

稳定的大鼠大脑中动脉栓塞脑梗死模型的建立

包新杰,李雪元,左赋兴,冯铭,窦万臣*,王任直

(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院神经外科,北京 100730)

【摘要】 目的 探讨使用激光多普勒血流监测技术制作稳定的大鼠大脑中动脉栓塞脑梗死模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的可行性。方法 16只SD雄性大鼠随机分成2组:实验组和对照组各8只。实验组将模型制作过程中脑血流下降至基础值的30%判定为模型制作成功;对照组不监测脑血流,将尼龙栓线插入深度为1.8 cm判定为模型制作成功。模型前和模型后24 h分别行神经损伤严重程度评分(modified neurological severity scores, mNSS);模型后24 h处死大鼠取脑,行2,3,5-三苯氯化四氮唑(TTC)染色并计算脑梗死体积。结果 实验组8只大鼠模型后24 h均出现典型偏瘫症状,mNSS评分稳定在10分~13分,梗死体积稳定性和均一性好,为(37.5±3.9)%。对照组8只大鼠mNSS评分稳定性较差,其中5只大鼠的mNSS评分为10分~13分,5只大鼠的脑梗死灶和实验组相似,但有3只大鼠的脑梗死体积明显小于实验组($P < 0.05$)。实验组的模型成功率为100%,对照组的模型成功率为62.5%($P < 0.05$)。结论 激光多普勒血流监测技术可以显著提高大鼠MCAO模型的成功率、稳定性和均一性。

【关键词】 脑梗死;模型;激光多普勒;中动脉,栓塞;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0395-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.011

Establishment of a stable rat model of middle cerebral artery occlusion

BAO Xin-jie, LI Xue-yuan, ZUO Fu-xin, FENG Ming, DOU Wan-chen*, WANG Ren-zhi

(Department of Neurosurgery, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) assisted by laser Doppler flowmetry. **Methods** Sixteen rats were randomly divided into two groups: (1) experimental group, $n = 8$; (2) control group, $n = 8$. In the experimental group, a sudden decrease of regional cerebral blood flow from baseline (before ischemia) to approximately 30% of baseline confirmed the correct placement of nylon thread. In the control group, 1.8 cm nylon thread insertion was performed without laser Doppler flowmetry. The modified neurological severity scores (mNSS) were tested before and 24 h after MCAO. All rats were killed at 24 h after MCAO. The brains were removed and dissected into 6 pieces of 2 mm coronal sections. The fresh brain slices were stained with 2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride and the relative infarct volume was measured. **Results** In the experimental group, 8 rats showed typical symptom of hemiplegy with stable mNSS (between 10 and 13) and infarct volume (37.5±3.9%). However, only 5 rats in the control group showed stable mNSS and infarct volume. The success rate of the model establishment was 100% in the experimental group compared with 62.5% in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The application of laser Doppler flowmetry significantly increases the establishment success rate of stable MCAO models in rats.

【Key words】 Cerebral ischemia; Model; Laser Doppler flowmetry; Middle cerebral artery, occlusion; Rat

[基金项目] 国家自然科学基金(81200916);国家高技术研究发展计划(863计划)(2014AA020513;2013AA020106)。

[作者简介] 包新杰(1982-),男,主治医师,研究方向:脑血管病的干细胞治疗。

[通讯作者] 窦万臣,E-mail: wangrz@126.com

Corresponding author: DOU Wan-chen. E-mail: liubaiyan@126.com

脑梗死是严重危害人类生命和健康的重大疾病之一,目前除发病 3~4.5 h 内及时溶栓外,尚无更为有效的治疗方法^[1]。人类急需在脑梗死的研究中有所突破,所以是否具有一种稳定、可靠的动物模型显得尤为重要。自 1989 年 Longa 等^[2]使用线栓法制备大鼠脑梗死模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)以来,该模型在脑梗死的研究中得到广泛运用。MCAO 模型制作的关键是插入栓线的头端能否到达大脑中动脉起始处,但是插线过程属于盲插,栓线头端到达的具体部位并不能用肉眼所见,只能凭借操作者的经验,利用插线深度和手感间接判断栓线位置是否合适^[3-5]。但是,这种经验性的判断往往导致模型不稳定、均一性差,本实验就能否使用激光多普勒血流监测技术提高大鼠 MCAO 模型的稳定性进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及实验用品

