

线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型 手术操作的研究进展

石将通¹, 赵 忠¹, 蒙息标¹, 田顺亮²

(1. 广西桂林医学院临床医学院, 桂林 541001; 2. 广西桂林医学院人体解剖学教研室, 桂林 541004)

【摘要】 线栓法大鼠大脑中动脉阻塞模型被普遍认为是标准的大鼠局灶性脑缺血动物模型。该模型在制备过程中, 易受到多重因素的影响, 其中手术操作对模型的成功制作起着关键作用。文章从大鼠颈部主要动脉的解剖位置、手术切口位置的选择、手术左右侧别的选择, 以及插线位置的选择进行了综述。

【关键词】 大鼠; 线栓法; 脑缺血模型; 大脑中动脉闭塞

【中图分类号】 Q95-336 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 07-0068-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.007.014

Advance on the operation of the suture-occluded method for focal cerebral ischemia model in rats

SHI Jiang-tong¹, ZHAO Zhong¹, MENG Xi-biao¹, TIAN Shun-liang²

(1. Clinical Medical College of Guilin medical university, Guilin 541001, China;

2. Department of Human Anatomy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

【Abstract】 Middle cerebral artery occlusion model with suture-occluded method in rats is widely regarded as the standard animal model of focal cerebral ischemia. In the process of preparation, it is easy to be influenced by multiple factors; among them the successful operation plays a key role. This article summarized from several aspects, such as the anatomic locations of the major arteries in the rat's neck, where to perform the incision, which side to perform the operation and where to insert the suture.

【Key words】 Rat; Suture-occluded method; Cerebral ischemia model; Middle cerebral artery occlusion

缺血性脑血管疾病是威胁人类健康与生存的主要疾病之一, 是中老年人常见病, 具有高发病率、高患病率、高死亡率、高致残率、高复发率的特点, 给患者及其家庭和社会造成巨大的负担。脑缺血动物模型是开展脑缺血损伤和治疗研究的基础, 大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型被公认为标准的局灶性脑梗死动物模

型^[1]。其中线栓法 MCAO 是研究缺血性脑损伤动物模型的首选造模方法^[2]。自 Koizumi 等^[3]于 1986 年首先采用线栓法成功制备大鼠 MCAO 模型以来, 随后不断有研究者对其改良, 但因制模方法的缺陷和不足, 目前操作仍较复杂, 脑梗死区域不稳定, 重复性较差^[4], 尚未形成统一的制模标准。本文拟从线栓法 MCAO 模型手术操作部位的选择以及近年来所做改良进行探讨。

【基金项目】 2013 年广西壮族自治区大学生创新创业训练项目 804。

【作者简介】 石将通 (1991 -), 男, 本科生; 赵忠 (1991 -), 田本科生; 蒙息标 (1990 -), 男, 本科生。

【通讯作者】 田顺亮 (1968 -), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 脑缺血及临床应用解剖学, E-mail: tianshunliang238@163.com。

1 血管的解剖位置

大鼠局灶性脑缺血模型的建立涉及到大鼠的颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉、枕动脉和翼腭动脉等颈部主要血管,因此明确血管的解剖位置是建模手术的关键。相关文献中存在着两种颈部动脉血管分布图,差异主要集中在大鼠颈外动脉和颈内动脉的分布情况上^[5]。有的文献所绘图中,颈内动脉位于颈外动脉的内侧^[6-7],而在有的图中,颈内动脉与颈外动脉的位置恰好相反^[8]。冯珂^[5]在造模过程中发现,颈总动脉在分叉处分为两条直径相当、单纯从形态方面难以区分的动脉。从正面观察,两动脉在颈总动脉分叉处基本呈背腹分布,而非内外分布。经进一步解剖、分离,方可确定在腹侧的动脉是颈外动脉,在背侧的是颈内动脉。汪飞^[9]也提到,在沿颈总动脉向上分离到颈总动脉分叉处时,朝腹侧走行的是颈外动脉,朝背内侧走行的是颈内动脉。张成英^[10]通过灌注后进行显微镜观测,颈外动脉管径为 0.80 ± 0.09 mm,颈内动脉近段管径为 0.71 ± 0.10 mm,颈外动脉与颈内动脉之间的角度为 $28.25^\circ \pm 1.37^\circ$ 。颈外动脉第一分支为枕动脉,行向前外,斜跨颈内动脉近段的腹侧,其管径 0.25 ± 0.04 mm;颈内动脉在鼓泡后缘发出的第一分支为翼腭动脉,其绕至鼓泡外缘穿鼓泡至其前缘经岩鼓裂浅出,主要分布至眼、鼻、口处,翼腭动脉管径为 0.52 ± 0.05 mm,其起始处距颈内动脉起始处距离为 3.61 ± 0.41 mm,与颈内动脉之间的角度为 $66.9^\circ \pm 1.65^\circ$ ^[10]。颈内动脉和颈外动脉,及其分支翼腭动脉和枕动脉的位置、走行等解剖学资料仍存在不确定性或缺,这会导致 MCAO 造模时间延长,出血增多,对大鼠的伤害增大,甚至建模失败。因而,有必要对大鼠颈部主要动脉血管的位置、走行进行进一步的研究。

