

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.21.001

不同程度弥漫性轴索损伤动物模型建立研究*

向 玲,张雨婷,梁 平,韦 红,彭玲珑,李禄生[△]

(重庆医科大学附属儿童医院神经外科/国家重点临床专科,重庆 400014)

[摘要] **目的** 自制一种弥漫性轴索损伤(DAI)装置,建立不同程度的DAI动物模型。**方法** 选取成年雄性清洁级SD大鼠70只,分为正常对照组(10只)与致伤组(60只),进一步将致伤组分为A、B、C3组,各20只。运用自制的实验装置致伤,使大鼠的头颅同时产生瞬间超大角加速度和线加速度,在恒定气压下通过不同的旋转往返加速运动次数,造成轻型(A组)、中型(B组)、重型(C组)3种不同程度的大鼠DAI损伤模型,进行行为及病理效应评价。**结果** 随着损伤程度的加重,损伤急性期致伤组大鼠的神经生理反射恢复的时间间隔与苏醒时间均增加($P<0.05$),致伤7d后致伤组大鼠的神经功能评分降低($P<0.05$);致伤后14d内A、B、C3组大鼠死亡率分别为5.0%、25.0%、50.0%。随着损伤程度的加重,DAI病理特征改变更为明显。**结论** 该装置能有效建立不同损伤程度的DAI动物模型。

[关键词] 弥漫性轴索损伤;实验装置;动物模型;大鼠**[中图分类号]** R651.15**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)21-2881-04**Study on the establishment of rat model of different degree of diffuse axonal injury***Xiang Ling, Zhang Yuting, Liang Ping, Wei Hong, Peng Linglong, Li Lusheng[△]

(Department of Neurosurgery/National Key Clinical Specialist, Affiliated Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To establish the different degrees of rat diffuse axonal injury (DAI) model by using a self-made DAI device. **Methods** A total of 70 healthy adult clean SD rats were selected and randomly divided into the normal control group ($n=10$) and DAI group ($n=60$), then the DAI group was randomly subdivided into the group A, B, and C, 20 cases in each group. The rat head injury model was prepared by using the self-made experimental device, which made the rat head to simultaneously produce instant oversized linear and angular accelerations, different degrees of rat DAI model, including mild DAI (group A), moderate DAI (group B) and severe DAI (group C), were induced by different rotation back and forth, accelerated movement times under the constant air pressure. The pathological and behavior effect evaluation was performed. **Results** With the injury degree aggravating, the time interval of nerve physiological reflex recovery and awakening time in the acute DAI groups were increased ($P<0.05$). The nerve function score after 7 d in the DAI groups was decreased ($P<0.05$); the death rates within 14 d after injury in the group A, B and C were 5.0%, 25.0% and 50.0% respectively. With the injury degree aggravating, the DAI pathological characteristics were more significant. **Conclusion** This device could effectively establish different injury degrees of DAI animal model.

[Key words] diffuse axonal injury; experimental facility; animal model; rat

弥漫性轴索损伤(diffuse axonal injury, DAI)是一种常见的颅脑损伤,其病情重、治疗难、预后差、病死率高^[1-5]。目前,DAI的致伤机制尚不完全明确,模型的研究仍是当今国内外致力探讨的课题。因此,笔者参照 Gennarelli 等^[6]和冯氏^[7]致伤装置,模拟DAI发生机制,自制了一种简便、可靠、稳定的损伤装置,使大鼠的头颅能同时产生瞬间超大角加速度和线加速度,并建立不同损伤程度的大鼠DAI模型,为深入研究DAI提供有用工具。

1 材料与方

1.1 实验动物 选取成年雄性清洁级SD大鼠70只,体质量300~400g,按随机数字表法分为正常对照组(10只)和致伤组(60只),致伤组按随机数字表法再分为A、B、C3组,各20只。

