

• 论著 •

大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉
制备脑缺血模型的建立与评价

李建生 刘敬霞 于海滨 王冬

【摘要】 目的 建立和评价大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉(MCA)制备的脑缺血动物模型。**方法** 大鼠随机分为假手术组(10只)、线栓组(12只)、血栓结合线栓组(12只)。线栓组大鼠用尼龙线阻塞MCA制备大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。血栓结合线栓组由颈外动脉插入改良的内置尼龙套线聚乙烯导管,插管成功后线栓退出一定长度,血液在导管内自凝后拔出套线,经导管推入凝血酶,血栓形成后再次插入套线,根据套线标记的长度向前推进血栓,使之阻塞大鼠MCA制备MCAO模型。术后6h,观察大鼠神经症状评分;测定脑组织含水量、脑梗死面积,观察大鼠脑组织病理变化。**结果** 线栓组和血栓结合线栓组均较假手术组大鼠的神经症状评分增高,脑组织含水量增加,脑梗死面积增大(P 均 <0.01),脑组织出现明显的病理损伤;与线栓组比较,血栓结合线栓组大鼠的神经症状评分、脑组织含水量、脑梗死面积及脑组织病理损伤差异均无显著性(P 均 >0.05)。**结论** 自体血栓结合线栓阻塞大鼠MCA可引起神经功能损害、脑组织水肿,造成脑组织明显的病理损伤,该法制备的MCAO模型可使血栓阻塞在期望血管(MCA)并可进行脑缺血/再灌注研究,防止血栓模型制备过程中及区域动脉溶栓治疗后再出血等,具有阻塞位置确切、梗死范围恒定、模型易于操作及可重复性好等特点。

【关键词】 脑缺血; 大鼠; 血栓模型; 卒中模型

Establishment and evaluation of reproduction of middle cerebral artery occlusion to produce cerebral ischemia with autologous blood clot and nylon thread in rat LI Jian-sheng*, LIU Jing-xia, YU Hai-bin, WANG Dong. * Department of Geriatrics, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, Henan, China

【Abstract】 Objective To reproduce cerebral ischemia using middle cerebral artery occlusion (MCAO) method with autologous blood clot and nylon thread in rat. **Methods** Rats were randomly divided into sham-operation group ($n=10$), suture-occlusion group ($n=12$), thrombus-suture occlusion model group ($n=12$) in which both autologous blood clot and nylon thread were used (thrombus-occluded group). Cerebral ischemia as a result of MCAO in suture-occlusion group was replicated by insertion of nylon thread. In thrombus-occluded group, a polyethylene catheter containing a nylon thread was inserted into the middle carotid artery via external carotid artery, and the nylon thread was pulled out to an appropriate length to allow blood to coagulate. Fifteen minutes later, thrombin was injected, and the nylon thread was re-inserted to complete MCAO. Specimens were taken after ischemia for 6 hours. Neurological symptoms were observed, brain water ratio and the cerebral infarction size were measured, and the pathological changes in the brain tissue were observed. **Results** Compared with sham-operation group, the evaluation score of neurological symptoms was significantly higher, and water content and cerebral infarction size were larger in suture-occlusion group and thrombus-occluded group (all $P<0.01$); the pathological changes of the brain were also more marked. Compared with suture-occlusion group, thrombus-occlusion group showed no differences in evaluation score, water content, cerebral infarction size and pathological changes of the brain (all $P>0.05$). **Conclusion** In rats, occlusion of middle cerebral artery with autologous blood clot and inserted nylon thread can result in the functional lesion, edema and the pathological changes in the brain. The MCAO reproduced by this method could produce thrombotic obstruction of the middle cerebral artery for the experimental study of cerebral ischemic/reperfusion injury, and it could prevent hemorrhage in the process of replication of animal model and in the course of thrombolysis therapy in the clinic. The model has the advantages of precision of the occlusion site, production of constant cerebral infarction size, easier performance and good repeatability.