2 大鼠颈部手术切口位置的选择

颈部手术切口主要有颈部正中切口和颈部旁侧切口两种。1986 年 Koizumi 等^[3]首次提出线栓法制造脑缺血模型时采用的即是颈部正中切口,后续文献^[11-15]报道的多数学者亦采用此法,颈部正中切口逐步成为经典的手术入路。颈部正中切口比较直观,但是正中切口需要经过颌下腺、颈部淋巴结,分离胸骨舌骨肌、肩胛舌骨肌、胸乳突肌、锁乳突肌、二腹肌等肌肉,分离和保护气管、迷走神

经、交感神经和舌咽神经丛等,该方法具有一定的手术风险和难度,对操作人员有较高的要求^[16]。而颈部旁侧入路的优势在于^[17-19]:手术视野暴露较充分;易于分离肌肉和血管,特别是深在的翼腭动脉;出血少;对气管刺激性小,不需要辅助呼吸,从而降低了手术难度和动物死亡率。冯珂等^[5]在实验中分别采用两种位置切口造模,比较之后亦认为:颈部旁侧切口更适合建模的要求。但颈部旁侧切口的具体位置目前尚无统一标准,有的在颈正中线偏右约 $0.2 \sim 0.3$ cm 处^[19-20];有的在颈正中线偏右约 0.5 cm^[21]。汪飞^[9]认为在采用颈部旁侧手术入路时,切口在中间稍偏外侧 0.5 cm $\sim$ 1.0 cm 即可,此时切口线正好在颈阔肌和胸锁乳突肌间隙处,如太靠外侧会给分离肌肉带来难度。

3 左右侧别的选择

大鼠 MCAO 模型侧别的选择目前尚未形成统一的共识,左右侧别都有人选择^[22-26]。但在文献报道中,以右侧手术居多。由于大鼠左、右侧大脑半球的解剖和生理功能不对称,大鼠左、右侧 MCAO 后会造成皮质和蓝斑内的去甲肾上腺素和黑质内的多巴胺水平变化不一样,导致左、右半球脑缺血后行为和生化改变不一致,若选择左侧动脉,危险系数比较大^[27]。由于大鼠左侧迷走神经直接分布于心脏,在对大鼠进行颈部手术操作时会对颈部迷走神经造成损伤,对心脏功能产生较大影响,容易造成血压的波动。而选择右侧可以减少脑外影响因素,有助于保持呼吸、体温及血压等全身状况的平稳^[17]。手术操作时,要根据研究的目的确定栓塞的侧别,而不能随意选择一侧;若出于尽量减少脑外影响因素的考虑,建议做急性大鼠脑缺血实验时,尽量选择右侧大脑中动脉栓塞^[28]。但有实验发现左、右侧手术入路模型并无明显区别,对模型制备的成功率也没有太大影响^[5,29]。

4 线栓插入位置的选择

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(middle cerebral artery, MCA)起始处,正确选择插线位置以便线栓能准确到达 MCA 起始部的同时尽可能减少对血管的损伤是十分重要的。线栓的插入主要有两种方法:一种是采用颈外动脉切口,将线栓由颈外动脉插入,插入后向下轻按颈外动脉使之与颈内动脉成近似直线,顺颈外动

