

·论著·

新生猪缺氧缺血脑损伤模型制备的研究

周文浩,邵肖梅,李瑾,陈莲

(复旦大学儿科医院新生儿科,上海 200032)

[摘要] 目的 研究新生猪缺氧缺血脑损伤(HIBD)模型的制备。方法 生后7d上海种白猪14只,双侧颈总动脉阻断,机械通气吸入低氧气体(FiO_2 6%),缺氧缺血(hypoxia ischemia, HI)持续30 min。监测心率、温度、有创动脉血压、脑电图(EEG)、血气、血糖、乳酸等,进行神经行为评分及脑组织病理分析。结果 与HI前比较,HI 30 min时血糖、乳酸升高明显,心率、平均动脉压、 PaO_2 、BE降低明显,HI 30 min EEG频率、电压均明显低于HI前。HI后24 h和72 h神经行为评分明显低于HI前,脑皮层、海马和基底节HE染色病理积分分别为(2.4 ± 0.6), (2.0 ± 0.4), (2.0 ± 0.7)。结论 新生猪HIBD模型可操作性好,可以造成脑损伤程度较为一致的脑部病理变化,为研究新生儿窒息后缺氧缺血性脑病提供较可信的模型。 [中国当代儿科杂志, 2003, 5(2): 113-116]

[关键词] 缺氧;缺血;脑损伤;猪;新生;模型

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)

Development of a Neonatal Piglet Model of Hypoxic Ischemic Brain Damage

Wen-Hao ZHOU, Xiao-Mei SHAO, Jin LI, Lian CHEN. Department of Neonatology, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China (Email: zhou-wen hao@yahoo.com.cn)

Abstract: **Objective** To develop an improved neonatal piglet model of hypoxic ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Fourteen 7-day-old piglets were subjected to temporary occlusion of both carotid arteries, followed by mechanical ventilation with low concentration of oxygen ($\text{FiO}_2 = 0.06$) for 30 minutes. Before and after the interventions, the heart rate, temperature, invasive blood pressure, blood gas, and concentrations of blood glucose and lactose were measured, electroencephalogram (EEG) was monitored, and neural behavior scores and pathologic changes of brain tissues were evaluated. **Results** Compared with the pre-intervention status, blood glucose and lactose concentrations significantly increased and the heart rate, mean arterial pressure, PaO_2 and basic excess significantly decreased after the hypoxic-ischemic intervention. In addition, the frequency and voltage of EEG decreased 30 min after the intervention. The neural behavior scores were significantly lower at 24 h and 72 h after the intervention. The pathologic scores of the cortex, hippocampus and basal were 2.4 ± 0.6 and 2.0 ± 0.4 , 2.0 ± 0.7 , respectively. **Conclusions** We have developed a reliable and reproducible piglet model of HIBD. [Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(2): 113-116]

Key words: Hypoxia; Ischemia; Brain damage; Piglet; Newborn; Model

新生猪体重和大小较接近于新生儿,可用于研究缺氧缺血(hypoxic ischemic, HI)对各器官、系统功能的影响,此外,其脑组织结构与人近似^[1],有较好的可比性。目前国内已有制备新生猪缺氧缺血脑损伤模型报道,一般采用单侧颈动脉结扎缺血、低氧密闭容器造成缺氧等办法,简便易行,但由于难以造成较为一致的脑损伤程度,故近十年国外已少有人文章报道。本文拟采用双侧颈动脉阻断缺血、机械

电生理和代谢状况等方法制备新生猪缺氧缺血脑损伤模型,以期可以造成预期较为一致的脑部病理变化,为研究新生儿窒息后缺氧缺血性脑病以及其他器官、系统功能损害研究提供较为可信的模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

生后7d上海种白猪14头,体重(1.67 ± 0.32)

[收稿日期] 2002-08-26; [修回日期] 2003-01-04

[作者简介] 周文浩(1969-),男,博士,主治医师。主攻方向:发育生物学损伤机制研究。

[通讯作者] 周文浩,上海市枫林路183号复旦大学儿科医院,邮编:200032。

kg,雌雄不限,由上海农科院种猪养殖厂提供。

1.2 模型制备

方法根据 LeBlanc 等方法进行改良^[2]。

1.2.1 外科手术 新生猪术前胃肠减压,氯胺酮 50 mg/kg 肌注基础麻醉,气管插管(直径 2.5~3.0 mm),采用 Newport 200 呼吸机间歇指令通气(IMV)模式进行机械通气,右侧股动脉置管,监测血压和备抽血样,耳缘静脉留置供补液和给药的通路,氯胺酮每小时 10 mg/kg 静脉微泵维持。颈正中纵切口,分离双侧颈动脉,带线。环境温度稳定 25℃,远红外保暖维持体温 38.5~39℃。