【Key words】 cerebral ischemia; rats; thromboembolic model; stroke model

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371812);河南省高校创新人才基金资助项目(2001-16);河南省杰出青年科学基金资助项目(06120000700)

作者单位:450003 郑州,河南中医学院老年医学研究所(李建生,王冬);100029 北京中医药大学(刘敬霞,于海滨)

作者简介:李建生(1963-),男(汉族),河南禹州人,医学博士,教授,博士研究生导师,主要从事中医防治脑血管病研究与临床工作(E-mail:lj88@371.net)。

脑梗死主要是由于来自颅外或颅内的血栓栓子,或者是由于脑血管局部血栓形成而引起脑动脉阻塞所致,因此,迅速溶解血栓、恢复血流是最基本、最有效的治疗方法^[1-4]。相关的研究要求脑梗死模型必须由血栓栓子阻塞脑动脉形成。Kudo 等^[5]在 1982 年首次描述了应用自体血栓注入脑动脉形成脑栓塞的大鼠模型,该模型被广泛应用于脑梗死溶栓治疗的实验研究中,此后又有学者不断对该模型进行了改良^[6,7]。但是,该模型的制备仍然存在梗死部位不够恒定、血栓形成前及溶栓药局部应用后的出血,不能很理想地进行脑缺血/再灌注损伤研究等问题,且关于该模型与其他脑缺血模型的比较评价研究少见报道。我们采用大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉(MCA)成功建立了局灶性脑缺血模型,并与既往制备的线栓法模型^[8]进行比较,评价血栓阻塞结合线栓阻塞 MCA 制备的脑缺血模型动物梗死范围和神经症状的恒定,以及模型的可操作性和重复性,为该模型更好地用于血栓阻塞性脑血管疾病的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理:清洁级 SD 大鼠 34 只,2~3 月龄,雌雄各半,平均体重(300±50)g,由河南省实验动物中心提供。按随机数字表法将大鼠分为假手术组、线栓组和血栓结合线栓组,除假手术组为 10 只,其余每组 12 只大鼠。实验大鼠术前 12 h 禁食、不禁水,制模后 6 h,按 8 分标准评分^[9]剔除神经症状评分在 4 分以下的大鼠。

1.2 模型制备:①线栓大脑中动脉闭塞(MCAO)模型采用改良的 Longa 法制备^[8]。②用大鼠自体血栓结合线栓阻塞 MCA 制备 MCAO 模型:血栓模型参照改良的 Zhang 法制备^[6,7]。将改良的、内置套线的聚乙烯导管进行标记;大鼠用体积分数为 6%的水合氯醛(0.4 ml/100 g)进行腹腔注射麻醉,背位固定,颈部正中用体积分数为 2%的碘酒和 75%的乙醇消毒,颈部正中切口,分离左侧颈总动脉,穿线备用;同时分离右侧颈总动脉,穿线备用;分离左侧颈内、外动脉,离断颈外动脉,结扎翼额动脉,于颈外动脉近动脉分叉处剪口,导管穿入颈内动脉,缓慢推进适当深度;根据标记长度适当退出套线,使血液流入导管内自凝,缓慢推入 20 U 凝血酶(济南军区生物制品药物研究所,批号 H41023661,每支 500 U)。使血液凝固,血栓形成;再次插入套线,用力均匀和缓地向前推进套线至标记位置,使形成的血栓阻塞 MCA 入颅处;留置导管,缝合皮肤,单笼饲养。③假

手术组不插入栓线和形成血栓。实验过程中保持大鼠肛温(37.0±0.5)℃,室温(26±1)℃。

1.3 取材与样品制备:术后 6 h 冰盘上取出全脑,用冷生理盐水(4℃)冲洗 3 遍,除去积血,用滤纸吸去表面水分,去除嗅球、小脑和脑干。于冰盘上迅速分离大脑半球,取左侧半球,从额极向后 4 mm 处冠状切取脑组织 3 mm,待测脑组织含水量;再向后冠状切取脑组织 2 mm,放入质量分数为 2%的四氮唑溶液进行氯化三苯四唑(TTC)染色,待测脑梗死面积;依次向后冠状切取脑组织 2 mm,放入体积分数为 10%的甲醛溶液,待进行脑组织病理观察。

