

医学康复

· 基础研究 ·

一种适用于康复研究的局灶性颅脑外伤大鼠模型

沈夏锋¹, 吴军发², 于惠贤³, 张宇玲⁴, 田闪², 路微波¹, 胡永善², 吴毅²

【摘要】 目的:仿制一种适合康复机制研究的局灶性颅脑外伤(TBI)动物模型,为国内广泛开展颅脑损伤康复机制研究提供基础。方法:成年雄性SD大鼠16只,随机分为颅脑外伤组和假手术组各8只。颅脑外伤组制作成控制性皮层损伤(CCI)模型,术后采用神经功能缺失评分、foot-fault test 和 cylinder test 评估动物感觉和运动能力;外伤后第21~25天行 Morris 水迷宫检查,评估大鼠认知功能的变化;在外伤后28d通过焦油紫(CV)染色检测脑组织病理改变和组织缺失情况。结果:颅脑外伤组大鼠较假手术组神经功能评分有明显降低($P<0.05$),运动协调能力和对称使用前肢的能力明显下降($P<0.05$),空间学习和记忆能力明显损坏($P<0.05$);脑组织明显缺损($P<0.05$),缺损组织周边出现神经元变性、坏死,神经元丢失伴胶质细胞增生。结论:控制性皮层损伤的TBI模型大鼠表现明显的感觉、运动、认知功能障碍和相应的病理改变,可以作为一项良好的TBI模型用于康复训练研究。

【关键词】 颅脑损伤;控制性皮层损伤模型;动物模型;康复

【中图分类号】 R49;R749.1 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2014.03.001

A focal brain trauma model for rehabilitation study SHEN Xia-feng, WU Jun-fa, YU Hui-xian, et al. Department of Rehabilitation, Shanghai First Rehabilitation Hospital, Shanghai 200090, China

【Abstract】 Objective: To establish an animal experimental focal traumatic brain injury (TBI) model for investigating the underlying mechanisms of rehabilitation. Methods: After adult SD rats had received a severe controlled cortical impact (CCI) injury, they were randomly assigned to TBI group ($n=8$) or sham operation group ($n=8$). After TBI, the neurological deficits scoring, foot-fault test and cylinder test were performed. On 21-25 days post-injury, rats were tested for spatial learning and memory in a Morris Water Maze. On 28 days post-injury, animals were sacrificed and evaluated for quantitative cortical lesion volume and pathological changes. Results: The rats in TBI group demonstrated declined neurological deficits scores, coordination and asymmetry compared to sham operation group ($P<0.05$). The rats in TBI group showed obvious deficits in spatial learning and memory ($P<0.05$). We also observed significant change in lesion volume, neuron loss and overexpression of microglia around the lesion in TBI group ($P<0.05$). Conclusion: Rats undergoing a severe CCI injury showed significant sensorimotor, cognitive performance impairment and pathological changes. It is suggest that the model should be useful for assessing the effects of rehabilitation in TBI.

【Key words】 traumatic brain injury; controlled cortical impact; animal model; rehabilitation

和脑卒中的康复研究相比,颅脑外伤(Traumatic brain injury, TBI)后康复机制的基础研究方面仍处于起步阶段,导致这种情况的原因与颅脑外伤机制高度复杂、缺乏公认成熟的TBI动物模型有关^[1]。控制性皮层冲击损伤模型(Controlled cortical impact, CCI)

是近年来公认较为成熟的TBI模型,非常适合TBI的损伤及康复治疗机制等方面的研究^[1]。但是,针对大鼠CCI模型的行为学改变研究不多。本文研究CCI颅脑外伤大鼠运动和认知功能的变化特点,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供的清洁级健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠16只,体质量250~270g。

1.2 方法 ①分组:大鼠随机分为颅脑外伤组和假手术组,每组8只。②造模:将颅脑外伤组大鼠用异氟醚

收稿日期:2014-03-27

作者单位:1. 上海市第一康复医院(筹),上海杨浦区老年医院康复医学科,上海200090;2. 复旦大学附属华山医院康复医学科,上海200040;3. 首都医科大学附属北京同仁医院康复医学科,北京100730;4. 上海理工大学医疗器械与食品学院,上海200093