1.2 DAI致伤装置的研制

1.2.1 原理及实验装置 该装置为一个高气流率驱动的气动转换装置,通过电动充气泵充气使动力气缸气压达到预先设定的预压气压(0.8kpa),启动气动转换系统推动齿轮滑块瞬间向右做线加速度运动,在滑块的带动作用,通过齿轮齿条的啮合作用,齿轮同时发生围绕其中心的旋转和沿导轨的直线运动,同时产生瞬间超大线加速度和角加速度复合运动。头颅旋转装置完成90°顺时针旋转后,借助于弹簧压缩缓冲装置而停止,再次启动气动转换装置触发按钮,使齿轮滑块反向加速运动,带动头颅旋转装置90°逆时针旋转,即完成一次90°旋转往返加速运动。连续触发气动转换系统启动开关,可实现多次往返旋转加速运动。实验装置见图1。

1.2.2 操作方法 操作时,大鼠用4%水合氯醛腹腔麻醉后(0.3mL/100g),将其头部两侧颞骨及头顶顶部垫以棉花,旋转

左、右、上的螺丝棒将头颅固定于中心位,大鼠连接器处于水平位。启动电动充气泵,充气至 0.8 kpa 后,多次触发气动转换装置,可使大鼠头颅行多次 90° 旋转往返运动。整个过程保证气压恒定。

1.3 方法

1.3.1 不同程度 DAI 模型的建立 致伤组大鼠经 4% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔麻醉后,固定于实验装置上。A、B、C 3 组分别行 1、2、3 次往返加速运动,致伤大鼠头颅(分别为轻度、中度、重度致伤);正常对照组大鼠麻醉后固定在致伤装置上,不致伤,1 min 后将大鼠卸下。

1.3.2 观察大鼠神经生理反射 观察损伤急性期(24 h 内,每分钟测定 1 次直至恢复正常)致伤组大鼠的神经生理反射(角膜反射、后肢爪反射、翻正反射)恢复的时间间隔及大鼠生命体征变化。

1.3.3 大鼠脑组织大体形态和病理学形态观察 于损伤后 24 h 分别在正常对照组及 A、B、C 组中各抽取 3 只大鼠,用 4% 水合氯醛腹腔麻醉后,快速开胸,左心室插管至主动脉,剪开右心耳,灌注 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS),至流出液清亮后停止灌注,换用 4% 多聚甲醛溶液灌注,至大鼠四肢及尾巴抽搐、双肺及肝脏颜色变白为止。灌注完成后迅速取脑,完整剥离全脑包括大脑、小脑、脑干,同时肉眼观察大体标本的病理变化后,遂将标本组织投入 4% 多聚甲醛溶液于 4 °C 固定 48 h;脑干和大脑冠状位切开,大脑沿脑中线矢状位切开,分别进行脱水、透明、浸蜡、包埋,脑干和大脑分别冠状位切片 5 μm 厚,行苏木素-伊红(HE)染色。

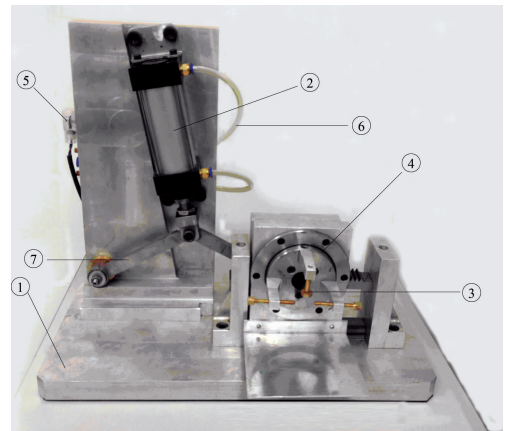
1.3.4 大鼠神经功能评分 于损伤后 7 d 参照文献[8]的 Carcia JH 大鼠神经功能评分标准(表 1),分别对 A、B、C 3 组大鼠进行神经功能评分,并统计 14 d 内 A、B、C 3 组的死亡率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两

