

· 综 述 ·

早产儿脑损伤动物模型的研究现状*

鲁利群¹综述,赵聪敏²审校

(1. 成都医学院第一附属医院儿科 610500; 2. 第三军医大学新桥医院儿科, 重庆 400037)

关键词: 早产儿; 脑损伤; 动物模型

中图分类号: R365.741

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)22-2816-02

近年来,产科和新生儿重症监护技术的不断提高使早产儿存活率明显增加,早产儿脑损伤的发病率亦呈逐年增加趋势。存活者约 35% 遗留慢性神经障碍,如脑瘫、癫痫、学习困难和认知觉的异常等^[1]。缺氧缺血和感染是导致早产儿脑损伤的主要原因。根据神经病理学可分为:(1)脑白质损伤(white matter injury, WMI),包括脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)和弥散性脑白质损伤;(2)非脑实质区出血,包括脑室周围-脑室内出血、蛛网膜下腔出血及脉络丛出血等;(3)其他部位损伤,如脑实质、小脑、脑干等。

脑室内出血(intraventricular hemorrhage, IVH)是 10 年前早产儿最主要的脑损伤形式,而 WMI 则是目前最常见的脑损伤类型,多发生于胎龄 23~32 周的早产儿,是造成严重神经系统后遗症的主要原因。其中 PVL 在 WMI 中更普遍,以脑室周围白质囊肿和凝固性坏死为特征,表现为少突胶质细胞前体细胞受损,髓鞘弥漫性损伤和形成障碍,反应性胶质化和小胶质细胞活化。但近年来神经影像学研究显示弥散性脑白质损伤超过了 PVL 的发生,占主要优势。

在早产儿脑损伤的研究过程中,动物模型的制作是进行基础研究的前提,借助动物模型,可以更深入细致地研究早产儿脑损伤的病因、病理、发病机制以及治疗和预后。早产儿脑损伤的动物模型众多,本文就其研究现状综述如下。

1 研究早产儿脑损伤的常用动物

选择一种最符合人类发育过程的早产儿脑损伤动物模型非常困难,因为不同物种脑结构和发育阶段存在差异,脑的不同区域发育速率也不相同。因此,迄今尚无一种最理想的能模拟人该疾病的动物模型。无论何种损伤形式,选择动物的关键是动物种类及其中枢神经系统的成熟年龄。

一般而言,制作模型要使其损伤的分布情况和形态学特征近似于人 WMI,在多脑回动物如兔、狗、猪、猫和绵羊要比啮齿类动物容易得多。但近年来,生后 1~7d 大鼠的缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)模型却得到较多研究发展,因为采用小动物所建立的模型在观察长期的神经病理情况及行为学方面更具优势。以鼠为代表的啮齿类动物因为繁殖快、价格低廉被大量应用于实验研究。生后 1d(postnatal day 1, P1)、生后 2d(postnatal day 2, P2)、生后 3d(postnatal day 3, P3)、生后 5d(postnatal day 5, P5)的新生大鼠约分别相当于孕龄 18~20 周、20~24 周、24~28 周、28~32 周出生的可存活早产儿。生后 7d(postnatal day 7, P7)新生大鼠一直是足月儿的动物模型,但近来研究显示其相当于接近足月(约 32~36 周),完全足月要在出生后 10d 左右^[2]。

采用新生大动物建立的模型所提供的生理参数更接近于

人类宫内或出生前的情况。非人类的灵长类动物模型比低级动物的研究价值更大,如恒河猴、猕猴、狒狒等。早产狒狒是与人类新生儿成熟度和脑损伤形式相似性较高的一种模型,能帮助提供人早产相关因素的证据^[3]。胎猴曾被用来建立 HIBD 动物模型,但因为其价格昂贵,数量有限,所以应用于基础实验研究受到限制。

2 缺氧缺血致早产儿脑损伤动物模型

1960 年 Levine 首次利用结扎颈总动脉和缺氧制成 HIBD 动物模型,1981 年 Rice 将此技术引用于新生大鼠并获成功。即结扎 P7 新生大鼠单侧颈总动脉后置于缺氧舱中限时缺氧制得 HIBD 模型。该模型不仅能观察到大脑皮质、海马、纹状体以及丘脑的组织损伤,还能观察到皮质下和脑室周围的白质损伤,因而很快在全球各实验室得到广泛应用,成为经典的新生儿 HIBD 模型。随后,学者们将 HIBD 的研究集中到脑白质损伤方面,建立了多种早产儿 HIBD 的动物模型。

