

脑缺血动物模型的研究进展

邹永杰 综述 崔高宇 冯华 审校*

第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室,重庆市 400038

摘要:脑缺血是当今世界上致死、致残率最高的疾病之一,其损伤机制及防治措施是当前研究热点。近年来随着实验目的的不同,研究者设计出了不同类型的脑缺血模型,本文主要针对影响小鼠局灶性脑缺血模型建立的各种因素进行综述。

关键词:脑缺血; MCAO; 模型

卒中是世界上发病率、致残率和死亡率均较高的严重疾病之一,其中缺血性脑卒中占卒中总数 85% 以上,而大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 是缺血性脑卒中最主要的原因^[1]。临床上脑缺血的预后与许多因素有关,如:缺血发生的原因、部位、持续时间、严重程度或是否有伴随症状等。为了研究其发病机制及其病理生理过程,与人类卒中过程相似的实验性局灶性脑缺血模型得到了广泛应用,成为卒中研究领域不可缺少的工具。本文对局灶性脑缺血动物模型综述如下:

1 实验性脑缺血模型

1.1 实验动物的选择

1.1.1 大动物 缺血性脑血管病最初的研究对象主要是大动物^[2],其优势如下:①更易进行影像学检测,如:核磁共振、功能成像等;②更易对生理学指标进行监测(如脑电图、动脉血气分析、血压、血糖等);③更适合测量脑血流量和研究脑代谢;④大动物有脑组织有沟回,其结构和功能上与人类更相似。其缺点为:①大动物费用高、饲养条件严格;②不易判断梗死是否完全,梗死灶变化较大;③大动物的麻醉方式复杂,可能对梗死灶产生影响。

1.1.2 小动物 目前缺血性脑血管病的研究对象绝大部分都是啮齿类动物,其优势如下:①价格低廉;②体重轻,实验费用低;③同系交配,血缘一致性高;④脑血管解剖结构及生理功能与灵长类动物相似;⑤大脑体积有利于固定和相关实验研究;⑥生态学和伦理学上更易被接受^[3]。同样,啮齿类动物也有自身的缺点:①神经解剖和代谢等与人类明显不同;②缺少大脑沟回,得出的实验结论必须

在灵长类上重复后才能应用于临床试验^[4]。

1.2 实验模型分类

脑缺血模型包括全脑缺血与局灶性缺血两大类,全脑缺血指全部或大部分脑血流量降低,局灶性缺血主要是特定区域的脑血流量降低^[3](表 1)。

表 1 实验性脑缺血模型概述

缺血类型	病因学	手术方式
全脑缺血模型	完全性缺血	心跳骤停 主动脉血流阻断 断头术 颈动脉气囊(止血带)阻断
	不完全性缺血	大出血/低血压 低氧性缺血 2 血管栓塞 + 低血压 4 血管栓塞 单向性 CCAO *
局灶性缺血模型	局灶性缺血	MCAO MCAO + 同侧 CCAO MCAO + 双侧 CCAO 自发性脑梗塞
	多病灶缺血	自体血栓形成术 微球栓塞术 光化学诱导栓塞术

* CCAO; common carotid artery occlusion(颈动脉闭塞)

1.3 小鼠局灶性脑缺血模型

1.3.1 开颅直接结扎法 MCAO 模型 1993 年 Chan 等采用于大脑中动脉靠近梨状皮层分支的位置电凝烧断大脑中动脉,同时结扎同侧颈总动脉及阻断对侧颈总动脉血流的方法建立局灶性缺血模型^[5]。该模型的特点:可视性强,可产生大脑皮质、尾状核及壳核梗死,模型稳定;缺点:需要开颅并

基金项目:国家自然科学基金面上项目:P2X7 受体调控星形胶质细胞 AQP4 表达在高压氧预适应抗脑水肿的作用机制研究(30973100)

收稿日期:2012-08-18; **修回日期:**2012-10-28

作者简介:邹永杰(1982-),男,硕士研究生在读,主治医师,主要研究方向:高压氧预适应的脑保护作用及机制研究。

通讯作者:冯华(1963-),男,博士生导师,主任医师,主要研究方向:颅脑外伤、脑肿瘤。

剪开硬脑膜,损伤大,颅腔的完整性受损,并容易造成颅内感染。该模型模拟了人的永久性脑梗死,常用于急性缺血研究。

1.3.2 光化学诱导法 MCAO 模型 2002 年 Schroeter 等通过静脉注射光敏剂,再用特定波长的光波照射而产生皮质梗塞的方法来制作局灶性缺血模型^[6]。该模型特点:不需要开颅即可进行光照,创伤小,动物存活率高,存活时间长;并且可以高度重复损伤的范围和区域,甚至可以通过立体定位照射来决定损伤区域,从而在皮质的特殊功能区选择性的产生梗塞;缺点:由于血脑屏障的破坏和血管源性脑水肿出现在数分钟内,不能产生卒中研究所需要的半暗带;且该方法导致终末动脉闭塞,无法形成再灌注,不能用于缺血再灌注损伤研究。该模型主要用于研究抑制血小板聚集药物,对脑梗死的防治,也可用于研究血栓形成过程中释放的血源性物质对脑梗死的作用。