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 16 只,体重 250~270 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】提供。

1.1.2 实验药物

水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司),生理盐水配成 10% 水合氯醛溶液;2,3,5-三苯氯化四氮唑(TTC,北京化学试剂厂),生理盐水配成 2% TTC 溶液。

1.1.3 实验器材

激光多普勒血流仪(MP150)和多普勒血流模块(LDF100)(Biopac Systems,美国);手术显微镜;显微手术器械;自制大鼠固定板;尼龙栓线(型号:2432,北京沙东生物技术有限公司);孵育箱(Series II, Thermo Forma)。

1.2 实验动物分组及模型制作方法

16 只 SD 雄性大鼠随机分成 2 组:实验组和对照组各 8 只。尼龙栓线上在距离头端 1.8 cm 处做标记,碘伏消毒备用。

模型制作在北京协和医院动物实验中心手术操作间【SYXK(京)2015-0025】进行。线栓法制作大鼠 MCAO 模型参照我们实验室的方法^[3-6]。手术前动物禁饮食 4 h 并称重,按外科无菌手术操作。实验组大鼠 10% 水合氯醛 0.35 mL/100 g 腹腔注射

麻醉后,俯卧位固定。头部矢状位皮肤正中切口约 1.5 cm,剥离骨膜,选择右侧前囟后 1 mm,右侧旁开 2 mm,硬脑膜下 1 mm 为大鼠脑表面大脑中动脉供血区域脑血流监测位点。直径 1 mm 磨钻头颅骨钻孔,保持硬脑膜的完整性。将激光多普勒血流测量仪的专用探头插入测量点硬脑膜下 1 mm,固定。专用软件记录并分析脑血流,激光反射率始终控制在 50% 左右。再将大鼠放至仰卧位并固定,手术显微镜下实施大鼠 MCAO 手术,剪掉颈部毛发,碘伏消毒皮肤;颈部正中切口 1.5 cm;剪开阔筋膜后显露右侧胸锁乳突肌,在胸锁乳突肌和颈前肌之间向深部分离后显露颈动脉鞘,游离右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉;用 6-0 丝线分别结扎颈外动脉根部和颈总动脉离分叉 8 mm 处,压闭阻断颈内动脉血流后于颈总动脉离分叉约 5 mm 处剪一小口,置入尼龙栓线,左手拿显微镊子夹住颈总动脉,右手用镊子辅助栓线沿颈内动脉方向插入,插入深度为 1.8 cm 左右时,有轻微阻力,脑血流下降至基础值的 30% 提示模型制作成功^[6];双结扎紧颈总动脉,剪断血管外部栓线,清理术野,缝合颈部切口,另外骨蜡封闭骨孔,全层缝合头皮。对照组大鼠模型制作过程中不监测脑血流,尼龙栓线插入深度为 1.8 cm 时表示模型制作成功^[5],其余同实验组。将大鼠放回鼠笼,自由饮食。

1.3 行为学评分

模型前和模型后 24 h 分别进行改良神经损伤严重程度评分(modified neurological severity scores, mNSS)^[3]。分为运动、感觉、平衡和反射四部分,总分为 18 分,正常大鼠得分为 0 分,得分越高则症状越重。

1.4 TTC 染色

MCAO 后 24 h,10% 水合氯醛深度麻醉大鼠后开颅取脑,切掉额极和枕极后冠状位切成 2 mm 厚度的脑块共 6 块,放入 2% TTC 溶液中避光 37 °C 孵育 30 min。10 倍显微镜下拍照,在 ImagePro Plus 软件中分析并计算梗死体积。间接梗死面积 = 正常侧脑组织面积 - 梗死侧正常脑组织面积。相对梗死体积 = 累积间接梗死面积 / 累积正常侧脑组织面积 × 100%^[3]。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 数据分析软件,测量数据均用 $\bar{x} \pm sd$ 表示。组间行为学评分和相对梗死体积比较,

使用独立样本 *t* 检验分析。两组间模型成功率比较,使用卡方检验。 $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 行为学比较