常用的如鼠双侧颈总动脉闭塞或单侧颈总动脉结扎结合 6%~8% 的氧缺氧 1.5~3.5h 的 HIBD 模型,能造成明显的白质损害。Sheldon 等^[4]结扎 P1 新生大鼠单侧颈总动脉,再予 6% 的氧缺氧 3.5h 后,发现同侧大脑半球出现了相应的组织损伤。损伤后第 1 天可见星型胶质细胞和小胶质细胞反应性改变,第 2 天皮层及尾状核神经元丢失、水肿,第 3 天水肿减轻,第 10 天损伤区域可见广泛的反应性改变,受损侧白质显著丢失。该模型模拟了极未成熟脑的 HIBD,可重复,有助于阐明神经元缺失和 PVL 的机制。Alfreda 等^[5]予 P3 新生大鼠吸入 5% 氧气 60min, 24h 后发现 30 只动物模型中 14 只死亡,存活 9 只出现脑损伤,损伤程度与存活的脑损伤早产儿一致。研究者还发现未成熟大脑对损伤刺激比成熟大脑更为耐受,如将 P3 大鼠暴露于与 P7 同样的缺氧环境中,脑损伤程度轻于后者。Uehara 等^[6]通过结扎 P5 新生大鼠双侧颈总动脉建立 PVL 模型,7 日龄时 90.9% 的脑白质发生改变,包括内囊及其周围的凝固性坏死和囊性损害,内囊及皮质下白质轴突断裂; 9.1% 发生脑梗死; 22.7% 脑皮质可见缺血性神经元; 大鼠脑血流灌注压下降约 25% 时白质比大脑皮质更易受损。因此,此模型有助于研究低血流灌注引起的脑白质损伤。Goni-de-Cerio 等^[7]将未成熟胎羊单侧颈总动脉结扎 1、3h 后处死胎羊,发现神经元坏死主要见于中脑、脑桥、深部小脑核以及基底核,凋亡细胞则广泛见于白质和灰质,不固定于某一脑区。部分胎羊表现为广泛的细胞膜不对称性改变,以及线粒体完整性受损。此模型证实缺氧缺血后早期的细胞死亡形式如凋亡和坏死具有脑区特异性和显著的动力学特征,说明治疗策略中拯救细胞尤其是凋亡细胞非常重要。

* 基金项目:成都医学院基金资助项目(CYZ07-004)。

上述模型的缺点在于不能模拟由于产前因素如胎盘功能不全、脐带因素或母体原因造成的胎儿宫内缺氧,其病理生理机制更为复杂多样。常用钳夹孕鼠双侧子宫动脉的方法建立宫内 HIBD 模型。短时间(如 10~30min)夹闭孕鼠子宫动脉后恢复血供,孕鼠近足月时剖宫取胎发现,胎鼠体质量和脑重均明显低于对照组,脑组织病理改变为神经元变性、水肿和坏死,胶质结节形成,脑组织液化坏死形成空洞^[8]。Mallard 等^[9]在猪怀孕 30d(足月为 68d)时结扎其一侧子宫动脉,建立了猪的 HIBD 模型。该方法导致胎猪脑室增大,皮质、纹状体和海马体积缩小,脑组织神经元数目减少,树突和轴突生长受抑制。De Haan 等^[10]夹闭怀孕母羊脐带 10min 可造成接近足月的胎羊短暂窒息,组织学上可见海马区神经元坏死,脑电图显示其神经元活动受抑。Derrick 等^[11]应用子宫胎盘功能不全的兔子制作了高张力性脑瘫动物模型。孕龄约 67%~70%足月的孕兔给予全脑缺氧,存活者自然分娩,P1 存活兔子相应的神经行为测试,测试录像结果显示,缺氧组在多项反应活动、吸吮和吞咽协调性的自主运动中有明显缺陷,还伴随四肢肌张力和主动屈伸运动增加。组织病理学检测显示皮层下运动通路包括基底神经节和丘脑出现特殊的急性脑损伤特征。尾状核和丘脑的持久损伤与高张力运动障碍明显相关,说明产前缺血缺氧导致了运动亢进和运动控制的异常。该结果为研究产前缺血缺氧造成围生期脑损伤的机制和后遗症提供了独特的行为学模型。Inder 等^[12]为研究早产和新生儿重症监护对未成熟脑的影响,选择 16 只胎龄 125d(足月为 184d)狒狒,给予两周重症监护后,神经病理学波谱检测表现为白质损伤、颅内出血和脑室扩大,与人早产儿脑损伤结果高度相似。

