

• 基础研究 •

大鼠小脑共济失调模型及病理学研究

刘诗翔 张苏明 李强 胡静

【摘要】 目的 建立 SD 大鼠海人酸(KA)损毁双侧小脑顶核制备的小脑共济失调动物模型;观察其共济失调的行为学和病理学改变。方法 采用大鼠脑立体定位仪,微量注射 KA 损毁 SD 大鼠双侧小脑顶核,制备 SD 大鼠小脑共济失调模型。采用自制鼠共济失调检测仪观察共济失调及行为变化、病理改变(光、电镜组织形态学改变)。结果 KA 损伤 SD 大鼠小脑共济失调模型行为学表现为后肢体行动困难、笨拙,行走不稳,躯体向左或右侧倾倒或打转,自己难以翻正,反应迟钝,胆小,紧张等表现;病理学证实注射部位的神经元大部分坏死、脱失,出现明显的神经变性损害的病理特点。结论 SD 大鼠双侧小脑顶核微量注射 KA 可成功制备小脑变性动物模型,其损伤的病理变化以神经元退变为主,而小脑的完整性不受破坏,适用于神经干细胞移植和再生的研究。

【关键词】 小脑共济失调;海人酸;病理学;大鼠

Cerebellar ataxia model and pathology in rats

LIU Shixiang*, ZHANG Suming, LI Qiang, et al

* Department of Neurology, Kunming General Hospital of Chengdu
Military Region, 650032 Kunming, China

【Abstract】 Objective To establish an animal model of cerebellar ataxia by injecting kainic acid (KA) into SD rat's bilateral cerebellar fastigial nuclei and to observe the praxiological and pathological change of SD rat's ataxia. Methods SD rat model of cerebellar ataxia was made by injecting KA into bilateral cerebellar fastigial nuclei. Then the ataxia and praxiological changes were observed by rat ataxia detector and pathological changes were observed under light and electron microscope. Results The praxiological manifestations of SD rat model of cerebellar ataxia induced by KA injury were as follows: difficulty of hind limb movement, clumsy, unstable walking, toppling and falling to left or right or rotating, and unable to turn over by itself, responding slowly, timid and nervous. Pathological examination demonstrated that most neurons in injection area were necrotic or disappeared and there were pathological characteristics of obvious neurodegenerative lesions. Conclusion Injection of KA into bilateral cerebellar fastigial nuclei of SD rat can successfully form cerebella degeneration animal model. The pathological changes of its injury is mainly degeneration of neurons, while the integrity of cerebella was not destroyed. The model is suitable for research on nerve cell transplantation and regeneration.

【Key words】 cerebellar ataxia; kainic acid; pathology; rats

临床上对小脑变性的治疗没有明确有效的方法。建立小脑变性的动物模型进行实验研究十分重要。但国内外对小脑变性的动物模型报道很少,而且既往采用通直流电损毁、手术切除等手段造成大范围小脑组织破坏,不利于后续研究。本实验用海

人酸(kainic acid, KA)损毁大鼠小脑顶核制备偏侧共济失调模型,旨在建立一个小脑变性的动物模型,为开展小脑内神经干细胞移植、再生以及神经药理学方面的研究提供小脑外形完整而有神经元变性损伤的动物模型,并从行为学、组织形态学等方面对该

收稿日期:2007-06-22

基金项目:云南省自然科学基金资助课题(资助号码:2002C007IM)

作者单位:650032 昆明市,成都军区昆明总医院神经内科(刘诗翔、李强、胡静);430030 武汉市,华中科技大学同济医学院临床神经医学研究中心(张苏明)

作者简介:刘诗翔,男,1961年9月生,云南会泽人,医学博士,主任医师,科主任。Tel:13759502818

模型加以评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 成年健康 SD 大鼠 50 只，雌雄不拘，体重 200~250g(昆明医学院动物科提供)，置于室温 18~22℃，安静环境饲养，12h 昼夜自然光照，自由饮水、取食。动物于实验前适应实验室环境 1 周。随机分组：对照组 10 只和注射 KA 组 40 只，其中左右小脑组各 20 只(另各取 10 只行病理学和行为学检查)。

