



颈总动脉穿刺法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型

刘华^{1,2}, 刘月美³, 关芮^{1,2}, 徐昭⁴, 朱文增¹

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100032; 2. 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 100029;
3. 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875; 4. 北京中医药大学东直门医院东区, 北京 101121)

【摘要】 目的 对颈总动脉穿刺法及传统线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型的时效性、成功率、死亡率比较。方法 将32只雄性大鼠随机分为颈总动脉穿刺法组与传统线栓法组, 将线栓从颈总动脉插入, 栓塞大脑中动脉。采用Bederson神经功能评分标准, 于术后24 h进行神经功能评分, 并统计24 h成功率及死亡率。结果 颈总动脉穿刺法和传统手术方法制备大鼠MCAO模型的插线栓时间、成功率、死亡率分别为(82.3 ± 17.4) s和(164.6 ± 22.0) s, 差异有显著性($P < 0.01$); 87.5%和68.75%, 差异无显著性($P > 0.05$); 6.25%和18.75%, 差异无显著性($P > 0.05$)。结论 颈总动脉穿刺法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型简单省时, 创伤小, 可操作性强。

【关键词】 脑缺血; 大脑中动脉栓塞; 线栓法; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0399-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.012

A modified method for common carotid artery puncture in the establishment of a rat model of middle cerebral artery occlusion

LIU Hua^{1,2}, LIU Yue-mei³, GUAN Rui^{1,2}, XU Zhao⁴, ZHU Wen-zeng¹

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100032, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 3. Beijing Normal University, Beijing 100875;
4. Dongzhimen Hospital Eastern District, Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 101121)

【Abstract】 Objective To compare the timeliness, success and mortality rates between the modified carotid artery puncture method (MCAPM) and standard suture method (SSM) in the establishment of rat model of a middle cerebral artery occlusion (MCAO). **Methods** Thirty-two male rats were randomly and equally assigned into MCAPM group and SSM group. The MCAO models were established by inserting a thread into the common carotid artery (CCA). 24 h after modeling, the rats of the two groups were evaluated with Bederson neurological scores, and the modeling success rate and mortality rate were analyzed. **Results** The suture insertion times, success rates and mortality rates of the MCAPM vs. SSM groups were (82.3 ± 17.4) s versus (164.6 ± 22.0) s ($P < 0.01$), 87.5% versus 68.75% ($P > 0.05$), and 6.25% versus 18.75% ($P > 0.05$). **Conclusions** MCAPM can be used to establish the rat model of MCAO due to its simplicity, mild wound and feasibility.

【Key words】 Cerebral ischemia; Middle cerebral artery occlusion, MCAO; Standard suture method; Rat

Corresponding author: ZHU Wen-zen. E-mail: zhuwenzeng530@163.com

大鼠颅内血管结构与人类接近, 实验条件容易
标准化, 价格较低, 饲养方便, 是目前脑缺血研究常

用的动物。因雌激素能降低大鼠脑梗塞的发生率和
死亡率^[1], 对大鼠脑缺血损伤后神经细胞有保护作

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273841)。

[作者简介] 刘华(1991年-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医学专业。E-mail: liuhua@bucm.edu.cn

[通讯作者] 朱文增, 博士后, 主任医师。E-mail: zhuwenzeng530@163.com

用^[2],扩张血管、增加脑血流量^[3],减轻脑损伤^[4],具有明显的脑保护作用^[5],故选择雄性大鼠作为实验对象。制备 MCAO 模型方法有线栓法^[6]、开颅电凝法^[7]、血栓栓塞法^[8]、光化学诱导法^[9]、颅脑开窗法^[10]等多种,线栓法制备 MCAO 模型具有不开颅、手术时间短、损伤小、稳定性和可行性高等特点,且可控制缺血与再灌注的时间,是国内外常用的方法^[11]。1986 年 Koizumi^[6]首先报道了利用线栓法制备 MCAO/R 模型,随后 Zea Longa^[12]于 1989 年在此方法上进行改进,成为了现今较为广泛应用的方法。本实验通过对 2 种不同手术方法的比较分析,成功的使用了穿刺法制作了大鼠 MCAO 模型。现将制作该模型的方法及经验介绍如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性成年 SD 大鼠 32 只,周龄 7~8 周,体重 250~280 g,来源于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001]。饲养及手术于首都医科大学实验动物部 SPF 级屏障环境[SYXK(京)2010-0020]。按照随机数字表法分为颈总动脉穿刺法组 A(16 只)与传统线栓法组 B(16 只)。

