

· 实验研究 ·

脑室周围白质软化新生大鼠模型的创建及所伴随的白内障病变

贺月秋, 陈惠金, 钱龙华, 陈冠仪

(上海交通大学医学院附属新华医院, 上海市儿科医学研究所, 上海 200092)

[摘要] 目的 创建与人类早产儿脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)病理相似的可靠PVL动物模型,并探索本PVL模型所伴随的白内障病变及其形成机制。方法 新生大鼠分为PVL组和假手术对照组,通过双侧颈总动脉结扎和8%低氧下缺氧30 min,建立PVL动物模型。分别于术后1 d进行脑片TTC染色以观察脑梗死情况,术后2 d和21 d进行光镜下脑病理检查,以及术后21 d进行眼部裂隙灯检查和光镜下眼球病理检查。结果 脑片TTC染色显示PVL新生大鼠脑组织呈现大面积白色梗死区,其梗死体积达 $(53.45 \pm 33.90) \text{ mm}^3$,梗死百分比为 $(24.98 \pm 15.44)\%$ 。光镜下病理研究证实,术后2 d的PVL新生大鼠脑室周围以及皮层下白质呈现囊性坏死和细胞凋亡,皮质神经元损伤轻微。术后21 d,其脑室周围以及皮质下白质可见多个囊性疏松坏死区域形成。相应日龄假手术组大鼠脑组织内则未观察到明显病理改变。术后21 d后,肉眼及裂隙灯下均观察到PVL组所有幼鼠双眼均呈现白内障,光镜下显示球后组织无明显病理改变。假手术组幼鼠眼部均正常。结论 通过对2日龄新生大鼠进行双侧颈总动脉结扎伴缺氧,成功创建了与人类早产儿PVL病理相似的PVL动物模型,效果肯定,重复性好。同时本建模方法也可引起白内障病变,可作为制作白内障动物模型的推荐方法之一。

[中国当代儿科杂志,2007,9(3):220-224]

[关键词] 脑室周围白质软化;模型;缺血缺氧;白内障;脑梗死;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)03-0220-05

Establishment of a neonatal rat model of periventricular leukomalacia and its concomitant cataract

HE Yue-Qiu, CHEN Hui-Jin, QIAN Long-Hua, CHEN Guan-Yi. Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China (Chen H-J, Email: hjchenk@online.sh.cn)

Abstract: Objective To establish a reliable neonatal rat model of periventricular leukomalacia (PVL) which is expected to be similar to PVL of human preterm infants pathologically, and to explore the concomitant eye lesions in the PVL model. **Methods** Two-old-day neonatal rats were randomly divided into a PVL group and a sham-operated group ($n = 19$ each). The PVL model was established by the ligation of bilateral common carotid arteries, followed by a 30-min exposure to 8% oxygen. The cerebral infarction area was assessed with TTC staining 1 day after operation. Cerebral pathology was examined under a light microscope 2 and 21 days after operation. The examinations of eyes under a slit lamp and the pathology of eyeballs under a light microscope were performed 21 days after operation. **Results** The TTC staining cerebral slices showed there were extensive white areas of infarction in the brain of the PVL group, with an infarction area of $53.45 \pm 33.90 \text{ mm}^3$ and a percentage of infarction of $(24.98 \pm 15.44)\%$. Significant cystic necrosis and apoptosis around the periventricular and subcortical white matter and mild damage in cortical neurons were observed in the PVL group 2 days after operation. The more obvious cystic necrosis around the periventricular area was found in the PVL group 21 days after operation. There were no pathological changes in the brain of the sham-operated group. All of rats in the PVL group had bilateral cataracts, however, no pathological changes were observed in their postbulbar tissues. The sham-operated group did not show eye abnormal. **Conclusions** The PVL animal model that was similar to PVL of human preterm infants pathologically was successfully established by the ligation of bilateral common carotid arteries, followed by 30-min hypoxia exposure, with a positive effect and a good repeatability. Cataract can also be induced by the method.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (3):220-224]

Key words: Periventricular leukomalacia; Model; Hypoxia-ischemia; Cataract; Cerebral infarction; Neonatal rats

