

· 论 著 ·

线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良

廖维靖 刘淑红 范明 杨万同 杨运煌 刘买利

【摘 要】 目的 提供改良的制作大鼠局部缺血性脑损伤模型的方法。方法 雄性 Wistar 大鼠 44 只, 体重 160 ~ 180 g, 随机分为空白对照组 ($n=6$)、假手术组 ($n=15$)、缺血损伤再灌注组 ($n=23$), 35 只用于脑的大体和组织学研究, 9 只用于核磁共振 T_2 WI 成像研究。颈部正中切口, 采用从颈内动脉插入线栓的造模方法, 用 5/0 尼龙线栓造成大脑中动脉血供阻断 (MCAO) 2 h。缺血损伤再灌注组的再灌时间点为 1 d ($n=8$)、2 d ($n=5$)、3 d ($n=5$)、7 d ($n=5$)。采用大体和组织学观察方法, 研究脑组织梗死灶及血管的变化。采用核磁共振 T_2 WI 成像技术, 检测大脑高信号强度区信号的变化。结果 空白对照组、假手术组未见梗死灶, 缺血损伤再灌注组有梗死灶的形成, 7 d 时的梗死灶体积为 $(118.65 \pm 43.61) \text{ mm}^3$ 。结论 改良的线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的方法稳定可靠, 手术过程简化, 容易操作。

【关键词】 缺血性脑损伤; 核磁共振成像; 大鼠

Modification of the preparation of models of focal ischemic brain injury with suture occlusion in rats LIAO Weijing*, LIU Shuhong, FAN Ming, YANG Wantong, YANG Yunhuang, LIU Maili. * Department of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】 Objective To develop a simple, relatively noninvasive model of focal ischemic brain injury in rats. Methods Forty-four male Wistar rats with an average body weight of $170 \pm 10 \text{ g}$ (mean $\pm$ SD) were used, and were randomly divided into three groups: group A rats ($n=6$) underwent no operation, group B rats ($n=15$) underwent sham operation, group C rats ($n=23$) underwent an operation of ischemic brain injury, in which the occlusion of right middle cerebral artery was induced by 5/0 nylon suture for 2 hours. The time points of reperfusion for group C rats were 1 day ($n=8$), 2 days ($n=5$), 3 days ($n=5$) and 7 days ($n=5$). The infarct volume and vascular changes in brains of group C rats were observed by gross anatomy and histology, and the changes of high signal intensity zones were measured by nuclear magnetic resonance T_2 weighted images. Results No infarct zone was found in group A and group B rats, the infarct volume at 7 days after reperfusion in group C rats was $118.65 \pm 43.61 \text{ mm}^3$. Conclusion The reported modified suture occlusion method for preparation of model of ischemic brain injury is reliable, and easier for management.

【Key words】 Ischemic brain injury; Experimental models; Rats

文献介绍了使用线栓阻断大脑中动脉 (middle cerebral artery, MCA) 制作缺血性脑损伤模型的方法, 对动物种类及实验模型、控制实验条件和干扰因素、规范实验方法提出国际认可的标准^[1]。对照标准, 1998 ~ 2001 年在 4 种康复医学类期刊发表的缺血性脑损伤的数篇实验论文中, 线栓的选择及造模的方法差异较大^[2-5]。模型的制作是研究工作的基础, 为提请康复医学专业同行注意尽可能采用国际认可的方法, 我们在前人工作的基础上, 结合在国外实验室学习的技术,

将改良的造模过程及结果进行报道。

材料与方法

一、动物造模

雄性 Wistar 大鼠 44 只, 清洁级, 体重 $(170 \pm 10) \text{ g}$ 。35 只购自军事医学科学院实验动物中心, 用于大体和组织学研究; 9 只购自同济医科大学实验动物中心, 用于在中国科学院武汉物理与数学研究所的核磁共振研究。按 Zea Longa 的线栓造模方法, 我们进行部分改良^[6]。腹腔注射 0.4% 戊巴比妥钠 (剂量为每公斤体重 40 mg), 右腹股沟切口, 暴露股动脉, 插管, 备置待用。颈部正中切口, 长 1.6 ~ 1.9 cm, 暴露右侧颈总动脉 (common cerebral artery, CCA) 和颈外动脉 (ECA), 5/0 丝线结扎颈外动脉。分离与颈总动脉伴行的迷走神经, 在距颈总动脉分叉处近端 0.5 ~ 0.6 cm 处结扎

