论著

文章编号:1000-5404(2006)22-2272-04

高原大鼠实验性开放性颅脑创伤模型的建立

张礼均,胥全宏,邓聪颖,胡胜利,林江凯,朱 刚,王宪荣,高伯元,冯 华 (第三军医大学西南医院神经外科,全军神经系统疾病微创诊治专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 建立模拟高原条件下大鼠实验性开放性颅脑创伤的动物模型。**方法** 用动物低压氧舱模拟高原环境,民用射钉枪射击建立大鼠实验性开放性颅脑创伤动物模型,分别于伤后各时相点观察动物行为学、病理学、听觉脑干诱发电位和脑含水量等结果,了解模型建立的稳定性和可重复性。**结果** 高原致伤组与平原致伤组均存在:①不同程度的颅脑创伤表现;②神经元细胞核、尼氏体和细胞器出现不同程度的损伤及缺血改变;③脑水肿;④伤后早期存在脑干抑制。两组比较,高原致伤组上述结果更严重,持续时间更长,本实验制备的开放性颅脑创伤动物模型,伤情稳定,可重复性好。**结论** 本实验制备的动物模型,成功地模拟高原条件下大鼠低速低能投射物所致的开放性颅脑创伤动物模型。

关键词:高原;开放性颅脑创伤;动物模型

中图法分类号:R-332;R339.54;R651.1 **文献标识码**:A

Establishment of animal model of open craniocerebral injury in rats exposed to high altitude

ZHANG Li-jun, XU Quan-hong, DENG Cong-ying, HU Sheng-li, LIN Jiang-kai, ZHU Gang, WANG Xian-rong, GAO Bo-yuan, FENG Hua (Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To establish animal model of open craniocerebral injury in rats exposed to simulated high altitude. **Methods** Healthy Wistar rats were raised in hypobaric oxygen chamber simulating 4 000-meter high altitude for 3 d, then were made into open craniocerebral injury by gunshots. The animal ethology, the pathology, brain-stem auditory evoked potential and water content of brain were observed immediately or at 1, 4, 12, 24, 48, 72, 168 h after gunshot. Matched rats raised at plain served as controls, and received the same treatment as the experimental rats. **Results** The rats in experimental group and control group all showed: (1) craniocerebral trauma at different degree; (2) ischemic changes and injuries at different degree in caryon of neuron, tigroid bodies and cell organs; (3) brain edema; (4) disorder of brain stem at early period after injury, but all features mentioned above were more severe in experimental rats than control rats. The rat model of open craniocerebral injury was of stability and good repeatability. **Conclusion** The model we established can simulate the open craniocerebral injury made by the missile projectile of brachytely and low energy in rats at high altitude.

Key words: high altitude; open craniocerebral injury; animal model

颅脑枪击伤在现代战创伤中极其常见,发生率高,阵亡率、伤死率和致残率高居各部位战伤首位[1,2],目前颅脑枪击伤的研究主要侧重于临床报道[3,4],缺乏稳定的重复性好的实验动物模型。国内外对高原颅脑创伤的伤情特点、发病机制及现场救治的研究均非常薄弱[3],目前还没有高原开放性颅脑创伤的动物模型制备的报道。本实验进行了模拟急进高原条件下大鼠

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划指令性课题(01L049)
Supported bt the Mandatory Scientific Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (01L049)

作者简介:张礼均(1975-),男,重庆市铜梁县人,硕士研究生,医师,主要从事研究颅脑创伤及神经外科重症监护方面的研究。电话:(023)68766070,E-mail:zlj940202@163.com

通讯作者:冯 华,电话:(023)68754153,E-mail:Fenghua8888@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-04-06;**修回日期**:2006-10-21

开放性颅脑创伤动物模型的制备，为下一步研究高原开放性颅脑创伤的伤情特点及救治提供可靠的动物模型。

1　材料与方法

1.1　动物及分组

健康 Wistar 大鼠 144 只（第三军医大学实验动物中心），体质量（200 ± 20）g，雌雄不限，随机分为平原及高原 2 组，每组 72 只。各组随机抽取 9 只动物作为平原及高原对照组，其余动物分别制备平原及高原组开放性颅脑创伤模型，分别于伤后 1、6、12、24、48、72 h 和 168 h 各时相点随机抽取 9 只动物进行实验研究。

