

胶原酶诱导的脑出血大鼠模型及其行为学改变

李红玲¹ 吴红然² 郭艳苏² 李春岩³

摘要 目的:建立稳定的脑出血大鼠模型,并观察其行为学及组织结构变化。方法:采用Ⅶ型胶原酶 0.5U/2.5μl 生理盐水,在立体定位仪下注入大鼠尾状核,然后在不同时间观察其行为学及形态学变化。结果:模型成功率 80%,出血后 6h 大体形态可见明显出血灶,直径约 3.0—3.5mm,且血肿大小、形态、部位相近;光镜下可见出血早期神经细胞水肿,白细胞浸润,后期神经胶质细胞、血管内皮细胞及神经细胞增生;大鼠行为学改变明显,并可持续到出血后 7d。结论:此模型死亡率低,成功率高,血肿稳定,行为学改变明显,病理学改变符合临床。

关键词 胶原酶;脑出血;模型;行为改变;组织改变

中图分类号:R493,R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-11-0977-03

Intracerebral hemorrhage model induced by injection of bacterial collagenase VII and the behavioral changes in rats/LI Hongling, WU Hongran, GUO Yansu/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21 (11):977—979

Abstract Objective:To make a model of intracerebral hemorrhage (ICH) in rat and to study the changes in the behavior and tissue structure during absorption of the hematoma.**Method:**A model of ICH was established by stereotactically injection of 0.5U bacterial collagenase VII per 2.5μl NS into caudate nucleus in rats. The behavior of rats with ICH was studied by measurement of Bederson score, beam-walking test, bilateral forepaws grasp and fore-limb placing. The changes in histology were observed. **Result:** The successful ratio of establishment of this model was 80%.The behavioral changes were significant in experimental rats. There were obvious hematomas at 6h after hemorrhage and the size, shape and position of hematomas were stable. The diameters of hematoma were about 3.0—3.5mm. In the earlier period, the neuron cells were swelling. In the late period, a lot of glial cells, endothelial cells of vessel and neuron cells appeared around hematoma. **Conclusion:**The ICH model in rat by intracerebrally injection of collagenase was reproducible. The obvious behavioral changes and histological changes were similar to clinical patient with ICH.

Author's address Dept. of Rehabilitation, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050000

Key words bacterial collagenase VII; intracerebral hemorrhage; model; behavioral changes; histological changes

脑出血模型一般多用脑内直接注血法,但对小动物来说,注血量、血肿大小与部位都难以控制^[1-2],使脑出血的实验研究受到一定限制^[3]。自 Rosenberg 等 90 年代介绍了一种脑内注射胶原酶诱发大鼠脑出血模型后,相关研究人员开始应用,并对 Rosenberg 方法进行了改进^[4-7],认为此方法简单,模型稳定。本研究应用Ⅶ型胶原酶成功诱发了脑出血模型,该模型表现出明显的神经功能异常。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

实验动物用健康雄性 SD 大鼠 70 只,体重 270—300g,由河北医科大学基础医学院实验动物中心提供,以标准饲料和纯净水喂养,饲养环境为我院动物室多层层流架(河北省石家庄市长风净化设备厂,河北省实验动物研究中心监制),恒温(20—25℃)。脑立体定位仪(江湾 I 型 C)。随机分为两组,实验组(35 只)和对照组(35 只),每组又分为术后

6h、12h、24h、48h、72h、7d、14d,7 个时相点,每个时相点 5 只。

1.2 材料与试剂

电子天平(日本 AND HR-120,精确度为 0.1mg);恒温干燥箱(北京市朝阳区来广营医疗器械厂);微量注射器 5μl;行为学评定用具(自制);手术器械;麻醉药速眠新 II(长春军需大学兽医研究所生产);Ⅶ型胶原酶(美国 Sigma 公司),用生理盐水配制成 0.2U 胶原酶/μl 的溶液。

1.3 动物模型建立

速眠新 II 号(0.8—1.0ml/kg)右侧背部肌肉注射麻醉,俯卧位将大鼠头部固定在立体定位仪上,使前囟和后囟在同一平面上。头部去毛,消毒,于颅正中

1 河北医科大学第二医院康复科,石家庄市和平西路 215 号,050000

2 河北医大二院神经内科实验室

3 通讯作者:李春岩(河北医科大学第二医院神经内科,050000)