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970935)、湖北省自然科学基金资助项目 (No. 98J099) 和湖北省科技厅攻关项目 (No. 992P1210)

作者单位: 430071 武汉大学中南医院 (廖维靖、杨万同); 军事医学科学院基础医学研究所 (刘淑红、范明); 中国科学院武汉物理与数学研究所波谱与原子分子物理国家重点实验室 (杨运煌、刘买利)

颈总动脉。在结扎线的远端,置丝线备用。用微小动脉夹夹闭备用线远端的颈总动脉,在备用线的近端用显微手术剪剪一小切口,将黑色 5/0 尼龙线栓送入切口,向上推至动脉夹处,将备用线扎紧,随即松开动脉夹。将线栓沿颈总动脉、颈内动脉顺行向上插入至 MCA 起始部,遇阻力时停止,从颈总动脉分叉处计算插入深度(1.7 ± 0.2) cm,造成大脑中动脉血供阻断(middle cerebral artery occlusion, MCAO)。尼龙线为上海申丁实业有限公司生产,直径 0.15 mm。栓线的头端加热,使之成球形,在解剖显微镜(OLYMPUS SZX9, Japan)下观察,用摄像头(Panasonic Colour Camera, Model WV-CL500/G, Matsushita Communication Industrial Co., Ltd., Japan)拍摄线栓。线栓长度 4 cm。缺血 2 h 后,无需再次麻醉,轻轻抓握动物将栓线后拔退至颈总动脉,即恢复大脑中动脉的血供。造模时室温保持在 $20 \sim 30^{\circ}\text{C}$,使用加热垫使动物的肛温维持在(37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。术后将动物置于放有清洁垫料的饲养盒,自由饮水、进食,必要时用滴管给动物喂水、湿润鼻部和眼部。

二、动物分组

用于大体和组织学研究的动物,随机分为空白对照组($n=3$)、假手术组($n=12$)、缺血损伤再灌注组($n=20$)。空白对照组不作任何处理。假手术组线栓插入的深度为 1 cm,2 h 后拔退至 CCA,每时间点 3 只。缺血损伤再灌注组的再灌时间点为 1 d、2 d、3 d、7 d,每时间点 5 只。用于核磁共振 T_2 WI 成像研究的动物,随机分为空白对照组($n=3$)、假手术组($n=3$)、缺血损伤再灌注组($n=3$)。 T_2 WI 研究动物的再灌时间点为 1 d。

三、血气分析和血糖测定

在 MCAO 前及缺血 2 h 后,分别取股动脉血做血气分析。使用 AVL 血气分析仪(Compact 1 Blood Gas Analyzer, Switzerland),测动脉氧分压、二氧化碳分压、pH 值。使用血糖测定仪(SureStepPlus, USA),在 MCAO 前及缺血 2 h 后测定血糖。

四、脑血流量测定

测定其中 15 只动物的局部脑血流量(regional cerebral blood flow, rCBF),即空白对照组 3 只、假手术组 3 只和缺血损伤再灌注组 9 只。将大鼠固定在立体定向器(上海江湾 I 型)上,暴露右顶骨,剥离骨表面的腱膜,使用便携式牙钻(SAESHIN PRECISION IND. CO., Korea),在 Bregma 点外侧 2 mm、尾侧 3 mm 处钻孔,直径 $2 \sim 3$ mm,仔细磨平骨内板呈透明状,使脑组织表面的硬、软脑膜完整,微循环完好,无脑脊液外漏。通过小孔,血管走行清晰可见。所测的 rCBF 实际是骨、硬脑膜、软脑膜和皮质的循环。采用激光多普勒血

流仪(laser Doppler flowmetry, Perimed Periflux Master 4001, Sweden),rCBF 以仪器显示的灌注单位(perfusion unit, PU)表示。再灌注组在 MCAO 前、MCAO 1 h 中和 MCAO 2 h 后再灌 2 h、4 h 和 1 d、2 d 测定 rCBF。

五、神经功能缺损评分

缺血 2 h 待动物清醒后,按 Bederson 方法进行肢体功能的神经缺损评分^[7]。标准:0 分,无任何神经功能缺失;1 分,左前肢不能伸展;2 分,向左侧行走;3 分,向左侧转圈,成追尾状。缺血损伤再灌注组 23 只动物的神经功能缺损评分 ≥ 32 。

