

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.12.1538

## 一种开放性颅脑外伤海水浸泡的动物模型

杨冰,李明\*,刘信龙,许峰峰,徐正平  
解放军455医院神经外科,上海200052

**[摘要]** **目的** 建立一种开放性颅脑外伤海水浸泡动物模型,研究其伤情特点。**方法** 健康雄性SPF级SD大鼠100只,随机分为5组,分别为对照组、轻型颅脑外伤海水浸泡组、中型颅脑外伤海水浸泡组、重型颅脑外伤海水浸泡组和重型颅脑外伤生理盐水浸泡组。采用控制性皮质撞击法造成不同程度的脑外伤,致伤后将大鼠局部损伤的脑组织浸泡在人工海水或生理盐水中,构建动物模型。观察各组大鼠行为学、病理学、脑含水量、血脑屏障通透性等变化。**结果** 建立的动物模型可较好地模拟遭海水浸泡的开放性颅脑外伤伤情特点。随脑外伤程度的加重,大鼠神经功能损伤、脑组织病理学、脑含水量、血脑屏障破坏程度逐渐加重;同等伤情下海水浸泡组脑组织坏死和出血等病理改变较生理盐水浸泡组明显加重;浸泡后24 h,同等伤情下海水浸泡组较生理盐水浸泡组脑组织含水量、血脑屏障破坏程度等均有显著加重。**结论** 制作的大鼠模型可模拟不同程度开放性颅脑外伤遭海水浸泡后的伤情变化。

**[关键词]** 开放性颅脑损伤;海水浸泡;动物模型;血脑屏障

**[中图分类号]** R 651.15 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)12-1538-05

### An animal model of open craniocerebral injury with seawater immersion

YANG Bing, LI Ming\*, LIU Xin-long, XU Feng-feng, XU Zheng-ping  
Department of Neurosurgery, No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

**[Abstract]** **Objective** To establish an animal model of open craniocerebral injury with seawater immersion and to study the characteristics of the injury. **Methods** A total of 100 healthy male SD rats were divided into 5 groups: control group, mild injury+seawater immersion group, moderate injury+seawater immersion group, severe injury+seawater immersion group and severe injury+normal saline immersion group. After SD rats had received a controlled cortical impact (CCI) injury, the injured brain tissue was soaked in seawater or normal saline to construct an animal model of open craniocerebral injury. We then observed the characteristics of the model, including the animal behavior, pathological changes, brain water content and the level of blood brain barrier (BBB) opening. **Results** The animal model could well simulate the characteristics of the open craniocerebral injury with seawater immersion. With the increase of brain injury severity, the cerebral dysfunction, cerebral pathology, cerebral water content, and the damage of BBB became more serious. The pathological changes of brain tissue necrosis and bleeding in severe injury+seawater immersion group were more notable than those in the severe injury+normal saline immersion group. Compared with the severe injury+saline immersion group, the water content of brain tissue and the damage of BBB were significantly increased in the severe injury+seawater immersion group after immersion for 24 h. **Conclusion** The rat model we established in this study can simulate the open craniocerebral injury with seawater immersion.

**[Key words]** open craniocerebral trauma; seawater immersion; animal models; blood-brain barrier

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(12): 1538-1542]

海战及海上作业发生意外时可能会导致开放性颅脑外伤伤员落水,使海水浸入伤口而加重原有的颅脑外伤<sup>[1]</sup>。临床经验表明目前此类伤员的临床症状比陆地伤员更为严重,病理变化更为突出,救治难

度更大,治疗效果亦更差<sup>[2-3]</sup>。为此,我们建立了模拟遭海水浸泡的开放性颅脑外伤大鼠模型,初步研究遭海水浸泡的开放性颅脑外伤伤情特点,现报告如下。

**[收稿日期]** 2016-07-26 **[接受日期]** 2016-11-06

**[基金项目]** 2014年度南京军区医学科技课题, Supported by 2014 Annual Medical Science and Technology Project of PLA Nanjing Military Area Command.