[收稿日期]2006-11-28;[修回日期]2007-01-08

[基金项目]上海市教委课题(05BZ08)。

[作者简介]贺月秋,女,在读博士。主攻方向:新生儿脑损伤。

[通讯作者]陈惠金,主任医师,教授,上海交通大学医学院附属新华医院,上海市儿科医学研究所,邮编:200092。

脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)为早产儿常见脑损伤,其后常导致早产儿发生脑瘫、认知以及视听障碍等严重后遗症,目前尚无有效防治方法。PVL主要损伤部位为侧脑室外角背部白质、侧脑室前角和体部、视(三角区和枕部)和听放射区(颞角)。PVL的发病机制尚不完全明了,目前认为可能与早产儿脑血管发育缺陷、少突胶质细胞(OL)前体对缺血缺氧的易损性以及缺乏内源性保护因子等因素有关^[1,2]。但迄今为止,国内外尚无借鉴的经典PVL模型制作方法。对7日龄新生大鼠进行单侧颈总动脉结扎伴缺氧2 h,是制作脑缺氧缺血损伤新生大鼠模型的经典方法,但该模型主要造成大脑皮层损伤以及弥漫性脑损伤,以神经元的损伤和丢失为主,因而该模型不适宜用于主要引起脑室周围白质OL前体丢失和损伤的PVL研究。有报道对新生大鼠脑室内注射化学性物质ibotenate,可造成其白质损伤。但该模型应属化学性损伤,不符合早产儿PVL的自然病理过程。也有对孕鼠子宫内注射大肠杆菌或者类毒素,可造成新生大鼠白质的炎症性损伤。但这类模型可用于因感染导致PVL的研究,却不适宜用于因缺血所导致PVL的研究,而缺血在PVL发病机制的学说中占了主导地位。成功建立以晚期OL前体为主、与人类早产儿PVL病理相似的可靠PVL动物模型,对研究早产儿PVL发病机制、探寻防治方法至关重要。而2日龄新生大鼠脑白质内的OL前体最为丰富,7日龄新生大鼠的脑白质内则主要为成熟OL,并形成早期的髓鞘化,因而理论上生后2 d的新生大鼠应相当于胎龄23~32周的人类早产儿PVL的好发期,应为制备PVL模型的最佳选择。本文在成功创建2日龄新生大鼠PVL模型的过程中,同时发现本模型也造成了2日龄新生大鼠眼部的白内障形成。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

2日龄Sprague-Dawley同窝新生清洁级大鼠[购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪2003-0002)],无性别选择,分为PVL组27只,假手术组19只。所有新生大鼠置于室温(20 ± 2)℃、湿度60%~70%、光照时间白天:黑夜=12:12 h的环境中,由母鼠自由喂哺。

1.2 实验材料

一套缺氧装置(由本研究室研制并获国家专

利)、TTC(氯化三苯基四氮唑染料)(购自Sigma)、8% O₂和92% N₂混合气体(本院氧气室提供)、其他试剂使用分析纯(本院科研中心实验室提供)、裂隙灯图像采集处理系统(苏州医疗器械总厂出品,上海复旦大学通信与科学工程系复新联合研究中心研制,本院眼科提供)。

1.3 PVL模型制备

参照Uehara方法^[3]并进行改良。乙醚麻醉后,仰卧位固定新生大鼠,颈部正中切口,分离并结扎双侧颈总动脉。手术时间少于10~15 min,术中新生大鼠的体温保持在36~37℃之间。术后将新生大鼠送入缺氧箱缺氧30 min,箱温为37℃,湿度(70 ± 5)%,8% O₂和92% N₂混合气体的输入流量为1~2.5 mL/min。假手术组游离双侧颈总动脉,但不结扎和缺氧。缺血缺氧完成后,返回母鼠身边继续喂养。