六、组织取材、切片、染色

再灌时间点结束时取材。戊巴比妥钠麻醉,迅速断头、取脑。将脑置于液氮预冷的异戊烷(-20°C)中,组织颜色变白后立即移至 -80°C 冰箱,待用。冰冻切片(-20°C),连续冠状,片厚 20 μm 。每 20 张切片取前 3 张作 HE 染色,其余作免疫组织化学研究。另一处理是将 3 组动物各取 1 例,断头取脑后立即浸入生理盐水,在解剖显微镜下拍摄大体照片。所拍照片进行各时间点的研究,同一时间点进行左、右侧对照研究。

七、图像处理

使用北航医学图像分析管理系统(CMIAS-008 型,北京航空航天大学研制),测定脑梗死面积/体积。先测出每张脑片的梗死面积及整个梗死灶的长度,即计算出梗死体积。

八、核磁共振 T_2 WI 检测

动物麻醉后,俯卧在检查凹槽内,牙杆穿过上下牙齿固定嘴,耳杆固定双耳,使头部固定。用粘胶带固定身体。所有测试均在 Bruker Biospec 4.7/30 核磁共振成像仪上完成。质子共振频率为 200 MHz,采用体线圈发射,表面线圈接收,最大梯度强度为 100 mT/m。成像方法采用多片多回波自旋回波脉冲序列(30、60、90、120、150、180、210、240 ms),1 次完成 8 片成像,视场范围 FOV 为 4 cm $\times$ 4 cm,范围包括大脑和小脑,成像时间 40 min。片厚 1.5 mm,2 片之间的中心距离为 1.8 mm。TR=250 ms,TE=30 ms。图像数据矩阵为 256 $\times$ 256。Xwin-NMR1.0 版处理软件。进行 T_2 WI 检测的时间点是再灌注后 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h 和 24 h。

九、统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 统计软件(6.12 版)进行方差分析。

结 果

一、血气分析和血糖测定

各组的血气分析和血糖测定指标未见显著性差异。

二、脑血流量测定

空白对照组和假手术组的 rCBF 未见显著性差异。缺血 1 h 时, rCBF 降为空白对照组的 20%, 差异呈显著性 ($P < 0.05$), 提示线栓造成 MCA 供血区血流量显著减少。再灌注 2 h、4 h 和 1 d、2 d 则分别为空白对照组的 30%、40% 和 60%、70%, 呈逐渐增加趋势 (表 1)。

表 1 空白对照组、假手术组和缺血损伤再灌注组 rCBF

组 别	MCAO 前	MCAO 1 h	再灌注			
			2 h	4 h	1 d	2 d
空白对照组	105 ± 15					
假手术组	102 ± 10					
缺血损伤再灌注组	96 ± 8	21 ± 6*	30 ± 7	40 ± 5	60 ± 11	70 ± 8

注:与 MCAO 前比较, * $P < 0.05$

三、线栓及线栓头的观察

线栓头在解剖显微镜下观察呈连续、光滑的曲面, 测得直径为 0.21 ~ 0.27 mm (图 1)。



图 1 解剖显微镜下的线栓头 ($\times 16$)

四、大体观察

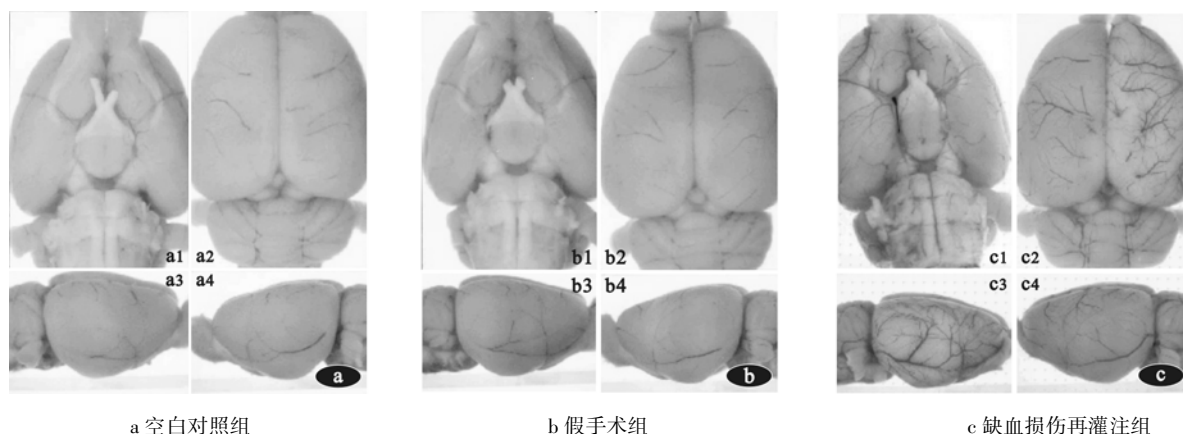
空白对照组和假手术组的大脑外观左右两侧对称, 背侧表面血管呈淡红色, 左右分布大体均一, 血管数量未见明显差异 (图 2a、图 2b)。缺血损伤再灌注组在缺血 2 h 时, 立即取脑, 腹侧可见线栓头位于 MCA 的起始部, 右脑外侧和背侧的血管明显扩张 (图 2c1)。拔线栓后, 腹侧 MCA 起始部近心端线栓到达过的血管呈扩张状。在 1 d、2 d、3 d, 肉眼见右脑组织肿胀明显, 显著不对称, 脑中线移向左侧, 浮游水中呈倾斜状, MCA 供血区组织苍白, 外侧、背侧和腹侧表面血管扩张、密集分布, 解剖镜下血管呈蜘蛛状, 数目明显多于左侧; 7 d 时右脑组织肿胀减轻, 表面轻度萎缩 (图 2c2、图 2c3、图 2c4)。再灌注组各时间点, 左侧脑组织表面血管的数目多于空白对照组和假手术组。