作者简介:李红玲,女,主任医师,硕士研究生导师,博士

收稿日期:2006-03-14

切开头皮约 2cm,前凶后 1mm,中线向右旁开 3mm 处于颅骨上钻一直径约 1mm 的小孔(尾状核部位),深达骨膜,然后将含有 0.5U 胶原酶/2.5μl 生理盐水微量注射器垂直固定在立体定位仪上,使针头与小孔在一条直线上,进针约 6mm(尾状核位置),然后缓慢推入脑内,注射完毕后,将针留置 10min,然后将微量注射器缓慢退出,用医用石蜡封闭骨孔,并给动物编号。对照组为假手术组,操作方法同上,将微量注射器缓慢进入脑内,注射同等剂量的生理盐水,留针 10min。

1.4 大鼠行为学评测

术前及术后不同时相点按下列 4 种方法进行行为学评测。

1.4.1 Bederson 评分^[8]:轻抓大鼠尾巴,提起高于桌面 10cm,正常大鼠两个前爪伸向桌面。脑损伤大鼠,其对侧前肢屈曲,姿势变化从轻度屈腕、伸肘、肩外展,到严重的腕肘屈曲、肩内旋外展。将大鼠放在一张大、软、有弹性、光滑的记录纸上,利于爪子抓牢。然后提起尾部,用手轻推大鼠肩部,直到前肢滑动几公分。这一动作在不同方向重复数次。正常或轻度功能障碍的大鼠,会在不同方向以同样的力抵抗推力。0分:无神经功能缺损;1分:前肢出现任何屈曲成分(即提尾悬空实验阳性),不伴其他不正常;2分:侧推抵抗力下降(即侧向推力实验阳性),伴前肢屈曲,无转圈行为;3分:同 2 级行为,伴自发性旋转(自由活动向瘫痪侧划圈)。

1.4.2 平衡木行走试验(beam-walking test)^[9]:测定运动整合及协调能力,平衡木长 80cm,宽 2.5cm,平放在距离地面高 10cm 处,按 Feeney 的记分标准:0分:穿过平衡木,不会跌倒;1分:穿过平衡木,跌倒机会少于 50%;2分:穿过平衡木,跌倒机会大于 50%;3分:能穿过平衡木,但受累的瘫痪侧后肢不能帮助向前移动;4分:不能穿过平衡木,但可坐在上面;5分:将大鼠放在平衡木上会掉下来。

1.4.3 肌力测验(或双侧前爪抓握 bilateral forepaws grasp)^[10]:直径 0.15mm 铁丝绳,长 46cm,置于距地面

70cm 高度上,其下放高 3.5cm 泡沫箱。将大鼠两个前爪放在绳上,放开,记录大鼠在绳上的时间。0分:挂在绳上 0—2s;1分:挂在绳上 3—4s;2分:挂在绳上 5s;3分:挂在绳上 5s,将后腿放在绳上。

1.4.4 前肢放置检测 (measurement of forelimb placing)^[11]:检查者手持大鼠背部皮肤使四肢悬空,将胡须刷触桌面角边缘,测试同侧前肢的活动情况,未受损者可将前肢迅速放到桌面,脑损伤时此动作有不同程度的损害。大鼠每侧受测 10 次,前肢触及桌面角边缘次数的百分率即为该侧得分。注意:抓握大鼠要轻柔,前肢自由悬垂,试验前轻轻上下活动大鼠,尽量让其放松,如大鼠挣扎,肌肉紧张或肢体放在试验者手上不记在内。

1.5 血肿大体及组织学观察

摘眼球处死动物后,取出大脑,去除额极 2mm 前部脑组织,经脑表面穿刺点冠状切开标本,取穿刺点后约 4mm 的脑组织,观察血肿大体形态,然后放入 4%多聚甲醛液固定,经脱水、透明、石蜡包埋,HE 染色,用于组织学观察。

