖造成宫内感染的方法简便易行,同样能模拟胎儿在母体子宫内获得的感染,但我们在实践过程中发现宫内感染的模型制备方法可重复性较低,难以制作出符合条件的脑瘫模型,而其他的模型制作方法尚不成熟。综上所述,最为经典的是单侧颈总动脉结扎的方法,该法自发表以来已被国内外学者广泛采用,已经趋向成熟稳定,且实验简便易行,可重复性好,是目前缺氧缺血性脑病模型优先选择的方法之一。在模型评估方面,无论用动物行为学还是病理切片方法,一般情况观察的均不可少,动物行为学评估法还要根据实际需要选择合适的行为学实验方法。

参考文献:

- [1] 李晓捷,唐久来,马丙祥,等. 脑性瘫痪的定义、诊断标准及临床分型[J]. 实用儿科临床杂志,2014,29(19):1520.

- [2] Ouskoi M, Coutinho F, Dykeman J, et al. An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2013, 55(6):509-519.
- [3] 刘冬. 警惕小儿脑瘫的发病率及预防 [J]. *中外医疗*, 2011, 30(32):71.
- [4] 毛凤霞. GPR17 调控脑白质损伤后内在修复潜能的研究进展[J]. *临床儿科杂志*, 2012, 30(3):287-290.
- [5] Back SA, Riddle A, Dean J, et al. The instrumented fetal sheep as a model of cerebral white matter injury in the pre-mature infant[J]. *Neurotherapeutics*, 2012, 9(2):359-370.
- [6] 李仰康. 新生猪缺氧缺血性脑损伤动物模型磁共振 ADC 值、H-MRS 和组织病理学的对照研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2005.
- [7] Spiegler M, Villapol S, Biran V, et al. Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2007, 66(6):481-490.
- [8] 尤登攀, 王冬, 王兴宏, 等. 小儿脑性瘫痪的病因学研究进展[J]. *中国现代药物应用*, 2012, 6(19):116.
- [9] Aydin A1, Gen K, Akhisaroglu M, et al. Erythropoietin exerts neuroprotective effect in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Brain Development*, 2003, 25(7):494-498.
- [10] 李江. 新生乳鼠脑缺血缺氧模型制作及评价的实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2008.
- [11] 连俊兰, 余琴, 王艳. 幼年大鼠缺氧缺血性脑病动物模型的研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2007, 16 (27):3947-3948, 3950.
- [12] 秦明, 朱虹, 魏云艳, 等. 脑瘫模型的制作与鉴定[J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(26):49.
- [13] 郭琛, 薛辛东. 感染/炎症与早产儿脑白质损伤[J]. *中国新生儿科杂志*, 2014(2):136-139.
- [14] McElrath TF, Hecht JL, Dammann O, et al. Pregnancy disorders that lead to delivery before the 28th week of gestation: an epidemiologic approach to classification [J]. *Am J Epidemiol*, 2008, 168(9):980-989.
- [15] 李晓捷, 高晶, 孙忠人, 等. 宫内感染致早产鼠脑瘫动物模型制备及其鉴定的实验研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2004, 19(12):885-889.
- [16] 邱洪斌, 王景涛, 王柏欣, 等. 宫内感染致脑发育损害的动物模型研究[J]. *黑龙江医药科学*, 2008, 31(2):46-47.
- [17] 高峰, 杨小朋, 陈刚, 等. 应用孕鼠腹腔注射脂多糖合并缺氧方法制作脑瘫动物模型的实验研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2011, 10(7):489-491.
- [18] Hu Y, Chen G, Wan H, et al. A rat pup model of cerebral palsy induced by prenatal inflammation and hypoxia[J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(9):817-824.
- [19] 孙叶强, 李晓捷. 胆红素致新生兔脑瘫动物模型的实验研究[J]. *中国康复*, 1999, 14(2):65-67.
- [20] Drobyshevsky A, Takada SH, Luo K, et al. Elevated spinal monoamine neurotransmitters after antenatal hypoxia-ischemia in rabbit cerebral palsy model [J]. *J Neurochem*, 2015, 132(4):394-402.
- [21] 王能里, 南燕, 柳艳丽, 等. 近足月胎兔持续宫内缺氧缺血性脑损伤模型的建立 [J]. *中国病理生理志*, 2012, 28(4):760-764, 768.
- [22] 南燕, 唐震海, 王能里等. 未成熟胎兔缺氧缺血性脑损伤模型的建立[J]. *临床儿科杂志*, 2014, (6):564-569.
- [23] Savard A, Brochu ME, Chevin M, et al. Neuronal self-injury mediated by IL-1 and MMP-9 in a cerebral palsy model of severe neonatal encephalopathy induced by immune activation plus hypoxia-ischemia [J]. *J of Neuroinflammation*, 2015, 12(1):111.
- [24] Savard A, Lavoie K, Brochu ME, et al. Involvement of neuronal IL-1 β in acquired brain lesions in a rat model of neonatal encephalopathy[J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 10(1):110.
- [25] 曹冉. 电毁损法与无水乙醇破坏锥体束法分别制作 SD 大鼠痉挛性脑瘫模型及其病理改变的实验研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [26] 李亮. 建立 SD 大鼠痉挛性脑瘫模型的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [27] Zhang Y, Lan R, Wang J, et al. Acupuncture reduced apoptosis and up-regulated BDNF and GDNF expression in hippocampus following hypoxia - ischemia in neonatal rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 172:124-132.
- [28] Xie C, Zhou K, Wang X, et al. Therapeutic benefits of delayed lithium administration in the neonatal rat after cerebral hypoxia-Ischemia[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e107192.
- [29] Mucci Dde B, Fernandes FS, Souza Ados S, et al. Flaxseed mitigates brain mass loss, improving motor hyperactivity and spatial memory, in a rodent model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Prostaglandins Leukot Essential Fatty Acids*, 2015, 97:13-19.
- [30] Wilson MD. Animal models of cerebral palsy: hypoxic brain injury in the newborn[J]. *Iran J Child Neurol*, 2015, 9(2):9-16.
- [31] 贺媛媛. 宫内感染序贯缺氧缺血性脑性瘫痪鼠模型构建与评估[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.

(编辑: 徐建平)