五、组织学观察

空白对照组和假手术组的 HE 染色切片呈红色。缺血损伤再灌注组 HE 染色见正常组织呈红色, 梗死灶呈白色, 两者界限明显, 7 d 时梗死体积为 $(118.65 \pm 43.61) \text{ mm}^3$ 。

六、核磁共振 T₂WI 检测

空白对照组和假手术组大脑双侧对称, 无结构改变。缺血损伤再灌注组 2 h、4 h 和 6 h 时间点, 右脑顶叶、颞叶和外侧尾壳核出现高信号强度区, 与周围正常组织对比明显, 提示存在缺血损伤病灶。8 h 和 10 h 大脑结构明显不对称, 右脑肿胀, 在 24 h 检测见到梗死灶 (图 3)。



a 空白对照组

b 假手术组

c 缺血损伤再灌注组

图 2 空白对照组、假手术组和缺血损伤再灌注组脑组织大体标本

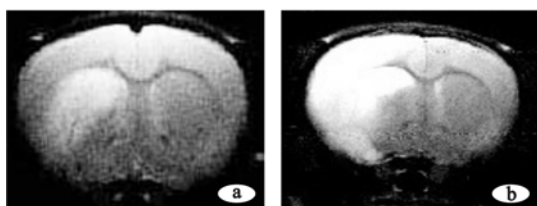


图 3 假手术组(a)、缺血损伤再灌注组(b)脑组织的成像

讨 论

国外学者应用插入线栓阻断大脑中动脉造成缺血性脑损伤的方法后, 其后手术方法有多种改进, 目的是使手术创伤更小, 操作更简单易行^[8]。目前的线栓造模方法, 不外是从颈外动脉插入和从颈总动脉插入 2 种, 再经颈内动脉抵达 MCA。经颈外动脉插入时, 插线

前需短暂夹闭颈内和颈总动脉^[6]。与 Zea Longa 方法不同,本文是从颈总动脉插入,未分离和夹闭颈内动脉,亦不结扎翼腭动脉,结果显示有恒定的梗死灶形成,重复性好。我们对改良的手术方式有如下体会:从颈总动脉插入的方法,难度比从颈外动脉插入要小,手术更易施行,且不刺激气管,不分离颈内动脉,对血管的机械刺激限制在颈总动脉,对生理结构的损伤小。直视下可清晰看见黑色线栓从分叉处进入颈内动脉。

因过程简化,手术创面小,手术时间缩短,完成 1 只动物的造模时间仅为 15 ~ 20 min。只要掌握插入深度,一般不会造成 Willis 环的破裂。

与 2 ~ 5 文献不同的是,本文除进行血气、血糖、rCBF 测定外,还采用核磁共振检测的方法对造模活体进行连续观察分析。对在康复医学期刊上已经发表的文章与国际上认可的文献 6, 8 ~ 10 进行分析比较,差异见表 2。

