

· 综述 ·

脑瘫动物模型的研究现状*

李江¹ 陈刚^{1,2}

脑性瘫痪(脑瘫)是儿童时期最常见的运动性残疾,且终生存在。主要临床表现为运动功能缺陷,姿势异常,同时还常合并语言障碍、智力发育迟缓、感知觉、行为和情感异常、癫痫及学习困难等症状。发达国家脑瘫的患病率为2%—3%,我国0—6岁脑瘫患儿有31万,患病率1.86%,患者以每年4.6万的速度递增。遗憾的是我们对于小儿脑瘫的发病机制至今不甚明了,目前尚无有效的治疗方法。这是一个庞大的群体,给个人、家庭和社会带来沉重的负担,因此,脑瘫患儿的功能恢复已成为世界各国科研机构研究的热点和难点。为探明其发病机制,找出更好的防治方法,许多研究研制了大量动物模型。为综合阐述比较各种动物模型的优点及不足,特撰文如下。

1 当前动物模型

根据动物模型制作的侧重点不同,我们将其分为3个方面:模型制备方法、模型鉴定及模型利用。

1.1 动物模型制备方法

动物模型的制备是研究疾病发生发展及探索其防治方法最基本最重要的步骤。模型制备是否科学合理直接关系到实验结果的科学性、可靠性及可重复性。根据脑瘫的病因学假说我们将收集到的动物模型大致分为三大类:感染、缺血缺氧及胆红素等神经毒素所致脑瘫。现分述如下。

1.1.1 感染模型:感染模型最常见,应用最广泛的为孕鼠腹腔内或子宫内注射粘多糖(LPS)导致幼鼠发病。我们也收集到幼鼠脑池内注射粘多糖联合颈内动脉结扎及低氧环境缺氧脑瘫动物模型。

1.1.1.1 腹腔内感染:腹腔内注射LPS是感染类模型中应用最广泛的。通常的做法是孕鼠自然条件下饲养2—3天,以适应新的实验室环境。孕15—19周时麻醉或非麻醉条件下腹腔内注射LPS 0.1—1.0mg/kg,致使孕鼠感染。在特定时段或自然分娩后对母鼠或幼鼠进行神经行为学观察或组织学检查。

1.1.1.2 宫内感染:Poggi等^[1]的模型是宫内感染模型中较为成熟的:Fischer 344鼠在孕15天,小儿耳镜辅助下经阴道给予子宫内注射LPS 1mg/kg体重或生理盐水作为对照。在自然分娩后1—21天内对两组幼鼠进行神经发育,神经行为学观察和组织学相关检查。幼鼠死亡率与药物剂量、孕鼠体重及种属直接相关。

1.1.1.3 脑内感染:Audrey BC等^[2]设计了幼鼠脑池内注射LPS联合颈内动脉结扎及低氧环境缺氧脑瘫动物模型,旨在阐明缺血缺氧后脑室内注射内毒素对脑白质的损害。然而组织学检查未发现任何脑白质损伤迹象,可能原因是LPS未能达到足以引起脑白质损伤的浓度。

1.1.2 缺血缺氧模型:研究表明围生期脑损伤不仅与宫内感染有关,而且与缺血性化学损伤关系密切,二者联合可使脑

瘫危险性提高70倍^[2]。缺血缺氧模型是常见的脑瘫动物模型,我们将其分为局部缺血缺氧、全身缺血缺氧及环境缺氧等三大类。单纯的缺血或环境缺氧模型并不常见,我们收集的模型资料多为两种或两种以上方法的联合动物模型。

1.1.2.1 缺氧缺血:缺氧缺血模型包括单侧颈动脉结扎、双侧颈动脉结扎、离体脑细胞培养和离体视神经培养等几种方式。

单侧颈总动脉结扎或切断造成一侧大脑半球缺血动物模型是最为成熟的,实验结果相对稳定可靠,因而是运用最为广泛的动物模型。一般是与环境缺氧联合应用。通常的做法是:幼鼠在自然条件下饲养2—3天,出生后第7天在麻醉条件下行颈正中中线纵切口,分离暴露一侧颈总动脉后行短暂结扎、永久结扎或切断,术后恢复1—3h后给予环境缺氧。此方法操作相对简单,缺血效果肯定,因而被广为采用。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^[3]。