作者简介:沈夏锋(1970-),男,副主任医师,从事神经康复方面的研究。

通讯作者:吴毅, wuyi4000@163.com

全身麻醉成功后,将大鼠俯卧位固定于操作台上,额顶部剃毛后碘伏消毒,并将鼠头固定于鼠脑立体定向仪上,沿中线矢状线切开皮肤,牵开皮肤,小心刮开骨膜,暴露颅顶骨,用牙科电钻沿中线右旁 5mm、前囟前 2.5mm 开一直径 5mm 的骨窗,暴露完整硬脑膜,移动显微操作臂精确定位,用 0310 款气压式颅脑损伤仪 (PSI, 美国) 不锈钢打击头对准圆形骨窗内的脑组织进行撞击,打击速度为 4.0m/s,时间 0.5s,深度 3.2mm^[2]。小心止血、缝合。假手术组进行相同的操作,但不进行撞击。见图 1。

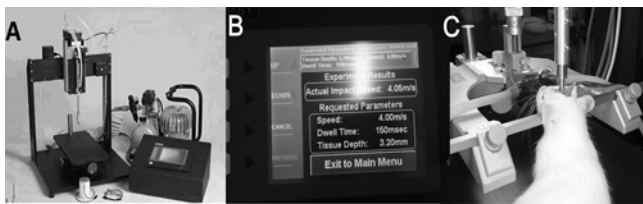


图 1 制作 CCI 颅脑外伤模型

图 A, 颅脑损伤仪。图 B, 调节参数。图 C, 造模。

1.3 评定标准 ①大鼠体质量改变:在 TBI 前及其后每隔 3d 测定一次大鼠体质量(g)。②大鼠神经功能损伤评分:从整体上评价动物损伤程度的一种量表,根据 Rogers 等^[3]7 分制方法评价大鼠神经功能损伤程度。③Foot-fault 测试^[4]:采用 7 分制评价左前肢的运动协调能力和感觉运动功能,最高为 6 分。④Cylinder 测试:评价患肢运动能力。分析脑损伤同侧前肢 (Ipsilateral, I)、对侧前肢 (Contralateral, C) 和双前肢 (Both, B) 的使用次数并按以下公式得到“前肢不对称使用分值” (Asymmetry Score, AS): $AS = (I + 1/2B) / (I + C + B) \times 100\%$ 。⑤Morris 水迷宫试验^[5]:a. 定位航行试验:计算每次 4 个象限逃避潜伏期的平均值,作为学习能力的测试结果。b. 空间搜索试验:撤除水下平台,从平台最远点放入大鼠,在 60s 内记录 4 个象限寻找平台的时间和路程,并计算平均值作为记忆能力测试的结果。⑥脑组织病理学检查:脑组织损伤体积% = $100\% \times (\sum \text{对侧面积} \times 30\mu\text{m} - \sum \text{同侧未缺损面积} \times 30\mu\text{m}) / (\sum \text{对侧面积} \times 30\mu\text{m})$ 。

1.4 统计学方法 用 SPSS 16.0 版统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

假手术组大鼠术后生命体征平稳,反射活动正常。颅脑外伤组大鼠术后的生命体征和反射出现紊乱,但恢复较快,左侧肢体均瘫痪。

2.1 大鼠体质量变化情况 假手术组大鼠的体质量呈稳步上升趋势,而颅脑外伤组大鼠则在术后第 3 天

体质量显著下降,随后逐步上升,2 组差异无统计学意义。见图 2A。

2.2 大鼠神经功能损伤评分变化 假手术组大鼠无神经功能损伤,术后各天评分均为 0,而颅脑外伤组大鼠在各时间点均表现出显著的神经功能障碍,神经功能损伤评分明显高于假手术组 (P<0.05)。见图 2B。

2.3 大鼠运动协调能力变化 颅脑外伤组大鼠在脑外伤后 foot-fault 测试评分明显下降,受伤后第 6 天最低,以后略有增高,但增高的幅度不明显,均明显低于假手术组 (P<0.05)。见图 2C。