表 2 线栓造模的文献分析

文 献	大鼠品系、性别、体重	线栓头直径及处理	插入深度	监测指标
引文 2	Wistar, 雄, 250 ~ 300 g	尼龙线, 0.12 ~ 0.14 cm, 无	1.5 ~ 2.0 cm	无
引文 3	Wistar, 未介绍, 180 ~ 250 g	6-0, 未介绍直径, 无	1.75 ~ 1.8 cm	无
引文 4	Wistar, 未介绍, 280 ~ 320 g	未介绍	未介绍	无
引文 5	Wistar, 未介绍, 240 ~ 300 g	未介绍	未介绍	无
引文 6	SD, 雄, 400 ~ 500 g	4-0 尼龙线, 火焰烧制	17 mm	血压, 血气, 血红蛋白, 脑电图
引文 8	Wistar, 雄, 280 ~ 300 g	4-0 尼龙线, 0.25 ~ 0.3 mm, 涂硅酮	未介绍	血气, rCBF, 体温
引文 9	Wistar, 雄, 300 ~ 400 g	4-0 尼龙线, 0.25 mm, 火焰烧制和涂硅酮	17 ~ 20 mm	血压, 血气, rCBF, 体温
引文 10	Wistar, 雄, 290 ~ 350 g	尼龙线, 0.28 mm		血压, 血气, 血糖, rCBF, 脑电图, 体温, 头温

已有多篇文献讨论动物选择、线栓及线栓头的直径、线栓插入深度、监测指标等问题^[1,6,8-11]。新近 Aspey 对 Wistar, SD 和 Fischer-344 大鼠施行线栓造模, 梗死范围的差异与动物品系有关, 缺血 2 h 再灌 70 h, Wistar 大鼠无死亡^[12]。线栓及线栓头的直径应依动物体重大小而定。有些尼龙钓鱼线的硬度大、韧性差, 插入过程中易造成动脉破裂。值得指出的是, 因为性激素对梗死灶的大小有影响, 实验应选择单一性别动物。缺血同侧的 Horner 征无特异性, 不宜作为造模成功的标志。用白炽灯照射来保持体温的方法, 常因身体受热不均, 最好不用。按照国际认可的标准, 2 ~ 5 文献与国外学者交流时往往受到质疑, 这是少部分人员对各种生理指标及影响因素认识不够^[1]。

选用 5/0 尼龙线, 柔韧性好, 用烙铁加热时比钓鱼线更易成球面, 制作时不用完全拉直, 插入时对血管内膜的损伤小。在预实验的基础上, 掌握技巧和手感后, 可将线栓一次准确插入到位。因为动物存在个体差异, 一般需预先准备多根线栓, 根据经验都能选择合适的线栓。用烙铁加热线栓头时应做到一次成功。作者曾使用过普通级大鼠做造模, 动物体质不够好, 对手术耐受差, 呼吸道常有痰液, 术后死亡多, 甚至个别动物不能耐受常量的麻醉。因此选用二级以上的动物非常重要, 否则实验结果不被国际期刊接受。在干燥季节和地区, 可用滴管人工湿润鼻部。线栓造模虽然有一定的难度, 但只要认真按照标准实施, 多数都能成功。

参 考 文 献

- 1 王伟. 严格控制实验条件, 建立标准化脑缺血模型. 中华神经科杂志, 1998, 31: 261-263.
- 2 郭云琴, 赵彼得, 罗毅, 等. 磁场治疗脑梗塞灶实验研究. 中华理疗杂志, 1998, 21: 334-336.
- 3 石正洪, 关永林. 局部脑缺血、再灌注损伤与氧自由基的关系. 中国康复医学杂志, 1998, 13: 254-257.
- 4 李云峰, 陈康宁, 郑新梅. 脑组织再灌注时 PKC 活化、BCL-2 表达与神经细胞凋亡. 中国康复, 2000, 15: 131-134.
- 5 郭宗君, 丰岩清, 郭云良, 等. 神经生长因子对脑缺血再灌注后生长相关蛋白和突触素表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22: 201-203.
- 6 Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- 7 Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurological examination. Stroke, 1986, 17: 472-476.
- 8 Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. Stroke, 1989, 20: 1037-1043.
- 9 Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats: which method works best? Stroke, 1993, 24: 294-298.
- 10 Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, et al. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. Exp Brain Res, 1992, 89: 67-78.
- 11 关云谦, 孙明, 徐超. 大鼠颈内动脉线栓法制备局灶性脑缺血模型及影响因素. 国外医学脑血管疾病分册, 2001, 9: 151-153.
- 12 Aspey BS, Taylor FL, Terruli M, et al. Temporary middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke and reperfusion. Neuropathol Appl Neurobiol, 2000, 26: 232-242.

(收稿日期: 2002-02-08)

(本文编辑: 郭正成)