两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 损伤急性期大鼠生命体征及神经生理反射恢复时间与苏醒时间比较 大鼠致伤后出现不同程度的肢体抽搐、大小便失禁和呼吸暂停,呼吸节律不齐,由浅快到深慢再到浅快,后慢慢趋于平稳。3 组大鼠损伤后均出现角膜反射、后肢爪反射及翻正反射消失。角膜反射、后肢爪反射、翻正反射的平均恢复时间在 A 组与 B 组、B 组与 C 组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。A 组与 B 组、B 组与 C 组苏醒时间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。苏醒后大鼠出现不同程度的活动减少、反应减慢、行走不稳。



①:底座(长 36 cm、宽 25 cm);②:动力气缸;③:大鼠连接器,包括大鼠放置台(长 14 cm、宽 13 cm),左右上 3 根旋转螺丝棒(分别长 6、6、4 cm);④:旋转部分(摆动金属杆、滑块、齿轮、齿条);⑤:电池阀;⑥:通气管(2 条);⑦:摆动杆。

图 1 DAI 致伤装置

表 1 Carcia JH 大鼠神经功能评分标准

实验类型	0 分	1 分	2 分	3 分
自主运动(将大鼠放入鼠笼中观察 5 min)	无自主运动	很少运动	运动并触及至少一侧笼壁	运动并触及至少三侧笼壁
体态对称性(提起尾部使其悬空观察四肢状态)	患侧无运动	患侧轻微运动	患侧运动较迟缓	双侧体态对称
前肢伸展运动(悬尾使后肢悬空,前肢移向桌子,使之仅靠前肢行走,观察前肢伸展运动)	左前肢无伸展运动	左前肢轻微伸展	左前肢有伸展运动,但不及右侧	两侧伸展对称
网屏实验	(-)	不能爬上	左侧劣势	正常攀爬
两侧身体触觉反射	(-)	左侧无反应	左侧反应弱于右侧	反应性相同
两侧胡须触觉反射	(-)	左侧无反应	左侧反应弱于右侧	反应性相同

表 2 3 组不同程度致伤大鼠神经生理反射恢复时间及苏醒时间比较($\bar{x} \pm s$, min)

组别	n	角膜反射消失时间	后肢爪反射消失时间	翻正反射消失时间	苏醒时间
A 组	20	28.50 ± 5.72	42.80 ± 4.50	58.10 ± 7.14	56.84 ± 8.43
B 组	20	39.50 ± 4.79*	52.80 ± 8.27*	80.80 ± 11.16*	76.54 ± 10.85*
C 组	20	44.80 ± 2.35*#	69.80 ± 11.08*#	106.20 ± 16.23*#	101.57 ± 15.56*#
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

*: $P < 0.05$, 与 A 组比较; #: $P < 0.05$, 与 B 组比较。

2.2 神经功能评分与死亡率 致伤后 7 d 对 3 组大鼠行神经功能评分,随往返加速运动次数增加,3 组大鼠神经功能评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。致伤后 14 d 内 A、B、C 3 组大鼠死亡率分别为 5.0%、25.0%、50.0%,其中 C 组与 A 组及 B 组死亡率比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