2.4 大鼠患肢运动能力变化 Cylinder 测试结果显示颅脑外伤组 AS 值在各时间点均无显著变化,均明显低于假手术组 (P<0.05),见图 2D。

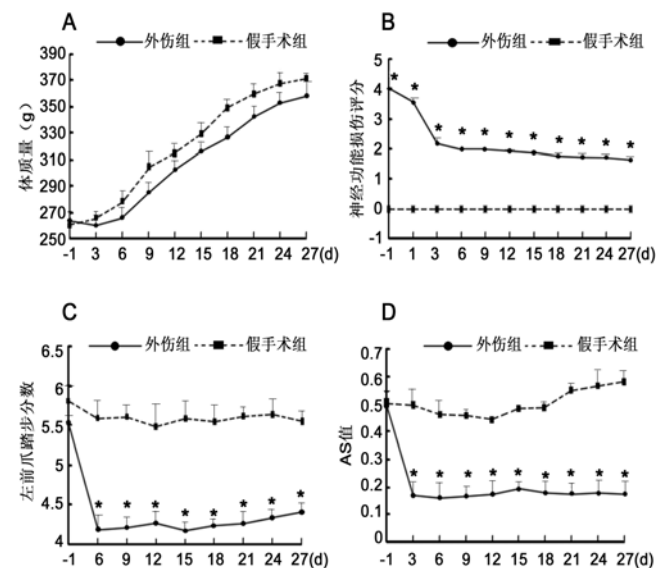


图 2 TBI 后不同时间大鼠体质量和行为学变化

与假手术组比较, * P<0.05

2.5 大鼠空间学习和记忆功能变化 Morris 水迷宫测试结果显示:在脑外伤后第 21~24 天,2 组大鼠各时间点的潜伏期逐渐缩短,颅脑外伤组大鼠逃避潜伏期明显比假手术组长 (P<0.05)。见图 3A。在 TBI 术后第 25 天进行空间记忆能力测试,结果显示颅脑外伤组大鼠在目标象限停留的时间明显短于假手术组 (P<0.05)。见图 3B。

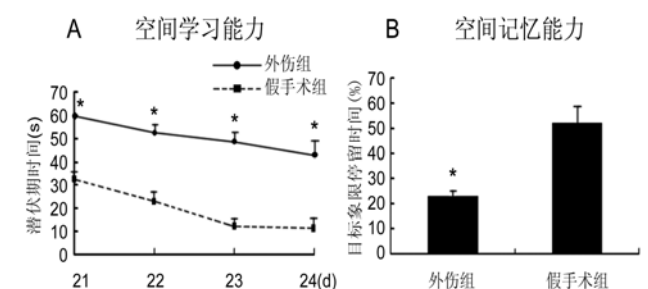


图 3 TBI 对大鼠空间学习和记忆能力的影响

与假手术组比较, * P<0.05

2.6 大鼠脑组织病理学检查 颅脑损伤大鼠组织损伤主要集中在损伤侧半球皮层、纹状体和海马;损伤主要表现为神经元变性坏死,受损区域神经元表现明显的排列紊乱,神经元丢失伴胶质细胞增生,可见囊状空腔;损伤对侧半球未见神经元损伤,细胞结构对称、排列规则、具有正常形态特征,见图4。与假手术组比较,颅脑外伤组大鼠脑组织体积缺失约32%。

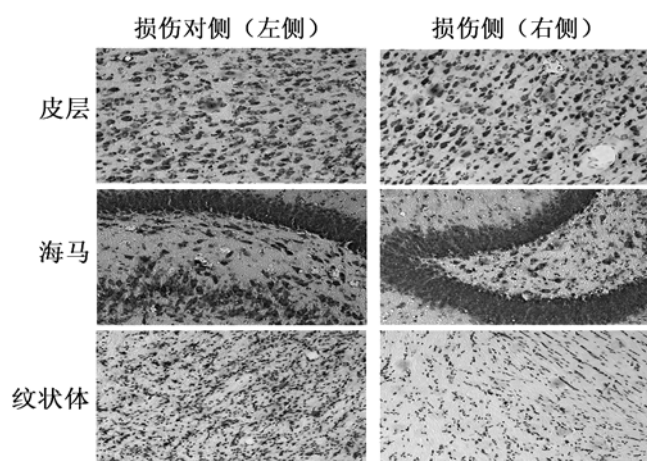


图4 TBI对大鼠脑组织神经元形态的影响(20×)

3 讨论

目前尚没有一种理想的TBI动物模型。局灶性损伤是TBI的最常见的一种类型,包括液压冲击伤(Fluid percussion brain injury, FPI)、自由落体撞击伤模型、打击负荷伤模型和CCI模型等,其中FPI和CCI是目前很常用的局灶性TBI动物模型。

