

脑瘫动物模型的建立与评价

王向野¹ 综述 杨小鹏² 陈刚^{2*} 审校

1. 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832002

2. 新疆维吾尔自治区人民医院神经外科, 新疆 乌鲁木齐 830001

摘 要: 目前, 脑瘫已成为世界各国科研机构研究的热点和难点, 能够成功有效的建立脑瘫动物模型就会为其发病机制的探索及治疗手段的研究打下坚实的基础。本文总结了近年来国内外各种脑瘫动物模型的建立以及鉴定方法, 并对不同模型的优缺点进行了比较。

关键词: 脑瘫; 动物模型

脑性瘫痪 (cerebral palsy, CP) 简称脑瘫, 是指患儿出生前后 1 个月内, 各种原因所致的非进行性脑损伤, 主要表现为中枢性运动障碍及姿势异常, 同时经常伴有智力低下、语言障碍、癫痫等并发症^[1]。近年来, 由于产科技术、新生儿医学的发展, 新生儿死亡率、死胎发生率均有明显下降, 但脑瘫的发生率有逐渐增长的趋势^[2]。国内外各科研机构通过建立动物模型模拟人类脑瘫, 对其发病机制进行研究, 只有有效逼真模拟人类发病情况, 才能真正准确地反映发病机制, 才能针对疾病进行有效的预防及治疗, 才能有助于减少患儿的致残率。本文总结了近年来国内外各种脑瘫动物模型建立的方法, 希望可以为脑瘫的基础实验及临床研究提供帮助。

1 脑瘫模型动物的选择

动物的选择是模型建立的首要条件, 多脑回动物如狗、猪、羊、兔等因体积较大、饲养相对困难、费用较贵等原因限制了其在实验中的大量应用; 与人类最接近的灵长类动物则更加昂贵和稀少, 不适应实验研究应用; 非多脑回动物如鼠类体形小、数量大、价格便宜、易饲养, 行为表现多样, 情绪反应敏感, 且其脑体积小便于脑组织病理变化和生化改变的观察^[3]。因此目前国内外大多倾向采用大鼠作为脑瘫模型动物。

2 脑瘫动物模型的建立

脑瘫动物模型的建立是探索脑瘫发生机制及防治方法的重要步骤, 只有成功模拟出类似人类脑瘫的动物模型, 才可以进行后续的研究。根据脑瘫

的病因我们将收集到的动物模型大致分为三大类—缺血缺氧、感染及胆红素等神经毒素所致脑瘫。现分述如下:

2.1 缺血缺氧因素所致脑瘫动物模型的建立

新生儿脑组织的缺血缺氧会造成缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD), 以脑室周围白质软化 (periventricular leukomalacia, PVL) 为主, 是造成脑瘫的主要原因^[4]。

新生儿期的缺血缺氧会导致脑瘫, 新生鼠缺血缺氧后出现的神经病理特征与人类的表现类似^[5], 此类模型常用的方法为 1~7 日龄鼠单侧颈总动脉结扎结合 6%~8% 氧, 缺氧 1.5~3.5 h 的模型^[6]。Tai 等^[7]将 3 日龄大鼠予结扎右侧颈总动脉后暴露于 8% 的氧 1.5 h, 通过摄食行为评估、间接热量测定和开放地带试验检测至生后 33 d, 结果发现缺血缺氧组大鼠出现显著的生长障碍, 转圈和旋后行为增加, 摄食行为的改变是由生长障碍所致。陈刚^[8]等通过对 7 日龄小鼠一侧颈动脉结扎合并体积分数为 8% 的氧气、92% 的氮气混合气体缺氧 2 h, 造成小鼠患侧脑室周围细胞排列紊乱, 局部囊性变和炎性细胞聚积; 患侧大脑皮质神经细胞明显减少, 神经细胞变性坏死, 胶质细胞反应性增生。