离体脑细胞培养是更严格意义上的缺血模型。为了研究急性脑缺血中谷氨酸盐释放环路对未成熟少突胶质细胞的影响,Robert Fern等^[4]制作了离体脑细胞培养的动物模型。这个模型与离体视神经培养^[5]一起成为迄今为止最为彻底的缺血模型,它摒除了诸多混杂因素的影响,单独研究少突胶质细胞的代谢情况,提高实验结果的可信性。然而其苛刻的实验条件限制了它的广泛应用。

1.1.2.2 全身缺血缺氧:全身缺血缺氧模型更形象逼真地模拟了人类胎儿在围生期缺血缺氧的过程,因而也更能体现多因素导致脑损害的事实。它包括妊娠期母体缺氧缺血和出生前后幼鼠的缺氧缺血。

Shenandoah Robinson等^[6]制作的妊娠期母体子宫动脉结扎属于出生前幼鼠的缺氧缺血。具体如下:孕18周大鼠在麻醉条件下行腹中线切口,暴露全部子宫动脉共4条,并同时阻断45min。对照组只做动脉暴露不阻断血流。在特定的不同时段采集幼鼠脑组织进行组织学检查。

单纯低氧环境在全身缺血缺氧模型中较为少见,通常是与其他方法联合运用。所采取的低氧环境条件是:孕鼠或幼鼠放置于密闭容器,6%—8%氧气与氮气平衡,保持一定湿度与温度(33—37℃),持续20min—4h不等时间,然后进行相关指标的观察。

1.1.2.3 联合缺血缺氧:通常的联合缺血缺氧是将局部缺血缺氧与全身缺血缺氧联合。最多见的做法是单侧颈总动脉结扎与低氧环境缺氧的联合,在此不再赘述。

* 基金项目:新疆维吾尔自治区科技攻关和重点科技项目[200633128(2)]

1 新疆维吾尔自治区人民医院神经外科,830001

2 通讯作者:陈刚(新疆维吾尔自治区人民医院神经外科,830001)

作者简介:李江,男,在读硕士研究生

收稿日期:2007-01-16

以上缺血缺氧模型未能用客观检验标准检验缺血的实际效果, 因而其可信度值得商榷。Art Riddle 等^[7]制作的模型通过测定脑血流分布及血氧饱和度等指标客观反映了缺血缺氧的结果。此模型分别测量脑血流分布及血氧饱和度, 其缺血缺氧效果的可信度大大提高, 因此值得借鉴。

1.1.3 胆红素等神经毒素致脑瘫动物模型: 此类模型最大的共同点是将在外源性神经毒性物质或活性氧物质注射入脑白质、腹腔或全身, 导致内环境紊乱, 细胞或细胞器代谢紊乱, 功能减退。此类媒介物主要有胆红素、甲基汞、三硝基丙酸等。

高胆红素血症可以增加未成熟脑组织对谷氨酸盐介导的兴奋性中毒的敏感性。McDonald 等^[8]制作的动物模型中提示高胆红素血症与谷氨酸受体激活是脑瘫的病因之一。Gibson 等^[9]证明并非所有谷氨酸盐均为脑室周围白质损害的病因。Evelin Vicente 等^[10]应用甲基汞(神经毒素) 孕鼠脑室内注射制作脑瘫模型, 于不同时间点采集脑脊液及脑组织, 并化验其中 S100B(浓度依赖性神经毒素)含量。

1.2 动物模型的鉴定及发病机制的探索

动物模型的鉴定在模型制作、发病机制的探索及模型利用中处重要地位。它是衡量模型制作是否成功的必要尺度, 是实验结果是否可信的前提条件。检验动物模型的依据所采用的方法分为生物学行为检测和组织病理学检测。

1.2.1 神经行为学检测: 目前脑瘫的诊断主要依靠其特征性的临床表现——运动功能的损害, 姿势的异常及智力及认知功能发育迟缓, 故神经行为学检验是脑瘫动物模型检验中重要的手段, 常用的检测方法有 open field、rotarod、水迷宫、倾斜板试验及拒俘反应试验等。李晓捷等^[11]亦给出了脑瘫动物的神经行为学鉴定标准。