1.4 脑梗死体积测定

每组各取3只新生大鼠,于术后1 d经乙醚麻醉后,用生理盐水进行心脏灌注后断头处死,迅速取出大脑组织置0℃冰冻生理盐水中约5 min,经冠状面由前向后切成6片,层厚1 mm左右。将脑片置于2% TTC中37℃避光孵育30 min进行脑片染色,再置10%福尔马林中固定24 h。数码相机拍摄脑片,用image tool 2.0软件对脑片进行图像分析。脑梗死区呈白色,非梗死区呈红色。根据公式: $V = \sum (A_1 + A_2) \times t/2$ 计算脑梗死面积^[4],其中V表示梗死体积,A₁和A₂表示脑切片嘴、尾侧梗死面积之和,再乘以脑片厚度以得出梗死体积。

1.5 PVL病理检查

每组各取8只,分别于术后2 d(4日龄)和21 d(23日龄)经乙醚麻醉后,快速断头取出脑组织,置10%中性福尔马林固定24 h后,用70%酒精保存备用。经常规组织脱水、透明石蜡包埋后,以丘脑中1/3平面行冠状切片,片厚5 mm。常规苏木精-伊红染色,光镜下观察脑室周围组织包括胼胝体、内囊、脑室周围和皮层下白质以及海马等的病理变化。

1.6 眼部检查

每组各取8只,分别于术后21 d(取眼前)置裂隙灯下进行眼部检查。应用裂隙灯相应图像采集处理系统软件对眼部检查结果进行图像收集和分析。随后在乙醚麻醉下摘除幼鼠眼球,固定于眼球固定液中(40%甲醛10 mL,冰醋酸5 mL,95%乙醇50 mL,蒸馏水35 mL配制而成),石蜡包埋切片及苏木精-伊红染色后,光镜下观察眼部病理改变。

1.7 统计学处理

脑梗死体积使用均数 $\pm$ 标准差表示,采用SPSS 11.0软件进行所有数据处理和统计分析。

2 结果

2.1 PVL动物死亡率

PVL组27只2日龄新生大鼠,其中8只在缺氧期间和术后2d内死亡,死亡率为29.6%,存活19只。

2.2 术后一般情况

PVL组新生大鼠在缺血术后30 min内均出现不同程度的异常反应,表现为皮肤苍白、发绀、循环差以及呈频繁点头状抽搐。约1.5~3 h左右,PVL新生大鼠的循环有所改善,但仍差于假手术组。在缺氧箱内缺氧期间,新生大鼠表现为烦躁不安,抽搐加重,甚至呈现滚动样或跳跃状抽搐,少数动物呼吸衰竭甚至死亡。恢复供氧后新生大鼠的皮肤迅速转为红润。上述异常反应均于1d后消失。术后21d后,观察到PVL组所有幼鼠均出现白内障。假手术组新生大鼠则未发生上述异常反应及眼部异常。

2.3 脑梗死体积

肉眼可见PVL组大鼠脑组织呈现大面积白色梗死区(图1A),其梗死部位多为大脑前、中动脉供血区域。假手术组脑片则颜色鲜红,未见白色梗死区(图1B)。经图像分析后,根据公式得出PVL组梗死体积为 $(53.45 \pm 33.90) \text{ mm}^3$,梗死百分比为 $(24.98 \pm 15.44)\%$ 。提示新生大鼠经双侧颈总动脉结扎伴缺氧半小时,成功造成大脑缺血性梗死。

2.4 光镜下脑病理改变

术后2d,PVL组新生大鼠的脑室周围以及皮层下白质可见囊性坏死以及大量凋亡细胞(图2),胼胝体损伤严重,组织结构模糊,神经纤维走向紊乱,呈网状或条索状,尚可见散在分布的胶质细胞增生区。大脑皮质结构则相对完整,细胞层次清楚,可见少量神经元水肿以及神经元数量相对减少。术后21d,PVL组幼鼠的脑室周围以及皮质下白质可见多个囊性疏松坏死区域形成。相应日龄的假手术组大鼠的脑组织则均未观察到肉眼和光镜下明显的病理改变。

2.5 眼部病理变化

肉眼观察PVL幼鼠眼部均呈现白内障改变,眼球呈部分或大部白色浑浊状,以双侧白内障为主。裂隙灯下显示PVL幼鼠有白内障表现;假手术组幼鼠眼球未见白内障改变(见图3A,B)。光镜下进行