**[作者简介]** 杨冰,博士,主治医师。E-mail: 2637531250@qq.com

\*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81815202, E-mail: 9839299@qq.com

## 1 材料和方法

1.1 人工海水的配制 人工海水的配制参照文献[4-5]报告的配方:氯化钠 26.518 g/L,硫酸镁 3.305 g/L,氯化镁 2.447 g/L,氯化钙 1.141 g/L,氯化钾 0.725 g/L。取浙江大麦屿离海岸 5 km 处的海水作为对照,同时检测配制的人工海水和天然海水的渗透压和电解质情况,结果证明人工海水与天然海水的渗透压和主要电解质含量极为接近。

1.2 动物及分组 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 100 只[动物许可证号:SCXK(沪) 2013-0006],体质量(300±20) g,采用随机数字表法结合随机数余数调整法将大鼠平均分为 5 组,分别为对照组、轻型颅脑外伤海水浸泡组、中型颅脑外伤海水浸泡组、重型颅脑外伤海水浸泡组和重型颅脑外伤生理盐水浸泡组。因海水浸泡过程中重型颅脑外伤组大鼠死亡 1 只,后该组再补充 1 只 300 g 雄性 SPF 级 SD 大鼠。死亡大鼠的各项数据均未列入后续统计结果。

1.3 开放性颅脑外伤海水浸泡动物模型的制备 使用戊巴比妥按 35 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉大鼠,麻醉成功后将大鼠以俯卧位固定。以牙科钻磨开颅孔直径约 6 mm,内侧距矢状缝 3 mm,后端距人字缝 3 mm。采用精密颅脑撞击器(PinPoint™ PCI3000 Precision Cortical Impactor,美国 Hatteras Instruments Inc.)建立开放性颅脑外伤动物模型;撞击头直径 5 mm,撞击速度 2 m/s,接触时间为 500 ms。其中轻型颅脑外伤组撞击深度为 1 mm,中型颅脑外伤组撞击深度为 2 mm,重型颅脑外伤组撞击深度为 3 mm。动物致伤后用细针头小心将硬膜十字型挑破至骨孔边缘。对照组钻孔并挑开硬膜但不致伤。暴露的脑组织表面覆盖脑棉片,输液器导管末端部分剪 2 个侧孔,侧孔面向脑棉片。缝合头皮切口中间部分,在脑表面形成两端开放的皮下隧道。将海水持续从输液器中滴入,使包含挫伤部位在内的大脑皮质模拟持续浸泡于海水环境。对照组和生理盐水浸泡组均采用生理盐水代替海水浸泡。所有动物浸泡时间均为 60 min。

### 1.4 检测指标

1.4.1 大鼠的生命体征、昏迷时间和神经功能评分 动物模型制作完成后记录大鼠的昏迷时间,并于模型

制作完成后 1、8、24 h 观察大鼠的呼吸、心率及神经功能评分。大鼠意识状态分为 6 级:1 级,在笼内活动如常;2 级,在笼内活动减少;3 级,在笼内活动减少并运动失调;4 级,翻正反射存在但不能站立;5 级,翻正反射消失但痛刺激有肢体回缩反应;6 级,对任何刺激无反应。其中 5、6 级被认为是昏迷状态。记录大鼠麻醉后翻正反射消失至评分达到 4 级时的时间,即为昏迷时间。大鼠神经功能评分采用 Longa 评分法,分 5 个等级:0 分,正常、无神经功能缺损;1 分,左侧前爪不能完全伸展、轻度神经功能缺损;2 分,行走时大鼠向左侧(瘫痪侧)转圈、中度神经功能缺损;3 分,行走时大鼠身体向左侧(瘫痪侧)倾倒、重度神经功能缺损;4 分,不能自发行走、意识丧失。

1.4.2 影像学检查 造模后 24 h 采用西门子 Magnetom Trio 3T 磁共振仪行大鼠头颅磁共振检查。采用 T<sub>2</sub>W<sub>1</sub> 序列对大鼠头颅行冠状位扫描。

1.4.3 病理学检查 每组取 2 只大鼠用于病理学检查。采用 H-E 染色观察各组大鼠的病理结果,采用伊文思蓝染色显示血脑屏障破坏范围。

1.4.4 脑含水量检测 每组取 2 只大鼠用于脑含水量检测,于模型制备完成后 24 h 断头取脑。将鼠脑沿矢状缝切开,区分两侧大脑半球,用精密电子天平称湿质量。置 80℃ 烤箱中,连续烘烤 48 h 至恒质量后称干质量。按 Elliott 公式计算脑组织含水量:脑组织含水量(%)=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.4.5 血脑屏障通透性检测 每组取 10 只大鼠用于血脑屏障通透性检测。于处死前 2 h 股静脉注射 20 g/L 伊文思蓝,剂量为 2 mL/kg。断头取脑后,按横断面切取损伤平面厚约 5 mm 的脑组织,将其分为致伤侧与对侧两部分。分析天平上称量湿质量后将其匀浆,匀浆液为 2 mL 的 50% 三氯乙酸。充分匀浆后,将组织匀浆液 22 866×g 离心 20 min,取 1 mL 上清与 3 mL 无水乙醇混合,应用荧光分光光度计在激发波长 620 nm、发射波长 680 nm 的条件下比色,依据光密度(D)值计算伊文思蓝的质量分数。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,组间比较采用方差分析。检验水准(α)为 0.05。