在所有神经行为学检测中最为经典的是 F. STRATA 等^[12]的模型, 研究结果显示缺氧鼠行动迟缓且探索行为较对照组明显减少, 然而评分结果未显示显著性差异, 原因可能如下: ①影响观察指标的主观因素较多; ②评分标准缺乏科学依据。Drobyshevsky 等^[13]研究了兔缺血缺氧损伤后嗅觉系统损伤, 结果显示影像学检查较神经行为学检测更为敏感及客观。

1.2.2 形态学、电生理及分子生物学检测: 脑瘫动物模型的组织学检验主要依赖于对动物活体、脑组织及脑脊液的影像学、神经电生理、组织病理学、电镜及分子生物学技术的检查。其中组织病理学检测由于具备能提供客观直观的组织形态学图像, 方便计数等优点而被广为应用。免疫相关的病理学及其他技术如: 免疫组织化学染色、免疫印迹法及免疫荧光标记等也因其高度的抗原抗体反应特异性在细胞计数、细胞形态学及细胞示踪方面的优点而受到广泛应用。神经电生理方法主要应用于检测动物活体功能性损害, 如国内李晓捷等^[14]深入研究了胆红素致脑瘫兔脑干听觉诱发电位, 得出胆红素致脑瘫兔的脑干听觉诱发电位改变为以双侧性、蜗后性、混合性听路损害为主的结论。F.Strata 等^[12]对小鼠进行皮质微电极刺激并绘图, 结果显示感觉运动受限组的动物 80% 一级皮质定位点支配臀部运动, 缺血组这一数据为 57.1%, 均高于对照组, 提示痉挛状态的再现。

1.2.3 机制的探索: 人类新生儿围生期脑损伤后病理结果显示少突神经胶质细胞缺失及皮质发育的紊乱。有证据表明在脑室周围白质软化早期即开始有神经胶质细胞的死亡。大量少突神经胶质细胞缺失的直接后果是脑室周围白质软化。其特征性的表现为脑室周围白质弥漫性或局灶性软化灶, 残留大片完整的灰质。因此众多的实验研究围绕着脑室周围白质软化及少突神经胶质细胞缺失来进行。Rothstein 等^[15]为了研究在缺血缺氧早期脑室周围哪些细胞最易受到损伤进行了实验研究, 结果表明在未成熟脑组织中脉络丛是最易受到缺血缺氧损害的结构, 而位于室管膜下区的神经干细胞对缺血缺氧损害有较高的耐受性。Art Riddle 等^[7]通过测定胎羊脑血流分布发现脑室周围白质损伤的广度与缺血的持续时间的不一致性, 且这种不一致性不能用结构的异质性解释。进一步研究发现白质损伤的范围与晚少突胶质细胞分布一致。其他实验研究同样显示出少突胶质细胞成熟度依赖的缺血损伤易感性。

关于少突胶质细胞损伤的机制 Vexler 等^[16]给予了较为详细的阐述, 主要包括细胞毒性机制、缺血后细胞程序性死亡及缺血后基因表达改变等三大方面。细胞毒性作用直接造成大脑微循环的变化进而导致缺血性细胞死亡。其发生机制可能与谷氨酸介导的氧化亚氮的产生, 损伤性 Ca 内流及脂质过氧化物表达有关; 细胞程序性死亡是一种生理性的, 有自身周期的细胞死亡。出现在胚胎发育时期, 出生后开始减低, 成年后降至最低水平。研究发现缺血等急性或慢性病程可激发细胞程序性死亡, 其机制可能与半胱天冬酶激活, 细胞内 Bcl-2/Bax 平衡破坏后线粒体内细胞色素 C 释放有关; 缺血后基因表达改变主要涉及早期快反应基因, 热休克蛋白及生长因子。