若考虑胎盘功能不全、脐带因素或母体原因等造成的产前胎儿宫内缺氧, 其病生机制更为复杂多样。Mallard 等^[9]在猪怀孕 30 d (足月为 68 d) 时结扎其一侧子宫动脉, 建立了猪的宫内缺血缺氧模型。该方法导致胎猪脑室增大, 皮质、纹状体和海马体积缩小, 脑组织神经元数目减少, 树突和轴突

基金项目: 国家自然科学基金项目 (NO. 30960393) 及新疆维吾尔自治区科技攻关和重点科技课题资助项目 (NO. 200633128(2))。

收稿日期: 2011-05-12; **修回日期:** 2011-10-21

作者简介: 王向野 (1986-), 男, 石河子大学医学院 2009 级神经外科在读硕士。研究方向: 小儿脑瘫的基础与临床研究。

通讯作者: 陈刚 (1970-), 男, 副主任医师, 博士学位, 硕士研究生导师, 主要从事中枢神经系统损伤修复的研究。

生长受抑制。Derrick 等^[10]建立了孕兔宫内缺血缺氧模型,以模拟胎盘早剥分娩损伤。70%~79%孕程的孕兔全脑缺氧后,存活胎兔出生后出现自主运动、旋转运动、嗅觉刺激反应运动以及吸吮和吞咽协调运动的多重障碍,高张力持续至少 11 d。MRI 检测发现内囊白质以及其他易损区域如基底节、丘脑和脑干的损伤。

2.2 感染因素所致脑瘫动物模型的建立

有实验研究证明宫内感染引起的胎儿免疫应答是导致围生期脑室周围白质软化(PVL)的一个主要致病因素^[11],其机制主要是炎症反应学说:炎症细胞因子与脑白质损害及脑瘫的发生高度相关,孕鼠宫内感染后,新生鼠脑内白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 mRNA 呈剂量依赖性增加,海马区、皮质酸性纤维蛋白呈阳性,星形细胞增多,髓鞘碱性蛋白下降以及少突胶质细胞活性改变^[12];炎症因子通过刺激其他细胞因子及 NO 合成,中性粒细胞浸润,黏附分子表达,破坏少突胶质细胞,在未发育成熟的脑组织内引起白质损伤^[13]。

国外已经研制了通过宫内细菌感染诱发早产造成类似围生期脑损伤的动物模型,Yesilirmak 等^[14]给孕龄 18~19 d 的孕 SD 大鼠腹腔内注射脂多糖 0.5 mg/kg,胎鼠出生后 7 d,发育脑髓鞘化异常,白质细胞死亡明显。

此外,国内李晓捷^[15]于孕鼠宫腔内注射脂多糖,引起胎鼠血 pH、SaO₂ 明显升高,干扰胎盘血液循环结果造成供应脑的血流量减少,建立了早产致脑瘫的大鼠模型。陈刚等^[16]首次应用孕鼠腹腔注射脂多糖合并缺氧的方法制作脑瘫动物模型,脑瘫鼠脑室旁正常组织结构破坏,细胞排列紊乱,局部大小不等圆形软化灶;胞浆内容物缺失,部分核膜破损,核内容物外溢。

2.3 胆红素等神经毒素所致的脑瘫动物模型的建立

此类模型最大的共同点是将在外源性神经毒性物质或活性氧物质注射入脑白质、腹腔或全身,导致内环境紊乱,细胞或细胞器代谢紊乱,功能减退。此类媒介物主要为胆红素,当其浓度过高时,游离的间接胆红素可进入新生儿中枢神经系统产生细胞毒性,导致新生儿永久性脑损伤,甚至产生严重后遗症,即胆红素脑病^[17],而胆红素脑病是导致脑瘫的又一主要病因。胆红素脑病急性期光镜