1.2 模型的建立 KA 组以 3% 戊巴比妥钠(20mg/kg)局部注射麻醉动物，俯卧位固定于鼠脑立体定位仪。消毒后沿枕部矢状线切开头皮，暴露颅骨。双氧水清洁骨面，参照大鼠脑解剖定位图谱和大鼠脑立体定位图谱^[1]，以矢状缝与人字缝交点为坐标 0 点，向后 4.4mm、向左和右旁开 2mm，牙科钻直径 1mm 小孔，将 5μl 微量注射器固定于立体定位仪上，注射针管尖部直径 20μm。KA 浓度为 10g/L，垂直向下 3~4mm，推注速度 0.25μl/min，左右小脑顶核各注射 1μl，完毕后留针 15min。术后消毒，缝合皮肤，肌注青霉素预防感染。安静保温喂养。对照组则向上述同样部位内注入等量生理盐水。脑切片经病理学证实注射部位在小脑顶核。

1.3 大鼠行为学及共济失调的观察 术后将大鼠放回饲养笼内。大鼠完全清醒后，采用自制大鼠共济失调检测仪^[1]检测共济失调是否形成，记录行为学表现及过竿时间。

1.4 形态学观察 实验组存活 12h 后取动物 20 只、对照组 4 只，进行光镜和 HITACHI H-600 (JEM1200EX)透射电子显微镜观察。

1.5 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件包进行统计学分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学特征 SD 大鼠左右小脑顶核各微量注射 KA 1μl 后，精神差，厌食，少动，行动摇晃迟缓，身体左右摇晃，头部触地，尾巴拖地，多次侧翻跌倒并不能自行翻正，左小脑组向左翻倒，右小脑组向右翻倒，嘴部寻找食物也十分笨拙。待大鼠症状稳定，进行过竿实验(表 1)。

2.2 病理学改变 光镜下，实验组大鼠出现脑组织局灶坏死、溶解，大量神经元脱失，脑组织水肿，颗粒细胞核浓缩、核碎裂，红色神经元核固缩，胞体缩小、

变形等改变(图 1~4)。

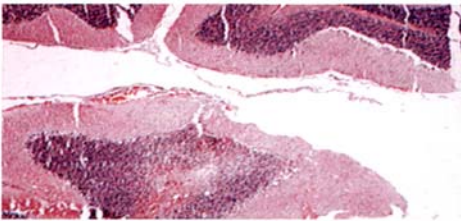
表 1 SD 大鼠共济失调检测仪过竿时间($s, n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	实验前	实验后	P 值
左小脑组	5.80±0.18	28.67±2.35	<0.0001
右小脑组	5.35±0.12	27.75±1.88	<0.0001
生理盐水组	5.53±0.10	5.63±0.11	>0.05



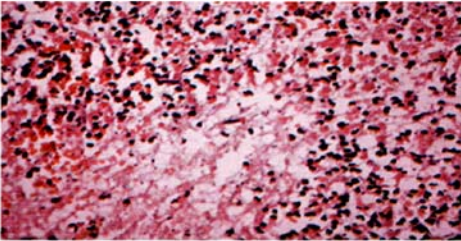
分子层、蒲肯野细胞层和颗粒细胞层，各层细胞的形态结构正常

图 1 大鼠小脑顶核组织形态的光学显微镜观察(HE 染色)



脑组织局灶坏死、溶解，周围脑组织水肿

图 2 注入 KA 后给药侧小脑顶核组织形态学的改变



核浓缩、核碎裂

图 3 颗粒细胞

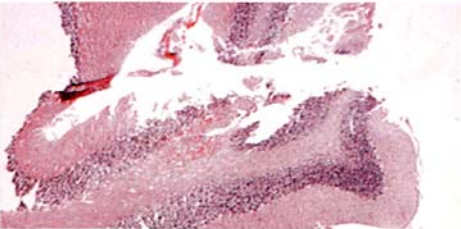


图 4 脑组织局灶坏死、溶解

3 讨论

3.1 KA 所致大鼠小脑变性模型的评价 目前，有

关大鼠小脑共济失调动物模型的标准尚未见报道,但参照帕金森病动物模型的标准^[2],即“有用的帕金森病动物模型是能够测量的,有行为及生理功能的损害,伴有解剖和生化的改变”;因此,笔者认为该模型比较符合此标准。此外,该模型还具有模型动物能保持正常的生存能力,可以实验前后自身对照的优点。而且由于KA对神经元的损伤是不可逆的,动物不能出现自发代偿。因此,该动物模型共济失调的症状明显、持续而稳定,病理证实神经组织主要发生了变性损害,由于保留了小脑的完整性,因而可进行更进一步的研究,如移植、神经药理学等需长期系统观察的实验研究。笔者认为用KA制作的小脑变性共济失调模型是研究小脑共济失调疾病的一种理想模型。