1.3.3 血栓栓塞法 MCAO 模型 1997 年 Zhang 等采用抽吸血凝块后注入生理盐水中,然后自颈总动脉注入到颈内动脉,形成脑内的多发血栓的方法制作局灶性缺血模型^[7]。该模型特点:不需要开

颅,能较好地模拟人脑梗塞的病理过程;缺点:栓子部位不稳定,无法对特定区域进行研究。该模型多应用在溶栓治疗的时间窗,给药途径,溶栓药物疗效,安全性以及溶栓时机体纤溶系统变化等研究中。

1.3.4 线栓法 MCAO 模型 1994 年 Yang 等^[8]根据小鼠的生理结构对 Longa 法^[9]进行改良,成功制备了小鼠 MCAO 模型。其原理是:栓线通过颈内动脉送入到大脑前动脉和大脑中动脉连接处,使大脑中动脉血供区域缺血,在缺血一段时间后可以取出,形成再灌注即短暂性缺血模型(transient MCAO, tMCAO),也可以不取出而产生永久性缺血模型(Permanent MCAO, pMCAO)。该模型特点:不需要开颅,可以准确控制缺血及再灌注时间,结果可靠,稳定性强,重复性高。缺点:该模型存在蛛网膜下腔出血^[10]等并发症。

2 小鼠线栓法 MCAO 模型的影响因素

小鼠线栓法 MCAO 模型受很多因素的影响,如:小鼠品系、性别、年龄、体重、线栓情况等(详见表 2)。

表 2 小鼠 MCAO 模型情况概述

卒中类型	品系	体重(周龄)	栓线规格	麻醉方式	观测时间	梗塞体积 mm ³	梗塞率	死亡率	文献
pMCAO	C57	22-25 g	5-0	异氟烷	18 h	55.2	30%	-	[11]
pMCAO	C57	24-30 g	6-0	异氟烷	24 h	40	22.22%	9.70%	[10]
pMCAO	C57	20-25 g	6-0 + sil *	氯胺酮+赛拉嗪	7 d	129.3	52.1%	81.80%	[12]
pMCAO	C57	20-25 g	8-0 + sil *	氯胺酮+赛拉嗪	28 d	95	52.1%	0%	[12]
MCAO30	C57	25-30 g	5-0 + PoL #	氟烷	24 h	20	11%	-	[13]
MCAO30	C57	22-25 g	5-0	异氟烷	24 h	53.4	29%	-	[11]
MCAO30	C57	24-30 g	6-0	异氟烷	24 h	23	12.5%	14.70%	[10]
MCAO30	C57	29±0.9 g	5-0	氟烷	24 h	56	30.4%	-	[14]
MCAO60	C57	25-30 g	5-0 + PoL	氟烷	24 h	31	16.8%	-	[13]
MCAO60	C57	29±0.9 g	5-0	氟烷	24 h	69	37.5%	-	[14]
MCAO90	C57	20-25 g	8-0 + sil	氟烷	24 h	72	39.1%	-	[15]
MCAO120	C57	25-30 g	5-0 + PoL	氟烷	24 h	29	15.8%	-	[13]
MCAO120	BALB/C	17-22 g	8-0 + sil	氟烷	24 h	69.7	37.9%	-	[16]
MCAO180	C57	25-30 g	5-0 + PoL	氟烷	24 h	38	20.6%	-	[13]
MCAO180	CD-1	25-35 g	5-0	水合氯醛	6 h	75.1	40.66%	-	[8] **

* Sil, silicone 硅胶; #PoL, poly-L-lysine, 左旋多聚赖氨酸; ** 小鼠的大脑半球体积来源于文献^[8]

2.1 品系差异

小鼠 MCAO 模型术后梗塞体积及区域具有明显的品系差别。研究发现, pMCAO 模型中, C57BL/6 小鼠的梗塞面积明显大于 Sv129 小鼠^[17], tMCAO 模型中, BALB/C 小鼠的梗塞面积明显大于 C57BL/6 和 Sv129, 并且死亡率明显高于后两者^[18]。而在开颅直接结扎法 MCAO 模型中,

