·综 述·

脑出血动物模型研究进展

Progress of studies on experimental animal models of intracerebral hemorrhage

孙辉利[1],余 茜[2] (1. 泸州医学院研究生学院 2010 级,四川 泸州 646000;2. 四川省医学科学院,四川省人民医院康复科,四川 成都 610072)

[关键词] 脑出血;动物模型;研究进展
[中图分类号] R743; R-332 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2013)01-0082-02

脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)占首次卒中的 10% ~ 15%,30 d 内死亡率占 35% ~52%,只有 20% 的患者 6 个月后生活能自理[1]。脑出血严重威胁人类生命和健康,其所引起的神经功能障碍大大降低了个体生存质量,并给社会带来极大的负担。脑出血的病理生理学相关机制尚未明确,众多学者通过建立动物模型研究脑出血后的组织损伤机制,以期探索出脑出血新的治疗方法,并评价其治疗的效果。本文综述了脑出血动物模型的造模技术、模型发展和应用,供学者参考。

1 动物选择

脑出血实验研究采用最多的为啮齿类动物,因其价格低廉,且目前已积累了大量关于啮齿类动物的生理、生化、药理、形态学及遗传学等可借鉴的实验基础资料[2],但其体型较小,脑组织容积小,注入血肿只能以微升计算,较难用影像学及形态学方法评价脑内血肿的变化。兔子因其耳静脉取血容易,且基底节区相对发达,易于穿刺定位,且出血后神经功能缺损明显,则脑出血后神经行为学变化和神经电生理改变的研究较常用[3]。犬类因其生理功能与人类相似性较高,颅脑体积大小也适中,便于进行模型制作及血肿清除手术训练[4]。灵长类动物的 DNA 与人类相似度极高,并且其生理结构和体型与人类高度相似,使得它们成为理想的临床前期实验动物[5],但由于其价格昂贵、来源较少以及伦理学的限制,使得其在脑出血研究中的应用受限。猪脑容积大、脑实质呈回状、脑白质发达,是猪脑用于脑出血研究的优势,价格相对灵长类动物便宜,且小型猪的大量培育使得其来源广泛,所以猪成为脑出血研究较为理想动物[6]。以上动物用于脑出血实验研究都各有优缺点,研究者应根据自己的研究目的选用适合的动物。

2 模型的制备

目前主要有四种方式用于脑出血动物模型的制备,包括:微球囊充胀法,细菌胶原酶注入法、自体血注入法和自发性脑出血模型。以下分别阐述各模型的特点。

2.1 微球囊充胀法

在 1987 年,Sinar 等[7]发明了微球囊插入充胀法制作脑出血模型。在 SD 大鼠颅骨定位钻孔,把微球囊置于 25 号钝性针头上,将其插入右侧尾状核,静置 30 min 后,在平均压 13.3 kPa 下,20 s 内将微球囊充胀至 50 uL,并且保留 10 min 后抽出。该模型可通过调节球囊内液体量,模拟不同血肿大小,且模型的一致性和重复性较好,避免了自体血注入法出现血液沿针道反流、血肿破入脑室或进入蛛网膜下腔以及血肿形态不一的缺陷。该模型理论上可用于研究脑出血血肿的占位效应和评价早期清除血肿后神经行为学的改变。故有学者利用微球囊充气和放气模拟血肿形成和清除的过程,研究外科血肿清除术的最佳治疗时机及临床疗效[8]。但该模型不能模拟血液成份本身对脑组织的损伤作用,不能观察血凝块形成所释放的物质引起的细胞毒性反应,因此目前较少采用此模型[9]。