1.2 主要实验器材

2636-4A 号线栓(北京沙东生物技术有限公司提供),6 号注射器针头,自制鼠板,自制拉钩。

1.3 实验试剂

水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司提供)、碘伏、75%乙醇。

1.4 手术方法

术前大鼠禁食不禁水 24 h^[13],手术当日用生理盐水现配 10% 水合氯醛,大鼠称重后按 0.35 mg/100 g 腹腔注射麻醉,待其完全麻醉后仰卧位将四肢及头部固定于鼠板,充分暴露下颌角至胸骨之间的颈部区域,备皮,分别应用不同的手术方法制备 MCAO 模型。A 组手术方法:用碘伏将颈部正中线及周围消毒后用 75% 乙醇脱碘两次,用 11 号手术刀沿颈部正中线切开长约 1.5 cm 的切口。用弯头眼科镊钝性分离皮下组织、腺体,钝性分离颈部肌肉,用自制拉钩将右侧胸骨舌骨肌、胸锁乳突肌拉向右侧,充分暴露出右侧颈总动脉鞘。使用玻璃分针分离右侧颈总动脉鞘及迷走神经,游离出 CCA。调整自制拉钩的位置,使右侧颈部的肌肉拉向右上方,

充分暴露 CCA 远心端,继续使用玻璃分针向远心端方向分离 CCA 直至颈内动脉(ICA)与颈外动脉(ECA)分叉处。使用 4-0 手术缝合线结扎右侧 CCA 及 ECA 近心端,并预留一段牵引线。在 CCA 远心端靠近 ICA 与 ECA 分叉处套一个活结备用,用血管夹暂时夹闭 ICA 以阻断血流。右手拇指、中指持预先放入栓线并消毒的 6 号注射器针头,左手持 CCA 近心端的牵引线并轻微向近心端方向牵拉,以 CCA 绷直为度。将针尖斜切面朝上向 CCA 远心端方向刺入。针尖斜切面完全进入 CCA 后,用右手食指向 CCA 内推动线栓,通过分叉处的活结,直至血管夹处。左手松开 CCA 近心端的牵引线并持眼科镊夹住线栓及血管,右手轻轻向后退针头。收紧 CCA 远心端的活结但不扎死,松开血管夹,慢慢将线栓推入 ICA,线栓进入分叉处(18 ± 1) mm^[14],线栓头部传来轻微的抵抗感,即说明线栓头部进入大脑中动脉(MCA),阻断血流。扎死 CCA 远心端的活结,剪去多余的线栓尾部、线头,也可保留线栓尾部于体外,待一定时间后向后拉出一段线栓造成再灌注模型。松开拉钩,生理盐水冲洗手术区域后用 3-0 缝合线以单纯连续缝合法缝合切口,酒精消毒,手术完成。将大鼠以头高脚低位仰卧放置于鼠笼中,待其清醒。B 组手术方法:参照 Zea Longa^[12]的方法并稍加改变,手术过程如下:分离结扎血管步骤同上,用眼科剪在 CCA 上剪一斜形开口并插入线栓,余步骤与 A 组手术方法相同。

1.5 神经功能评分

参照 Bederson 神经功能评分标准^[15],0 分无神经功能缺损症状;1 分不能完全伸展左前肢(提尾悬空实验阳性);2 分左肩部侧推抵抗力下降(侧向推力实验阳性),伴左前肢屈曲;3 分左肩部侧推抵抗力下降,伴自发性旋转(自由活动向左侧划圈);4 分不能自发行走,伴有意识丧失。

1.6 数据处理和统计分析

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 20 统计软件进行数据统计分析,采用独立样本 *t* 检验、Fisher 的精确检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

两组插线栓时间、成功率、存活率比较:动物术后 24 h 内存活,且神经功能评分 1 分以上为手术成功。A、B 两组平均插线栓时间分别为(82.3 ± 17.4) s、(164.6 ± 22.0) s,差异有显著性($P < 0.01$)。表 1 为