1.2　开放性颅脑创伤动物模型的制备

1.2.1　射钉枪性能测定　　民用气动 F-30 J422 直钉枪作为大鼠开放性颅脑创伤制备工具，致伤钉为 F-30 封钉，实验压力 0.7 MP，用铜丝靶测时仪（第三军医大学野战外科研究所）测定该工作压力下初速度为（24.23 ± 3.53）m/s。

1.2.2　制备平原致伤组动物模型　　碘酒酒精消毒大鼠头部后，固定其头部，取双眼内眦连线后 15 mm，中线旁开 2 mm 作为致伤点，将射钉枪口紧贴致伤点头皮，射击方向垂直向下，伤后随即沿伤道方向轻柔取出直钉。

1.2.3　制备高原致伤组动物模型　本实验模拟急进高原，将动物放入减压舱内，连续饲养 3 d，舱内压力 61.6 kPa（模拟海拔 4 000 m 高原，舱内温度 18 ℃），每日开舱 2 次，每次 30 min，更换添加食水，打扫舱内卫生。3 d 后致伤，方法同 1.2.2。伤后在同等条件下饲养至各时相点检测完毕。高原对照组采取同样饲养方法。

1.3　方法

1.3.1　观测指标及方法

1.3.1.1　动物行为学　　各组大鼠自由进食水，观察伤后各时相点饮食、活动和死亡情况。

1.3.1.2　病理学　　取大体标本、HE 染色 、尼氏染色和透射电镜比较两致伤组病理结果。

1.3.1.3　听觉脑干诱发电位（brain-stem auditory evoked potential，BAEP）　　2% 异戊巴比妥钠 100 mg/kg 腹腔麻醉，固定大鼠，1 寸连续记录电极于矢状缝与双侧外耳道交点斜向前刺入头皮下 5 mm，参考电极置于测试耳后皮下，地线以金属夹连接尾根部，Keypoint4 型（美敦力公司，美国）诱发电位仪记录，Click 短声刺激，强度 100 dB，声源距外耳道 10 mm，持续 0.1 ms，滤波带 100 ~ 2 000 Hz，分析时间 10 ms，平均叠加 2 100 次，重复 2 次，伤后即测。

1.3.1.4　脑含水量　　各组伤后预定时间内将动物断头处死，迅速取脑，部位一致，伤区前外侧 1 mm 取大脑皮层 1 块，滤纸吸去表面的血液及水分，分析天平（分度值 0.1 mg）称湿重后，置试管内，80 ℃ 恒温烤箱烘烤至恒重（2 次质量差 ≤ 0.2 mg），称取干重，计算脑含水量。

1.4　统计学处理

统计资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　伤后动物行为学观察情况

2.1.1　一般情况　　伤道直径较枪钉略宽，约 1.5 mm，枪钉多可沿伤道轻松取出，未见明显异物及碎骨片。①平原致伤组：即刻呼吸暂停 13 只（14.29%），辅助呼吸 1 ~ 3 min 后恢复规则自主呼吸，轻度全身抽搐 46 只（50.55%），肢体活动障碍 11 只（12.09%），昏迷 > 1 h 8 只（8.79%），醒后反应迟钝、行动迟缓，对外界刺激反应力降低，不思饮食等表现，个别躁动不安。伤后 24 h 表现最为明显，之后逐步恢复，至 168 h 仍不能完全恢复正常。②高原致伤组：高原致伤组较平原致伤组伤情重，伤后 48 h 显著，即刻呼吸暂停 15 只（16.48%），全身抽搐 52 只（57.14%），肢体活动障碍 12 只（13.19%），昏迷 > 1 h 9 只（9.89%）。2 组比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）。③高原对照组：出现轻微上述表现。