BABL/C 小鼠的缺血损伤程度明显比 C57BL/6 小鼠和 Sv129 小鼠严重^[19], 这三种小鼠中, BALB/C 小鼠的后交通动脉(Posterior communicating arteries, PCA)是缺失的, 而 C57BL/6 小鼠的 PCA 明显发育不良, 而 Sv129 小鼠的 PCA 相对开放程度较高, 这说明后交通动脉的开放程度对于线栓法 MCAO 模型缺血效果有较大影响^[20]。

2.2 动物自身因素之间的差异

临床流行病学研究表明卒中发生具有明显的性别差异,雌性动物对缺血的敏感性明显低于雄性动物^[21],因此为了排除激素的干扰,实验中多选择雄性小鼠。此外,有研究表明体重差小于 9 克能有效防止由于体重引起的误差^[17]。

2.3 栓线差异

栓线的选择需要与体重相匹配,合适的线栓应当是能最大程度地阻断进入大脑中动脉的血流,而对血管产生最小的刺激和损伤。栓线头端的处理方法:①直接将单尼龙线头端烫成光滑而膨大的球形,未借助其它覆盖材料以达到增加直径,改善物理、化学性质的目的。②在尼龙线头端的表面覆盖硅胶,以增加直径,并且利用硅胶的弹性,减小对血管内皮的损伤。③将尼龙线头端烫圆后再涂以 0.1% 左旋多聚赖氨酸,利用其带有正电荷,易于同带有负电荷的血管内面粘连特点用于阻断颈动脉系统血流。Yuan 等^[12]发现:用 8-0 尼龙线前端包 1.5 mm 硅胶(直径 0.13 ~ 0.15 mm)的栓线,在体重 20 ~ 25 克范围内的 C57BL/6 小鼠上制作的 MCAO 模型成功率高,死亡率低。

2.4 麻醉差异

目前,国际上比较通用的有异氟烷等气体麻醉、水合氯醛腹腔注射麻醉、及戊巴比妥钠腹腔注射麻醉等(见表 2)。气体麻醉效果好,苏醒快,可以任意控制麻醉时间长短,但对设备要求高,而水合氯醛或戊巴比妥钠腹腔注射麻醉相比前者简易可行,因此国内大多使用后两种麻醉方式。汪静等^[22]研究发现水合氯醛对动物的胃肠道、上呼吸道影响较大,高浓度使用时受试动物出现口、鼻腔分泌物增多,有阻碍动物呼吸的状况发生;在苏醒过程中出现蜷缩、不愿攀爬的现象。戊巴比妥钠药性则相对稳定,用药过程中无明显不良症状,苏醒后动物活动自如。

2.5 生理学影响

体温、血压、血气和血糖等参数在实验研究中都是应当监测的项目。急性脑缺血患者血糖明显升高,高血糖水平会导致更大的梗塞面积、更差的临床预后和更高的死亡风险^[23]。因此,大多数研究中采用术前 12 ~ 24 小时禁食,有利于控制动物的血糖水平。体温对 MCAO 模型的影响十分明显,低体温能明显减小梗塞面积,减轻神经功能损伤^[24]。因此,在实验过程中应当保持动物体温在

36.5℃ ~ 37.5℃,如果有条件则进行脑温监测。

3 MCAO 模型的评定指标

3.1 神经功能学评分

小鼠 MCAO 模型的神经功能学评分标准主要有 Longa 法^[9]和 Bederson 法^[25]两大类。Longa 法为 5 级 0 ~ 4 分制:0 分,无神经损伤;1 分,提尾时对侧前肢内收屈曲,不能完全伸展(轻度神经损伤);2 分,爬行时向对侧旋转,划圈(中度神经损伤);3 分,站立时向对侧倾倒(重度神经损伤);4 分,无自主活动伴意识障碍。Bederson 法为 4 级 0 ~ 3 分制:0 分:无神经损伤症状;1 分:提尾时对侧前肢不能完全伸展;2 分:前肢抵抗对侧推力能力下降;3 分:向对侧转圈。这两种评价方法都得到了广泛的应用。此外,也可以用 MRI 等方法来对 MCAO 模型进行相关评价。

3.2 梗塞面积

在缺血损伤模型中最准确的观察指标就是梗塞面积。在动物死后,可以通过免疫组化方法、TTC 染色法等对梗塞面积进行测量;在活体上,也可以利用 CT、MRI 等来对梗塞面积进行测量^[26]。

