DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.008
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
1394 2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)12-1394-02

采用Ⅳ型胶原酶构建大鼠脑出血模型

张艳玲[1],陈康宁[1],邵淑琴[1],王 英[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院神经内科;[2]基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 利用Ⅳ型胶原酶构建大鼠脑出血模型,并研究血肿形成速度和血肿形成大小的影响因素。方法 使用健康雄性200~250 g Wistar大鼠,随机分组,分别脑内尾状核注射不同容积Ⅳ型胶原酶/肝素生理盐水溶液、单纯Ⅳ型胶原酶生理盐水溶液、单纯生理盐水,于术后6 h、12 h、24 h、3 d、7 d分别观察冰冻切片连续切片血肿大小。结果 单纯生理盐水注射仅引起12 h内的针道渗血,单纯胶原酶生理盐水注射3 d可以形成直径3 mm左右的血肿,Ⅳ型胶原酶/肝素生理盐水注射24 h可形成直径3 mm左右的血肿。结论 Ⅳ型胶原酶/肝素生理盐水注射可以建立理想稳定的脑出血动物模型,且血肿大小和注射溶液容积呈正相关。

关键词:胶原酶;脑出血;动物模型
中图法分类号:R-332;R345;R743.34 文献标识码:A

Establishment of rat cerebral hemorrhage model by type Ⅳ collagenase injection

ZHANG Yan-ling, CHEN Kang-ning, SHAO Shu-qin, WANG Ying (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To establish a cerebral hemorrhage model in rats by local injection of type Ⅳ collagenase, and explore the factors affecting the speed and volume of hematoma formation. **Methods** A total of 150 healthy male Wistar rats weighing from 200 to 250 g were randomly divided into 3 groups, control, collagenase, and collagenase/heparin groups. Animals in those groups received injection of saline, collagenase (0.2 U/μl), and collagenase (same dose) and heparin (2 U/μl) with different volume respectively at the caudate nucleus. The volume of the hematoma in the rats (n=6 at each time point) was observed 6, 12, and 24 h, and 3, 7d after the injection. **Results** Permeation of blood was found in 12 h after injection in control group. Hematoma about 3 mm in diameter was found in 3 d after injection in collagenase group, while in collagenase/heparin group, it was found in 24 h. **Conclusion** Cerebral hemorrhage model established by local injection of collagenase/heparin in saline solution is ideal and reliable, and the size of hematoma is in correlation with the volume of solutions injected into the brain.

Key words: collagenase; cerebral hemorrhage; animal model

脑出血是一种常见病、多发病,关于脑出血的实验研究很多,动物模型有很多种。曾经使用水、气囊模仿脑出血的占位效应,之后采用自体血脑内注射的自体血肿模型[1],以及目前使用较多的胶原酶脑出血模型[2]。水、气囊可以模仿脑出血后的占位效应,但不能反映出血后局部红细胞在病理生理中的作用;自体血肿模型很好的解决了上述问题,但是自体血肿模型是人为的血肿过程,血肿来势突然;胶原酶脑出血模型相对更接近病理过程,体现了一个逐渐渗血的过程。目前利用胶原酶构建脑出血动物模型主要有两种,分别使用Ⅳ型胶原酶和Ⅶ型胶原酶。我们使用Ⅳ型胶原酶配合肝素建立动物模型,实验证实Ⅳ型胶原酶可达到稳定的脑出血效果,配合肝素局部注射可以加快脑出血血肿形成的速度。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物选用健康雄性Wistar大鼠150只,体重200~250 g,鼠龄4~7月,由第三军医大学附属大坪医院医用实验动物中心提供;Ⅳ型胶原酶(美国Sigma公司);肝素钠注射液(沪生物12 500 U/2 ml);江湾型动物头颅立体定位仪;微量注射器;微量分析天平;恒冷冰冻切片机。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 Wistar大鼠随机分为生理盐水对照组、Ⅳ型胶原酶组、Ⅳ型胶原酶/肝素钠组,其中Ⅳ型胶原酶/肝素钠组按注射药物溶液容积不同又分为3个小组。每组分为术后6 h、12 h、24 h、3 d、7 d共5个时相点,每时相点动物6只。各组间动物体重无显著差异。

