论著

文章编号:1000-5404(2011)17-1798-05

电凝法制作大鼠脑卒中模型的改良研究

刘海朋[1],胡永波[1],张小东[2],王 娜[3],谢 鹏[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科[1];637000 南充,川北医学院附属医院神经内科[2];430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科[3])

[摘要] **目的** 对电凝制作大鼠脑卒中模型方法进行改良及评价。**方法** 将26只成年雄性SD大鼠(体质量200~300 g)分成5组:Tamura手术组、Tamura假手术组、改良手术一组、改良手术二组、改良假手术组。分别使用Tamura法和改良电凝法制作脑卒中模型。术后对大鼠神经功能缺损,脑梗死面积和部位进行评价。**结果** 与Tamura法比较,改良电凝法手术时间更短,术后大鼠没有出现颞下颌关节紊乱;改良手术一组大鼠没有出现明显的神经功能缺损,改良手术二组大鼠肢体瘫痪比较明显;改良手术一组大鼠脑梗死面积比较小,梗死范围局限于大脑皮层,改良手术二组梗死面积较大,梗死部位在基底节测区和大脑皮层。**结论** ①改良电凝法更加简便快速,对设备和操作技术要求更低,对大鼠其他损伤更小。②使用改良电凝法阻断大脑中动脉的不同部位,可以实现不同面积和部位的脑梗死、满足不同的实验条件和目的。

[关键词] 电凝法;动物模型;大脑中动脉闭塞;脑梗死;大鼠

[中图法分类号] R-332; R363.124; R743.3 [文献标志码] A

Improved electrocoagulation method for establishing rat cerebral apoplexy model

Liu Haipeng[1], Hu Yongbo[1], Zhang Xiaodong[2], Wang Na[3], Xie Peng[1] ([1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan Province, 637000; [3]Department of Neurology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province, 430022, China)

[**Abstract**] **Objective** To improve the electrocoagulation method for establishing a rat cerebral apoplexy model, and to evaluate the improved electrocoagulation method. **Methods** Rat cerebral apoplexy models were established with Tamura method and an improved electrocoagulation method separately. Twenty-six adult male Sprague-Dawley (SD) rats (body weights 200 to 300 g) were divided into five groups: a Tamura operation group, a Tamura sham-operation group (no middle cerebral artery occlusion), a first improved operation group (middle cerebral artery occlusion in position 1), a second improved operation group (middle cerebral artery occlusion in position 2), and an improved sham-operation group (no middle cerebral artery occlusion). After operation, the neurological deficit and cerebral infarction area and site of rats were tested. **Results** Compared with Tamura method, the improved electrocoagulation method had shorter operation time and did not induce temporomandibular joint disorder. No obvious neurological deficit was found in the rats of the first improved operation group, but obvious paralysis of limbs was found in the rats of the second improved operation group. The rats of the first improved operation group that had infarction confined in the cerebral cortex exhibited a smaller infarction area than the rats of the second improved operation group that had infarction in the cerebral cortex and lateral caudoputamen. **Conclusion** The improved electrocoagulation method is simpler and more efficient, has lower requirements for equipments and operation techniques, and causes less injury to rats. With middle cerebral artery occlusion at different sites, the improved electrocoagulation method can induce cerebral infarction in different areas and at different sites, and thus, is suitable for experiments with different conditions and purposes.

[**Key words**] electrocoagulation; animal models; middle cerebral artery occlusion; cerebral infarction; rats

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2009CB918300). Corresponding author: Xie Peng, Tel: 86-23-68485490, E-mail: xiepengcqmu@gmail.com

脑卒中发病率死亡率较高,全世界大约有1/6的人一生最少发生一次脑卒中[1]。脑卒中动物模型是研究人类脑血管病重要的手段和方法。脑卒中动物模型的创建和改进,历来是脑血管疾病科研工作者关注和研究的热点。一种简单、稳定、可重复性好、梗死面积均一的动物模型制作方法,有助于研究人类脑血管

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2009CB918300)