2.2 细菌胶原酶注入法

细菌胶原酶是一种蛋白水解酶,能降解血管基底膜及间质胶原。1990 年,Rosenberg 等[10]用细菌胶原酶直接注入 SD 大鼠脑组织内诱导出脑出血模型。在这个模型中,通过立体定位仪用微量泵在 9 min 内把 2 uL 含有 0.011U 细菌胶原酶的生理盐水分组注入大鼠左侧尾状核。Rosenberg 等观察到胶原酶注入后 10 min 即有血液渗出,在 0.5 U 胶原酶组出血点周围水肿明显,且大鼠死亡率低,所以适合于脑出血的实验研究。在这模型基础上演变出一些模型,包括注射部位的改变[11],调整胶原酶浓度[12],注射速度和体积不同,还有胶原酶加肝素注入[13]。脑实质内注入胶原酶后可破坏脑血管基底膜,血液渗出到组织间隙通过缓慢积聚而形成血肿,血肿由小片状逐步汇集成较大血肿区域,且与脑实质混杂存在,因此与临床脑出血的发病不同。该模型较适合于研究脑出血后脑水肿的病理生理、生化改变及评价脑出血后神经功能的恢复状况和药物的治疗效果的研究。

2.3 自体血注入法

脑内直接注入自体血是目前最常用的脑出血动物模型,被认为是目前标准的实验模型。该模型由 Ropper 等[14]在 1982 年提出。从供体鼠静脉抽取血液,在 1 s 内通过 27 号导管注入到模型鼠右侧尾状核。这个模型没有考虑到供体鼠血液本身对模型的影响和注射压力变化等。因此,在 1994 年,由 Yang GY 等[15]用微注射泵把自体血以稳定的速率注射到右侧尾状核,制

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.2013010036
[收稿日期] 2012-09-20 [修回日期] 2012-10-06

作出一个可控、可复制的脑出血模型。然而,这种模型遇到一个主要的问题是注射速率较快会使血液沿着针道反流、破入脑室系统或是溢到硬膜下。为了解决血液沿针道反流问题,1996 年 Deinsberger 等[16]提出两次注血法。先注射 5 μmL 新鲜自体血,等待 10 min 使得血凝块形成并堵塞针道后再注射血液到尾状核形成血肿,这样使得血液沿针道反流最小化。但注射时间延长易形成血凝块,使得注射难度增大。有实验[13]在猪的颅骨定位钻孔后插入 19 mm 长的套管针,用 200 mm 长的硅胶导管连接套管针和动脉导管,动脉导管装有 10 mL 含抗凝剂肝素钠的动脉血,然后打开三通阀,连接电子微注射泵后以 2 mL/min 的速率注入 5 mL 血液到脑组织。注血过程可控性强,但血液注入后仍存在反流而血肿大小不稳定。同年,Shi Y 等[17]在猪的颅骨定位钻孔后将 8 号导尿管垂直插入脑内 2 cm,从导尿管气囊通道匀速缓慢注入 2.5 mL 生理盐水以扩开脑实质,静置 20 min,把气囊内水抽出后,两次取尾动脉血分别为 1 mL 和 1.5 mL,用前述两次注血法完成猪脑幕上出血模型。这种在注血前先将脑组织扩开一个腔,血液注入后反流明显减少,且血肿形态大小较稳定,结合了微球囊充胀法和自体血注入法优点,但在血液注入前已有气囊机械压迫导致脑损伤,则很难与血液本身所致脑损伤区别。

虽该模型仍存在不足,其不能模拟人体血压变化对脑出血血肿大小的影响,股动脉穿刺对后期神经功能评分有一定影响,但仍适用于血肿周围水肿带的病理生理机制的研究。张波等[18]将胶原酶诱导法和自体血注入法在同一实验中进行了对比,其认为自体血注入模型更接近临床。近年来自体血注入法产生 ICH 动物模型,其周围水肿带的病理生理机制成为研究热点。Yuxiang Gu 等[19]研究发现脑出血后周围水肿带有铁堆积并导致 DNA 损伤,对模型予以去铁胺治疗后其损伤降低。Gang Wu 等[20]对大鼠脑出血模型进行 MRI 检查也发现血肿周围有铁堆积。有证据表明凝血酶参与了脑出血后急性脑损伤,使得血脑屏障破坏、脑水肿、神经元凋亡[21]。也有学者发现凝血酶对脑出血后期的恢复起重要作用,其能促进神经、血管的再生和重塑[22-23]。另外,研究发现基质金属蛋白酶(MMPs)也参与了脑出血后脑损伤病理过程,且可能与凝血酶相互作用产生神经毒性[24]。