1.2.2 动物模型的建立 使用Ⅳ型胶原酶建立脑出血模型的方法参照文献[3~6],大鼠术前12 h禁食,4 h禁水,用0.4%戊巴比妥钠腹腔麻醉,保证手术操作期间大鼠有自主呼吸,俯卧固定于江湾型动物头颅立体定位仪上,头皮丁字切开,取前囟为原点,向右3 mm,向后1 mm,深度5 mm为注射点(尾状核),骨钻钻开颅骨,进针后缓慢注射药物溶液,留针2 min,缓慢退针,骨蜡封闭颅骨钻孔。缝合皮肤。术中大鼠肛温保持在36.5~37.5℃,手术后动物被送至通风和有空调的动物房饲养。Ⅳ型胶原酶/肝素钠组(Collagenase/heparin)的3个小组分别注射Ⅳ胶原酶/肝素/生理盐水溶液0.7 μl、1.4 μl和2.0 μl(每1 μl含Ⅳ型胶原酶0.2 U及肝素2 U)。对照组(Control)颅内注射生理盐水2.0 μl,Ⅳ型胶原酶组(Collagenase)注射Ⅳ胶原酶/生理盐水溶液2.0 μl(每1 μl含Ⅳ型胶原酶0.2 U)。

1.2.3 标本的取材和制备 术后在相应时相点过量乙醚麻醉动物,迅速开胸暴露心脏,从左心室插管至主动脉根部,在右

基金项目:第三军医大学基金资助项目(2002)
作者简介:张艳玲(1974-),女,河北省石家庄市人,硕士研究生,医师,主要从事脑血管病方面的研究。电话:(023)68752905
收稿日期:2002-07-19;修回日期:2002-10-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

心耳剪开一小口做出口。4℃生理盐水 100 ml 快速灌注, 之后稍减慢灌注速度冲洗至流出液清亮, 换 4% 多聚甲醛 100 ml 快速灌注, 之后稍减慢灌注速度继续固定, 灌注约 30 min 至动物四肢变硬。断头取脑, 以注射针道为中心做冠状切片, 厚度约 5 mm, 30% 蔗糖/4% 多聚甲醛液脱水后至恒冷冰冻切片机做连续切片, 切片后测量血肿直径。

1.3　统计学处理

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 医学统计学软件对结果进行 t 检验和 Pearson 相关系数分析。

2　结果

2.1　不同容积Ⅳ型胶原酶/肝素/生理盐水溶液注射后脑出血血肿形成情况比较

注射后不同时相点, 大鼠脑内尾状核部位均出现明显血肿, 见表 1。时间和血肿直径的 Pearson 相关系数分析显示, 24 h 内脑出血血肿直径随时间延长逐渐增大(r= 0.954), 之后出血逐渐吸收, 直径减小。24 h 不同组间血肿直径有显著性差异(P < 0.05)。注射药物溶液容积和血肿直径的 Pearson 相关系数分析显示, 各时相点脑出血血肿直径和注射溶液容积成正相关(12 h 和 24 h 的 r 值分别为 0.973 和 0.987)。

表 1　不同容积Ⅳ型胶原酶/肝素/生理盐水溶液注射后脑血肿直径的大小(n= 6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Diameters of hematoma induced by collagenase/heparin solution at different volume (n= 6, $\bar{x} \pm s$)

Group	6 h(mm)	12 h(mm)	24 h(mm)	3 d(mm)	7 d(mm)
0.7 μl	0.2±0.09	0.5±0.06	1.0±0.06	0.5±0.14	0.1±0.06
1.4 μl	0.2±0.06	1.0±0.06	1.8±0.15 *	0.8±0.18	0.3±0.06
2.0 μl	0.3±0.09	2.0±0.14	3.0±0.14 *#	1.0±0.14	0.5±0.14

*: P< 0.05 *vs* 0.7 μl group (24 h); #: P< 0.05 *vs* 1.4 μl group (24 h)

2.2　肝素钠在脑出血血肿形成中的作用

试验中发现 2.0 μl Ⅳ型胶原酶/肝素钠药物注射后可以达到理想的血肿体积, 故采用 2.0 μl 药物局部颅内注射, 在对照组、Ⅳ型胶原酶组和Ⅳ型胶原酶/肝素钠组中观察肝素钠对血肿形成体积及形成速度的影响。单纯生理盐水注射仅引起 12 h 内的针道渗血, 单纯胶原酶生理盐水注射 3 d 可以形成直径 3 mm 左右的血肿, Ⅳ型胶原酶/肝素生理盐水注射 24 h 可形成直径 3 mm 左右的血肿, 见表 2。实验结果说明肝素可以增加血肿形成速度, 使血肿形成高峰提前。单纯胶原酶组与胶原酶/肝素溶液组脑血肿的最大直径间无显著性差异(P> 0.05), 而此两组与单纯生理盐水组(对照组)最大直径比较均差异非常显著(P< 0.01)。