1.4 观察指标

1.4.1 神经症状评分:术后 6 h 观察大鼠神经症状,按 8 分标准评分^[9],记录分值。

1.4.2 脑组织含水量测定:用天平称取脑组织湿重(精确度 0.1 mg)后放入干燥箱中(100±2)℃干燥,24 h 后称取干重。

$$\text{脑组织含水量} = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

1.4.3 脑梗死面积测定:切取脑组织 2 mm,放入 2%四氮唑溶液,37℃水浴锅温孵 30 min 后放入 10%甲醛溶液,15 min 后取出脑组织,数码相机对脑片(枕侧)进行拍照,应用计算机软件测定脑片梗死面积与相应侧总面积,计算面积比值。

$$\text{面积比值} = \text{梗死面积} / \text{总面积} \times 100\%$$

1.4.4 脑组织病理观察:术后 6 h 将大鼠断头取脑,用 10%的中性甲醛溶液固定 7~14 d,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色,光镜下观察脑组织病理形态的改变。

1.5 统计学处理:采用 SPSS 11.0 统计软件。数据资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经症状评分(表 1):线栓组和血栓结合线栓组大鼠较假手术组神经症状评分均增高(P 均<0.01);血栓结合线栓组大鼠神经症状评分和线栓组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 脑组织含水量(表 1):线栓组和血栓结合线栓组大鼠的脑组织含水量较假手术组均显著增高(P 均<0.01);线栓组大鼠脑组织含水量和血栓结合线栓组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 脑梗死面积(表 1):线栓组和血栓结合线栓组大鼠脑梗死面积较假手术组均显著增高(P 均<0.01);血栓结合线栓组大鼠脑梗死面积较线栓组增大,但差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠的神经症状评分、脑组织含水量
及脑梗死面积比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of neural symptom score, brain water ratio and cerebral infarction area in rats of every group($\bar{x} \pm s$)

组别	神经症状评分(分)	脑组织含水量(%)	脑梗死面积(%)
假手术组	0(10)	62.27 $\pm$ 4.46(10)	0(10)
线栓组	5.25 $\pm$ 0.71(8) Δ	81.26 $\pm$ 1.03(8) Δ	37.95 $\pm$ 5.23(8) Δ
血栓结合线栓组	5.38 $\pm$ 0.52(8) Δ	82.30 $\pm$ 0.98(8) Δ	39.07 $\pm$ 4.95(8) Δ

注:括号内为动物数;与假手术组比较, $\Delta P < 0.01$

2.4 脑组织病理改变:假手术组神经细胞胞膜清晰完整,无变形、水肿,核仁清晰可见;线栓组和血栓结合线栓组模型大鼠脑组织病变区域间质疏松,神经细胞肿胀明显、变形、胞膜不清、胞浆深染、胞核固缩,有神经细胞自溶及坏死,间质水肿明显,细胞及血管周围间隙增大。

3 讨论

脑缺血动物模型的制备是研究脑缺血损伤的基点和核心,线栓法制备的 MCAO 脑缺血动物模型因具有阻塞部位恒定、可进行再灌注损伤等优点而成为脑缺血研究的常用模型,已被广泛应用^[10]。早期溶栓治疗可能会成为急性脑梗死最重要的治疗方法^[2-4,11],溶栓研究要求脑缺血动物模型应是由血栓阻塞脑动脉所致,此外,其他如某些疾病对中风预后的影响^[12]、药物疗效的对比评价等研究^[2,3,13,14]也均是在血栓栓塞性脑缺血动物模型基础上进行。Kudo 等^[5]在 1982 年首次应用自体血栓注入脑动脉形成脑梗塞大鼠模型,但该方法是从颅外颈动脉注入栓子,栓子离开导管后需随血流移动较长距离,因而具有较大的随意性,使该模型重复性较差,成功率较低,且体外所形成血栓的成分、性质均与体内有异。1997 年 Zhang 等^[6]从大鼠颈外动脉逆行插管至颈内动脉,并进入颅内,在 MCA 起始部注入凝血酶诱导血栓形成获得成功;同时在该模型上进行的溶栓实验表明,该模型具有梗死部位不定、凝血弥散等不足^[15]。此后又有人对模型进行了改进^[4],但仍然存在血栓是否阻塞期望血管,以及未能很好解决血栓形成前或溶栓治疗后经导管出血的问题。