眼球病理观察,显示PVL组和假手术组幼鼠均呈现晶体后组织致密,排列整齐,无水肿,未见血管增生以及球后组织增生等病理改变(图4A,B)。

3 讨论

在早产儿所有医学问题中,PVL最为棘手,其发生率在早产儿中高达26%~60%。国内外对PVL的发病机制和神经生物学尚在不断探索研究中,迄今对PVL没有任何治疗和预防方法。深入进行PVL发病机制和防治研究,对于提高早产儿存活率,减少和杜绝残疾儿发生,改善早产儿生存质量,提高人类素质,无疑具有重要意义。成功建立与人类早产儿PVL病理相似的可靠PVL动物模型,是研究早产儿PVL发病机制、探寻防治方法、最终能攻克这一世界性难题的重要前提。但迄今为止,国内外尚无可借鉴的经典PVL模型制作方法。

本文通过对2日龄新生大鼠结扎双侧颈总动脉和8%低氧下缺氧30 min,建立了PVL动物模型。肉眼可见PVL新生大鼠脑内呈现大面积白色梗死区。光镜下病理研究证实,PVL新生大鼠的脑室周围以及皮层下白质呈现囊性坏死以及细胞凋亡,皮质神经元则损伤轻微。同时本研究通过免疫组化分析以及电镜检查,进一步证实PVL新生大鼠模型存在OL前体的明显丢失以及髓鞘未能形成(另文报道),提示本造模方法成功创建了以OL前体为主、与人类早产儿PVL病理相似的PVL动物模型。

本研究在建立2日龄新生大鼠PVL动物模型的过程中,发现所有PVL大鼠眼部均呈现双侧白内障,但球后组织无明显病理改变。假手术组大鼠则均未发生白内障。

PVL早产儿除早期死亡外,存活者主要引起痉挛性脑瘫、认知以及视、听障碍等后遗症。脑室周围存在多种神经核团以及神经辐射纤维。PVL常见涉及视放射区,在相应区域内即使存在较小的PVL囊腔,也常引起视觉问题。常见问题主要包括视觉分辨率差、眼球运动严重障碍、视野缩小、偏盲、复视甚至视盲等。供应眼球及其眼附属器血液的眼动脉来自颈内动脉,尚有部分来自颈外动脉的面部动脉系统,包括面动脉、颞浅动脉以及眶下动脉等^[5],因而理论上大脑相关部位的永久性梗死可以导致眼部病变。但不论临床观察以及有关建立PVL模型的动物实验,均尚未见白内障的发生与PVL有密切关联的报道。

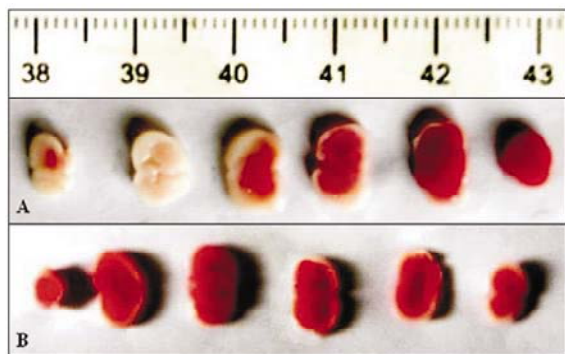


图1 3日龄PVL组和假手术组新生大鼠脑梗死大体对照观察(冠状面左起前额部始,依次直至枕部)。A:1例PVL组新生大鼠术后1d,其TTC染色脑片显示大脑内呈广泛梗死。B:1例同日龄假手术组新生大鼠的TTC染色脑片显示脑内无梗死灶。