2.4 自发性脑出血模型

自发性脑出血动物模型主要有两种:一种是改变遗传基因获得的易卒中自发性高血压大鼠(SHRsp),卒中率高,能重现人类自发性脑出血发病过程。但因存在遗传局限性,易变种、断种,饲养困难,且价格高、来源少而限制了其在脑出血研究中的广泛应用。另一种是肾血管性高血压大鼠(RHR),采用夹闭双肾动脉或一侧肾动脉导致肾血管性高血压,但造模成功率低,典型者仅 40% ~60%,可能与动脉夹放置后固定不佳,动脉夹间隙宽度不合适有关。因此 Chelko SP 等[25]对肾动脉夹进行改进从而提高了造模成功率。相比于 SHRsp,RHR 廉价易得、造模简单且易于饲养。但两者都存在脑出血的部位和出血量不易控制的问题,故目前应用受限。另有药物诱导高血压脑出血动物模型,给 C57BL/6 小鼠输入 AngⅡ和一氧化氮合酶抑制剂诱导产生慢性高血压,再通过注射 AngⅡ进而产生急性高血压,从而发生高血压脑出血[26]。

此方式造模简单,创伤较小,但仍有脑出血部位和出血量不稳定的缺点。Gang Wu 等[27]在 SHRsp 基底节区注入自体血制作脑出血模型,将改变遗传基因的方式和自体血注入法结合,但研究发现血压的缓慢升高加重脑出血后神经损伤,并不能使血肿和周围水肿带扩大。

综合上述脑出血动物模型各自优缺点,目前仍缺乏一种能在高血压、动脉粥样硬化病理生理基础上发生的出血量及出血部位都稳定的脑出血动物模型。更缺乏脑出血恢复期能用于康复训练研究的动物模型。所以,探索出更接近人类脑出血发病过程的脑出血动物模型将进一步推动脑出血病理生理机制的研究,找到预防和治疗脑出血的新方法。

[参考文献]

[1] 汤秉洪,覃宗明,杨明彬,等. 高血压致丘脑出血的手术治疗分析[J]. 局解手术学杂志,2012. 21(3):275 -276.

[2] Wang J, Fields J, Dore S. The development of an improved preclinical mouse model of intracerebral hemorrhage using double infusion of autologous whole blood[J]. Brain Res,2008,1222(11):214 -221.

[3] 张建军,刘 铁. 兔脑出血模型的建立及其方法比较[J]. 浙江临床医学,2007,9(6):727 -728.

[4] 罗兴梅,伍国锋. 超早期微创清除颅内血肿对家犬脑出血模型运动诱发电位的影响[J]. 中国微创外科杂志,2011,11(3):256 -258.

[5] Zhu H, Li Q, Feng M, et al. A new cerebral hemorrhage model in cynomolgus macaques created by injection of autologous anticoagulated blood into the brain[J]. J Clin Neurosci,2011,18(7):955 -960.

[6] 刘 丛,程 远. 幼猪脑出血模型的建立与评价[J]. 中风与神经疾病杂志,2012,29(1):21 -23.

[7] Sinar EJ, Mendelow AD, Graham DI, et al. Experimental intracerebral hemorrhage: effects of a temporary mass lesion[J]. Br J Neurosurg, 1987, 66(4): 568 -576.

[8] Lopez-Valdes E, Hernandez - Lain A, Calandre L, et al. Time window for clinical effectiveness of mass evacuation in a rat balloon model mimicking an intraparenchymatous hematoma [J]. J Neurol Sci, 2000, 174(1):40 -46.