3 感染致早产儿脑损伤动物模型

普遍认为围生期感染和母胎炎症与早产和脑损伤密切相关。炎症是脑损伤的重要发病机制,与其他显著的脑损伤和发育不良产生的后果一致,相关的流行病学资料和多种动物模型均证实了这一观点,但二者间的因果关系仍不清楚。为探讨感染对未成熟脑的影响机制,诸多新生动物模型用于 WMI 的研究。例如产前或产后微生物如细菌(结肠菌或阴道加德菌)、病毒(绵羊痘病毒)或细菌产物(脂多糖)给药制作 WMI 模型。脂多糖是最常用的制作未成熟鼠、猫、狗和绵羊 WMI 模型的感染物质,其诱导脑损伤的机制尚不完全清楚,可能涉及免疫反应,进而启动全身炎症反应,导致系统低血糖、血液凝固、脑血流灌注不足、中枢神经系统炎症细胞激活。给孕龄达 65%足月的绵羊注射脂多糖和予脐带闭塞产生的 WMI 分布相似。尽管形态学改变不同,但与脑血流灌注不足激起的广泛小胶质细胞反应相比,脂多糖会导致更多的炎症细胞渗透入脑和局部小胶质细胞/巨噬细胞。而且,小剂量的脂多糖注射本身对 P7 大鼠没有不良反应,但却能增加缺氧缺血后的脑损伤程度,提示细菌产物对未成熟脑具有易感性^[1]。如给孕龄 18~19d 的孕 SD 大鼠腹腔内注射脂多糖 0.5mg/kg,胎鼠出生后 7d,发育脑髓鞘化异常,白质细胞死亡明显^[13]。而且,小剂量脂多糖给药所导致的脑损伤将会影响到成年时期^[14]。其他的细菌产物如脂膜酸也被用于对未成熟脑耐受性的研究,提示先天的免疫系统对各种配体具有不同的反应,对此还需进一步探讨。

4 其他早产儿脑损伤模型

高氧、高温和注射兴奋性氨基酸受体激动剂等药物均被用于制作早产儿脑损伤模型。例如将动物从出生即暴露于 80%的氧气中,直至生后 5d,每天调整 2 次,以制作高氧性脑损伤

模型^[15],可发现与前述脑损伤模型相似的变化。而 Nuñez 等^[16]用外源性的蝇蕈醇,即选择性的 γ -氨基丁酸受体激动剂注射给 P1 新生大鼠制作早产儿脑损伤模型。在生后 7d 和 21d,可见海马神经元减少。与海马相关的行为学功能降低,如水迷宫学习能力,直至青少年时期。Chen 等^[17]对 P5、P7 大鼠从双侧室外侧角和前肢感觉运动皮质间的白质注射兴奋性毒性鹅膏蕈氨酸,到生后 14d,P5 组皮层灰质完整,但出现局灶性的髓鞘化降低,区域囊性变。在 P7 组髓鞘化障碍较轻,但出现广泛的神经微丝免疫反应性缺失。生后 28d 测试其皮质脊髓功能发现,所有大鼠均随年龄得到改善,组织学检测前脑横断面积无差别,但室周面积明显扩大,尤其是 P7 组。P5 组胼胝体的抗髓鞘免疫反应密度明显低于前联合。此模型尤其是 P5 组成功模拟了脑室周围白质损伤模型,也提示 P7 是嗜齿类发育相当于人皮质脊髓成熟的时期,对脑室周围白质损伤易感,而 P5 则是少突胶质细胞前体细胞对兴奋毒性更敏感的时期。

生发层基质-脑室内出血是早产儿常见的神经学问题。对孕 29d 的兔子剖腹取胎,3h 后予幼兔腹腔内注射丙三醇,约 80%的幼兔发生 IVH。与对照组相比,IVH 组幼兔脑室周围可见较多嗜中性粒细胞和小胶质细胞围绕,室周凋亡和变性神经元明显多于皮质。 β 淀粉样前体蛋白和神经微丝的免疫标记提示发生了轴突损害。神经行为学上 IVH 组的行走能力较对照组差且不稳定。尚未发现急性系统中毒的表现。同时,从早产儿的尸解中也发现了同样的 IVH 脑室周围凋亡和细胞浸润的结果,而在无 IVH 组却未发现。因而,该模型可作为早产儿 IVH 的动物模型,并能提供急性脑损伤的证据,为预防 IVH 和出血后的并发症奠定了基础^[18]。

早产儿脑损伤动物模型的建立能够对早产儿脑损伤发生的病理生理机制进行深入研究,更清楚地了解组织损伤的发展变化过程及其结局,也有助于进行治疗策略与治疗方法的验证,并开辟进一步的研发方向。目前尚无一种动物模型能模拟所有的早产儿脑损伤,每种模型均有其优缺点,应针对研究重点选择适宜的动物模型。相信今后会建立更多更接近临床的动物模型,使对早产儿脑损伤的研究更趋完善。

参考文献:

- [1] Skoff RP, Bessert D, Barks JD, et al. Plasticity of neurons and glia following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats[J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(2): 331.
- [2] Hagberg H, Peebles D, Mallard C. Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults[J]. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2002, 8(1): 30.
- [3] Inder T, Neil J, Yoder B, et al. Non-human primate models of neonatal brain injury[J]. *Semin Perinatol*, 2004, 28(6): 396.
- [4] Sheldon RA, Chuai J, Ferriero DM. A rat model for hypoxic-ischemic brain damage in very premature infants[J]. *Biol Neonate*, 1996, 69(5): 327.
- [5] Alfreda S, Anthony J, Ronald F. Development of a postnatal 3-day-old rat model of mild hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Brain Res*, 2003, 993: 101.
- [6] Uehara H, Yoshioka H, Kawase S, et al. (下转第 2821 页)