

•综述•

线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的规范

廖维靖 范明 杨万同

[关键词] 线栓阻断大鼠中动脉;缺血性脑损伤;动物模型;综述
中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2003)11-0673-04

大鼠缺血性脑损伤的造模方法有数种,线栓阻断大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)造模是使用较多的方法之一。线栓造模方法自上世纪 80 年代末被创建以来,已在研究工作中得到广泛应用,其后讨论线栓造模及评价的英文文章已不下百篇。2002 年仍有造模方法的文章发表,足以说明这一问题还未完全成熟^[1-8]。上世纪 90 年代以来,国内开始出现论述造模的标准和规范^[9-11]的文献。模型的选择和应用,是研究工作的基础和出发点。造模是否符合标准,决定了研究工作的可信度,这需要研究者将自己的工作按国际认可的标准进行。为引起同行对这一问题的重视,本文将近年国内外的造模研究现状作一综述。

1 线栓的选择及处理

1.1 线栓材料 尼龙线的质地非常重要,材质不好的线在受热时会发生不规则的变形,使线栓直径尤其是

线栓头的直径相差很大,难以保证直径均一。外科手术用的尼龙线质地较好,用酒精灯火焰烧或电热烙铁加热,制备的线栓头钝圆(blunt)、美观,直径均一。Koizumi 和 Zea Longa 最初使用的是尼龙线^[1,2],国内部分作者使用的尼龙线是市售钓鱼线。用钓鱼线烧制的线栓头不够钝圆。

1.2 线栓头直径 根据动物体重的大小,选用不同直径的尼龙线。体重 175—400g 的大鼠,选 3-0 或 4-0 尼龙线,直径为 0.22—0.33 mm。为保证能完全堵住 MCA 的起点,并避免伤及血管内皮和刺破血管,应对线栓头端进行“钝化”处理,常用的方法是火烧/烙铁烫圆、涂硅酮(或牙托粉)和多聚赖氨酸(poly-L-lysine)等,使线栓头的直径增大、钝圆。各家报道的情况见附表。

附表 线栓阻断大鼠中动脉模型制备比较

作者	大鼠品系	体重(g)	线号	制备工艺	插入深度 (从 CCA 分叉处计算)
Zea Longa ^[2]	SD	400—500	4-0	线栓头烧制成钝圆	17 mm
Laing ^[5]	Wistar	300—400	4-0		17—20 mm
Memeza wa ^[6]	Wistar	290—350	直径 0.28 mm	栓头钝圆,1000# 砂纸抛光	
Kawamura ^[12]	SD	240—300	3-0	线栓头烧圆,1500# 砂纸抛光	17.5 mm
Bialobok ^[13]	Wistar	280—320	3-0 直径 0.24 mm	栓头烧制,直径约 0.33 mm,涂多聚赖氨酸	约 20 mm,或遇有一定的阻力,即停止推入
Kastrup ^[14]	SD	290—350	4-0	线栓头涂硅酮	
Spore ^[15]	Wistar	260—300	3-0	线栓头用火烧制	17—19 mm
Belayev ^[16]	SD	280—340	3-0	线栓头烧制成钝圆,涂 0.1% 多聚赖氨酸,60℃ 干燥 1 h	18—20 mm
Wang ^[17]	SD	190±25	3-0 或 4-0	线栓头烧制成直径 0.22—0.25 mm	
Manoonkitiwongsa ^[18]	SD	250—320	4-0	线栓头烧制成钝圆	18 mm
Neumanr Haefelin ^[19]	SD	300—340	4-0	线栓头涂硅酮	
Kuge ^[20]	SD	276—346	4-0		17 mm
Hudzik ^[21]	Wistar	280—310			20 mm
Rogers ^[22]	SD	300—350	3-0	线栓头烧钝圆,直径 0.26—0.30 mm,并涂多聚赖氨酸	18—20 mm
Kane mitsu ^[8]	Wistar	250—350	直径 0.148	线栓头 5 mm 段涂硅酮,使直径为 0.2 或 0.3 mm,其余部分用烙铁制成“塞子”	
Irving ^[23]	SD	300—350	3-0	线栓头烧制成钝圆,直径 0.28—0.3 mm,涂多聚赖氨酸	
Modo ^[24]	SD	300—330		线栓头直径 0.4 mm	20—21 mm

基金项目:1. 国家自然科学基金项目(39970935 和 30271671);2. 湖北省自然科学基金项目(98J099);3. 湖北省科技厅攻关项目(992P1210)。
作者单位:1. 430071 武汉市,武汉大学中南医院康复医学科(廖维靖 杨万同);2. 100850 北京市,军事医学科学院基础医学研究所(范明)。作者简介:廖维靖(1962-),男,在读博士,副教授,主要研究方向:神经疾病的康复。