一种致伤量可定量、受伤程度一致和可重复的TBI动物模型是进行比较治疗效果的基础。CCI模型特点是可造成较精确的损伤,符合上述的要求。其原理是通过高速运动的空气产生冲击力作用在不锈钢打击头造成TBI^[6]。该方法受个体差异因素影响较小,能够精确控制气动装置的,从而能严格控制损伤程度和打击部位,造成脑挫裂伤和颅内血肿,目前得到较广泛的应用。虽然CCI可以精确定位和控制参数,但是各个实验室采用的参数各不相同,造成损伤的程度和病变范围均不一致,导致不同行为学、生理学、血脑屏障、代谢、炎症和免疫反应。在打击时间、速度、深度和部位等参数中,打击深度是最主要的因素,其次是打击头的形状,再次是打击头的直径和速率^[7]。本实验采用CCI颅脑损伤模型,深度3.2mm,打击后大鼠都出现短暂昏迷、一过性呼吸暂停、体重下降、运动感觉和空间学习记忆能力障碍,模拟了临床TBI的症状和体征。

感觉、运动障碍是TBI的重要功能障碍之一。检索国内有关TBI动物模型的研究,发现观察指标仅局

限于神经功能损伤评分、病理检查等,未进行包括感觉、运动和认知障碍系统的行为学评估^[8-9]。本实验对大鼠TBI后的行为学进行相应的研究,发现大鼠神经功能损伤评分、foot-fault test和cylinder test等评分明显降低,表明CCI造成大鼠运动感觉等功能障碍。因此,该模型适用于研究感觉运动障碍功能恢复为目的的康复研究。

认知功能障碍是TBI后的并发症之一,严重影响康复训练结果和其他功能的恢复,如果能尽早改善患者的认知功能,则大大加快TBI患者功能的恢复。Morris水迷宫试验中的逃避潜伏期反映空间学习能力,目标象限停留时间和空间记忆能力有关,空间学习与记忆能力主要和海马功能有关^[10]。本实验大鼠经历TBI后,其潜伏期明显延长,在目标象限停留时间缩短,提示认知功能遭到极大的破坏。此外,病理也提示海马萎缩,神经元坏死。因此,该种脑外伤模型也适用于针对改善大鼠认知功能为目的的康复研究。

行为学评估是评估康复训练效果的一项重要指标。本实验大鼠运动感觉障碍和认知功能障碍持续较长时间,这为康复干预治疗提供了充裕的时间,可以观察周期较长的实验大鼠的恢复情况。

大脑组织缺失体积的大小也是评估康复训练效果的一项指标。康复训练往往会导致大脑发生可塑性的变化,本实验大鼠脑结构明显破坏,可适用于针对大鼠脑组织的结构可塑性为研究目的的康复研究。

除CCI脑外伤模型外,FPI模型也应用非常广泛,其缺点是难以控制恒定的外力作用和时间,多引起广泛脑损伤,容易引起低位脑干移位和神经源性肺水肿,死亡率高,创伤性脑水肿形成不明显^[7]。

本实验大鼠TBI模型有损伤机制单一、致伤程度定量准确、重复性好、条件易于控制和能复制分级脑损伤模型等优点,与临床脑外伤力学机制相似,充分模拟临床局灶性创伤性脑损伤及脑水肿,可以了解大鼠脑损伤后的病理生理和分子机制变化,是一个可广泛用于颅脑损伤后康复机制研究的动物模型。当然,CCI模型也存在缺点,如颅骨开窗后不能观察到骨折,且人为减压措施对急性脑水肿形成、硬膜外血肿占位效应的观察有一定影响,与临床闭合性脑损伤发生机制稍有不同,在研究中要考虑这一点。

【参考文献】

- [1] 王娜,李林. 创伤性脑损伤动物模型的研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(10): 905-906.
- [2] Wagner AK, Sokoloski JE, Ren D, et al. Controlled cortical impact injury affects dopaminergic transmission in the