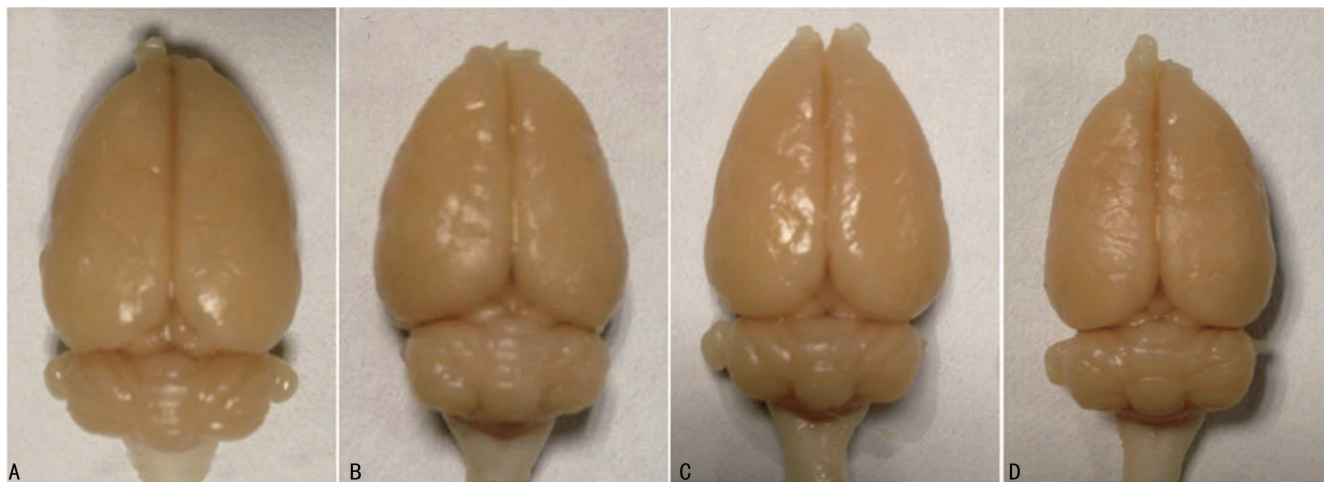
2.3 病理学改变 肉眼下,正常对照组和 A、B、C 3 组大鼠大脑表面、蛛网膜下腔、脑室等区域均未见明显出血病灶,见图 2。光镜下正常对照组可见神经束排列整齐且无空泡形成;A 组可见大脑胼胝体区、灰白质交界区、脑干等部位神经束疏松、紊乱,血管淤滞,空泡形成,神经元肿胀变性,细胞核显示不清,突触结构模糊的典型 DAI 病理特征。B 组与 A 组比较,C 组

与 B 组比较,其神经束排列更疏松、紊乱,空泡形成及神经细胞肿胀变性更明显,见图 3。

表 3 3 组不同程度致伤大鼠神经功能评分及死亡率比较

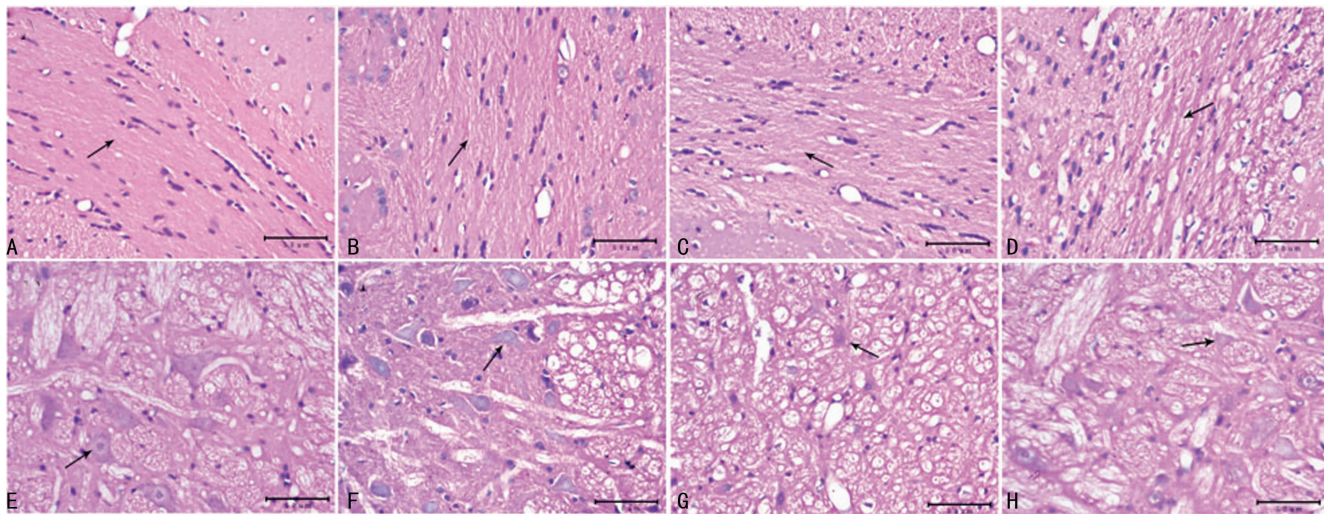
组别	n	神经功能评分($\bar{x} \pm s$,分)	死亡率[n(%)]
A 组	20	16.90 ± 1.50	1(5.0)
B 组	20	14.00 ± 1.70*	5(25.0)
C 组	20	8.00 ± 1.63*#	10(50.0)*#
P		<0.05	<0.05