## 2 结果

**2.1 大鼠一般情况** 撞击后部分重型颅脑外伤组大鼠出现短暂的呼吸暂停和轻度全身抽搐,1 min后均自行缓解。海水浸泡过程中重型颅脑外伤海水浸泡组大鼠死亡1只,其余各组均未发生大鼠死亡。致伤后1 h时大鼠的心率、呼吸均有不同程度的加快,重型颅脑外伤海水浸泡组大鼠尤为明显,其心率为(309.8±4.2)次/min,呼吸为(98.7±4.6)次/min。对照组、轻型颅脑外伤海水浸泡组、中型颅脑外伤海水浸泡组、重型颅脑外伤海水浸泡组和重型颅脑外伤生理盐水浸泡组大鼠昏迷时间分别为(0.21±0.06)、(0.48±0.28)、(2.15±0.17)、(3.30±0.24)、(2.45±0.19) h,中型颅脑外伤海水浸泡组、重型颅脑外伤海水浸泡组和重型颅脑外伤生理盐水浸泡组大鼠的昏迷时间均长于对照组和轻型颅脑外伤海水浸泡组( $P<0.05$ ),重型颅脑外伤海水浸泡组大鼠的昏迷时间长于重型颅脑外伤生理盐水浸泡组( $P<0.05$ )。

**2.2 大鼠神经功能评分** 各实验组大鼠神经功能评分变化见图1。造模后1 h重型颅脑外伤海水浸泡组、中型颅脑外伤海水浸泡组和重型颅脑外伤生理盐水浸泡组大鼠的 Longa 评分均高于对照组( $P<0.05$ );造模后8、24 h重型颅脑外伤海水浸泡

组与重型颅脑外伤生理盐水浸泡组之间、轻型颅脑外伤海水浸泡组与对照组之间的 Longa 评分差异均无统计学意义,其他各组之间两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

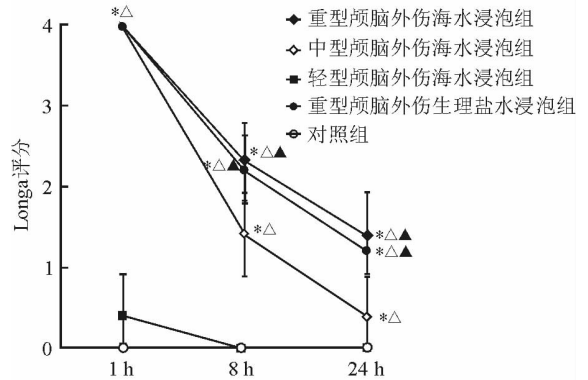


图1 各组大鼠 Longa 评分变化

\* $P<0.05$ 与对照组比较;  $\triangle P<0.05$ 与轻型颅脑外伤海水浸泡组比较;  $\blacktriangle P<0.05$ 与中型颅脑外伤海水浸泡组比较。  $n=20, \bar{x}\pm s$

**2.3 头颅磁共振检查** 造模后24 h行大鼠头颅磁共振检查,结果如图2所示。可见轻型颅脑外伤海水浸泡组大鼠头颅损伤主要累及皮质浅表,重型颅脑外伤海水浸泡组大鼠头颅创伤直达深部核团、水肿波及对侧脑,中型颅脑外伤海水浸泡组介于以上两者之间;海水浸泡组大鼠头颅的出血和水肿较同等致伤条件下生理盐水浸泡组更为明显。