1.3 动物模型应用于脑瘫的治疗研究

脑瘫患儿内源性神经干细胞和神经前体细胞不可逆损伤导致目前尚无有效的治疗方法。众多的治疗方法正在探索之中, 主要包括干细胞移植、高压氧及兴奋性氨基酸受体阻断途径。

1.3.1 干细胞移植: Takeshi Hayashi 等^[17]研究了缺血损伤后神经前体细胞的分化及移行。新生神经祖细胞用溴脱氧尿苷标记, 利用免疫组织化学分子技术区分由祖细胞分化而来的细胞系。在试验组中, 发现了大量被标记的少突胶质细胞前体细胞及小胶质细胞, 并在室管膜下区祖细胞定居的缺血区发现了少量被标记的神经元呈明显增生迹象, 表明有新生祖细胞移行至缺血区并分化为神经前体细胞。同时发现被标记的星形胶质细胞、少突胶质细胞前体细胞及小胶质细胞也在缺血后呈现增生活跃, 提示神经前体细胞也许会成为治疗脑损害的有效方式。Carola Meier 等^[18]研究了人类脐带血干细胞在缓解新生鼠缺血后痉挛状态中的作用。7 日龄健康小鼠单侧颈动脉结扎环境缺氧 80min 后, 腹腔移植人脐带血衍生单核细胞。特定时段进行足迹法步态分析; 病理结果显示实验组在缺血区发现移植细胞, 并通过步态分析得出移植有助于缓解缺血后的痉挛状态的结论。国内王力平等^[19]经侧脑室穿刺进行神经干细胞移植得出类似结论。林绿标等^[20]人行异种间神经干细胞移植将小鼠神经干细胞移植到猫脑中, 用免疫组

组织化学的方法追踪观察小鼠神经干细胞在猫脑中存活、迁移并分化的情况。结果显示移植后1个月仍有大量存活,部分细胞分化为神经元及神经胶质细胞,部分细胞向猫脑组织中迁移。运动技能评估显示:细胞移植后家猫症状有所改善,但移植侧与对侧肢体瘫痪及平衡失调的改善在统计学上无显著性差别。

1.3.2 兴奋性氨基酸受体阻断:在缺血条件下轴突与神经胶质释放出大量兴奋性神经递质谷氨酸。大量科学实验研究显示谷氨酸及天冬氨酸等兴奋性氨基酸对新生儿缺血缺氧损伤后脑的发育有重要作用^[21],谷氨酸受体介导的兴奋性中毒是新生儿缺血缺氧白质损伤的重要机制^[22]。阻断兴奋性氨基酸受体介导的兴奋性中毒成为挽回白质损伤的方向。其中研究较多的阻断介质有N-乙酰半胱氨酸,托吡酯,NBQX及促红细胞生成素(EPO)等。

1.3.3 高压氧治疗:Calvert等^[23]研究了高压氧对缺血缺氧性脑损伤的神经保护作用。7日龄健康小鼠单侧颈动脉结扎环境低氧2.5h后间隔1h放置3标准大气压高压氧舱1h,并设立对照组,5周后进行双侧大脑半球质量,组织病理学及神经生物学等指标检测。结果显示缺血+高压氧组脑质量介于对照组与单纯缺血组之间;光镜及电镜下可见缺血+高压氧组缺血区细胞萎缩与坏死较单纯缺血组明显减少。高压氧治疗后神经功能有明显改善,提示高压氧治疗可减轻缺血缺氧对未成熟脑的损害。

2 小结

为探明其发病机制,找出更好的防治方法,国内外进行了大量动物模型研究以模仿脑瘫的临床表现、发病机制并利用其探究脑瘫的防治方法。模型的制作中单侧颈总动脉结扎结合低氧环境的动物模型制作方法是更为成熟的,实验结果相对稳定可靠。全身缺血缺氧模型更形象逼真地模拟了人类胎儿在围生期缺血缺氧的过程,因而也更能体现多因素导致脑损害的事实。动物模型检验方法有神经行为学、形态学、电生理及分子生物学检测。在发病机制方面,成熟度依赖的少突胶质祖细胞的缺血敏感性导致脑室周围白质损伤的选择易感性。主要包括细胞毒性机制,缺血后细胞程序性死亡,缺血后基因表达改变等三大方面。

脑瘫患儿内源性神经干细胞和神经前体细胞不可逆的损伤导致目前为止尚无有效的治疗方法。众多的治疗方法正在探索之中,主要包括干细胞移植,兴奋性氨基酸受体阻断途径及高压氧治疗。细胞移植和基因治疗技术的飞速发展治疗此类疾病带来了希望。根据脑瘫的发病机制和目前的研究现状许多学者认为采用基因修饰细胞移植治疗小儿脑瘫可能是最新、最有前途的治疗方法之一。

参考文献

[1] Poggi SH, Jane Park, Laura Toso, et al. No phenotype associated with established lipopolysaccharide model for cerebral palsy [J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2005,192: 727—733.
[2] Audrey BC Coumans, Johannes Middelani, Yves Garnier, et al. Intracisternal application of endotoxin enhances the susceptibility to subsequent hypoxic-ischemic brain damage in neonatal Rats[J]. Pediatric Reserch, 2003, 53:770—775.