[通信作者] 谢 鹏,电话:(023)68485490,E-mail:xiepengcqmu@gmail.com

疾病的发病机制、转归和治疗。线栓法是目前应用最广泛的造模方法,但是线栓法制作的脑卒中大鼠,个体之间梗死面积差异较大,均一性不高[2],而且梗死面积大,死亡率高[3]。线栓模型和临床上少见的大面积、致死性,半球梗死的患者更加接近[4]。电凝法也是一种常用的造模方法,术后大鼠存活时间长,死亡率低,梗死面积较一致,均一性好,而且梗死面积相对较小,因此更加接近临床[4]。电凝法手术过程相对比较复杂,对操作人员的技术和设备都有一定的要求,如果对电凝法进行改进,将更加有利于其推广和应用于科学研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

普通级 SD 成年雄性大鼠 26 只,体质量 200 ~ 300 g,由重庆医科大学动物实验中心提供。大鼠适应性喂养 1 周,水和食物自由获得。动物房 12 h 明暗周期循环(7:00 ~ 19:00 开始光照),室温控制为(21 ± 2)℃,湿度为 60% 左右。26 只大鼠依据体质量随机分成 5 组,分别是 Tamura 术组 6 只、Tamura 假手术组 4 只、改良手术一组 6 只、改良手术二组 6 只、改良假手术组 6 只。

1.2 实验方法

改良手术组一阻断位置在"电凝位置 1",位于大脑下静脉(inferior cerebral vein, ICV)以上,大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)皮层"Y"型分支前约 2 mm。改良手术二组阻断位置在"电凝位置 2",为嗅束和 MCA 交界区(与 Yamamoto 等[5]的阻断位置一致)。Tamura 手术组采用 Tamura 法[4],改良手术组采用改良电凝法制作脑卒中模型,假手术组采用相应的手术方法,但是不凝断 MCA。SD 大鼠 MCA 和其他主要动脉的解剖定位见图 1,改良手术一组和改良手术二组 MCA 凝断位置见图 2。

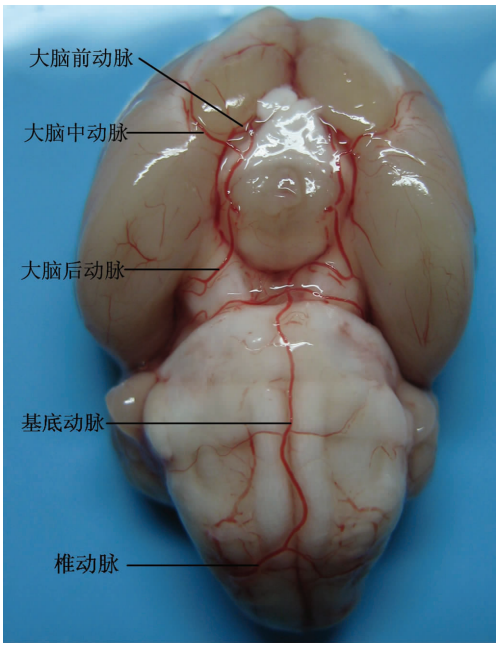


图 1 SD 大鼠 MCA 和其他主要动脉的解剖定位

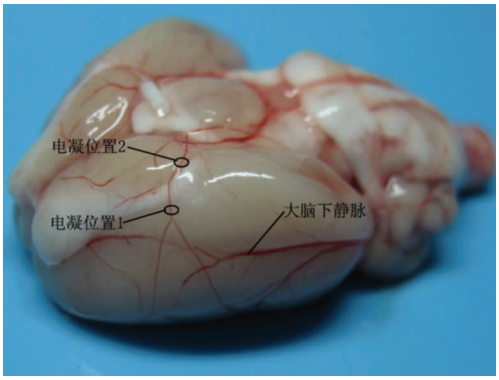
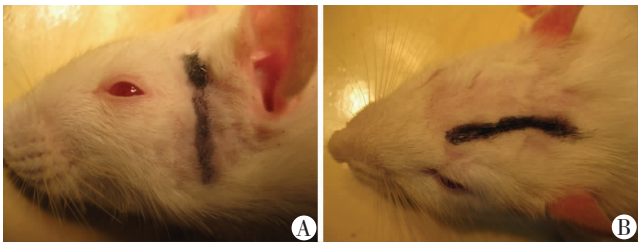