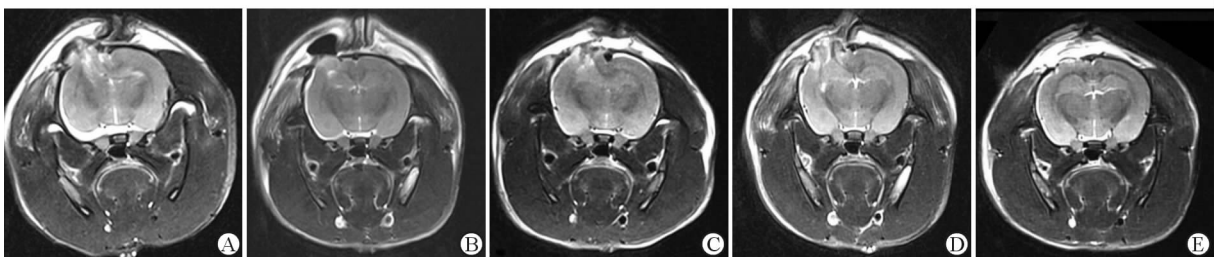


图2 造模后24 h各组大鼠头颅磁共振图像

A: 重型颅脑外伤海水浸泡组; B: 中型颅脑外伤海水浸泡组; C: 轻型颅脑外伤海水浸泡组; D: 重型颅脑外伤生理盐水浸泡组; E: 对照组

## 2.4 病理学检查

**2.4.1 大体标本** 大鼠左侧半球损伤部位可见直径约5 mm的圆形致伤灶,致伤灶底部可见轻重不一的挫伤脑组织,周围脑组织水肿。伤情越重,脑组织挫伤和坏死范围越大(图3)。横断面显示重型颅脑外伤组损伤深度直达丘脑,周围可见大片脑组织因血脑屏障破坏而被伊文思蓝染色,损伤灶周边有大片的出血;海水浸泡组与生理盐水浸泡组相比血脑屏障破坏范围明显增大。中型颅脑外伤海水浸泡

组损伤深度直达海马,周围亦可见出血和蓝染区域。轻型颅脑外伤海水浸泡组损伤范围局限于皮质,血脑屏障破坏范围、程度较重度和中等颅脑外伤组亦明显减少。对照组脑组织表面仅轻度水肿,剖面可见皮质及以下各层脑组织完好。