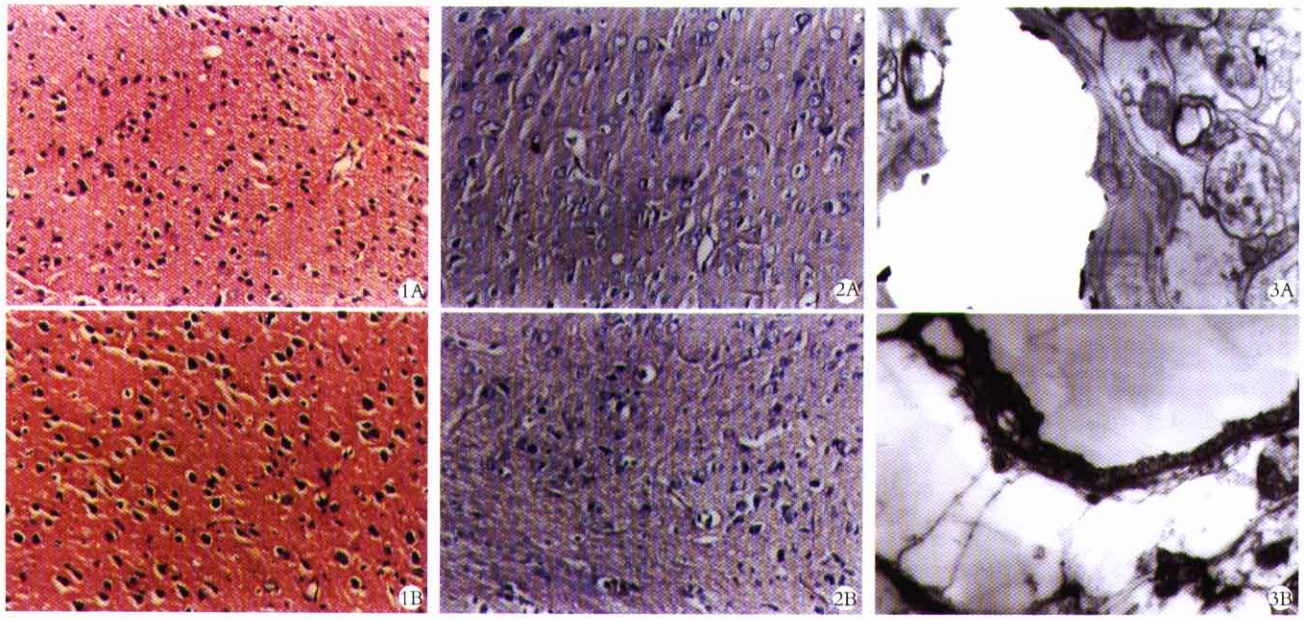
2.1.2　死亡情况　　两致伤组动物死亡以伤后即刻和 24 h 内为主，平原致伤组伤后即刻和 24 h 死亡分别为 8 只和 9 只，高原致伤组为 7 只和 14 只。早期主要死因为伤道大出血及呼吸、心跳停止；168 h 死亡两致伤组均为 2 只，主要原因为伤道感染、颅内感染。高原对照组及平原对照组均存活良好。

2.2　病理学

大体观察：两对照组脑表面完整无损；致伤组动物以伤道为中心皮层淤血，局灶脑挫伤，直径 3 ~ 6 mm，个别可见颅内血肿及基底池、颅底少量蛛网膜下腔出血，未见明确颅内感染病灶形成。

光镜：①HE 染色：伤道边缘神经元坏死，大片出血，伤区边缘 3 mm，1 ~ 6 h 有神经细胞缺血改变，细胞轻度缩小或肿胀、核固缩、核仁和细胞器消失、血管周围间隙增宽，24 ~ 48 h 大量神经元颗粒空泡改变，核溶解，高原致伤组各时相点缺血改变及脑水肿程度较平原致伤组严重（图 1A、B）。②尼氏染色：平原致伤组损伤 6 h 神经元尼氏体数目减少，24 ~ 48 h 进一步减少，变小，胞体肿胀变圆，细胞质空泡形成，核结构模糊消失，72 h 逐渐恢复，高原致伤组较平原致伤组上述改变明显（图 2A、B）。

透射电镜：1 ~ 6 h 出现神经元线粒体肿胀、嵴断裂、结构模糊、内质网和高尔基复合体扩张、粗面内质网脱颗粒、髓鞘变形、血管基底膜断裂，内皮细胞吞饮小泡增多，外侧可见渗出液聚集，血管受压变形，管周星形细胞突起水肿，24 ~ 48 h 达到高峰，72 h 开始恢复。高原致伤组上述改变较为明显（图 3A、B）。