脉走向经颈总动脉分叉处进入颈内动脉进而前行阻断 MCA;另一种是从颈总动脉插线,经颈内动脉到达 MCA 起始部。

从颈外动脉插线有两个好处^[30]:一方面是线栓如果误入颈内动脉的分支翼腭动脉,可通过调整颈外动脉残端而更利于线栓深入到颈内动脉直至大脑前动脉;另一方面大脑供血的主要动脉为颈总动脉,如果从颈总动脉剪口,复灌时无法松开颈总动脉,即无法实现充分再灌注。颈外插入线栓可保留颈总动脉的完整性,再灌注时将线栓抽出后只需扎紧颈外动脉残端,即可打开颈总动脉而实现充分复灌,这也更符合临床病理特征。但经颈外动脉插线也有不足之处:剪断颈外动脉对实验动物的损伤太大,若不剪断而只游离颈外动脉,则由于该动脉与颈内动脉之间的角度太小($28.25^{\circ} \pm 1.37^{\circ}$),线栓不易进入颈内动脉,而且颈外动脉比较细,眼科剪很难把握,易把动脉剪断且不能有效控制出血量,再灌注取出栓线时由于心脏压力较大,较容易造成脑内出血导致动物死亡;而且经颈外动脉插线,到达大脑中动脉的距离较长,相应地插入线栓的时间较长^[10];此法操作难度较大,需要有一定经验^[31]。

颈总动脉插线法的特点是操作简单,比较容易掌握,插入线栓比较顺利,成功率较高^[9]。采用从颈总动脉插入线栓,不分离和夹闭颈内动脉,也不结扎翼腭动脉,对血管的机械刺激仅限于颈总动脉,对生理结构的损伤小。结果显示有恒定的梗死灶形成,重复性好,难度小,手术易施行^[32]。从解剖学角度来说,颈内动脉相当于颈总动脉的直接延续,所以线栓走行路径顺畅,插线多能顺利进行。实验中将颈总动脉永久结扎,这就更保证了大鼠的脑缺血;而双侧颈外动脉之间的广泛吻合,能保证再灌注的进行^[33]。但有人认为该方法将导致持久的同侧颈总动脉阻塞,限制再灌注血流^[5];颈总动脉末端附近有颈动脉窦和颈动脉小球,操作不慎,容易引起实验动物血压升高和呼吸异常^[34]。

除了从颈总动脉插线和颈外动脉插线两种方法之外,张成英等^[10]采用 20 只经墨汁乳胶混合液灌注的大鼠脑标本,对颈内、外动脉的形态分布,颈内动脉与颈外动脉之间以及颈内动脉与其第一分支之间的角度进行显微观察和测量,认为翼腭动脉起始处是线栓法经颈内动脉制作大鼠大脑中动脉区脑缺血模型的最佳插线部位,它定位准确、简便易行、创伤小,能够极大提高模型制作的成功率。

近年来,研究者不断地就线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型的改良方案进行探索,尽管制模的成功率有所提升,但仍难以形成统一的制模标准。目前研究多着力于制模方法及其手术操作的探索,而对大鼠颈部与制模相关的血管及其周围伴行神经的基础研究尚有不足,手术中对血管、神经的损伤是制模失败的一个重要原因。因此,有必要对大鼠颈部相关血管及其周围神经进行进一步的研究观测,以减少对大鼠的损伤,提高线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型的成功率。

参考文献:

- [1] Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007, 87(1): 179-197.
- [2] 王桥生,符晖,曾红科. 线栓法大鼠局灶性脑缺血模型的改进与评价[J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(5): 291-294.
- [3] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *Stroke*, 1986, 16(8): 1-8.
- [4] 李晶,郭利平. 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型的研究进展[J]. *天津中医药大学学报*, 2008, 27(1): 54-56.
- [5] 冯珂,纪立金. 线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞模型的体会[J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(1): 21-23.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [7] 顾振,韩群颖,苏殿三,等. 大鼠短暂性局灶性脑缺血模型改进的制作方法[J]. *南京医科大学学报*, 2001, 21(6): 513-514.
- [8] 蒋海山,陆兵勋,姬仲,等. 线栓法大鼠缺血/再灌注脑损伤模型的改良[J]. *第一军医大学学报*, 2004, 24(10): 1156-1159.
- [9] 汪飞,储照虎,赵守才. 线栓法大鼠大脑中动脉闭塞模型的制备[J]. *基层医学论坛*, 2011, 15(1): 14-17.
- [10] 张成英,赵旭东. 栓线法制作大鼠局灶性脑缺血模型插线部位的选择[J]. *四川解剖学杂志*, 2004, 12(2): 110.
- [11] 张小冲,赵浩,马建华,等. 线栓法大鼠 MCAO 模型的实验研究[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(6): 55-58.
- [12] 王晓丽,王玲. 局灶性脑缺血对大鼠胃黏膜屏障功能的影响[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2013, 47(6): 205-208.
- [13] 许贤平,易飞,杨晓苏,等. 大鼠局灶性脑缺血后 LMO4 和 pCREB 的表达[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 30(6): 497-499.
- [14] 王荣亮,刘小蒙,张营,等. 大鼠局灶性脑缺血后神经功能评分与脑梗死体积相关性分析[J]. *首都医科大学学报*, 2013, 34(2): 69-74.

