



# 改良大鼠弥漫性脑损伤实验模型

陈梅花<sup>1</sup>, 陈贵珍<sup>1</sup>, 贾万钧<sup>1</sup>, 孙汝亮<sup>1</sup>, 胡丙杰<sup>2</sup>

(1. 深圳市宝安区中医院, 深圳 518100; 2. 广州市卫生局, 广州 510000)

**【摘要】** 目的 改良弥漫性脑损伤动物模型, 建立一种简单实用的闭合性弥漫性颅脑损伤动物模型。方法 改良 marmarou 打击装置建立大鼠弥漫性颅脑损伤动物模型, 脑组织的病理学改变使用渡银染色及 HE 染色法检测。结果 损伤呈全脑局部弥漫性分布, 有出血、神经细胞肿胀、胶质细胞嗜酸性变、脑组织疏松、神经细胞变性坏死、嗜神经现象。结论 改良的 marmarou 闭合性大鼠颅脑损伤模型可作为闭合性弥漫性颅脑损伤研究的病理实验基础。

**【关键词】** 弥漫性颅脑损伤; 渡银染色

**【中图分类号】**R-332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2013) 07-0029-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.007.007

## Improved the rat model of diffuse brain injury

Chen Mei-hua<sup>1</sup>, Chen Gui-zheng<sup>1</sup>, Jia Wang-jun<sup>1</sup>, Sun Ru-liang<sup>1</sup>, Hu Bing-jie<sup>2</sup>

(1. Baoan Hospital of TCM Shenzheng 518100; 2. Bureau of Health of Guangzhou Municipality Guangzhou, 510000)

**【Abstract】 Objective** To improve the rat model of diffuse brain injury and establish a simple and practical animal model to study closed diffuse brain injury. **Methods** The marmarou-brain injury model was improved. The morphological changes of brain injury was detected by routine histochemical and silver staining. **Results** In the improved rat model diffuse hemorrhage were observed. Which included bleeding, swelling of nerve cells, glial cells eosinophilic change, loose brain tissue, nerve cell degeneration and necrosis, perineural phenomenon. **Conclusions** The improved marmarou-rat model could be used to study closed diffuse brain injury.

**【Key words】** Diffuse brain injury (DAI); Silver staining

理想的脑损伤动物模型必须与人体实际损伤机制相近,此外还须具备高度可重复性,极小的个体差异等特点。目前可造成弥漫性脑损伤的动物模型有多种,1988年 shapira 等<sup>[1]</sup>用下落的重物撞击颅骨成功地复制了闭合性大鼠局部脑挫伤模型,在此基础上,1994年 marmarou 等<sup>[2-3]</sup>成功建立大鼠弥漫性脑损伤模型。但该模型打击物下落后易反弹,造成二次甚至多次损伤,大鼠头顶金属圆盘与大鼠头部接触面积小,打击力度不易弥散,容易造成集中的脑挫伤,而且大鼠死亡率高、操作繁琐,因

此有必要建立一种简单操作、损伤轻、实验死亡率低、可重复性好的脑损伤动物模型,本研究在 marmarou 研究的基础上,改良了 marmarou 闭合性大鼠弥漫性脑损伤模型,以期建立一种简单实用的闭合性弥漫性颅脑损伤动物模型为闭合性弥漫性脑损伤的病理研究提供更好的实验基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物模型材料及制作方法

(1) SPF 级 SD 大鼠(中山大学基础医学院实

[基金项目]中国博士后科学基金(NO:2011M501314)。

[作者简介]陈梅花(1977年生),女,病理主治医师,硕士,研究方向:神经病理、法医病理。

[通讯作者]胡丙杰(1966年生),男,副教授,博士,研究方向:法医病理。

验动物中心提供【SYXK(粤)2007-0081】5只,雄雌不限,体重:( $250 \pm 10$ )g。随机分9组,每组5只。实验组根据伤后时间分为1h、3h、6h、12h、24h、48h、72h、120h八组,受打击后分时间段麻醉后断颈处死取脑;对照组为腹腔麻醉,苏醒后再麻醉后断颈处死取脑。在本实验室无特定病原体(specific-pathogen free, SPF)的饲养间【SYXK(粤)2007-0081】饲养。

(2) 打击装置(改良 marmarou 自由落体打击器)金属管(不锈钢管)长1m,直径1.5cm;金属棒(铁棒):直径1.2cm,长45cm,重量450g;海绵垫(大小 $0.25 \times 0.25 \times 0.1$ cm,密度 $40 \text{ kg/m}^3$ );大鼠铁头盔;细线(钓鱼丝)。金属支架(铁制金属支架,由底座、主杆和金属管夹组成)。

(3) 模型制作:实验组大鼠用2%戊巴比妥钠( $45 \text{ mg/kg}$ )腹腔注射麻醉后,俯卧固定于海绵垫上,暴露颅顶骨,将铁头盔套于头顶,头盔中央圆形标记对准导管口,置于导管下方,铁棒置于底端离头盔1m高处,沿导管自由下落,打击在大鼠头部的头盔上,迅速提起细线,避免二次打击。(弥漫性脑损伤模型原理示意图如图2.1)