4 实验性 MCAO 模型存在的主要问题及展望

临床上大部分患者的缺血范围较小,大概占同侧大脑的 4.5% ~ 14%,而梗塞面积大于 39% 的被定义为恶性脑梗塞,药物治疗基本无效,产生严重的脑损伤、脑疝甚至死亡,需要开颅,死亡率高达 80%^[27]。小鼠线栓法 MCAO 模型所形成的梗塞面积占同侧的大脑半球的绝大部分,梗塞范围根据缺血再灌注的时间而不同(见表 2),缺血范围大部分占同侧的 21% ~ 45%。表明目前常用的 MCAO 模型并不是临床上常见的类型。因此,如何对缺血模型进行改良使其更好地与临床情况相符,是缺血性脑损伤研究亟需解决的问题。笔者相信,随着脑缺血动物模型的不断成熟,必将为缺血性脑血管病治疗的飞跃发展做出贡献。

参 考 文 献

- [1] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2012, 125(1):188-197.
- [2] 马宁,蔡继福,姜卫剑. 局灶性脑缺血动物模型的制备. 神经损伤与功能重建, 2010, 5(1):53-55.
- [3] Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, 1989, 20(12):1627-1642.

- [4] Braeuninger S, Kleinschnitz C. Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med*, 2009, 1:8.
- [5] Chan PH, Kinouchi H, Epstein CJ, et al. Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: reduction of edema and infarction in transgenic mice following focal cerebral ischemia. *Prog Brain Res*, 1993, 96:97-104.
- [6] Schroeter M, Jander S, Stoll G. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods*, 2002, 117(1):43-49.
- [7] Zhang Z, Chopp M, Zhang RL, et al. A mouse model of embolic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(10):1081-1088.
- [8] Yang G, Chan PH, Chen J, et al. Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1994, 25(1):165-170.
- [9] Longa EZ, Weinstein PH, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [10] Tsuchiya D, Hong S, Kayama T, et al. Effect of suture size and carotid clip application upon blood flow and infarct volume after permanent and temporary middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res*, 2003, 970(1-2):131-139.
- [11] Wexler EJ, Peters EE, Gonzales A, et al. An objective procedure for ischemic area evaluation of the stroke intraluminal thread model in the mouse and rat. *J Neurosci Methods*, 2002, 113(1):51-58.
- [12] Yuan F, Tang Y, Lin X, et al. Optimizing suture middle cerebral artery occlusion model in C57BL/6 mice circumvents posterior communicating artery dysplasia. *J Neurotrauma*, 2012, 29(7):1499-1505.
- [13] Belayev L, Busto R, Zhao W, et al. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res*, 1999, 833(2):181-190.
- [14] Mccoll BW, Carswell HV, Mcculloch J, et al. Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. *Brain Res*, 2004, 997(1):15-23.
- [15] Kilic E, Kilic U, Matter C M, et al. Aggravation of focal cerebral ischemia by tissue plasminogen activator is reversed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor but does not depend on endothelial NO synthase. *Stroke*, 2005, 36(2):332-336.
- [16] Gao D, Zhang X, Jiang X, et al. Resveratrol reduces the elevated level of MMP-9 induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice. *Life Sci*, 2006, 78(22):2564-2570.
- [17] Connolly EJ, Winfree CJ, Stern DM, et al. Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*, 1996, 38(3):523-531, 532.
- [18] Schulte-Herbruggen O, Klehmet J, Quarcoo D, et al. Mouse strains differ in their susceptibility to poststroke infections. *Neuroimmunomodulation*, 2006, 13(1):13-18.
- [19] Majid A, He YY, Gidday JM, et al. Differences in vulnerability to permanent focal cerebral ischemia among 3 common mouse strains. *Stroke*, 2000, 31(11):2707-2714.
- [20] Kitagawa K, Matsumoto M, Yang G, et al. Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(5):570-579.
- [21] Scott E, Zhang QG, Wang R, et al. Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. *Front Neuroendocrinol*, 2012, 33(1):85-104.
- [22] 汪静, 丁隽, 姜莹, 等. 两种麻醉剂对 KM 小鼠麻醉效果的比较. *实验动物与比较医学*, 2009, 29(2):132-134.
- [23] Kruyt ND, Biessels GJ, Devries JH, et al. Hyperglycemia in acute ischemic stroke: pathophysiology and clinical management. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(3):145-155.
- [24] Ridenour TR, Warner DS, Todd MM, et al. Mild hypothermia reduces infarct size resulting from temporary but not permanent focal ischemia in rats. *Stroke*, 1992, 23(5):733-738.
- [25] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17(3):472-476.
- [26] 任丽. CT 灌注成像在缺血性脑血管病中的应用进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2011, 38(1):69-73.
- [27] Hacke W, Schwab S, Horn M, et al. 'Malignant' middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol*, 1996, 53(4):309-315.