- [15] Jingyu Zhang, Zhigang Yu, Zhiqiang Yu, *et al.* rAAV-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor promotes neurite outgrowth and protects neurodegeneration in focal ischemic model [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011, 4(5):496–504.
- [16] 张莹,舒兆瑞,沈梅红. 线栓法制备脑缺血再灌注的影响因素及探讨[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 12(12):80–83.
- [17] 陈春富,李劲松. 栓线法大鼠局灶性脑缺血模型的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1996, 13(1):18–19.
- [18] 刘运泉,戴颖. 线栓法大鼠局灶性脑缺血模型的改进[J]. 中国临床解剖学杂志, 2005, 23(2):222–223.
- [19] 王张,张艺,赵启鹏,等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的动态变化[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(3):116–119.
- [20] 吴培要,王静,谢丽芬,等. 线栓大鼠大脑中动脉缺血模型制作方法的改进[J]. 贵阳医学院学报, 2009, 1(2):108–110.
- [21] 马贤德,孙宏伟,柴纪严,等. 线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型的方法研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 6(6):1200–1201.
- [22] 崔景军,何娇君,李晶,等. 大鼠大脑中动脉梗死模型的评价标准探讨[J]. 天津中医药, 2013, 30(1):33–35.
- [23] 王柳清,邵蓓,林真珍,等. 大鼠大脑中动脉近端及远端阻塞脑缺血模型的脑梗死体积和行为学差异比较[J]. 中国临床神经学, 2013, 21(3):259–263.
- [24] 王振华,刘云会,马腾,等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注早期血脑屏障通透性变化的研究[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(12):1073–1076.
- [25] Robinson RG. Differential behavioral and biochemical effects of Right and left hemispheric cerebral infarction in rat [J]. *Science*, 1979, 205(4407):707–710.
- [26] Eun – Ah Bae, Yang-Jin Hyun, Min-kyung Choo, *et al.* Protetive Effect of Fermented Red Ginseng on a Transient Focal Ischemic Rats [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(5):1136–1140.
- [27] Ganta Vijay Chaitanya, Hanithi Prakash Babu. Activation of Calpain, Cathepsin-b and Caspase – 3 during Transient Focal Cerebral Ischemia in Rat Model [J]. *Neurochem Res*, 2008, 33(3):2178–2186.
- [28] 高焕民. 大鼠脑的优势半球与脑缺血模型例别的选择[J]. 医学综述, 2002, 8(1):95.
- [29] 吴晓毅,陈华德. 线栓法大鼠局灶性脑缺血模型的研究[J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2006, 3(1):40–43.
- [30] 陈岚,曹良勋,钱貽菰,等. 缺血再灌注时间对小鼠大脑中动脉闭塞模型的影响[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(11):1292–1295.
- [31] 赵帅,樊小农,孟智宏,等. 线栓法制备大鼠中动脉缺血闭塞模型研究进展[J]. 江西中医药, 2012, 43(3):77–80.
- [32] 吴松笛,耿晓英,夏峰,等. 改良线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2006, 10(35):1316.
- [33] 杨德兵,马存根,尉杰忠. 脑缺血 – 再灌注动物模型的改良与评价[J]. 中国医药指南, 2011, 9(5):6–7.
- [34] 王棕可,胡跃强. 大鼠脑缺血再灌注模型改良的探讨[J]. 中国中医急症, 2011, 20(8):1286–1287.

[修回日期]