(4) 取材及处理:实验组按时间段分别用2%戊巴比妥钠( $45 \text{ mg/kg}$ )麻醉断颈取完整脑组织;对照组麻醉后断颈取脑。所有取材均用10%甲醛固定72h,在大脑正中外侧1~2mm处作矢状切面,均包含大脑、小脑、脑干三部分,取材厚度约5mm,石蜡包埋,切片厚度约 $2 \mu\text{m}$ ,分别进行常规HE染色和镀银染色。

## 1.2 实验试剂

HE染色试剂:95%酒精、100%酒精、苏木素、盐酸酒精、伊红;

镀银染色试剂:自制氨银溶液,20%硝酸银水溶液30mL,无水乙醇20mL。将此两溶液混合立即呈现白色沉淀,逐滴加入浓氨水,在沉淀刚溶解后,再滴加5滴浓氨水,过滤后使用。

## 1.3 HE及镀银染色方法

### (1) HE染色方法

切片经 $60^\circ\text{C}$ 烤片、二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后,苏木素染色10min、流水冲洗。盐酸酒精分化数秒,流水冲洗。伊红染色3min,水洗、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片。

### (2) 镀银染色

1) 石蜡切片脱蜡至水洗;2) 蒸馏水洗1min;3) 于 $37^\circ\text{C}$ 温箱内用2%硝酸银水溶液避光浸染25min;4) 蒸馏水洗1min;5) 10%甲醛溶液还原数秒,

至切片黄色终止;6) 蒸馏水洗1min;7) 氨银溶液滴染20s;8) 倾去溶液,用10%甲醛溶液还原1min,到切片呈棕黄色;9) 蒸馏水洗3min;10) 0.2%氯化金水溶液调色5min;11) 蒸馏水洗1min;12) 5%硫带硫酸钠水溶液固定4min;13) 水洗3min,然后用虑纸将切片周围水分吸干;14) 乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封固。

## 2 结果

### 2.1 大体观察

脑表面无明显改变。

### 2.2 常规HE染色

损伤呈全脑局部弥漫性分布,有出血、神经细胞肿胀、胶质细胞嗜酸性变、脑组织疏松、神经细胞变性坏死、嗜神经现象。在1~3h组出血改变较为明显,其它改变没有时间上的特异性分布。

大脑:见点状、片状出血灶,微血管出血;脑组织疏松,呈海绵状;神经细胞胞体肿胀,核偏位;胶质细胞胞质嗜酸性变,小胶质细胞围绕肿胀的部分神经细胞周围呈嗜神经现象(图1、图2,彩插4)。

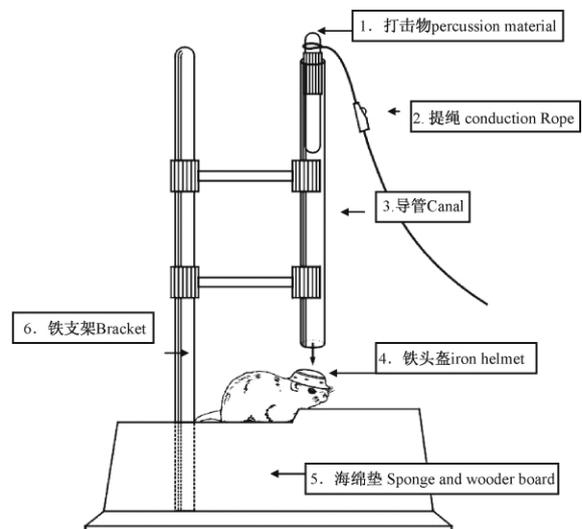


图1 打击装置示意图

小脑:见点状出血灶,蒲肯野细胞肿胀,变性坏死,小胶质细胞围绕蒲肯野细胞呈嗜神经现象(图3、图4,彩插4)。

脑干:见微血管出血;脑组织疏松,呈海绵状;部分神经细胞固缩(图5,彩插4)。

### 2.3 镀银染色

大脑、小脑、脑干轴索不规则增粗、卷曲、断裂。同一轴索出现粗细不均,弯曲走行成波浪状;同一条轴索的不同部位以及不同轴索粗细差异大;断裂

轴索断端膨大。正常对照组和各实验组未见轴索断裂后的收缩球现象(图 6 彩插 4)。

### 3 讨论

#### 3.1 建立闭合性弥漫性脑损伤模型的意义

临床医师和法医病理工作者实际工作中经常遇到颅骨无骨折,临床症状不明显,伤后经过一段时间死亡的病例。肉眼观察脑无病变或只有轻微病变,显微镜下观察病理改变以弥漫性的轴索损伤为主,有不同程度的弥漫性脑血管出血,弥漫性脑组织疏松,胶质细胞反应等<sup>[4,5]</sup>。对该种损伤后的治疗、护理,以及损伤后经过时间的改变成为困扰临床及法医病理工作者的难题。理论上,这种脑损伤后可能有一些生物学指标在不同的部位呈时序性改变,可以作为该种脑损伤时间、脑损伤病理学改变的生物学指标。人体取材的损伤时间不易控制,因此,建立该种脑损伤动物模型对于脑损伤后时间、脑损伤病理改变推断显得尤为重要。为与实际病例相近,这种脑损伤模型必须具备以下特点:

(1) 损伤机制与临床相近,受伤部位在头部,伤后死亡率低;

(2) 颅骨完好无损,无颅内血肿及脑疝等严重病变;

(3) 镜下检查见以弥漫性轴索损伤为主的脑损伤改变。

在此基础上,必须考虑到:

(1) 实验结果受动物个体影响小,可重复性好;

(2) 复制简单,经济,适用范围广。

本研究用自制打击装置,以 100cm/450g/90° 的力度打击大鼠头部,建立改良 marmarou 大鼠弥漫性脑损伤模型,观察 HE 染色及镀银染色结果:以局部弥漫性轴索损伤为主,伴散在的轻微脑血管出血、神经细胞肿胀变性坏死、胶质细胞反应,符合上述脑损伤模型标准。而初松涛<sup>[8]</sup>、李雪松<sup>[9]</sup>、中国人民解放军第四军医大学<sup>[10]</sup>所建立的脑损伤模型由于打击力度或打击装置与本研究不一致,导致病理学改变与本研究不一致。

#### 3.2 模型的创新之处及创新的意义

(1) 特制的铁头盔是该模型的特点(用大鼠头颅作石膏模型,用该模型制作铁头盔)其作用是保护颅骨,同时使作用力范围弥散,使得与头盔接触部位的脑组织都受到打击力的作用;也使得损伤程度比同等打击力度下的 marmarou 模型轻,因而肉眼观察不见有明显的出血等改变。同时因为脑表面的

沟回形结构,以及颅骨的锐利的骨棘,使得突出部位受到直接的打击作用力,而凹部受到从直接打击部位传导过来的力的作用,因而使得弥漫性损伤呈局部分布。理论上在打击物直接作用部位可能有较严重的损伤,但是由于切片取材部位的选择,显微镜下没能观察到这种现象。

(2) 模型的另一特点是在打击物的上端系一细线(钓鱼丝)(因为导管的直径与打击物的直径只有细微差别,这一差别是为避免导管壁与打击物的摩擦而设计),细绳的直径小于打击物与导管之间的空隙宽度,在打击后迅速提拉,避免对头部造成二次损伤。Marmarou 用迅速移开大鼠的方法避免多次打击,在本模型的制作过程中发现并不可行,因为打击物大部分还在导管内,在打击物下端紧贴大鼠的情况下,很难移开打击物下的大鼠。

(本文图 1~6,见彩插 4。)

#### 参考文献:

- [1] Shapira Y, Shohami E, Sidi A, et al. Experimental closed head injury in rat: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Crit Care Med*, 1988, 16: 258 - 265.
- [2] ANTHONY MARMAROU, MonTASSER A. ABD-ELFATTAH FODA, et al. A new model of diffuse brain injury in rats part 1: Morphological characterization. *J Neurosurg*, 1994, 80: 291 - 300.
- [3] MONTASSER A. ABD-ELFATTAH FODA, ANTHONY MARMAROU. A new model of diffuse brain injury in rats part 2: Morphological characterization. *J Neurosurg*, 1994, 80: 301 - 313.
- [4] Cziger A, Mihaly A, Farkas O, et al. Dynamics and regional distribution of c-fos protein in rat brain after a closed head injury. *J Mol Med*. 2004 Aug; 14(2): 247 - 52.
- [5] Butler TL, Penny packer KR. Temporal and regional expression of Fos-related proteins in response to is Brain Res Bull. 2004 Mar 1; 63(1): 65 - 73.
- [6] 邓平,徐小虎,祝家镇,等.机械性脑干损伤动物模型的建立. [J]中华实验外科杂志 2002 02.
- [7] 梅元武,张洪,孙圣刚,等.不同药物麻醉后大鼠全脑缺血脑温的变化. [J]卒中与神经疾病 2001. 8(5): 282 - 285.
- [8] 初松涛.大鼠重度闭合性颅脑损伤模型构建及伤后 S100B 蛋白表达与颅脑损伤时间关系的研究[D]. 延边大学 2007.
- [9] 李雪松,皮党育,刘新.大鼠弥漫性脑损伤模型制作及伤后病理生理变化[J].中国基层医药,2008,15(8): 1307 - 1309,1409.
- [10] 中国人民解放军第四军医大学.一种动物闭合性脑损伤落体打击器:CN201414851[P].2010-03-03.

(修回日期)2013-06-06