1.2.2 缺氧缺血 基础状态平稳 1 h 后阻断双侧颈总动脉,同时吸入 FiO₂ 6% 的空气和氮气混合气体,持续时间 30 min。

1.2.3 HI 后处理 终止 HI(恢复 FiO₂ 为 0.4,恢复双侧颈总动脉血供),调整呼吸机参数,维持 PaCO₂ 40~50 mmHg,至自主呼吸、血气正常后停用机械通气。若 HI 后持续平均动脉压(MAP) < 40 mmHg,予多巴胺每分钟 20 μg/kg 维持;低分子右旋糖酐 10 ml/kg 扩容;入液量为每小时 5 ml/kg,根据血糖水平决定葡萄糖输入速度,维持血糖水平 5~9 mmol/L。抗痫治疗予鲁米那负荷量 20 mg/kg,维持量每日 5 mg/kg。

1.3 指标测定

采用 Datex-Engstrom CS/3 监护仪连续监测心率、呼吸、有创动脉血压、皮肤和直肠温度。有创动脉血压压力传感器置于腋中线水平,与空气相通调零,用水银压力计校正,采用 NOVA 血气分析仪间断测定血气、血糖、电解质、乳酸等。采用便携式 Nation 8000 脑电图机,于 HI 前 5 min 始连续监测脑电动态变化(用柱状电极分别置于 O₁、O₂、Cz 和嘴部,记录枕部 EEG)。根据 LeBlanc 等^[2,3]方法进行新生猪神经行为评分,分别于 HI 前,HI 后 24 h 和 72 h 进行,新生猪神经行为评分内容包括意识状态、颅神经、反射、运动及合作协调等 5 方面,每项最大分值为 4,最低值为 1,故正常为 20 分,脑死亡 5 分。

1.4 病理检查

于 HI 后 72 h 采用氯胺酮麻醉后,进行原位灌流固定。颈动脉插管,颈静脉剪开,50 ml 生理盐水预冲,10% 磷酸缓冲中性甲醛灌流,直至流出液清亮,断头取脑,置于 10% 磷酸缓冲中性甲醛中固定。如中途死亡,即刻进行上述处理。病理分析专人进行,常规脱水、石蜡包埋,视交叉水平后 3 mm 处行冠状切片,HE 染色,切片厚度 4 μm,光镜观察大脑、海马、基底节断面脑病理改变,进行病理积分^[4,5]。在 400 倍光学显微镜下测量每个测量框内坏死细胞数,每个测量区域连续在不同的地方测量 3 次。测量框面积为 12 μm²。见表 1。

表 1 新生猪脑病理计分表

Table 1 Pathologic scores of the brain in the neonatal piglets

计分	部位		
	皮层	海马	基底节
0	正常	正常	正常
1	白质梗塞 < 1 mm	坏死神经元 ≤ 30%	坏死神经元 ≤ 30%
2	白质梗塞 4~6 mm	坏死神经元 31%~60%	坏死神经元 31%~60%
3	皮质、白质梗塞 ≥ 10 mm	坏死神经元 ≥ 61%	坏死神经元 ≥ 61%

注:总分为三部位分数累计。

1.5 统计学分析

均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 一般情况

HI 2~5 min 小猪皮肤灰白,大部分小猪开始烦躁,约 15 min 左右开始处于昏睡、昏迷。终止 HI 后约 2 h,小猪开始对强刺激出现反应,自主呼吸逐渐规律。14 例新生猪均出现抽搐,多于 2~6 h 内发生,平均抽搐开始时间(5.2 ± 4.7) h,最早于 HI 20 min、最晚于 HI 后 24 h 内发生。神经行为变化表现为头部颤抖、翻身不能、平衡障碍、抽搐、肢体运

动障碍等。3只小猪死亡,死亡原因分别为惊厥持续状态、中枢性呼吸衰竭、心力衰竭,死亡率21.4%。

2.2 HI前后生理参数变化

为减少干扰因素,HI前生理参数控制于正常水平,HI前后维持新生猪直肠温度于38.5~39℃。HI 15 min时心率、平均动脉压、乳酸水平明显高于

HI前,差异有显著性($P < 0.01$ 或 0.05); PaO_2 、BE较HI前明显降低(均 $P < 0.01$)。HI 30 min时血糖、乳酸明显高于HI前,差异有显著性($P < 0.01$),心率、平均动脉压、 PaO_2 和BE明显降低,HI后4 h乳酸水平仍明显高于HI前($P < 0.01$),其余指标与HI前比较差异无显著性($P > 0.05$),见表2。