A:平原组; B:高原组

图1 平原和高原致伤组大鼠伤后6 h神经元改变 (HE染色×200)

图2 平原和高原致伤组大鼠伤后48 h神经元改变 (尼氏染色×200)

图3 平原和高原致伤组大鼠伤后48 h神经元及血脑屏障改变 (透视电镜×6 000)

2.3 BAEP

高原致伤组与平原致伤组比较,各波潜伏期及波间潜伏期明显延长,以伤侧Ⅲ波以后各波潜伏期延长最为明显,前者更明显,Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ波潜伏期及Ⅰ~Ⅴ波波间潜伏期2组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。其中2只在1~24 h死亡,潜伏期及波间潜伏期明显延长,伤侧各波平坦,波形难以辨认,见表1。

2.4 脑含水量结果

高原致伤组与平原致伤组不同时相点局部脑皮层含水量比较,有统计学意义(表2)。

表1 高原致伤组与平原致伤组BEAP($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别		BEAP各波潜伏期					
		Ⅰ	Ⅲ	Ⅴ	Ⅰ~Ⅲ	Ⅲ~Ⅴ	Ⅰ~Ⅴ
平原	对照组	1.16±0.11	2.87±0.19	4.90±0.24	1.71±0.16	2.03±0.16	3.74±0.18
	伤后健侧	1.36±0.12[a]	3.30±0.08[a]	5.17±0.15	1.94±0.09	1.87±0.08	3.81±0.13
	伤后患侧	1.53±0.09[ac]	3.75±0.02[bd]	5.90±0.14	2.22±0.17[ac]	2.15±0.12	4.37±0.29[ac]
高原	对照组	1.23±0.26	2.90±0.18	4.96±0.24	1.68±0.17	2.06±0.21	3.73±0.17
	伤后健侧	1.51±0.18[ae]	3.68±0.11[ae]	5.67±0.10[ae]	2.17±0.10[a]	1.99±0.20	4.16±0.27[a]
	伤后患侧	1.88±0.17[ace]	4.16±0.16[bce]	6.38±0.11[bce]	2.28±0.10[ac]	2.22±0.20	4.50±0.23[ace]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与各对照组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$,与同组患侧与健侧比较; e: $P<0.05$,与平原致伤组各相应时相点比较

表2 高原致伤组与平原致伤组脑皮层含水量[$n=72$, ($\bar{x}\pm s$)%]

组别	对照组	时相点						
		1 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	168 h
平原组	78.30±0.35	80.31±1.03[a]	81.47±1.27[a]	86.47±1.23[ab]	86.65±1.17[a]	85.84±0.81[a]	85.60±1.15[a]	81.81±1.60[ab]
高原组	78.74±0.94	76.33±0.62[a]	83.12±1.12[abc]	87.58±0.99[a]	88.55±1.03	89.44±1.27[ad]	87.50±1.12[ac]	82.66±1.13[ab]

a: $P<0.01$,与各对照组比较;b: $P<0.01$,与相邻上一时相点比较;c: $P<0.05$,d: $P<0.01$,与平原致伤组各相应时相点比较

3　讨论

高原引起机体病理生理改变主要因素是缺氧[5,6]，急性高原病多在海拔 2 500 m 以上发生，低压氧舱常用于模拟高原动物实验研究。

本实验用低压氧舱模拟海拔 4 000 m 的高原，缺氧与高原基本一致，Wastar 大鼠作为标准化实验动物，遗传背景明确，动物个体差异小，利于大批量重复实验，完全满足本实验要求，持续减压饲养 3 d 后实验，可模拟急进高原状态，射钉枪作为致伤工具，具有简易、伤情稳定、存活率高、存活时间长、便于观察等特点，可模拟低速低能投射物所致开放性颅脑创伤的研究。射钉枪制备颅脑创伤模型具有火器伤的部分特点，但又不具备火器伤的高能、高速、高破坏性等特点，具有一定局限性。通过动物行为学和死亡率的观察，本实验制备模型伤情稳定、可重复性好，能较好地模拟高原开放性颅脑创伤进行伤情特点的研究。