[9] Wu B, Ma Q, Khatibi N, et al. Ac-YVAD-CMK Decreases Blood-Brain Barrier Degradation by Inhibiting Caspase-1 Activation of Interleukin-1beta in Intracerebral Hemorrhage Mouse Model[J]. Transl Stroke Res, 2010,1(1):57 -64.

[10] Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke,1990, 21(2):801 -807.

[11] 刘安民,罗 铭,金华伟,等. 胶原酶诱导不同部位脑出血大鼠模型的神经功能比较[J]. 中华实验外科杂志,2008,25(5):615 -616.

[12] 杨 洁,倪厚杰,唐洲平. Ⅶ型胶原酶构建大鼠脑出血模型的组织病理学研究[J]. 神经损伤与功能重建,2012,7(4):235 -237.

[13] 王 坤,张少军. Ⅳ型胶原酶尾壳核内注射致中重度脑出血大鼠模型的建立[J]. 蚌埠医学院学报,2011,36(4):339 -341.

[14] Ropper AH, Zervas NT. Cerebral blood flow after experimental basal ganglia hemorrhage[J]. Ann Indian Acad Neurol, 1982, 11(4): 266 -271.

(下转第 86 页)

patients with blunt chest wall trauma: a systematic review and meta-analysis[J]. Injury, 2012, 43(1): 8 - 17.
[3] Kulshrestha P, Munshi I, Wait R. Profile of chest trauma in a level 1 trauma centre[J]. J Trauma, 2004, 57(3): 576 - 581.
[4] Bergeron E, Lavoie A, Clas D, et al. Elderly trauma patients with rib fractures are at greater risk of death and pneumonia[J]. J Trauma, 2003, 54(3): 478 - 485.
[5] Sirmali M, Turut H, Topcu S, et al. A comprehensive analysis of trau-matic rib fractures: morbidity, mortality and management[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2003, 24(1): 133 - 138.
[6] Bulger EM, Edwards T, Klotz P, et al. Epidural analgesia improves outcome after multiple rib fractures[J]. Surgery, 2004, 136(2): 426 - 30.
[7] Tanaka H, Yukioka T, Yamaguti Y, et al. Surgical stabilization or internal pneumatic stabilization? A prospective randomized study of management of severe flail chest patients[J]. J Trauma, 2002, 52(4): 727 - 732.
[8] Pape HC, Remmers D, Rice J, et al. Appraisal of early evaluation of blunt chest trauma: development of a standardized scoring system for initial clinical decision making[J]. J Trauma, 2000, 49(3): 496 - 504.
[9] Schild HH, Strunk H, Wever W, et al. Pulmonary contusion: CT vs plain radiograms[J]. J Comput Assist Tomogr, 1989, 13(3): 417 - 420.
[10] Fink MP, Helsmoortel CM, Stein KL, et al. The efficacy of an oscillating bed in the prevention of lower respiratory tract infection in critically ill victims of blunt trauma. A prospective study[J]. Chest, 1990, 97(1): 132 - 137.
[11] Antonelli M, Conti G, Moro ML, et al. Predictors of failure of noninvasive positive pressure ventilation in patients with acute hypoxemic respiratory failure: a multi-center study[J]. Intensive Care Med, 2001, 27(10): 1718 - 1728.
[12] Ozguc H, Akkose S, Sen G, et al. Factors affecting mortality and morbidity after traumatic diaphragmatic injury[J]. Surg Today, 2007, 37(12): 1042 - 1046.
[13] Rubikas R. Diaphragmatic injuries Eur[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2001, 20(1): 53 - 57.
[14] Grimes OF. Traumatic injuries of the diaphragm[J]. Am J Surg, 1974, 128(2): 175 - 181.
[15] Sangster G, Ventura V, Carbo A, et al. Diaphragmatic rupture: a frequently missed injury in blunt thoracoabdominal trauma patients[J]. Emerg Radiol, 2007, 13(5): 225 - 230.
[16] Waldschmidt ML, Laws HL. Injuries of the diaphragm[J]. J Trauma, 1980, 20(7): 587 - 592.
[17] Matthews BD, Bui H, Harold KL, et al. Laparoscopic repair of traumatic diaphragmatic injuries[J]. Surg Endosc, 2003, 17(2): 254 - 258.
[18] Martinez M, Briz JE, Carillo EH. Video thoracoscopy expedites the diagnosis and treatment of penetrating diaphragmatic injuries[J]. Surg Endosc, 2001, 15(1): 28 - 32.
[19] Mattox KL, Feliciano DV, Burch J, et al. Five thousand seven hundred sixty cardiovascular injuries in 4459 patients. Epidemiologic evolution 1958 to 1987[J]. Ann Surg, 1989, 209(5): 698 - 705.
[20] Mirvis SE, Shanmuganathan K, Miller BH, et al. Traumatic aortic injury: diagnosis with contrast-enhanced thoracic CT-five-year experience at a major trauma center[J]. Radiology, 1996, 200(2): 413 - 422.
[21] Demetriades D, Velmahos GC, Scalea TM, et al. Operative repair or endovascular stent graft in blunt traumatic thoracic aortic injuries: results of an American Association for the Surgery of Trauma Multicenter Study [J]. J Trauma, 2008, 64(3): 561 - 570.
[22] Hoffer EK. Endovascular intervention in thoracic arterial trauma[J]. Injury, 2008, 39(11): 1257 - 1274.