- rat striatum[J]. J Neurochem, 2005, 95(2): 457-465.
- [3] Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. Stroke, 1997, 28(10): 2060-2066.
- [4] Gerlinde AM, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore-and hindlimb stepping, placing, and co-ordination[J]. Journal of Neuroscience Methods, 2002, 115(2): 169-179.
- [5] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nature Protocols, 2006, 1(2): 848-858.
- [6] Sutton RL, Lescaudron L, Stein DG. Unilateral cortical contusion injury in the rat: vascular disruption and temporal development of cortical necrosis[J]. J Neurotrauma, 1993, 10(2): 135-149.
- [7] Morganti-Kossmann MC, Yam E, Bye N. Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory[J]? Injury, 2010, 41(Suppl 1): 10-13.
- [8] 刘媛, 王莉, 曾琳, 等. 一种改良的创伤性脑损伤模型的建立[J]. 2008, 13(7): 416-419.
- [9] 周杰, 肖现, 章翔, 等. 一种大鼠激光脑损伤模型的建立[J]. 2009, 8(2): 113-117.
- [10] Saatman KE, Feeko KJ, Pape RL, et al. Differential behavioral and histopathological responses to graded cortical impact injury in mice[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(8): 1241-1253.

• 经验交流 •

口部肌肉治疗在功能性构音障碍儿童语言训练中的应用

翟燕, 宋晓萍, 翟佳, 李丽

【关键词】 口部肌肉治疗; 功能性构音障碍; 语言训练

【中图分类号】 R49; R493 【DOI】 10.3870/zgkf.2014.03.032

2005年3月~2012年9月在我中心康复训练的患儿50例,均符合功能性构音障碍的诊断标准^[1],排除先天性构音器官畸形、听力障碍、口吃患儿。经儿保科智力测试排除智障及发育障碍。其中男36例,女14例;年龄3岁6个月~12岁4个月。对就诊儿童进行<S-S>语言发育迟缓检查及构音障碍检查,用自制调查量表,向家长了解儿童婴幼儿时期辅食添加情况及语言发育情况,语音清晰度及流利性等。根据调查量表采取相应训练:①对于口部肌肉力量和协调性差的儿童进行口部肌肉功能训练,包括口腔感知觉训练、下颌稳定训练、舌功能训练、呼吸训练、口型模仿及发音训练。训练用具采用莎拉罗森菲德·庄臣(Sara Rosenfeld-Johnson, SRJ)口部肌肉治疗用具^[2],包括海绵按摩棒、咀嚼器、咬牙胶棒、吸管套装、吹气笛套装、肥皂泡套装等。②听觉辨别能力训练采用多媒体形象教学。③对于因为下颌稳定性不好导致的舌根音发音不清的患儿,采用构音训练。同时对存在进食方式异常的儿童进行家长培训,配合在家中进食及咀嚼训练。训练每天1~2次,每次30min。

治疗4~65d后,50例患儿,痊愈42例;50个单词正确率100%;好转8例;80%单词发音错误得以矫正,个别发音清晰

度差,但基本能进行日常交流^[3]。训练前,50例中有26例存在唇力度低下,35例最长发音时间<14s,44例舌头左右摆动范围小,38例舌头上下运动范围小,28例吹气不能或弱,37例下颌骨稳定性、灵活性差,40例患儿50个单词检查正确率<50%,22例听觉辨别能力差,45例注意力<15min;训练后,存在这些问题的患儿分别下降为9、3、2、4、1、5、3、2、10例($P<0.05$)。

目前儿童的功能性构音障碍的发生率较高,但是家长的重视程度较低,未给予及时干预和治疗,使儿童的构音器官得不到足够锻炼,导致习得语言后出现构音障碍,语音清晰度低。本研究通过系统的口部肌肉训练,增强功能性构音障碍儿童对口腔结构的意识,将口腔感知觉正常化,改善他们发音说话时口部肌肉结构所需的自主活动的准确性,并增强口部肌肉的独立活动力,建立连续发音活动的肌肉力量和耐力,同时结合发音讲话训练,会使此类儿童更加容易的学会发音,从而改善发音清晰度,提高交流能力。因此采用口肌训练对儿童功能性构音障碍的改善是行之有效的办法。

【参考文献】

- [1] 罗桂芳,杨庆镗,林慧娟,等.言语训练配合心理干预治疗脑卒中后构音障碍[J].中国康复,2013,28(2):119-119.
- [2] 莎拉罗森菲德·庄臣,王春燕.口部肌肉家居训练册[M].美国:创新治疗师国际中心出版,2008:22-34.
- [3] 李胜利.语言治疗学[M].北京:人民卫生出版社,2008:106-108.

收稿日期:2013-12-23

作者单位:大庆市龙南医院儿科语言康复中心,黑龙江 大庆 163453

作者简介:翟燕(1975-),女,主管护师,主要从事儿童语言障碍矫治方面的研究。