Aspey 报道,涂硅酮的线栓比未涂硅酮的线栓,产生的梗死灶要大,死亡率高^[25]。

使用 4-0 尼龙线,SD 大鼠体重相差 124—154g^[2-20]。使用 3-0 尼龙线,SD 大鼠体重相差 50—60g^[12-22],Wistar 大鼠体重相差 20g^[13-15]。分析上述文献,各厂家的尼龙线并非一个标准,所以报道的直径存在较大的差异。另外,产品质量的差异使同一“号”的尼龙线存在差异^[20]。对比国内几个合资厂家的尼龙线标准,同号的线其直径存在细小差异。有人曾对 Longa 方法的线栓和 Koizumi 方法的线栓进行比较^[5],有兴趣的读者可参阅。

2 动物的选择

2.1 品系 所用动物是 Wistar 大鼠、Sprague-Dawley 大鼠、Fisher 344 大鼠和 Long Evans 大鼠^[25-26]。新近 Aspey 报道,对 3 种大鼠(Wistar、SD、Fisher-344)进行线栓造模,其运动功能改善、梗死程度和死亡率存在差异^[7]。何种品系的动物最适宜做线栓模型,各家报道有一定出入,可能跟各实验室的条件和技术有关。最常用的是 Wistar 大鼠和 SD 大鼠。我们观察到,对饲养条件非常好的 2 级以上的动物(Wistar 大鼠、SD 大鼠,同批、同窝、同性别),即使将体重(160—170g)控制在 5g 以内,用同一根线栓头试插同品系的几只动物,有的很快可以插入到 MCA,有的则不易插入,提示需要不同直径的线栓头。动物个体之间存在不可避免的差异,不同品系的大鼠差异更大。我们曾用适合 180g 体重的 Wistar 大鼠的线栓,试插体重 185g 的 SD 大鼠,结果失败。

2.2 体重 动物体重决定线栓头的直径及插入的深度。在英文发表的文献里,许多作者采用 280g 以上体重的大鼠。即使有些作者使用的动物体重十分接近,但插入的深度也存在一定的差异。

2.3 性别 因雌激素对脑损伤有保护作用,所以不可雌雄动物混用。单一性别是必须的。除因研究雌激素的作用而选择雌性动物外,目前多选择雄性动物。

2.4 级别 普通级的大鼠,体质状态差,对手术创伤的耐受力低,十分脆弱,有时手术中即死亡,甚至常量的麻醉药不能耐受。手术中呼吸道分泌物多,加上缺血损伤的打击,容易死亡。目前普通级大鼠已不可作实验研究,必须是清洁级(2 级)和无特定病原体(3 级)的动物。国家已颁布新的实验动物管理标准,明确禁止使用普通级的动物。2 级以上的动物,手术后的存活率明显提高,恢复过程较快。部分作者往往不能重复出著名实验室的结果,一个关键问题是忽视动物的选择。

2.5 个体差异 即使是 2 级以上的动物,体重相当,其血管的变异也较大。

3 监测指标

3.1 血压 从尾动脉或股动脉插入聚乙烯管(polyethylene catheter, PE 管),连接多道生理仪,连续记录血压的波动变化。如果需要术中给药,则另开静脉通道。

3.2 血气 血气分析是监测造模必备的指标。监测血压变化时,可以通过 PE 管的 3 通管而便利地进行血气分析的取样。

3.3 血流量 在颅骨 Bregma 点尾侧 3 mm 和外侧 2 mm 钻孔,直径约 3 mm。仔细将颅骨磨至菲薄呈透明状,用牙科水泥封围,盖上石英玻片,铸成颅窗。这种处理使脑组织表面的硬、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。用激光多谱勒血流仪测定局部脑血流量(rCBF)。需要注意探头的置放,要避开硬、软脑膜表面的大血管,以免引起假阳性的结果。激光多谱勒血流仪(LDF)采用的是主观设定的灌注单位(perfusion unit, PU)指标,以测量前的基础血流量为 100 PU,而后确定相对的百分数值,因此不是直接的读数。下降到 20% 以下即为成功。

3.4 血糖 术中要监测血糖。排除因血糖水平过高引起脑组织的损伤。

3.5 控制体温 采用加热垫的方法,使动物体温保持在(37±0.5)℃。监测头温不够准确,需要测直肠温度。一般用温度传感器涂上润滑膏或凡士林,插入直肠 7 cm,连续记录身体深部体温的变化。

跟人体手术时的监测内容相似,实施监测时动物身上插满了管子,动物的完整数据才能得到。对动物进行“人道”的监测符合动物管理规定。

4 麻醉

国际通行的气体麻醉剂是氟烷(halothane)。优点是麻醉起效快,呼吸平稳,便于术中调控麻醉深度。在动物鼻端用面罩或插入气管,可以方便地控制 halothane 流量,使动物保持在合适的麻醉深度。halothane 的浓度一般是 2%—3%,使用 30% 的氧气和 70% 的 NO 混合气体,维持量的浓度是 0.5%—1%。在国内目前普遍未有 halothane 麻醉的条件下,可选用水合氯醛、乌来糖。