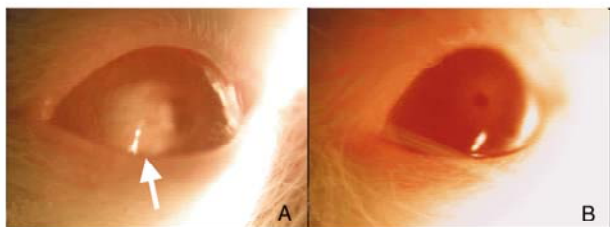


图3 裂隙灯观察PVL组和假手术组幼鼠的眼部改变。A:PVL幼鼠的眼球呈浑浊状白色改变;B:假手术组幼鼠眼部无白内障形成。

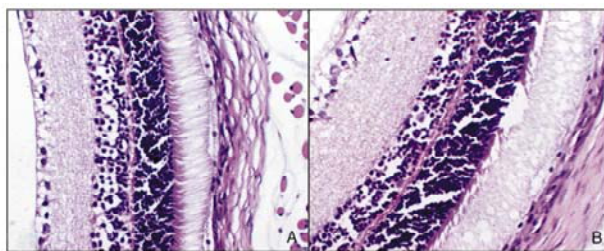


图4 光镜下观察PVL组和假手术组幼鼠的眼球病理学变化($\times 200$)A:PVL幼鼠的球后组织排列整齐,无水肿及组织增生等病变;B:假手术组幼鼠的球后结构未观察到病理改变。

临床上导致新生儿白内障有先天和后天的因素。前者与遗传或感染因素有关,常见如母体营养不良或代谢障碍、病毒感染或药物中毒等因素,造成新生儿在胚胎期、胎儿期或出生后出现晶状体纤维的分化不良或晶状体发育异常。与感染有关的先天因素常引起单侧性白内障。后天因素则多与外伤或老年因素有关,临床上常引起双侧白内障^[6-8]。

文献中没有见到PVL和白内障的相关报道。临床上常发现脑瘫患儿多伴有视力损害,其原因主要与中枢视觉通路受损有关,也有部分视力损害继发于白内障或视网膜病^[9]。PVL是造成脑瘫的主要原因,提示PVL也有引起白内障的可能。早产和低

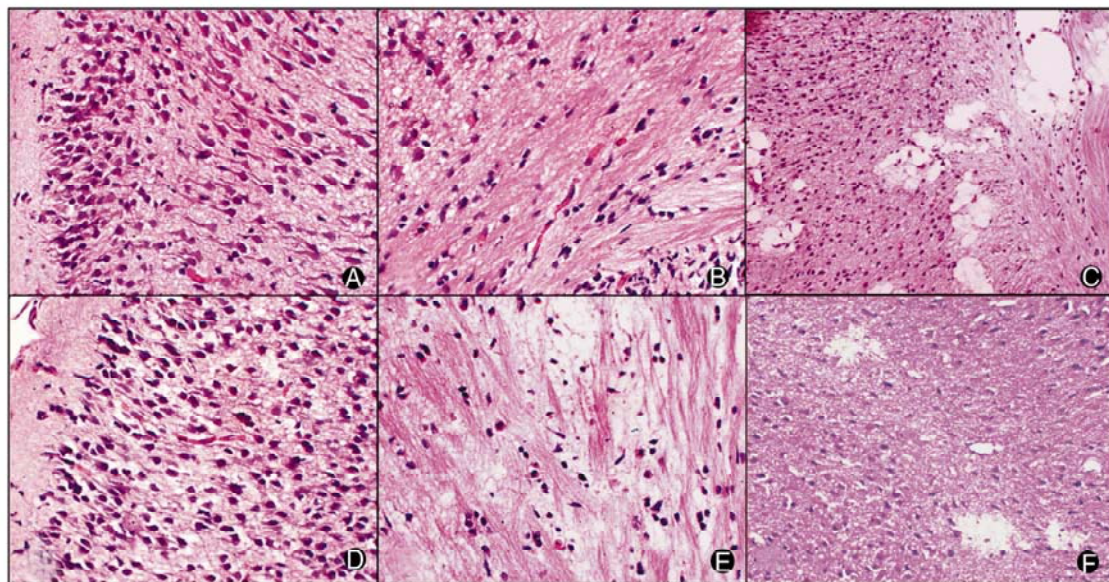


图2 PVL组和假手术组术后2d及21d光镜下脑病理图片。A:术后2d假手术组($\times 400$),显示正常脑皮质结构;B:术后2d假手术组($\times 400$),显示正常脑白质结构;C:术后2d PVL组($\times 200$),显示脑室周围囊性坏死;D:术后2d PVL组($\times 400$),显示脑皮质细胞水肿,数量减少,排列欠规则;E:术后2d PVL组,显示脑白质神经纤维走行紊乱;F:术后2d PVL组($\times 100$),显示皮质下白质囊性坏死。