3.2 KA引起SD大鼠小脑病理学的改变及机制的探讨 本实验结果表明,大鼠注入KA后小脑病理组织学及超微结构发生明显改变,出现脑组织局灶坏死、溶解,大量神经元脱失,脑组织水肿,颗粒细胞核浓缩、核碎裂,红色神经元核固缩,胞体缩小、变形等改变,提示局部注射KA严重损伤了小脑组织,导致大鼠出现共济失调。关于KA导致神经元损伤的机制可能与KA受体激动导致内源性氨基酸的释放^[3];增加胞浆内细胞色素C、Caspase-3和Caspase-9的表达导致神经细胞的凋亡^[4~6];通过电压依赖性钙通道使钙离子流入脑细胞,引起细胞内钙超载^[7];通过基因调控引起氧化应激和炎症反应^[8]等有关。

参考文献

- [1] Schannc FAX, Kanc AB, Young EE, et al. Calicium dependence of toxic cell death; a final common pathway. *Science*, 1992, 206:700.
- [2] Calne DH. Advances in the neuropharmacology of parkinsonism, *Ann Intern Med*, 1979, 90:219.
- [3] William J, Nicklas BK, Soll B. Effect of kainate on ATP level and glutamate metabolism in cerebellar slices. *Eur J Pharmacol*, 1980, 62: 209-213.
- [4] Faherty CJ, Xanthoudakis S, Smeyne RJ. Caspase-3 dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. *Mol Brain Res*, 1999, 70: 159-163.
- [5] Ouyang YB, Tan Y, Comb M, et al. Survival and death-promoting events after transient cerebral ischemia; phosphorylation of Akt, release of cytochrome C, and activation of caspase-like proteases. *Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19:1126-1135.
- [6] 郭颂, 饶明俐. Caspase及细胞色素C在海人酸所致海马组织兴奋性毒性损伤中的表达. *中风与神经疾病杂志*, 2000, 17:258-266.
- [7] 韩柏, 白培深, 李夏青. 海人酸对脑细胞胞浆游离钙的影响. *中华精神科杂志*, 1998, 31:37-39.
- [8] Dalton T, Pazdernik TL, Wagner J, et al. Temporal spatial patterns of expression of metallothionein I and III and other stress related genes in rat brain after kainic acid-induced seizures. *Neuroche Int*, 1995, 27: 59-71.

(上接第54页)

- humans. *Circulation*, 2003, 108: 1701-1706.
- [5] Pintot-Slottow TL, Waksman R. Overview of the 2006 Food and Drug Administration Circulatory System Devices Panel meeting on drug-eluting stent thrombosis. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2007, 69: 1064-1074.
 - [6] Cheneau E, Leborgne L, Mintz GS, et al. Predictors

of subacute stent thrombosis: results of a systematic intravascular ultrasound study. *Circulation*, 2003, 108: 43-47.

- [7] Moussa I, Oetgen M, Roubin G, et al. Effectiveness of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin in preventing stent thrombosis after coronary stent implantation. *Circulation*, 1999, 99: 2364-2366.

(上接第57页)

- in West Pomerania province of Poland. Comparison between primary coronary intervention and thrombolytic therapy. *Kardiol Pol*, 2006, 64:591-599.
- [7] Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*, 2003, 361:13-20.
 - [8] Cucherat M, Bonnefoy E, Tremeau G. WITH-

DRAWN: primary angioplasty versus intravenous thrombolysis for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007, 18:CD001560.

- [9] La Scala E, Steffenino G, Dellavalle A, et al. Half-dose thrombolysis to begin with, when immediate coronary angioplasty in acute myocardial infarction is not possible. *Ital Heart J*, 2004, 5:678-683.