**2.4.2 H-E 染色结果** 光镜下可见各致伤组损伤中心区域脑组织缺损,蛛网膜和皮质连续性被破坏;周围脑组织内有散在的出血灶,血管周间隙扩大;部分神经核呈三角形深染,核染色重,胞周出现空

泡;更远的部位白质出现疏松改变,胞周出现空泡,整个脑组织呈海绵样改变表现。重型颅脑外伤海水

浸泡组和重型颅脑外伤生理盐水浸泡组相比,出血、胞周空泡样改变和血管周间隙扩大更为明显(图 4)。

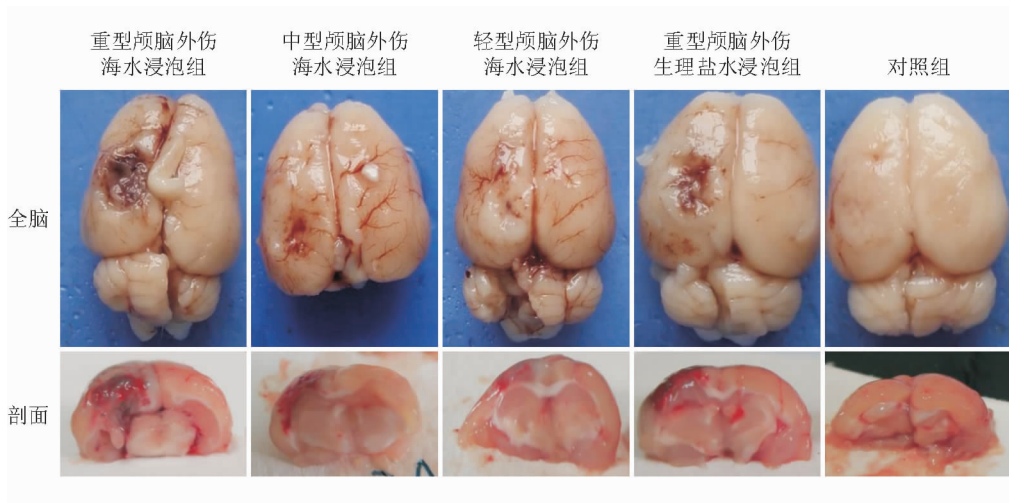


图 3 造模后 24 h 各组大鼠脑大体标本

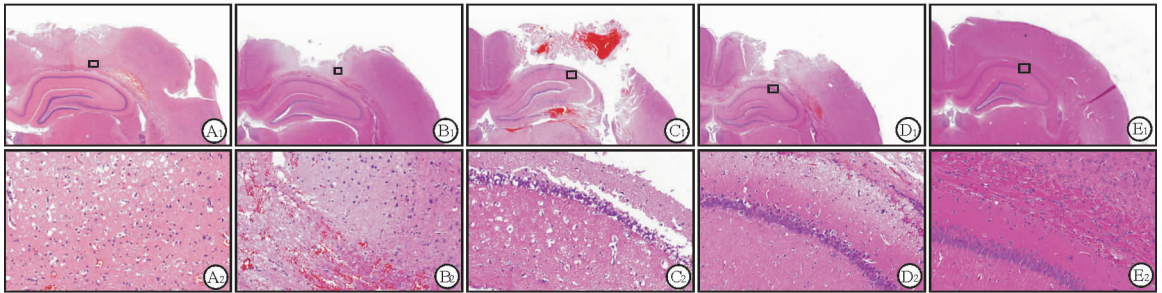


图 4 各组大鼠的 H-E 染色表现

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: 轻型颅脑外伤海水浸泡组; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>: 中型颅脑外伤海水浸泡组; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>: 重型颅脑外伤海水浸泡组; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>: 重型颅脑外伤生理盐水浸泡组; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>: 对照组. A<sub>2</sub>~E<sub>2</sub> 分别为 A<sub>1</sub>~E<sub>1</sub> 的放大图,黑框提示放大部位. Original magnification: ×2 (A<sub>1</sub>~E<sub>1</sub>), ×200 (A<sub>2</sub>~E<sub>2</sub>)

2.5 脑组织含水量 重型颅脑外伤海水浸泡组、中型颅脑外伤海水浸泡组、轻型颅脑外伤海水浸泡组、重型颅脑外伤生理盐水浸泡组和对照组大鼠脑组织含水量分别为(80.18±0.07)%、(79.56±0.05)%、(79.25±0.07)%、(79.65±0.07)%和(77.72±0.06)%,除中型颅脑外伤海水浸泡组与重型颅脑外伤生理盐水浸泡组之间差异无统计学意义外,其余各组两两比较差异均有统计学意义(P<0.05)。

2.6 血脑屏障通透性 采用脑组织伊文思蓝含量评价血脑屏障的通透性,结果见表 1。伤侧脑组织除中型颅脑外伤海水浸泡组与重型颅脑外伤生理盐水浸泡组差异无统计学意义外,其余各组两两比较差异均有统计学意义(P<0.05);健侧脑组织除中型颅脑外伤海水浸泡组与重型颅脑外伤生理盐水浸泡组、轻型颅脑外伤海水浸泡组与对照组差异无统计学意义外,其余各组两两比较差异均有统计学意义(P<0.05)。

表 1 各组大鼠脑组织伊文思蓝含量

$w_B/(\mu g \cdot g^{-1})$ , n=10,  $\bar{x} \pm s$

部位	重型颅脑外伤海水浸泡组	中型颅脑外伤海水浸泡组	轻型颅脑外伤海水浸泡组	重型颅脑外伤生理盐水浸泡组	对照组
伤侧	13.706±0.930*△▽	9.607±0.950*▲	5.334±0.705*△	9.793±0.453*	2.991±0.282
健侧	7.424±1.101*△▲▽	3.844±0.22*▲	2.938±0.362△	4.379±0.235*	2.551±0.321

\* P<0.05 与对照组比较; △ P<0.05 与重型颅脑外伤生理盐水浸泡组比较; ▲ P<0.05 与轻型颅脑外伤海水浸泡组比较; ▽ P<0.05 与中型颅脑外伤海水浸泡组比较