(编辑:周小林)

(上接第 83 页)

[15] Yang GY, Betz AL, Chenevert TL, et al. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats[J]. Br J Neurosurg, 1994, 81(7): 93 - 102.
[16] Deinsberger W, Vogel J, Kuschinsky W, et al. Experimental intracerebral hemorrhage: description of a double injection model in rats[J]. Amyotroph Lateral Scler, 1996, 18(4): 475 - 477.
[17] Shi Y, Li Z, Zhang S, et al. Establishing a model of supratentorial hemorrhage in the piglet[J]. Tohoku J Exp Med, 2010, 220(1): 33 - 40.
[18] 张 波,孙善全,邱国平,等. 胶原酶和自体血注入法建立脑出血动物模型的比较[J]. 解剖学杂志, 2012, 35(1): 75 - 78.
[19] Gu Y, Hua Y, He Y, et al. Iron accumulation and DNA damage in a pig model of intracerebral hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 111(7): 123 - 128.
[20] Wu G, Xi GH, Hua Y, et al. T2* magnetic resonance imaging sequences reflect rrain tissue iron deposition following intracerebral hemorrhage[J]. Transl Stroke Res, 2010, 1(1): 31 - 34.
[21] Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage[J]. Lancet Neurol, 2006, 5(1): 53 - 63.
[22] Hua Y, Keep RF, Gu Y, et al. Thrombin and brain recovery after intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2009, 40(3): 88 - 89.
[23] Yang S, Song S, Hua Y, et al. Effects of thrombin on neurogenesis after intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2008, 39(7): 2079 - 2084.
[24] Xue M, Fan Y, Liu S, et al. Contributions of multiple proteases to neurotoxicity in a mouse model of intracerebral haemorrhage[J]. Brain, 2009, 132(1): 26 - 36.
[25] Chelko SP, Schmiedt CW, Lewis TH, et al. A novel vascular clip design for the reliable induction of 2-kidney, 1-clip hypertension in the rat [J]. J Appl Physiol, 2012, 112(3): 362 - 366.
[26] 张玲玉,叶 鹏,等. 小鼠急性和慢性高血压期间自发性脑出血[J]. 中华高血压杂志, 2010, 18(4): 399 - 399.
[27] Wu G, Bao X, Xi G, et al. Brain injury after intracerebral hemorrhage in spontaneously hypertensive rats[J]. J Neurosurg, 2011, 114 (6): 1805 - 1811.

(编辑:左艳芳)