下可见神经细胞变性坏死;急性期过后出现的脑瘫在丘脑下核和苍白球部位的神经细胞显著减少,脊髓神经纤维亦减少,并有星形胶质细胞增生、肥大以及纤维形成等改变。孙叶强^[18]等给仔兔腹腔注射胆红素 300 mg/kg,成功制作与人类核黄疸表现相似的脑瘫动物模型,机制为新生动物具有自身胆红素生成较多、转运胆红素的能力不足、肝功能发育未完善、较易形成高胆红素血症的特点,高胆红素血症可以增加未成熟脑组织对谷氨酸盐介导的兴奋性中毒的敏感性。

3 脑瘫动物模型的鉴定

有效地对模型进行鉴定才能判断模型制作的成功性,才能提高实验数据的可信度。我们所采用的检验动物模型常用方法有以下几点:

3.1 神经行为学检测

目前脑瘫的诊断主要依靠其特征性的临床表现,即空间学习认知能力、运动功能的损害,姿势的异常等,检测方法主要有 Morris 水迷宫、足印重复间距分析试验、平衡木试验等。水迷宫中大鼠需要对迷宫周围物体的空间位置进行比较评价,从而学会寻找及记忆迷宫中平台的位置,爬上平台,逃避溺死, Morris 水迷宫是测验大鼠学习和记忆尤其是空间记忆的比较可靠的方法^[19]。此外,应用足印步态重复间距、平衡木试验对脑瘫动物模型生物学行为检验,研究结果显示模型组足印步态重复间距、平衡木通过时间以及后足脱落次数均与正常组有差异,脑瘫鼠肢体存在行动迟缓、运动障碍^[8]。

3.2 病理形态学

组织病理学检测可以客观直观的获取到组织形态学图片,可以清晰的观察到脑皮层细胞排列是否整齐,轮廓是否清晰,结构是否完整以及有无异型性细胞等等。

3.3 神经电生理检测

神经电生理方法对脑瘫的检测近年来得到了飞速的发展。如 Strata 等^[20]对小鼠进行皮质微电极刺激并绘图,结果显示感觉运动受限组的动物 80% 一级皮质定位点支配臀部运动,缺血组这一数据为 57.1%,均高于对照组,提示痉挛状态的再现。陈刚等^[8]对大鼠后肢进行了运动诱发电位检测,结果显示模型鼠后肢运动诱发电位与对照组相比,波幅明显降低。

3.4 分子生物学指标

由于缺氧缺血或宫内感染等可激活受损局部

的星形细胞和小胶质,它们产生多种细胞因子,并与血液中渗入的白细胞一起对这些细胞因子产生应答,进而损害脑白质组织的星形细胞、少突胶质以及轴突等,最终导致脑白质组织的坏死、星形胶质化、细胞凋亡以及囊腔形成等多种病理改变^[21]。分子生物学指标的测定也为后续细胞移植与基因治疗脑瘫提供了理论依据。

4 各种脑瘫模型的比较及优缺点

目前尚无一种动物模型能模拟所有类型的脑瘫,每种模型都有其优缺点,应针对研究方向和研究重点选择适宜的动物及动物模型。众多模型制作中单侧颈总动脉结扎结合低氧环境的动物模型制作方法是较为成熟的^[22],实验结果相对稳定可靠,是运用最为广泛的脑瘫动物模型。此方法操作相对简单,缺血效果肯定,其缺点在于不能模拟由于产前因素造成的胎儿宫内缺氧。腹腔内注射脂多糖模型旨在反应内毒素对脑白质的局部损害,与脂多糖的局部浓度密切相关^[23];另外,脂多糖模型对运动功能的损害较小。胆红素致脑瘫动物模型的主要原理是将此类外源性神经毒性物质注射至腹腔,导致内环境紊乱,引起细胞代谢紊乱与功能减退,动物对象在早产鼠较足月鼠更易成功,因而实验要求更复杂^[18]。