两致伤组比较，即刻呼吸暂停比例均较高，辅助呼吸 1 ~ 3 min 后恢复规则自主呼吸，提示开放性颅脑创伤后现场救护首先应该保持呼吸道通畅，并辅以机械通气，可以显著降低死亡率。高原致伤组全身抽搐更明显(52∶46)，症状重，可能与脑组织缺氧有关，保持呼吸道通畅同时，早期吸氧可能会环节症状的发生及程度，1 ~ 24 h 内死亡的实验动物行 BEAP，可见潜伏期及波间潜伏期明显延长，伤侧各波平坦，波形难以辨认，跟动物行为学结果一致，说明颅脑枪击伤早期存在脑干功能抑制，早期保持呼吸道通畅，体外心脏按摩等现场救护是极其重要的，往往可以挽救呼吸暂停、心跳骤停病例的生命。伤后大体标本见伤道淤血，个别存在颅内血肿，早期密切观察病情变化是至关重要的，条件许可，立即行头颅 CT 等影像学检查，可以确定下一步处理意见。HE 染色和尼氏染色均提示伤后 6 h 出现神经元缺血、坏死，颅脑创伤救治目的之一就是挽救半暗带神经元，因此神经元的保护应该伤后 6 h 内进行，而高原致伤组出现时相更早，程度更重，救治难度无疑会进一步增加，透射电镜说明同样结果。无论在时间还是在空间分布上，高原致伤组均较平原致伤组脑水肿更明显，有统计学意义($P<0.05$)，说明高原环境下开放性颅脑创伤脑水肿程度更严重，持续时间更长，脑水肿引起颅内压增高，会进一步加重缺氧，因此高原颅脑创伤脱水治疗应该较平原加强，有条件的话，应该进行颅内压监测，以指导脱水剂的运用和手术时机的选择，可以更有效地救治高原开放性颅脑创伤。

通过观察本实验制备的动物模型动物行为学、病理学、BEAP 和脑含水量结果显示，高原环境下开放性颅脑创伤的损伤程度较平原致伤组更重，发生时间更早，持续时间更长[7]。除遵循开放性颅脑创伤早期清创[4,8]外，现场早期保持呼吸道通畅、运用神经保护药物或措施、吸氧和加强脱水，对降低高原开放性颅脑创伤死亡率、减少神经功能损害具有重要作用，因此本实验制备动物模型较好地模拟高原开放性颅脑创伤，伤情稳定，可重复性好，是研究高原颅脑枪击伤的较好的实验动物模型。

参考文献：

[1] GHAJAR J. Traumatic brain injury[J]. Lancet, 2000, 356(9233): 923 - 929.

[2] 冯　华，王宪荣. 实用神经外科基础与临床[M]. 北京：人民军医出版社，2002：211 - 221.

[3] ERDOGAN E, GONUL E, SEBER N. Craniocerebral gunshot wounds [J]. Neurosurg Q, 2002, 12(1): 1 - 18.

[4] KIM K A, WANG M Y, MCNATT S A, *et al*. Vector analysis correlating bullet trajectory to outcome after civilian through-and-through gunshot wound to the head: using imaging cues to predict fatal outcome [J]. Neurosurgery, 2005, 57(4): 737 - 747.

[5] 胥全宏，杨日高，冯　华. 66 例高原颅脑外伤伤情特点及预后分析[J]. 重庆医学，2003，32(11)：1529 - 1531.

[6] CROCKARD H A, BROWN F D, JOHNS L W, *et al*. An experimental cerebral missile injury model in primates[J]. J Neuroserg, 1977, 46(6): 776 - 783.

[7] 胥全宏，冯　华，王宪荣，等. 高原大鼠颅脑损伤局部脑组织氧分压变化特点[J]. 中华神经外科疾病研究杂志，2005，4(2)：137 - 140.

[8] AMIRJAMSHIDI A, ABBASSIOUN H, RAHMAT H. Minimal debridement or simple wound closure as the only surgical treatment in war victims with low-velocity penetrating head injuries. Indications and management protocol based upon more than 8 years follow-up of 99 cases from Iran-Iraq conflict[J]. Surg Neurol, 2003, 60(2): 105 - 110.

（编辑　薛国文）