两组手术成功率和死亡率的情况。结果表明, A 组成功率高于 B 组, 差异无显著性 ($P > 0.05$); A 组死亡率

率低于 B 组, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 两组手术成功率和死亡率比较 ($n = 16$)

Tab. 1 Comparison of the success and mortality rates of operation in the 2 groups

组别 Groups	成功数/只 Cases of success	死亡数/只 Cases of death	成功率/% Success rate	死亡率/% Mortality rate
颈总动脉穿刺法组 A MCAPM group A	14	1	87.5	6.25
传统线栓法组 B SSM group B	11	3	68.75	18.75

3 讨论

3.1 器材

采用自制拉钩及鼠板, 比市售商品廉价实用, 且可以在充分暴露术野的前提下尽量减小伤口, 对大鼠刺激减小, 节约手术时间, 降低感染风险。

3.2 麻醉

水合氯醛溶液不稳定, 久置、光照、高温均可促进其分解, 需现配现用, 否则易引起大鼠死亡; 术前禁食不禁水 24 h, 否则食物影响体重易导致水合氯醛给药不精确造成死亡; 腹腔注射时针头进入大鼠腹腔后需注意将针头退出些许, 防止麻醉药注入肠腔造成麻醉不足及术后肠梗阻。

3.3 吸痰

水合氯醛麻醉会造成呼吸道分泌物增多, 易导致大鼠窒息而死, 固定大鼠后将大鼠舌头拉向一侧, 术中需随时关注大鼠呼吸状态, 呼吸道分泌物增多时可用注射器吸痰。

3.4 备皮

尽量备皮干净且不伤到皮肤, 严格执行外科手术消毒标准, 降低术后感染的风险。

3.5 分离

分离颈动脉鞘及迷走神经时尽量采用玻璃分针, 减少对迷走神经的刺激。

3.6 结扎

结扎血管、动脉夹夹闭 ICA 时需远离颈动脉窦及迷走神经节, 防止大鼠猝死, 且建议都结扎准备完毕最后再用血管夹夹闭 ICA, 减少金属刺激血管及迷走神经节的时间。结扎完血管后线头保留适当长度, 当线栓进入血管后在入颅部分难以推进时, 可以充当牵引线, 适当调整血管及线栓角度, 可提高成功率。

3.7 线栓

根据大鼠的体重选择合适的线栓。最初线栓多是实验人员以鱼线为原材料自己手工烧制而成, 线

栓品质不稳定, 现在多采购机械化生产的成品线栓, 保证线栓的稳定性; 朱继^[16]等研究发现, 通过将线栓预设为弧形, 与 ICA 走行一致, 通过调整推送线栓角度而不会进入翼腭动脉 (PPA), 避免对 PPA 的结扎操作, 减小刺激, 提高成功率。课题组通过多次实验发现, 线栓凹面向内向上弯曲时更易进入 ICA。

3.8 手法

穿刺时尽量将针头与 CCA 保持平行, 以免刺穿血管, 且穿刺孔尽量靠近 CCA 近心端, 以防一次穿刺不成功找不到针眼, 可以继续向远心端寻找穿刺点。如若多次调整血管及线栓角度仍未成功, 建议退出线栓并用血管夹夹闭 ICA, 更换不同弧度的线栓再次尝试插入, 可大大提高成功率。切不可蛮力硬插入线栓, 否则易导致脑出血。退出针头前需用眼科镊夹住固定线栓及血管, 防止在退出针头时将线栓也一并退出血管。

3.9 深度

线栓插入约 16 mm 时应当放开牵引线, 放松血管至正常生理形态, 然后缓慢推进线栓, 至手下有轻微抵抗感即可, 此时插入深度约 (18 ± 1) mm^[14]。若牵拉血管会导致血管正常形态改变, 线栓插入成功后放松血管会导致其位置改变, 影响梗塞效果。