*: $P < 0.05$,与 A 组比较;#: $P < 0.05$,与 B 组比较。



A: 正常对照组;B: 轻度致伤;C: 中度致伤;D: 重度致伤。

图 2 致伤 24 h 大鼠脑大体标本情况



A: 正常对照组;B: 轻度损伤;C: 中度损伤;D: 重度损伤;E: 正常对照组;F: 轻度损伤;G: 中度损伤;H: 重度损伤。

图 3 胼胝体神经纤维束及灰白质交界区、脑干等部位神经元损伤情况(HE 染色, ×400)

3 讨 论

DAI 是导致颅脑外伤患者重度伤残、植物状态及死亡的常见原因^[1-5,9]。各种暴力作用于头部产生线或角加速度,在脑组织内产生剪切力,导致神经轴索损伤甚至断裂、毛细血管撕裂,使脑深部白质发生广泛弥漫损伤即 DAI^[10]。其发生机制尚不完全明确,是神经外科研究的重要内容,有研究证明头部直线和旋转加速运动是导致 DAI 最重要的机制之一^[11]。为模

拟该损伤机制,笔者参照国内外相关致伤装置,自制了一种可以使大鼠的颅同时产生瞬间超大角加速度和线加速度的致伤装置。

DAI 动物模型的建立在国内外已经有较多研究,如瞬间旋转损伤模型^[6,12]、液压冲击损伤模型^[13]、打击负荷损伤模型^[14]、加速或减速损伤模型^[15]、牵拉损伤模型^[16]等。目前,众多学者对 DAI 损伤机制的认识趋于一致,即外力使头部产生

线或角加速度,由于脑各组织的物理质量不同,其运动速度不均,易受剪切力作用,导致神经轴索损伤甚至断裂。因此,笔者在参照 Gennarelli 等^[6]和冯氏^[7]的致伤装置基础上,加以改进,模拟直线加速和角加速的发生机制,制作了一种由恒定气压推动可同时产生恒定线加速度和角加速度的实验装置。借助气动转换系统实现 90°顺时针、逆时针旋转往返加速运动,并保持恒定的线加速度及角加速度。该装置结合了直线加速及旋转加速损伤机制,更符合临床实际中 DAI 的发生机制。

临床上 DAI 患者的预后差别很大,主要由损伤当时的严重程度决定。因此,建立一个稳定的可以反映不同损伤程度的动物模型,用于 DAI 的治疗及预后研究具有重大意义。既往报道中尚缺乏对 DAI 损伤程度进行分级的研究,因此笔者拟通过调控旋转往返加速运动次数,来实现不同程度致伤。

本研究在预实验过程中观察发现,仅对大鼠做 1 次顺时针 90°旋转加速运动后,病理组织学观察发现未见明显弥漫性轴索损伤病理学改变;做 1 次 90°顺时针、逆时针旋转往返加速运动后,病理组织学可见轻度弥漫性轴索损伤病理改变;行 4 次往返运动致伤后大鼠的死亡率极高,无法完成实验。因此,笔者分别给予 A、B、C 3 组 1、2、3 次旋转往返加速运动,制造不同程度 DAI 模型。结果发现 3 组大鼠致伤后在神经生理反射、神经功能评分及病理组织学改变上均符合 DAI 表现,且组间有明显差异。既往很多实验装置建模后,大体标本可见明显出血灶^[17-18],实际上是一种复合型损伤,并非单纯的 DAI,本实验在致伤后 24 h, A、B、C 3 组大鼠肉眼下大脑表面、蛛网膜下腔、脑室等区域均未见明显出血病灶,而病理组织学改变上符合 DAI 的表现,因此本装置所建立的 DAI 模型属于单纯型 DAI,将更有利于相关研究。