图 2 改良手术一组和改良手术二组 MCA 凝断位置

1.2.1 Tamura 法制作脑卒中模型 大鼠使用 3.5% 水合氯醛麻醉,剂量为 1 ml/100 g。在左侧眼和耳连线的中点做一垂直切口,长 1.5 ~ 2.0 cm(图 3A)。将大鼠侧卧位放置在 SXP-1C 手术显微镜(上海医疗器械股份有限公司,上海)下进行显微外科手术。具体手术过程与 Tamura[4] 方法完全一致。最终颅底找到 MCA 进行凝断。后用吸收性明胶海绵(金陵药业股份有限公司,南京)覆盖,缝合皮肤。腹腔注射青霉素 4 万单位预防感染,使用 HSS-1(B)恒温浴槽(成都仪器厂,成都)进行保温,直至清醒。Tamura 法假手术组手术过程同上,但是不凝断 MCA。

1.2.2 改良电凝法制作脑卒中模型 动物麻醉后,俯卧位,使用 SN-3 型脑立体定位仪(NARISHIGE,日本)固定头部。在头顶正中左侧旁开 0.3 cm 的位置做一切口(图 3B),并分离皮肤。在颞肌和顶骨的交界处,用手术刀在颞肌上做一纵向切口,使用刀柄将颞肌从颅骨上剥离,并使用自制拉钩固定,暴露颞窝。为了防止热和钻头伤及硬脑膜或者大脑皮层,使用生理盐水冷却的颅骨钻在鳞状骨前部打孔,不要打穿,留有一薄层骨,使用镊子夹取出,使用小咬骨钳向前下方扩大骨窗,注意不要破坏硬脑膜。在大脑皮层表面,大概在左眼和右耳的连线上,可以看到向前外上走行的 MCA。使用玻璃分针轻轻上抬大脑,使 MCA 暴露更加充分。使用 932 型电热烧灼器(上海医疗器械股份有限公司,上海),调整好温度(温度太高易灼伤大脑,温度太低不能完全阻断 MCA 血流),分别在"电凝位置 1"和"电凝位置 2"(图 2)对 MCA 进行凝断。结束后,使用明胶海绵覆盖,逐层缝合,并进行预防感染和保温。改良假手术组除了不凝断动脉外,其余手术过程同上。



A:Tamura 法;B:改良法

图 3 Tamura 法和改良法电凝大鼠脑卒中模型的手术切口位置

1.3 脑组织染色

术后 2 d,大鼠断头取脑。脑组织使用 1% 的 TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑;BBI,加拿大)染色,染色液使用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液配制。整脑直接使用 TTC 染色液进行染色。脑片染

色时,先把脑组织放在-20℃冰箱进行短暂的冷冻,然后使用自制脑槽进行切片,脑切片厚度为2 mm,随后再进行染色。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件,多样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法。

2 结果

2.1 成功率和死亡率

手术过程中,Tamura假手术组和改良手术二组各有一只大鼠死亡(死亡原因可能是麻醉剂过量,或者是喉部分泌物过多所致),随后使用同批次大鼠补充。在使用颅骨钻钻孔,或使用咬骨钳扩大孔径时,Tamura手术组和改良手术二组各有一只大鼠的硬脑膜遭到破坏,导致手术失败。术后2 d,各组大鼠恢复良好,没有出现动物死亡。

2.2 手术时间对比

使用单因素方差分析对手术时间进行分析,结果差异明显[$F(2,17)=6.303$, $P<0.01$]。与Tamura手术组相比,改良手术一组(LSD;$P<0.05$)和改良手术二组(LSD;$P<0.05$)的手术时间均比较短。改良手术一组和改良手术二组之间没有明显的差异(表1)。