1.6 统计学分析

采 State 统计软件进行单因素方差分析,样本均数两两比较。

2 结果

2.1 动物存活率

70 只实验大鼠共死亡 10 只,其中 3 只可能与大鼠个体对麻药敏感性高有关(应用麻药后 20min 死亡 2 只,40min 死亡 1 只),出血过量导致脑疝死亡 4 只(注射后 72h 死亡 2 只,48h 死亡 2 只),血液进入脑室死亡 3 只,存活率 85.7%(60/70)。胶原酶注射组 35 只大鼠,于注药后 6h 出现行为学改变者为造模成功,成功率为 80%(28/35)。

2.2 行为学改变

见表 1。

2.3 大体形态学改变

假手术组大鼠脑组织外观与正常大鼠脑组织比

表 1 实验组和对照组不同时间行为学变化

(得分, $\bar{x} \pm s$)

	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d
Bederson 评分							
实验组	2.8±0.45 ^②	2.6±0.55 ^②	2.0±0.0 ^②	2.4±0.55 ^②	1.4±0.55 ^②	0.8±1.3	0.0±0.0
对照组	1.4±0.55	0.4±0.55	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
平衡木行走试验							
实验组	4.0±0.0 ^②	3.6±0.55 ^②	3.0±0.0 ^②	2.6±0.55 ^②	2.0±1.0 ^②	0.8±1.3	0.0±0.0
对照组	2.6±0.55	0.2±0.55	0.2±0.45	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
肌力测试							
实验组	0.0±0.0	0.4±0.55 ^①	0.6±0.55 ^②	0.8±0.84 ^②	1.1±0.78 ^②	2.1±0.92 ^①	3.0±0.0
对照组	0.4±0.55	1.4±0.55	2.6±0.55	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0
前肢放置检测							
实验组	4.0±5.48	12.5±8.37 ^②	40±10 ^②	50.0±12.5 ^②	62±10.95 ^②	72±29.36 ^①	86±11.4
对照组	15±7.07	80±8.37	92±8.57	94±5.48	96.5±5.0	98±5.48	98±5.48

实验组与对照组比^①P<0.05;^②P<0.01

较无差别。模型组存活的28只大鼠,术后6h可见尾状核区有明显血肿形成,周围脑组织出现不同程度的肿胀,各血肿大小、形态和部位相近,直径约3.0—3.5mm。术后7d血肿基本吸收。

2.4 组织学改变

光镜下:注入胶原酶后6h血肿区可见大量红细胞,少量脑组织及炎性细胞;72h血肿区周围可见大量白细胞浸润及神经细胞水肿;5d时病灶内见胶质细胞增生;14d时病灶内由胶质细胞、胶原纤维和小血管增生,形成瘢痕(图1—4,见后置彩色插页1)。

3 讨论

脑出血模型有4种:脑内直接注血法、脑内注入胶原酶诱发脑出血法、脑内植入填充物法和自发性脑出血法等。其中以自体血注入法较多用,但用于大鼠时,常因注血速度不易控制,而出现血液进入蛛网膜下隙或血肿破入脑室,模型不稳定。胶原酶是一种金属蛋白酶,它可以分解细胞间基质及血管基底膜上的胶原蛋白,在人体主要存在于巨核细胞和单核细胞中,呈失活状态。在病理情况下可以由细胞释放并激活。脑内注射胶原酶后能分解邻近血管基底膜上的胶原酶蛋白,使血管壁受损而引起渗血,进而血液逐渐积聚,形成小片出血^[1,12]。因此此模型与人类脑出血有一定差别,所以有作者采用胶原酶加肝素脑内注射诱发脑出血,认为可以使血肿提早形成,并有一实体血肿^[4,6-7]。本研究虽未加用肝素,但注射胶原酶后6h,大体形态可见尾状核区有一明显的血肿,且各血肿大小、形态相近,组织学改变符合脑出血病理变化。

胶原酶用量与脑出血量成正比,不同文献胶原酶注射用量0.3—0.6U不等,本研究采用270—300g SD大鼠,注射0.4U胶原酶/2 μ l生理盐水后大鼠瘫痪不明显,注射0.6U胶原酶/3 μ l生理盐水后死亡率较高,而将0.5U胶原酶/2.5 μ l生理盐水注射于大鼠脑内后成活率高,且有较明显的行为学改变,与以往研究相近^[3]。但也有研究报告脑内注射胶原酶0.3U/ μ l或0.4U/ μ l同样可以造模成功^[12-13],这可能与实验用动物体重有关。