表2 新生猪HI前后生理参数变化

Table 2 Physiological values before and after HI in the neonatal piglets

时间	心率 (bpm)	平均动脉压 (mmHg)	血糖 (mmol/L)	乳酸 (mmol/L)	pH	PaO_2 (mmHg)	PaCO_2 (mmHg)	BE (mmol/L)
HI前	194±16	68±9	6.4±0.6	4.2±0.7	7.42±0.06	115±37	43±7	-3.2±0.6
HI 15 min	235±24 ^b	102±11 ^b	7.0±1.4	8.0±1.6 ^a	7.15±0.08	25±9 ^b	36±8	-11.5±1.3 ^b
HI 30 min	104±19 ^b	40±12 ^b	9.4±1.7 ^b	10.4±2.1 ^b	7.04±0.11	28±10 ^b	34±6	-13.5±2.1 ^b
HI后4 h	182±26	79±15	7.2±0.9	8.3±1.2 ^b	7.40±0.05	97±13	41±5	2.4±1.1

注: a 与HI前比较 $P < 0.05$; b 与HI前比较 $P < 0.01$

2.3 HI前后神经行为评分和EEG变化

HI前新生猪神经行为评分为(17.7±0.6),HI后24 h、48 h新生猪神经行为评分分别为(12.4±2.3)和(14.7±1.2),明显低于HI前(均 $P < 0.05$)。

HI前新生猪脑电频率为(5.8±0.9) Hz,电压为(86±14) μV ;HI 30 min时EEG频率、电压分别为(2.8±0.7) Hz、(21±15) μV ,均明显低于HI前($P < 0.05$, $P < 0.01$)。10例新生猪HI中出现静息电位,平均出现时间为(23±3) min;其余4例HI 30 min时电压 $< 50 \mu\text{V}$ 。

2.4 病理变化

所有新生猪脑水肿明显,脑沟变窄,2例脑表面点状出血,3例脑室出血。HE染色病理表现为皮质结构紊乱,皮质和髓质分界不清,皮质、白质、海马和基底节可见不同程度的梗塞和神经元坏死和凋亡。所有动物均可见皮层下白质散在梗塞,呈部分融合的完全或不完全梗塞,见图1。6例明显皮层梗塞,10例海马和基底节梗塞明显,其中2例死亡者发现皮层、海马大片状梗塞和大量的神经元坏死,见图2。HI病变神经元表现为细胞皱缩、胞浆少、核固缩深染,细胞周围形成空区等。脑皮层、海马和基底节HE染色病理积分分别为(2.4±0.6)、(2.0±0.4)、(2.0±0.7)。

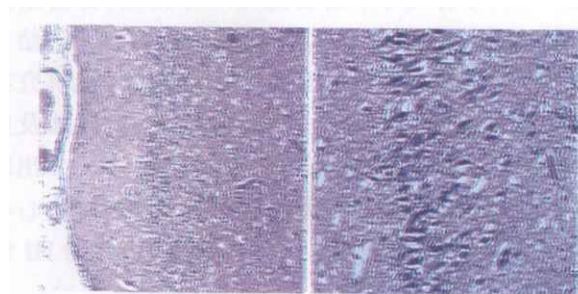


图1 HIBD新生猪皮层、海马病理改变

Figure 1 Pathological changes of the cortex and hippocampus in the neonatal piglets with HIBD

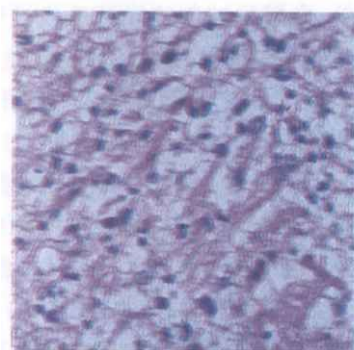


图2 HIBD新生猪坏死神经元表现(40×10镜下观)

Figure 2 Expression of necrotic neurons in the neonatal piglets with HIBD

3 讨论

哪种动物模型最能模拟新生儿HIBD? 目前尚

无一致意见,分析近40年相关文献^[6],急性HIBD模型动物多采用猪,其次羊、鼠、狗和非人灵长类动物等;而慢性HIBD模型动物主要为鼠。无论新生儿或实验动物,脑损伤类型主要取决于其成熟度,不同种类动物出生时脑发育并不处于同一阶段,初生猪脑相当于36~38周人胎脑的成熟度,7日龄猪脑成熟度与足月新生儿的中枢神经系统发育程度相似,故本研究选择出生7日龄猪制备足月新生儿HIBD实验模型。