[3] Hisakazu Uehara, Hiroshi Yoshioka, Shoji Kawase, et al. A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion[J]. Brain Research, 1999, 837: 213—220.
[4] Robert Fern, Thomas Moller. Rapid Ischemic cell death in immature oligodendrocytes: A fatal glutamate release feedback loop[J]. The Journal of Neuroscience, 2000, 20: 34—42.
[5] Robert Fern. Intracellular Calcium and cell death during ischemia in neonatal rat white matter astrocytes in situ [J]. The Journal of Neuroscience, 1998, 18: 7232—7243.
[6] Shenandoah Robinson, Kasia Petelenz, Qing Li, et al. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats [J]. Neurobiology of Disease, 2005, 18: 568—581.
[7] Art Riddle, Ning Ling Luo, Mario Manese, et al. Spatial Heterogeneity in oligodendrocyte lineage maturation and not cerebral blood flow predicts fetal ovine periventricular white matter injury[J]. The Journal of Neuroscience, 2006, 26: 3045—3055.
[8] McDonald JW, Shapiro SM, Silverstein FS, et al. Role of glutamate receptor-mediated excitotoxicity in bilirubin-induced brain injury in the Gunn rat model [J]. Experimental Neurology, 1998, 150: 21—29.
[9] Gibson CZ, Clowry GJ. The effect on motor cortical neuronal development of focal lesions to the sub-cortical white matter in the neonatal rat: a model for periventricular leukomalacia[J]. Int J Devl Neuroscience, 2003, 21: 171—182.
[10] E' velin Vicente, Matheus Boer, Marina Leite, et al. Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methyl mercury-intoxicated pregnant rats [J]. Neuro Toxicology, 2004, 25: 771—777.
[11] 李晓捷, 高晶, 孙忠人. 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, 9: 885—889.
[12] Strata F, Coq JO, Byl N, et al. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: implications for a rodent model of cerebral palsy [J]. Neuroscience, 2004, 129: 141—156.
[13] Drobyshevsky A, Robinson AM, Derrick M, et al. Sensory deficits and olfactory system injury detected by novel application of MEMRI in newborn rabbit after antenatal hypoxia-ischemia[J]. Neuroimage, 2006, 32: 1106—1112.
[14] 李晓捷, 姜志梅, 孙叶强, 等. 胆红素致兔脑瘫动物模型的脑干听觉诱发电位研究[J]. 现代康复, 1999, 3: 164—165.
[15] Raymond P, Rothstein Steven W, Levison. Damage to the choroid plexus, ependyma and subependyma as a consequence of perinatal hypoxia/ischemia [J]. Dev Neurosci, 2002, 24: 426—436.
[16] Vexlera ZS, Ferrieroa DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury [J]. Semin Neonatol, 2001, 6: 99—108.
[17] Hayashi T, Iwai M, Ikeda T, et al. Neural precursor cells division and migration in neonatal rat brain after ischemic/hypoxic injury[J]. Brain Research, 2005, 1038: 41—49.
[18] Carolameier, Johannes Middelani, Bianca Wasielewski, et al. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells[J]. Pediatric Research, 2006, 59: 244—249.
[19] 王力平, 樊东升, 王荫华, 等. 神经干细胞脑脊液移植后存活及迁移规律研究[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11: 337—338.
[20] 林绿标, 章翔, 林旭. 神经干细胞移植治疗脑缺血的实验模型[J]. 中国临床康复, 2006, 10: 7—10.
[21] Adem Aydin, Kursad Genc, Mustafa Akhisaroglu, et al. Erythropoietin exerts neuroprotective effect in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury [J]. Brain & Development, 2003, 27: 494—498.
[22] Follett PL, Wenbin Deng, Weimin Dai, et al. Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: A protective role for topiramate [J]. The Journal of Neuroscience, 2004, 24: 4412—4420.
[23] Calvert JW, Wei Yin, Mona Patel, et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model[J]. Brain Research, 2002, 951: 1—8.