表 2　单纯Ⅳ型胶原酶 2 μl 与Ⅳ胶型原酶/肝素溶液 2 μl 注射后脑血肿的大小(n= 6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Diameters of hematoma induced by collagenase, and collagenase/heparin solution of 2 μl (n= 6, $\bar{x} \pm s$)

Group	6 h(mm)	12 h(mm)	24 h(mm)	3 d(mm)	7 d(mm)
Control	0.2±0.06	0.3±0.06	0.2±0.09	0.1±0.06	0.0±0.00
Collagenase	0.2±0.06	0.5±0.06	2.0±0.14	3.0±0.14 *	1.0±0.06
Collagenase/heparin	0.3±0.09	2.0±0.14	3.0±0.14 *#	1.0±0.14	0.5±0.14

*: P< 0.01 *vs* Control group (2 h); #: P> 0.05 *vs* Collagenase group (3 d)

3　讨论

Ⅳ型胶原酶和Ⅶ型胶原酶都被用于脑出血动物模型的构建, James Peeling 等[4,5] 使用Ⅳ型胶原酶曾建立成功的脑出血动物模型, 但Ⅳ型胶原酶应用较Ⅶ型胶原酶脑出血动物模型相对较少, 本实验中证实Ⅳ型胶原酶脑出血动物模型可以达到良好的出血和血肿形成的效果, 而且模型稳定, 重复性强, 可以在脑出血动物实验中广泛应用。

我们采用和文献[3~5] 报道一致的Ⅳ胶原酶/肝素/生理盐水溶液的浓度(每 1 μl 含Ⅳ型胶原酶 0.2 U 及肝素 2 U), 使用了 3 种不同容积的溶液局部注射, 预试验中我们使用与文献报道一致的 0.7 μl 溶液局部注射, 但发现不能形成理想的血肿体积, 血肿在注射胶原酶/肝素溶液后 24 h 达到最大体积, 血肿直径在 1 mm 左右。加大局部注射溶液量至 1.4 μl 和 2 μl, 在 2 μl 组, 我们获得理想的脑出血动物模型, 血肿在 24 h 形成达到高峰, 平均血肿直径在 3~3.5 mm 左右。

我们发现脑出血血肿体积和注射溶液容积成正相关, 因为我们使用相同的Ⅳ胶原酶/肝素/生理盐水溶液的浓度(每 1 μl 含Ⅳ型胶原酶 0.2 U 及肝素 2 U), 这种血肿体积随注射溶液容积增加而增加的现象可能意味着血肿体积与注射的Ⅳ胶原酶、肝素总量有关。预试验中我们改变Ⅳ胶原酶/肝素/生理盐水溶液的浓度时, 同时改变向尾状核注射的溶液容积, 保持注射到局部的Ⅳ胶原酶、肝素总量不变, 我们观察到相同的Ⅳ胶原酶、肝素总量可以形成相同大小的血肿容积。

本试验中, 使用Ⅳ胶原酶/肝素/生理盐水溶液脑内局部注射, 血肿形成的高峰在 24 h 左右, 单独使用Ⅳ胶原酶/生理盐水溶液脑内局部注射, 血肿形成的高峰在 3 d 左右。是否配合肝素, 对血肿大小无明显改变。但配合使用肝素可以使血肿形成时间提前, 说明肝素可以增加血肿形成速度, 使血肿形成高峰提前。

参考文献:

[1] Kingman T A, Mendelow A D, Graham D I, *et al*. Experimental intracerebral mass: tiem-ralated effects on local cerebral blood flow[J]. J Neurosurg, 1987, 67(5): 732－738.

[2] Rosenberg G A, Mun-Bryce S, Wesley M, *et al*. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1990, 21(5): 801－807.

[3] Marc R, Yan H J, James Peeling Experimental intracerebral hemorrhage in rats magnetic resonance imaging and histopathological corralates[J]. Stroke, 1996, 27(2): 2 312－2 319.

[4] Peeling J, Yan H J, Chen S G, *et al*. Protective effects of free radical inhibitors in intracerebral hemorrhage in rat[J]. Brain Res, 1998, 795(1－2): 63－70.

[5] Peeling J, Yan H J, Chen S G, *et al*. Effect of FK－506 on inflammation and behavioral outcome following intracerebral hemorrhage in rat[J]. Exp Neurol, 2001, 167(2): 341－347.

[6] Altumbabic M, Peeling J, Del-Bigio-M R. Intracerebral hemorrhage in the rat effects of hematome aspiration[J]. Stroke, 1998, 29(9): 1 917－1 922.

(编辑　郭健秀)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net