严格意义上符合 MCAO 的动物模型制备必须明确以下几方面:血栓来源、大小、数目和成分;血栓进入脑动脉所阻塞的血管;栓子走形和最终位置等。因此,要建立由血栓栓塞 MCA 制备 MCAO,缺血的梗死体积和行为表现较为恒定,稳定性、重复性较好的模型,需做到:通过直接插管至 MCA 起始部诱导血栓形成,梗死灶的大小和部位稳定;由凝血酶诱导血栓形成,更接近于临床脑梗死的病理特点,血栓

的组成成分与颈总动脉硬化斑块相似;对溶栓治疗有良好的反应性^[4]。

本研究采用大鼠自体血栓结合线栓阻塞 MCA 成功制备了脑缺血模型,结果显示,与线栓阻塞法比较,血栓结合线栓法制备的 MCAO 模型大鼠神经症状评分、脑组织含水量、脑梗死面积、脑组织病理损伤等方面差异均无显著性。认为该模型可使血栓阻塞在期望血管(MCA)进行脑缺血/再灌注,并可防止血栓模型制备过程中及区域动脉溶栓治疗后经导管出血等不足,具有阻塞位置明确、梗死范围恒定、模型易操作及可重复性好等特点,可用于血栓阻塞性脑血管疾病脑缺血/再灌注损伤研究,及为急性脑梗死的经区域动脉进行溶栓治疗提供依据。

参考文献:

- Ibayashi S, Takano K, Ooboshi H, et al. Effect of selective brain hypothermia on regional cerebral blood flow and tissue metabolism using brain thermo-regulator in spontaneously hypertensive rats[J]. Neurochem Res, 2000, 25: 369-375.
- 王春华, 赵永刚, 丁颖, 等. 溶栓剂治疗急性脑梗死的临床疗效观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11: 118-119.
- 王文静, 孙一兵, 汪银洲, 等. 急性脑梗死尿激酶介入溶栓治疗临床观察[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 12-14.
- 王左生, 连亚军, 赵幸瑜, 等. 脑梗死患者溶栓治疗前后经颅多普勒检测及其临床意义[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 699.
- Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, et al. An animal model of cerebral infarction: homologous blood clot emboli in rats[J]. Stroke, 1982, 13: 505-508.
- Zhang Z, Zhang R L, Jiang Q, et al. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17: 123-135.
- 张兆岩, 郭述苏, 曹霞. 大鼠大脑中动脉血栓形成模型的建立[J]. 解放军医学杂志, 2001, 26: 423-425.
- 曹勇军, 程彦斌. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的改进与探讨[J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 17: 198-200.
- 吴俊芳, 史以菊, 刘天培. 小柴碱对小鼠和大鼠脑缺血的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9: 156-158.
- 冯学功, 刘茂才, 孙景波, 等. 益溶口服液对脑梗死大鼠溶栓状态下再灌注损伤的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24: 143-146.
- Overgaard K, Sperling B, Boysen G, et al. Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a Danish pilot study[J]. Stroke, 1993, 24: 1439-1446.
- Tejima E, Katayama Y, Suzuki Y, et al. Hemorrhagic transformation after fibrinolysis with tissue plasminogen activator: evaluation of role of hypertension with rat thromboembolic stroke model[J]. Stroke, 2001, 32: 1336-1340.
- Lapchak P A, Chapman D F, Zivin J A, et al. Pharmacological effects of the spin trap agents N-t-butyl-phenylnitron (PBN) and 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in a rabbit thromboembolic stroke model: combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator[J]. Stroke, 2001, 32: 147-153.
- 吴根喜, 郑道海, 张保荣. 尿激酶颈动脉溶栓配合中药治疗急性脑梗死 48 例临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11: 248-250.
- 常丽英, 张新江, 张苏明. 用于溶栓研究的血栓栓塞性脑梗死动物模型[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2001, 9: 229-231.

(收稿日期: 2005-11-02 修回日期: 2006-03-24)

(本文编辑: 李银平)