5 展望

脑瘫是目前严重影响人口质量的疾病,不经治疗患病是终生的,这就使脑瘫康复的任务巨大而又艰难。对脑瘫患儿进行早期诊断、早期干预,采取综合康复治疗措施,可以改善脑瘫患儿的生活质量,提高人口素质,减轻家庭和社会的负担^[24]。因此,建立切实可行的脑瘫动物模型对脑瘫的实验研究和临床工作有重要意义。

尽管人们在脑瘫的发病机制和动物模型制作上取得了显著的进步,但仍然需要实验工作者尝试从更多方面去发现更新更好的指标,不断改进以获得对该病更真切的动物模型模拟^[25]。

参 考 文 献

- [1] 胡莹媛. 脑性瘫痪定义的历史沿革. 中国康复理论与实践, 2003, 9(5): 257-258.
- [2] 刘伟, 陈刚, 迟广明. 脑瘫治疗的现状. 中国康复理论与实践, 2007, 13(12): 1118-1120.
- [3] 赵聪敏, 鲁利群. 早产儿脑损伤动物模型的研究现状与展望. 第三军医大学学报, 2009, 11(22): 2167-2170.
- [4] Spiegler M, Villapol S, Biran V. Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2007, 66(6): 481-490.
- [5] Calvert JW, Yin W, Patel M, et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. *Brain research*, 2002, 951(1): 1-8.
- [6] 王晓慧, 郑华, 邹丽萍. 脑室周围白质软化症在脑性瘫痪发病中的意义. 中国康复医学杂志, 2005, 20(1): 52-53.
- [7] Tai WC, Burke KA, Dominguez JF, et al. Growth deficits in a postnatal day 3 rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Behavioural brain research*, 2009, 202(1): 40-49.
- [8] 陈刚, 李江, 刘伟等. 构建新生乳鼠脑性瘫痪模型及其稳定性. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(37): 7326-7329.
- [9] Mallard C, Loeliger M, Copolov D, et al. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction. *Neuroscience*, 2000, 100(2): 327-333.
- [10] Derrick M, Drobyshevsky A, Ji X, et al. A model of cerebral palsy from fetal hypoxia-ischemia. *Stroke*, 2007, 38(2 Suppl): 731-735.
- [11] Bracci R, Buonocore G. Chorioamnionitis; a risk factor for fetal and neonatal morbidity. *Biol Neonate*, 2003, 83(2): 85-96.
- [12] Cai Z, Pan ZL, Pang Y, et al. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res*, 2000, 47(1): 64-72.
- [13] Saliba E, Henrot A. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biol Neonate*, 2001, 79(3-4): 224-227.
- [14] Yesilirmak DC, Kumral A, Baskin H, et al. Activated protein C reduces endotoxin-induced white matter injury in the developing rat brain. *Brain Res*, 2007, 1164: 14-23.
- [15] 李晓捷, 高晶, 孙忠人. 宫内感染致早产鼠脑瘫动物模型制备及其鉴定的实验研究. 中国康复医学杂志, 2004, 19(12): 885-889.
- [16] 陈刚, 胡燕荣, 钟杰, 等. 孕鼠腹腔注射脂多糖合并缺氧环境造成宫内胎鼠脑部损伤. 中国康复理论与实践, 2009, 15(9): 807-809.
- [17] 周月娥, 张宏, 李小艳. 新生儿胆红素脑病治疗与护理. 实用预防医学, 2008, 15(4): 1161-1162.
- [18] 孙叶强, 李晓捷, 吴军, 等. 胆红素致新生兔脑瘫动物模型的实验研究. 中国康复, 1999, 14(2): 65-67.
- [19] 方松, 余化霖. Morris 水迷宫实验中海马相关空间学习记忆的研究进展. 国际病理科学与临床杂志, 2010, 30(4): 321-326.
- [20] Strata F, Coq JO, Byl N, et al. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: implications

tions for a rodent model of cerebral palsy. *Neuroscience*, 2004,129(1):141-156.