3.10 其他方法

本课题组成员在实验初期尝试不分离颈动脉鞘及迷走神经直接结扎血管插入线栓, 以期减小对血管及神经的刺激, 同时缩短手术时间。但通过多次预实验发现, 当一次插入线栓不成功时, 血管塌陷, 很难区分颈动脉鞘及血管, 难以再次插入线栓; 且插入后因颈动脉鞘遮挡, 难以看清线栓上的标记, 难以准确掌握线栓插入的深度, 失败率较高, 故未采用。亦尝试过按照备皮、分离、插线栓、缝合四个步骤多人流水作业方法, 每个成员负责自己最擅长的部分, 大大节省造模时间。但是当大批量造模时, 人和机器不同, 疲倦现象严重, 不利于长时间造模手术的进行。

3.11 B 组劣势

采用 B 组手术插线栓方法时,模型成功率较低,且死亡率较高。本课题组成员讨论后认为可能原因如下:(1)用眼科剪剪开的斜形开口,在插入线栓时开口部分容易被拽断,改变了血管原有的生理形态,所以难以将线栓送入颅内。(2)即使勉强将线栓送入颅内,也因血管断开,其生理形态改变而不确定线栓插入的深度,故模型的稳定性及成功率较低。(3)手术时间较长,且反复推送线栓不得进入,对血管壁有刺激,术中出血量增多,易引起大鼠死亡。(4)反复推送线栓易导致血管壁被刺穿,造成脑出血。

3.12 不足与展望

本方法满足再灌注的需求,但因后续实验需要永久性脑梗塞模型,故未做再灌注模型的成功率及存活率的统计。其次,因样本量小,可能对数据会有误差,对手术成功率及存活率的意义,有待进一步大数据实验分析。最后,因后续实验对大鼠治疗,故未计算梗死体积变异系数,模型稳定性未知,有待进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Simpkins J W, Rajakumar G, Zhang Y, et al. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat [J]. *J Neurosurg*, 1997, 87 (5): 724 - 730.
- [2] Sudo S, Wen T C, Desaki J, et al. Beta-estradiol protects hippocampal CA1 neurons against transient forebrain ischemia in gerbil [J]. *Neurosci Res*, 1997, 29(4): 345 - 354.
- [3] Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, et al. Gender-linked brain injury in experimental stroke [J]. *Stroke*, 1998, 29(1): 159 - 165, 166.
- [4] Shi J, Bui J D, Yang S H, et al. Estrogens decrease reperfusion-associated cortical ischemic damage: an MRI analysis in a transient focal ischemia model [J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 987 - 992.
- [5] Toung T J, Traystman R J, Hurn P D. Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats [J]. *Stroke*, 1998, 29(8): 1666 - 1670.
- [6] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemia brain edema; a new experiment model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemia area [J]. *Stroke*, 1986, 8(1): 1 - 8.
- [7] Kanemitsu H, Nakagomi T, Tamura A, et al. Differences in the extent of primary ischemic damage between middle cerebral artery coagulation and intraluminal occlusion models [J]. *J Cerebral Blood Flow & Metab*, 2002, 22(10): 1196 - 1204.
- [8] Hill N C, Millikan C H, Wakim K G, et al. Studies in cerebrovascular disease. VII. Experimental production of cerebral infarction by intracarotid injection of homologous blood clot; preliminary report [J]. *Proc Staff Meet Mayo Clin*, 1955, 30(26): 625 - 633.
- [9] Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, et al. Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats [J]. *Stroke*, 1993, 24(2): 286 - 292.
- [10] Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, et al. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats [J]. *Stroke*, 1982, 13(4): 505 - 508.
- [11] Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, et al. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(9): 1655 - 1658.
- [12] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84 - 91.
- [13] 贾淑伟, 夏青. 线栓法建立局灶性脑缺血模型的方法与探讨 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(24): 33 - 35.
- [14] 张成英, 陈传好, 邵正仁, 等. 大鼠颈内动脉的解剖及其在脑缺血模型中的应用 [J]. *解剖学杂志*, 2002, 25(6): 581 - 583.
- [15] Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats [J]. *Stroke*, 1986, 17(6): 1304 - 1308.
- [16] 朱继, 万东, 唐文渊. 改良线栓法制备大鼠局灶脑缺血模型 [J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(08): 685 - 687.

[收稿日期] 2016-01-19