5 术式的选择

5.1 插入深度 最初是将线栓从颈外动脉(ECA)插入,绕过颈总动脉(CCA)分叉处,进入颈内动脉(ICA),向远端行进通过颅底,遇到轻微阻力即不继续插,这时抵达 MCA 的起始部,阻断 MCA。从 CCA 分岔处计算插入深度,体重 300g 以上的动物约(18±0.5) mm。各家报道见附表。一般而言,插入深度超过 20 mm,有 2 种情况:线栓头直径太小,逾过 MCA 的起点,进入 ICA;线栓头刺破 Willis 环。插入深度短于 17 mm,可能是线栓头直径稍大,未能抵达 MCA 的起点。这种情

况可往回拔线栓,调整方向后再插或更换另 1 根线栓。

其后有作者对此作了改良,将线栓从 ECA 插入改为从 CCA 插入,因线栓是从 CCA 顺行进入 ICA,避开动脉分岔处的弯折,难度减小,操作变为简便。国内不少作者操作精细,不结扎 ICA 的分支翼腭动脉(PPA),简化程序,凭熟练的经验 and 良好的手感即可 1 次准确插入到位,15—20 分钟即可完成造模,使手术时间缩短。因为线栓阻断模型是阻断整个 ICA,所以 Kanemitsu 建议该模型称为 ICA 阻断模型^[8]。

5.2 阻断时间 因研究的目的不同,线栓的阻断时间为 0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h、3h 和 4h。Kastrup 的研究显示,阻断时间 $\geq 3h$,可以造成最大程度的梗死^[14]。阻断时间为 4h 时,可以造成脑组织更严重的囊性坏死和液化灶,运动功能几乎无改善,死亡率高^[7,18]。

5.3 “人道”处理伤口 缝合伤口前,拭干组织渗液,用局麻药软膏涂抹切口,减轻动物的疼痛。缝合后对合皮肤。

6 环境的控制

6.1 室温 应将室温控制在 20°C — 30°C ,以保证动物体温舒适,不因过冷、过热而使结果出现大的变化。寒冷的冬季,用灯泡照射的局部加热方法,因使动物受热不均,不用为宜。

6.2 光照 饲养时保持正常昼夜,明暗 12 小时交替^[18,21,22,27]。

6.3 饲养条件 自由饮水和进食颗粒食料。

7 线栓造模的形态、功能评价

线栓造模成功与否,怎样进行评价,近年的文章逐渐增加。从脑组织切片、MRI 影像^[14,27,28]和行为学^[24,28-30]的功能状态可以对线栓造模是否成功作出判断。MRI 对活体动物进行无创伤的连续观察,其优点是其他方法无可比拟。国内已开始动物活体 MRI 的研究。神经行为学的评定非常成熟,观察感觉运动和平衡能力:自发运动能力、翻正反射、水平棒实验、抓握反射、笼具倾斜 45° 的运动、体位放置反应、(视觉)识物反应。功能评定内容:检测足错误试验、双侧非对称试验、旋转器试验、Morris 水迷宫试验。Morris 水迷宫试验检测认知功能、学习能力^[24]。脑梗死后 23 周,神经行为学观察功能缺损仍然存在^[21]。

8 善待动物

动物的管理规定要求达到其福利。动物的存活时间是功能评价的前提,正确选择动物及“人道”地善待为人类做出贡献的动物,这些“朋友”将帮助研究者完成研究所需的数据采集。

9 缺点

线栓造模并非完美无缺,存在下列不足:①线栓造模过程是非直视下的手术,血流是否完全阻断不能即

刻得知。借助 LDF 实时进行监测局部血流量和 MRI 检测表观扩散系数(apparent diffusion coefficient, ADC),其判断准确率可以显著提高。②动物品系、体重、批次会影响结果。动物饲养条件好的单位所繁育的动物,可以使影响程度降低。③操作者的科研训练影响结果。严格的训练和足够例数的实践可以复制出稳定的结果。④血管破裂出血。操作不小心极易刺破血管或拔线栓时引起出血。轻柔、精细的操作可以减少血管破裂的发生。

10 小结

线栓造模的过程十分繁杂,要获得准确、可靠的结果,必须按照规范和标准严格进行。著名实验室所进行的造模研究,大都有数年的积累,系统规范。与实施人体手术一样,对照国际认可的手术造模的监测标准,国内还有许多基础工作需要补做。只有这样,所得结果才有说服力。在国家标准跟世界接轨之时,研究工作应按之实施,以保证我国的研究在世界范围内得到承认。必须重视严格控制生理变异,即使是体温、血压、血气或血糖的微小变化,都将对模型造成影响^[31]。