一系列用于评测单侧脑损伤后急性或慢性期感觉运动功能和可塑性的试验已被设计并应用,这些试验对研究中枢神经系统感觉运动区的功能恢复和评价行为结果或药物干预的疗效非常有用。如Longa评分法Bederson评分^[8]主要评测动物的神经功能缺失情况;平衡木行走试验^[9]测定运动整合及协调能力;转棒上行走(rotating-rod walking)^[14]可评估

和训练动态平衡。肌力测验^[10]和网屏实验^[14]可客观评价前爪抓握能力和肌力;肢体对称试验评分法(limb symmetry test)^[15]、肢体放置试验(limb placement test)和前肢放置检测检测前后肢的活动能力;爬绳试验(the rope climbing test)和爬梯试验(ladder climbing test)^[17]用于检测双前肢和后肢的协调性。移动和站立活动(locomotor and rearing)记录动物日常活动能力;水迷宫等检测动物的认知功能(cognitive function evaluation)等。不同实验检测动物不同方面的能力,但由于一些检测方法复杂或动物不易完成,所以我们选择了4种比较常用且相对简单的方法,从不同方面对大鼠进行功能评定。结果显示,Bederson评分和平衡木行走试验在注射胶原酶6h后即出现异常,且与对照组有明显差异,但持续时间较短,7d时基本恢复正常。而肌力测验和前肢放置检测于注射后12h才表现出与对照组有差异,但持续时间较长,可达7d。所以,对研究用时较长的实验可选用这两种方法进行行为学评定。

参考文献

- [1] 张化彪,张苏明. 脑出血模型[J]. 国外医学·脑血管疾病分册, 2002,10(6):469—472.
- [2] 陈彦克,陈衍城. 自发性脑出血动物模型[J]. 国外医学·脑血管分册, 2004,12(8):576—678.
- [3] Rosenberg GA, Mun-Bryce BS, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats [J]. Stroke, 1990, 21(5): 801—807.
- [4] Del Bigio MR, Yan HJ, Buist R, et al. Experimental intracerebral hemorrhage in rats: magnetic resonance imaging and histopathological correlates [J]. Stroke, 1996, 27(12): 2312—232.
- [5] Chesney JA, Kondoh T, Conrad JA, et al. Collagenase-induced intrastriatal hemorrhage in rats results in long-term locomotor deficits [J]. Stroke, 1995, 26(2): 312—317.
- [6] 任泽光, 吴建中. 大鼠脑出血模型[J]. 中华神经外科杂志, 1993, 9(4): 205—207.
- [7] 张艳玲, 陈康宁, 邵淑琴, 等. 采用IV型胶原酶构建大鼠脑出血模型[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(12): 1394—1395.
- [8] Bederson JB, Pitlis LH, Tsun M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472—476.
- [9] Altumbabic M, Peeling J, Bigio MRD, et al. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration [J]. Stroke, 1998, 29: 1917—1923.
- [10] Dean RL, Scozafava J, Goas JA, et al. Age related differences in behavior across the life span of the C57BL/6J mouse [J]. Exp Aging Res, 1981, 7: 427—451.
- [11] 邓世山, 王松, 张本斯, 等. 自体血与胶原酶注入大鼠尾状核建立脑出血模型比较研究[J]. 四川解剖学报, 2003, 11(1): 8—11.
- [12] 张花先, 黎杏群, 梁清华, 等. 采用VII胶原酶建立脑出血中风络大鼠模型[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(4): 1—3.
- [13] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [14] 徐莉, 李玲, 陈景藻, 等. 康复训练对大鼠脑梗塞神经功能恢复的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22(2): 86—88.
- [15] Sondra T, Bland BA, Schallert T, et al. Early exclusive use of the affected forelimb after moderate transient focal ischemia in rat: function and anatomic outcome [J]. Stroke, 2000, 31: 1144—1164.