表1 Tamura法和改良法制作脑卒中大鼠模型的整体评价

组别	n	手术成功(例)	术后死亡(例)	手术时间[$(\bar{x}\pm s)$min]	颞下颌关节紊乱(例)	longa评分(分)	霍纳征
Tamura手术组	6	5	0	44.0±7.3	4	0	0
Tamura假手术组	4	–	0	–	2	0	0
改良手术一组	6	6	0	26.0±4.5[a]	0	0	0
改良手术二组	6	5	0	29.0±5.2[a]	0	1.6	0
改良假手术组	4	–	0	–	0	0	0

a:$P<0.05$,与Tamura手术组比较

2.3 术后大鼠状态评价

术后大鼠恢复良好,但是Tamura手术组有4只,Tamura假手术组有2只大鼠的低位门齿发生了轻微的向手术对侧的侧移位,出现了颞下颌关节紊乱,进食和咀嚼食物受到了一定的影响。术后5组大鼠的手术侧眼睛均无明显的霍纳征。

2.4 肢体功能评价

术后24 h,采用longa评分[3]对各组大鼠肢体功能进行评价。改良手术二组大鼠出现了明显的手术对侧肢体瘫痪(表1),但是改良手术一组和Tamura手术组均没有大鼠出现明显的肢体功能障碍。两假手术组大鼠同样无明显的神经功能缺损。

2.5 梗死的面积和部位

Tamura手术组和改良手术组大鼠大脑均表现了明显的梗死。两个假手术组大鼠手术过程中,大脑皮层虽受到轻微的损伤,但是缺血损害很容易和手术所致的局部皮层损害区别开来(图4)。从侧面看,改良手术一组的梗死面积明显的小于改良手术二组。从脑片看,改良手术一组脑组织梗死局限于电凝周围的大脑皮层,基底节没有明显的梗死。改良手术二组大脑梗死部位在基底节测区和大脑皮层(图5)。