综上所述,尽管线栓造模的方法存在一些不足,但其可靠性得到认可,目前被广泛用于研究损伤的机制和药物评价,并被用于小鼠的造模^[32,33]。虽然线栓造模的操作有一定的难度,只要认真按照标准进行足够数量的动物实验,手术技巧可以达到炉火纯青。

[参考文献]

- [1] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. Jpn J Stroke, 1986, 8(1): 1—8.
- [2] Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [3] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurological examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472—476.
- [4] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20(8): 1037—1043.
- [5] Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats: which method works best[J]? Stroke, 1993, 24(2): 294—298.
- [6] Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, et al. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. Exp Brain Res, 1992, 89(1): 67—78.
- [7] 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[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2000, 26(3) : 232 - 242 .
- [8] 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 Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(10) : 1196 - 1204 .
- [9] 王伟. 严格控制实验条件, 建立标准化脑缺血模型[J]. *中华神经科杂志*, 1998, 31(5) : 261 - 263 .
- [10] 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[J]. *国外医学脑血管疾病分册*, 2001, 9(3) : 151 - 153 .
- [11] 廖维靖, 刘淑红, 范明, 等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良及讨论[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24(6) : 345 - 348 .
- [12] Kawamura S, Li Y, Shirasawa M, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion in rats using an intraluminal thread technique[J]. *Surg Neurol*, 1994, 41(5) : 368 - 373 .
- [13] Bialobok P, Cregan EF, Sydserff SG, et al. Efficacy of AR-R15896AR in the rat monofilament model of transient middle cerebral artery occlusion[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 1999, 8(6) : 388 - 397 .
- [14] Kastrup A, Engelhorn T, Beaulieu C, et al. Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood-brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. *J Neurol Sci*, 1999, 166(2) : 91 - 99 .
- [15] Sporer B, Martens KH, Koedel U, et al. L-arginine-induced regional cerebral blood flow increase is abolished after transient focal cerebral ischemia in the rat[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(10) : 1074 - 1080 .
- [16] Belayev L, Alonso OF, Busto R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model[J]. *Stroke*, 1996, 27(9) : 1616 - 1622 .
- [17] Wang L, Yushmanov VE, Liachenko SM, et al. Late reversal of cerebral perfusion and water diffusion after transient focal ischemia in rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(3) : 253 - 261 .
- [18] Manoonkitiwongsa PS, Jackson-Friedman C, McMillan PJ, et al. Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(10) : 1223 - 1231 .
- [19] Neumann-Haefelin T, Kastrup A, Del Crespigny A, et al. Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation[J]. *Stroke*, 2000, 31(2) : 1965 - 1972 .
- [20] Kuge Y, Minegami K, Yamaguchi T, et al. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(9) : 1655 - 1658 .
- [21] Hudzik TJ, Rorrelli A, Bialobok P, et al. Long-term functional end points following middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. *Pharmac Biochem Behav*, 2000, 65(3) : 553 - 562 .
- [22] Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, et al. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. *Stroke*, 1997, 28(10) : 2060 - 2065 .
- [23] Irving EA, Bentley DL, Parsons AA. Assessment of white matter injury following prolonged focal cerebral ischemia in the rat[J]. *Acta Neuropathol(Berl)*, 2001, 102(6) : 627 - 635 .
- [24] Modo M, Stroemer RP, Tang E, et al. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion[J]. *J Neurosci Methods*, 2000, 194(1) : 99 - 109 .
- [25] Aspey BS, Cohen S, Patel Y, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1998, 24(6) : 487 - 497 .
- [26] Aronowski J, Strong R and Grotta JC. Reperfusion injury demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(10) : 1048 - 1056 .
- [27] Palmer GC, Peeling J, Corbett D, et al. T₂-weighted MRI correlates with long-term histopathology, neurology scores, and skilled motor behavior in a rat stroke model[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2001, 939: 283 - 296 .
- [28] Peeling J, Corbett D, del Bigio MR, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: correlation between histopathology, T₂-weighted magnetic resonance imaging, and behavioral indices [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2001, 10(4) : 166 - 177 .
- [29] Chou IC, Trakht T, Signori C, et al. Behavioral/environmental intervention improves learning after cerebral hypoxia-ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(10) : 2192 - 2197 .
- [30] Roof RL, Schielke GP, Ren X, et al. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(11) : 2648 - 2657 .
- [31] Hossman KA. Experimental models for the investigation of brain ischemia[J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 39(1) : 106 - 120 .
- [32] 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 [J]. *Brain Res*, 1999, 833(2) : 181 - 190 .
- [33] Gursoy-Ozdemir Y, Bolay H, Saribas O, et al. Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2000, 31(8) : 1974 - 1981 .

(收稿日期: 2003-04-21)