出生体重亦为导致白内障的相关因素之一,而PVL好发于早产儿,提示早产、低出生体重、PVL和白内障之间可能存在某种关联,尽管目前文献上并未见到明确这种关联的相关报道^[10]。

本实验证实通过缺血缺氧所创建的PVL动物模型,同时也导致了白内障的发生,其具体机制尚有待深入探讨。推测本模型所伴随的白内障表现,应与后天缺血缺氧因素密切相关。由于双侧颈总动脉的被结扎、导致脑内和眼部的供血不足,不仅造成脑室周围白质的缺血性坏死和软化,也引起了眼部白内障病变的发生。

和以往通过单侧颈总动脉结扎及缺氧、或通过大脑中动脉栓塞等造模方法不同,本实验通过双侧颈总动脉结扎伴缺氧,可以造成明确的脑梗死病变。成熟大鼠因大脑基底动脉环的侧枝循环丰富,常常发生脑梗死模型复制困难的问题。而2日龄新生大鼠因血管发育尚不完善,容易建立脑梗死模型,且有很好的重复性。也有对沙土鼠双侧颈总动脉结扎建立全脑缺血模型,但必须通过放血造成低血压,才能完成全脑缺血模型的制作,术中动物死亡率高,术后长期生存效果差,因此目前很少被采用。对动物进行大脑中动脉栓塞和四血管结扎所建立的脑缺血模型,也因手术相对复杂且死亡率高,而使应用受到限制。

本实验通过对2日龄新生大鼠进行双侧颈总动脉结扎伴缺氧所创建的模型,不仅可以成功模拟与人类早产儿PVL病理相似的PVL动物模型,且造模简单快捷,无需附加低血压条件,效果肯定,重复性好,动物种属也不局限,因此有较好的推广价值,为深入进行PVL的发病机制和防治的相关研究奠定了可靠基础。此外,本建模方法也可引起白内障病变,可作为制作白内障动物模型的推荐方法之一。

[参 考 文 献]

- [1] Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant[J]. *Pediatr Res*, 2001, 5(5):553-562.
- [2] Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. 1. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(4):1302-1312.
- [3] Uehara H, Yoshioka H, Kawase S, Nagai H, Ohmae T, Hasegawa K, et al. A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion[J]. *Brain Res*, 1999, 837(1-2): 213-220.
- [4] Schabitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia editorial comment [J]. *Stroke*, 2000, 31(9): 2212-2217.
- [5] 刘家琦,李凤鸣. 实用眼科学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社,1999, 389.
- [6] Wirth MG, Russell-Eggitt IM, Craig JE, Elder JE, Mackey DA. Aetiology of congenital and paediatric cataract in an Australian population[J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86(7):782-786.
- [7] Haargaard B, Wohlfahrt J, Rosenberg T, Fledelius HC, Melbye M. Risk factors for idiopathic congenital/infantile cataract[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(9):3067-3073.
- [8] Guzzetta A, Mercuri E, Cioni G. Visual disorders in children with brain lesions: 2. Visual impairment associated with cerebral palsy [J]. *Eur J Paediatr Neurol*, 2001, 5(3):115-119.
- [9] SanGiovanni JP, Chew EY, Reed GF, Remaley NA, Bateman JB, Sugimoto TA, Klebanoff MA. Infantile cataract in the collaborative perinatal project: prevalence and risk factors [J]. *Arch Ophthalmol*, 2002, 120(11):1559-1565.
- [10] Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. Anatomic analysis of blood vessels in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing brain[J]. *Pediatr Res*, 2004, 56(1):117-124.

(本文编辑:吉耕中)