模型制作前两组大鼠 mNSS 评分均为 0 分。实验组 8 只大鼠模型后 24 h 均出现典型偏瘫症状,表现为:站立不稳,向左侧跌倒或转圈,提起鼠尾可见左前肢屈曲,头向患侧抬起,mNSS 评分稳定在 10 分~13 分(图 1)。对照组 8 只大鼠 mNSS 评分稳定性较差,其中 5 只大鼠偏瘫症状明显,mNSS 评分为 10 分~13 分,但有 3 只大鼠无明显偏瘫症状,mNSS 评分偏低,分别为 8 分、6 分和 3 分(图 1)。

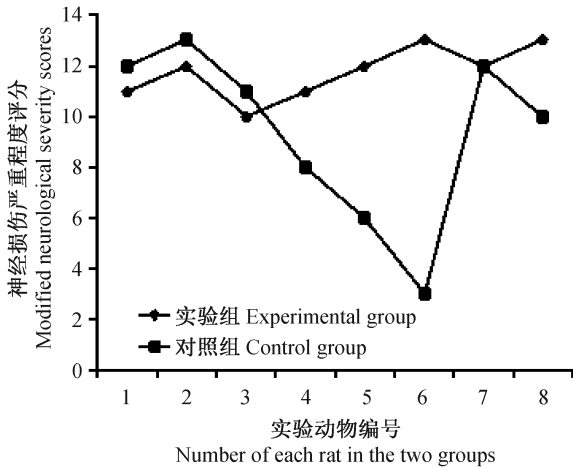


图 1 两组大鼠模型后 24 h 的 mNSS 评分

Fig. 1 mNSS of each rat in the two groups 24 h after MCAO

2.2 大鼠脑梗死体积和模型成功率比较

TTC 染色结果显示,实验组 8 只大鼠均显示出明显梗死灶,梗死体积稳定性和均一性好(图 2),为 $(37.5 \pm 3.9)\%$ 。大鼠取脑时见右侧大脑肿胀明显,并可见外侧额、颞、顶部大脑中动脉供血区域脑组织颜色苍白,TTC 染色见大脑皮层和基底核外侧白色梗死灶。对照组 8 只大鼠的脑梗死灶稳定性较差,其中 5 只大鼠的脑梗死灶和实验组相似,但有 3 只大鼠的脑梗死体积明显小于实验组,分别为 26%、15.6% 和 22.2% ($P < 0.05$)(图 2)。