综述文献报道,HIBD模型制备中缺氧可采用低氧混合气体吸入、阻断呼吸或降低子宫灌注(阻断母体主动脉或子宫动脉)等;缺血可采用可逆性颈动脉阻断、结扎一侧或双侧颈总动脉、放血或循环中断等,通过造成完全或不完全的缺氧缺血,致使新生动物发生HIBD。有文献报道^[7],单侧新生猪颈总动脉结扎不能导致该侧大脑的缺血,结扎侧脑血流量无明显降低,可能与Willis环从对侧提供血供有关,故本研究采用双侧颈总动脉阻断方法造成全脑缺血。不同个体对HI耐受能力不尽相同,若需造成相对一致的脑损伤,应监测脑能量代谢、EEG,结合血气、乳酸、心率、血压等指标综合判断,本研究在HI过程中监测EEG、平均动脉压、心率、乳酸及血气改变,发现HI 30 min EEG改变明显,71.4%出现静息电位,同时代谢性酸中毒明显,乳酸升高,心率和平均动脉压明显下降,因此,以30 min作为HI终结点较为合理。

除实验动物个体差异外,实验条件不一致是导致HIBD损伤程度差异的主要因素,如①造模前基础状态:HI前若存在酸中毒,HIBD相对严重;②麻醉剂量控制:研究认为,深麻醉后更易造成严重的HIBD,此外,麻醉后抑制呼吸可造成拔管延迟,增加感染机会;③环境温度、血糖控制:新生猪脑血流量可随血糖和温度变化而明显波动,本研究中新生猪直肠温度控制于38.5℃~39℃,HI前血糖控制于正常水平,从而减少实验误差;④低氧浓度的控制:大体动物由于氧耗量较大,若采用密闭容器方法,即使定时调整浓度,氧浓度波动仍极大,稳定的低浓度氧吸入是造成较为恒定程度HIBD的关键因素之一,本研究采用机械通气方法提供低浓度氧,可稳定控制吸入气体量和低氧浓度,HI 15 min和30 min时PaO₂稳定维持30 mmHg以下水平。

以往国内研究新生儿HIBD多采用新生鼠模型,制备方法简单、耗费低廉,且易于长期随访,适宜

于病理、生化、功能性研究^[8],国外采用新生猪制备HIBD模型报道不少,采用大体动物可进行脑代谢、脑电生理、脑血流等多项生理指标监测。LeBlanc等^[2]用0~3 d猪双侧颈动脉可逆性阻断缺血30 min、缺氧15 min(FiO₂ 6%),该模型死亡率30%,幸存动物中70%~80%有神经缺陷。Rootwelt等^[4]采用单纯缺氧(8% FiO₂),直到动脉平均压和心率下降,该模型死亡率17%,存活者100%有神经症状和脑病理变化。本研究模型死亡率为21.4%,存活者中100%均出现神经系统症状和脑病理变化,同时新生猪脑的病理检查均发现较为一致的病理变化。本研究中新生猪HIBD病理改变为皮层、海马、基底节多呈部分融合的完全或不完全梗塞,神经元坏死,病变程度与Rootwelt等^[4]报道相仿,且其病变类型与足月儿的HIE特点相类似。

本实验结果认为,新生猪HIBD模型可操作性好,可以造成预期较为一致的HIBD,价格亦较低廉,适宜于急性或亚急性器官、系统功能损害研究。

[参 考 文 献]

- [1] Tuor UI, Del Bigio, Chumas PD, et al. Brain damage due to cerebral hypoxia/ischemia in the neonate: pathology and pharmacological modification [J]. *Cerebrovasc Brain Metab Rew*, 1996, 8(1): 159-193.
- [2] LeBlanc MH, Qian XB, Cai ZW. The effect of glucose during ischemia on brain ATP, lactate, and glutamate in piglets [J]. *Biol Neonate*, 1997, 72(1): 243-254.
- [3] Feng Y, LeBlanc MH, LeBlanc EB, et al. Desmethyl tirilazad improves neurologic function after hypoxic ischemic brain injury in piglets [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28(5): 1431-1438.
- [4] Rootwelt T, Loberg EM, Moen A, et al. Hypoxiemia and reoxygenation with 21% or 100% oxygen in newborn pigs: changes in blood pressure, base deficit, and hypoxanthine and brain morphology [J]. *Pediatr Res*, 1992, 32(1): 107-113.
- [5] Greenwood K, Cox P, Mehmet H, et al. Magnesium sulfate treatment after transient hypoxia-ischemia in the newborn piglet does not protect against cerebral damage [J]. *Pediatr Res*, 2000, 48(2): 346-350.
- [6] Roohey T, Raju TNK, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis [J]. *Early Hum Develop*, 1997, 47(1): 115-146.
- [7] Laptook AR, Stonestreet BS, William OH. The effect of carotid artery ligation on brain blood flow in newborn piglets [J]. *Brain Res*, 1983, 276(1): 51-54.
- [8] 吴婉芳. 新生儿缺氧缺血性脑病动物实验研究 [J]. *中国实用儿科杂志*, 1995, 10(1): 69-72.

(本文编辑:吉耕中)