- [21] 谭洁璐,郑湘榕. 脑性瘫痪动物模型的制作与鉴定研究进展. *国际儿科学杂志*,2010,37(5):494-496.
- [22] Drobyshesky A, Derrick M, Wyrwicz AM, et al. White matter injury correlates with hypertonia in an animal model of cerebral palsy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(2):270-281.
- [23] Girard S, Kadhim H, Beaudet N, et al. Developmental motor

deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ ischemia; a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience*, 2009,158(2):673-682.

- [24] 温林豹,陈刚. 脑瘫的外科治疗前景. *国际神经病学神经外科学杂志*,2009,36(1):48-52.
- [25] Yager JY, Ashwal S. Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain Damage. *Pediatr Neurol*,2009,40(3):156-167.

人脐带血来源的间充质干细胞在脑胶质瘤治疗中的应用前景

范存刚,周景儒 综述 张庆俊* 审校

北京大学人民医院神经外科,北京市 100044

摘要:人脐带血来源的间充质干细胞能够表达多种趋化因子受体,可与胶质瘤细胞分泌的各种细胞因子相互作用而向胶质瘤定向迁移。hUCB-MSCs 不仅可以通过诱导肿瘤细胞凋亡、上调抑癌基因表达、阻碍细胞周期进程和抑制肿瘤血管新生等机制发挥抗胶质瘤作用,还可通过携带治疗基因发挥更强大的抗肿瘤功效,在胶质瘤的生物治疗中具有广泛应用前景。

关键词:脑胶质瘤;胶质母细胞瘤;脐带血;间充质干细胞;基因治疗

脑胶质瘤是成人中枢神经系统最常见的原发性肿瘤。由于在发病早期向周围正常脑组织内浸润生长而在瘤床周围形成卫星灶,手术难以彻底切除。这些浸润至正常脑组织中的卫星灶往往成为肿瘤复发的根源,为此迫切需要研究能够追踪浸润此类肿瘤细胞的靶向治疗策略。随着干细胞研究的深入,能够向胶质瘤定向迁移、易于进行基因修饰的神经干细胞(neural stem cells, NSCs)引起了人们的广泛兴趣^[1],然而其临床应用却受到取材困难、数量不足、伦理和法律等诸多因素的制约。鉴于间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)也具有向脑胶质瘤定向迁移的能力,还能抑制肿瘤生长,有望成为治疗脑胶质瘤的新型种子细胞^[2]。虽然骨髓 MSCs(BM-MSCs)是 MSCs 的主要来源,但其含量较低,且随年龄增长其细胞含量和增殖能力显著下降^[3]。因此,易于分离和扩增的人脐带血来源

的间质干细胞(human umbilical cord derived mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs)成为当前研究的热点^[4]。

1 hUCB-MSCs 的抗胶质瘤作用

近来研究发现,未经基因修饰和经过基因修饰的 hUCB-MSCs 均具有显著的抗胶质瘤作用。Kang 等^[5]发现未激活的 hUCB-MSCs 和经过细胞因子激活的 hUCB-MSCs 均对人胶质瘤细胞 U87 MG 具有显著的细胞毒作用,经过 IL-2、IL-15、GM-CSF 或其组合激活的 hUCB-MSCs 具有更强的抗肿瘤作用,提示 hUCB-MSCs 可作为直接效应细胞发挥抗胶质瘤功效。Kim 等^[6]报道携带肿瘤坏死因子相关的凋亡诱发放配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)的 hUCB-MSCs 能明显抑制肿瘤生长并延长荷瘤小鼠生存期,提示 hUCB-MSCs 可作为胶质瘤基因治疗的有效载体,通过

基金项目:国家自然科学基金青年项目(项目编号:81001009)

收稿日期:2011-1-25;**修回日期:**2011-12-07

作者简介:范存刚(1978-),男,硕士,主治医师,主要研究方向:干细胞移植治疗中枢神经系统疾病。

* **通讯作者:**张庆俊,电话 010-88326468,电子邮箱 zhangqjhb@yahoo.com