综上所述,本装置原理与临床 DAI 发生机制相似,实验方法简单合理,易于操作,可重复性强,能成功构建具有典型 DAI 病理学及神经功能改变的动物模型,且可通过调节旋转往返加速运动次数构建不同的损伤程度,是一种较为理想的 DAI 损伤装置。

参考文献

- [1] Li XY, Feng DF. Diffuse axonal injury: novel insights into detection and treatment[J]. *J Clin Neurosci*, 2009, 16(5): 614-619.
- [2] Jing GJ, Yao XT, Li YY, et al. Mild hypothermia for treatment of diffuse axonal injury: a quantitative analysis of diffusion tensor imaging[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(2): 190-197.
- [3] Roe WD, Mayhew IG, Jolly RD, et al. Traumatic brain injury, axonal injury and shaking in New Zealand sea lion pups[J]. *Vet J*, 2014, 200(1): 96-102.
- [4] Matsukawa H, Shinoda M, Fujii MA, et al. Acute alcohol intoxication, diffuse axonal injury and intraventricular bleeding in patients with isolated blunt traumatic brain injury[J]. *Brain Inj*, 2013, 27(12): 1409-1414.
- [5] Zaninotto AL, de Paula Guirado VM, Baldivia B, et al. Improvement of verbal fluency in patients with diffuse brain injury over time[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2014(10): 1155-1160.
- [6] Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, et al. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate[J]. *Ann Neurol*, 1982, 12(6): 564-574.
- [7] 李雪元,戴广辉,冯东福,等. 小动物弥漫性脑损伤致伤装置的设计[J]. *生物医学工程与临床*, 2009, 13(6): 489-493.
- [8] Carcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634.
- [9] Woischneck D, Kapapa T, Scheuerle A, et al. The histological confirmation of diffuse axonal injury in severe brain injury survivors[J]. *Versicherungsmedizin*, 2014, 66(4): 188-192.
- [10] Povlishock JT, Christman CW. The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts[J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(4): 555-564.
- [11] Browne KD, Chen XH, Meaney DF, et al. Mild traumatic brain injury and diffuse axonal injury in swine[J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(9): 1747-1755.
- [12] Friess SH, Ichord RN, Owens K, et al. Neurobehavioral functional deficits following closed head injury in the neonatal pig[J]. *Exp Neurol*, 2007, 204(1): 234-243.
- [13] Park E, Liu E, Shek M, et al. Heavy neurofilament accumulation and alpha-spectrin degradation accompany cerebellar white matter functional deficits following forebrain fluid percussion injury[J]. *Exp Neurol*, 2007, 204(1): 49-57.
- [14] Marmarou A, Foda MA, van Den Brink W, et al. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics[J]. *J Neurosurg*, 1994, 80(2): 291-300.
- [15] 谭源福,曹美鸿,刘运生. 减速性脑损伤动物模型的创建[J]. *中华创伤杂志*, 2001, 17(4): 212-215.
- [16] Singh A, Lu Y, Chen C, et al. A new model of traumatic axonal injury to determine the effects of strain and displacement rates[J]. *Stapp Car Crash J*, 2006(50): 601-623.
- [17] 刘晓斌,宋锦宁,陈景宇,等. 脑弥漫性轴索损伤实验装置的研制及动物模型的建立[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2008, 29(5): 595-598.
- [18] 何海涛,黎海涛,黎川,等. 急性弥漫性轴索损伤致伤模型的建立及损伤机制初步探讨[J]. *重庆医学*, 2007, 36(15): 1496-1498.