### 3 讨论

开放性颅脑外伤合并海水浸泡是一类特殊创伤,建立合适的动物模型有利于研究其损伤机制和救治方法。我们采用控制性皮质撞击法造成大鼠脑外伤,致伤后将局部损伤的脑组织浸泡在人工海水中,成功构建了大鼠开放性颅脑外伤海水浸泡模型。SD大鼠作为标准化实验动物,遗传背景明确,动物个体差异小,廉价,利于大批量重复实验。控制性皮质撞击法是利用气动或电磁冲击装置驱动刚性撞击头,冲击暴露的脑皮质造成损伤。在该模型中,可通过改变活塞的速率、打击深度、停留时间来调节脑损伤的严重程度,这种方法具有重复性高、受个体差异因素影响较小等优点,避免了重物落体造成的反弹伤害风险<sup>[6-7]</sup>。模型建立后通过磁共振检查和大体标本研究发现,重型颅脑外伤组损伤深度直达丘脑,中型颅脑外伤组损伤深度可达海马,轻型颅脑外伤组损伤范围局限于皮质。由于致伤程度可精确调节,采用该方法制备动物模型具有安全性高、死亡率低的优势。本次实验共有81只大鼠进行致伤(对照组20只仅开颅未致伤),仅有1只实验大鼠死亡。我们认为采用直径5 mm的撞击头,撞击速度2 m/s,接触时间为500 ms,轻型、中型、重型颅脑外伤的撞击深度分别为1、2和3 mm,可以安全、有效地精确重复制作不同严重程度的开放性颅脑外伤海水浸泡动物模型。

伤后24 h是颅脑外伤临床治疗的重要时间点,一般而言外伤后24 h活动性出血明显减少而脑水肿逐渐加重,是影响治疗成败的关键因素<sup>[8-10]</sup>。因此本实验选择了造模后24 h作为观测点,以了解海水对脑组织的破坏程度和作用机制。根据实验结果,我们发现同等致伤条件下,海水浸泡组较生理盐水浸泡组在大鼠脑组织含水量、血脑屏障破坏程度等方面均有显著加重。两组H-E染色病理切片对比研究亦发现,海水浸泡组标本呈现出血管周间隙扩大、白质出现疏松改变、胞周出现空泡、整个脑组织呈海绵样改变等特点。虽然颅脑外伤后早期海水浸泡降低了血管的通透性,抑制了水分向组织间隙和细胞内的转移,从而导致脑水肿的高峰期被延迟,

但我们发现随着时间的推移,海水对脑组织的破坏性影响将逐渐表现出来,并且占了主要作用,导致血脑屏障破坏加剧,最终加重创伤性脑水肿。海水浸泡导致细胞膜内外离子浓度紊乱、自由基增多,使得血脑屏障破坏加剧,神经元和神经胶质细胞膜水通道异常开放<sup>[9]</sup>可能是导致上述表现的原因。今后我们将在该实验动物模型的基础上针对氧化应激水平和水通道蛋白等环节开展进一步研究,以揭示其深层次的机制。

### [参考文献]

- [1] 张剑宁,程 岗.我国海上颅脑战创伤研究现状[J].中华神经外科杂志,2012,28:211-213.
- [2] 于 永,余新光.海水浸泡重型开放性颅脑损伤清创范围的研究[J].中国微侵袭神经外科杂志,2009,14:271-272.
- [3] 谢培增,梁鹿章,何强华,朱红胜,刘 君,李 扬,等.海水浸泡开放性颅脑伤的治疗[J].海军医学杂志,2002,23:212-214.
- [4] 薛小军,张文华,周 松,李冉冉,张行健,陈文有,等.伤后早期应用乌司他丁对海水浸泡兔腹部开放伤的干预效果[J].解放军医学杂志,2013,25:35-38.
- [5] 张 迪,裴少保,王海峰,蒋传海,朱 捷,吴成如,等.兔海水浸泡脊髓损伤的病理变化观察[J].解放军医学杂志,2013,38:772-777.
- [6] 胡登科,王文学,伏光辉,宋学军.脑损伤动物模型研究:液压冲击损伤与控制性皮层撞击损伤的比较[J].国际医药卫生导报,2015,21:3551-3553.
- [7] CHEN J Q, ZHANG C C, LU H, WANG W. Assessment of traumatic brain injury degree in animal model[J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7: 991-995.
- [8] 张 赛,李建国.神经创伤学新进展 3[M].天津:南开大学出版社,2009:4.
- [9] 王 娟,钱令嘉,谢 方,程 岗,王亚明,李志超,等.颅脑损伤合并海水浸泡对大鼠脑线粒体的研究及意义[J].中华神经外科疾病研究杂志,2015,14:213-217.
- [10] 鲁 宏,雷小燕,胡 惠,何占平.早期创伤性脑水肿水通道蛋白4的表达及组织病理改变[J].中华创伤杂志,2013,29:1224-1229.

[本文编辑] 孙 岩