结合 mNSS 评分及 TTC 染色结果,实验组的模型成功率为 100%,对照组的模型成功率为 62.5%,两组之间有显著的统计学差异($P < 0.05$)。

3 讨论

大鼠 MCAO 模型是神经科学领域研究脑梗死

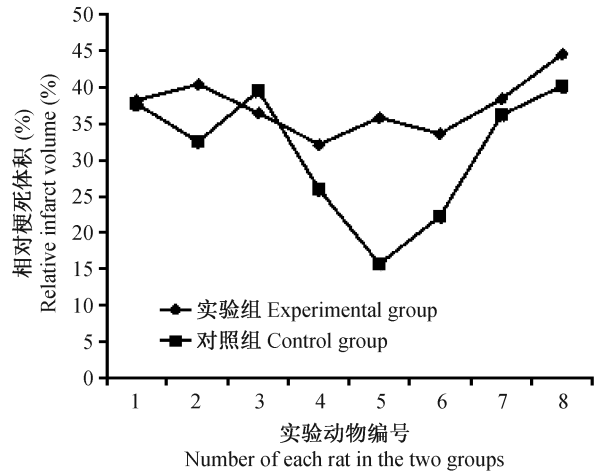


图 2 两组大鼠模型后 24 h 脑梗死体积

Fig. 2 The infarct volume of each rat in the two groups at 24 h after MCAO

的常用模型之一,其最大的优点是制作方便,操作熟练者制作一只模型的平均时间是 20 min。栓线头端放置是否准确是 MCAO 模型成功与否的重要因素,操作者可以通过感觉栓线头端到达 ICA 分叉处时遇到轻微阻力来判断栓线放置是否成功。但是这个模型存在一个显著的缺点,就是栓线头端的放置是一个盲插过程,完全依赖于操作者的经验和熟练程度。初学者遇到的主要问题有两个:首先,栓线放置深度不够。栓线头端进入翼腭动脉(pterygopalatine artery, PA),这种情况对新手最为常见,此时栓线进入深度约为 0.8 cm,遇到阻力;另外,若栓线头端通过 PA,栓线可以轻松到达 ICA 入颅处,插入深度约 1.3 cm,此处 ICA 有转折,栓线偶尔会遇到阻力。以上情况均可能被误判为栓线放置成功;其次,栓线放置过深。因 ICA 颅内段走行较直,栓线多无阻力,当栓线头端到达颅内颈内动脉分叉处时,会遇到轻微阻力,但对于新手来说,这种轻微阻力不出现或者很难把控,倘若栓线继续向前则进入大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)或者大脑前动脉(anterior cerebral artery, ACA),因为 MCA 是颅内 ICA 的直接延伸,故以进入 MCA 多见,导致栓线放置过深,插入深度约为 2.2 cm。栓线深度不够,对侧血流通过大脑底部 Willis 环会对右侧大脑进行供血,大鼠无偏瘫症状和脑梗死出现,模型失败;栓线放置过深,进入 MCA,大鼠虽出现典型偏瘫症状,但其模型后 48 h 的存活率很低,大部分大鼠会在模型后 48 h 内死亡,脑梗死范围过大和急性期脑水肿过于强烈是栓线插入过深后大鼠死亡的主要原因^[5]。

可见,制作大鼠 MCAO 模型的经验性判断往往导致模型不稳定、均一性差,有的模型无症状,mNSS 评分很低;有的模型症状很重,mNSS 评分过高,短时间内死亡率高;研究者需要挑选 mNSS 评分适中的纳入后续实验。这虽然在一定程度上提高了模型的均一性,但仍然不够精准,另外会废弃相当一部分大鼠,导致浪费。所以,如何使模型症状明显但又不至于过多死亡是制作 MCAO 模型的瓶颈所在。

为解决这一问题,我们尝试使用激光多普勒血流监测技术提高大鼠 MCAO 模型的稳定性和均一性。我们把脑血流下降至基础值的 30% 认定为模型制作成功^[6],插入深度为 1.8 cm 左右。当栓线放置深度不够时,脑血流不下降或者轻度下降,提示操作者即使遇到阻力也不能误认为模型制作已结束,必须通过手法调整栓线方向,将栓线头端继续向深处放置;当栓线头端放置过深进入 MCA 时,脑血流往往急促下降至基础值的 30% 以下,提示操作者即使未遇到阻力也应停止继续向深处放置,而应该适当退出栓线。本实验的两组大鼠均由同一位操作熟练者完成,结果提示即使操作者经验丰富,完全由经验判断的对照组的模型成功率为 62.5%,这和我们既往的工作相符。当我们使用激光多普勒血流监测技术后,可以将实验组的模型成功率提高至 100%,显著提高大鼠 MCAO 模型的稳定性和均一性,并且使得实验大鼠得到了充分利用。

由此可见,我们推荐激光多普勒血流监测技术用于大鼠 MCAO 模型的制作。但是,目前可能阻碍其推广的原因有两个:首先,激光多普勒血流监测设

备和微小探头相对昂贵;其次,模型制作过程相对繁琐,模型制作时间明显延长。我们在熟练情况下制作大鼠 MCAO 模型的平均时间为 20 min,使用激光多普勒血流监测技术后,平均时间延长至 70 min,时间主要消耗在激光多普勒探头的放置和血流监测的调试上面。但是,对于我们追求精益求精的大鼠 MCAO 模型及珍惜实验大鼠而言,设备的配置和单只模型制作时间的相对延长是完全值得的。

参 考 文 献

- [1] Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(13): 1317-1329.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral-artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [3] Bao XJ, Wei JJ, Feng M, et al. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2011, 1367: 103-113.
- [4] 赵浩,李永宁,王任直,等.大鼠局灶性脑缺血模型的有效制备[J].*中国实验动物学报*,2009,17(6):432-436.
- [5] 包新杰,王任直,赵浩,等.线栓法插线深度对大鼠脑梗死模型制备的影响[J].*中国实验动物学报*,2011,19(3):68-71.
- [6] Bao XJ, Feng M, Wei JJ, et al. Transplantation of Flk-1⁺ human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats [J]. *Eur J Neurosci*. 2011, 34(1): 87-98.

[收稿日期] 2016-01-18