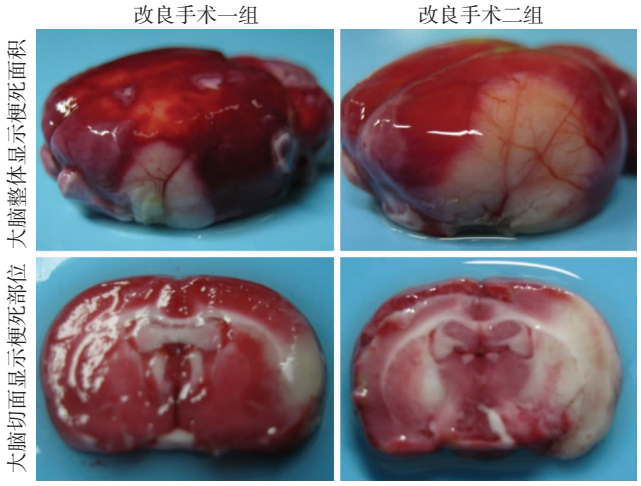


图5 改良手术一组和改良手术二组梗死面积和部位的对比

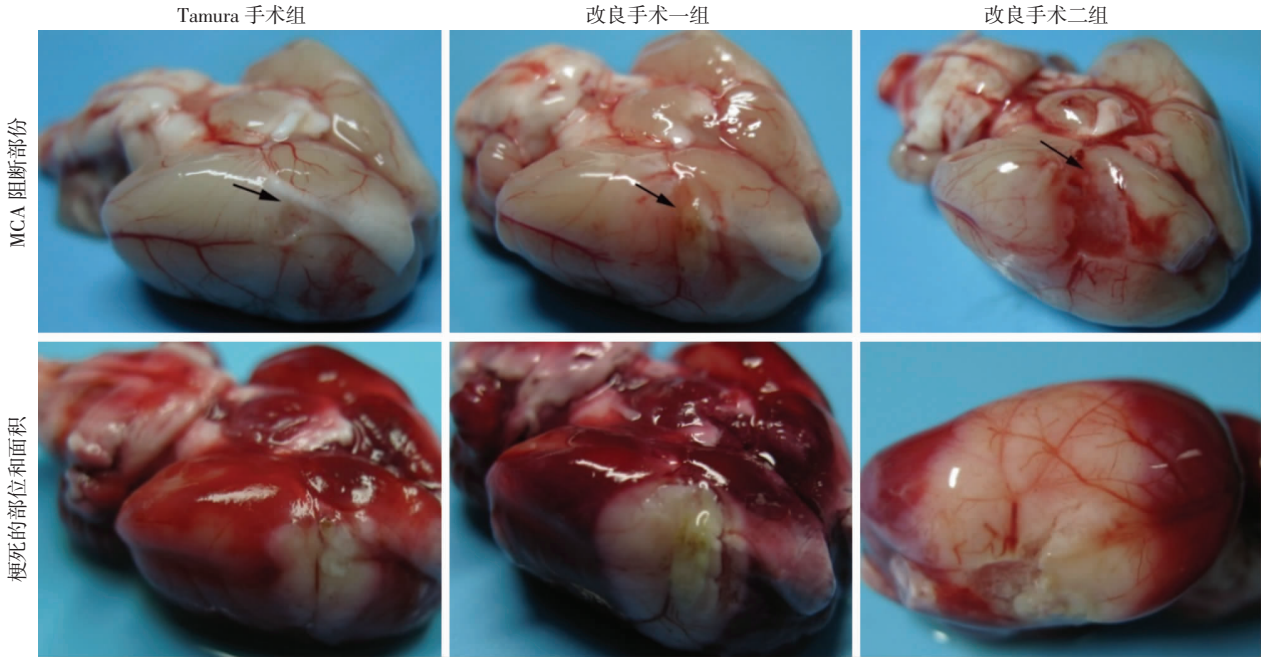


图4 Tamura组、改良手术一组、改良手术二组MCA阻断部位和梗死部位对比(↑:示MCA阻断部位)

3 讨论

从一开始,人类对脑卒中模型的探索就不曾停歇。1951年开始出现在狗身上使用开颅法制作脑卒中模型[6],最近有报道使用猪制作开颅脑卒中模型[7]。大鼠脑部血管有大脑前动脉(anterior cerebral artery, ACA)、大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)、大脑后动脉(posterior cerebral artery, PCA)(图1),血管有皮层和穿通动脉分支,因此大鼠的血液循环和人有很大的相似性[4,8],加上使用大鼠比较经济,所以此后脑卒中模型普遍采用大鼠作为研究对象。

动物脑卒中的方法大体分为开颅法和非开颅法[9]。大鼠脑卒中模型较早是在1981年,由Tamura等[4]采用开颅电凝的方法来制作,随后Bederson等[10]把电凝法加以推进。1989年longa等[3]的线栓法开创了非开颅法制作脑卒中模型的新纪元,随后线栓法不断完善,并被广泛地使用。Longa评分[3]也成为神经功能缺损经典的评分方法。

目前电凝法也仍然被广泛使用[11-12]。国内外的研究者一般使用Tamura法[4]或Bederson法[10]制作电凝脑卒中模型。这两种方法均是选择眼和耳的中间作为手术入路,要损伤颞部肌肉及其周围的血管和神经,并且术后大鼠易出现颞下颌关节紊乱等手术并发症[13],加上颞部咀嚼肌受损,有些大鼠甚至出现进食困难。传统电凝法大鼠需要侧卧位,普通脑立体定位仪无法使用,而且需要借助手术显微镜完成手术。改良电凝法采用俯卧位,头部固定容易,选择颅顶作为手术入路,可以直接把颞肌从颅骨上剥离,无需去除颧骨和切除颞肌,也避免了损伤颞肌周围的神经、肌肉和血管,对大鼠的损伤较小,术后没有颞下颌关节紊乱和进食困难,同时手术时间也大为缩短。

5组动物模型的大鼠,手术侧眼睛均没有明显的霍纳征出现。在许多线栓模型和有些电凝模型中[14-15],研究者把是否出现霍纳征作为判断脑卒中模型是否成功的标准。霍纳征可能是由于线栓法分离颈部动脉时,周围的植物神经受到刺激或者损伤所致,而不应该用其来判断脑卒中模型是否成功。

国内许多研究者使用电凝法制作脑卒中模型没有具体指出MCA阻断的部位[16-17]。本实验使用改良电凝法,在"电凝位置1"阻断MCA,梗死部位仅局限于大脑皮层(感觉皮层的较低区域),运动皮层和基底节没有受到损害,因此大鼠没有出现肢体瘫痪,此结果与前人的研究结果一致[13,18-19]。但是国内有研究者在"电凝位置1"(介于嗅束和ICV之间的MCA)凝断MCA后,动物表现出明显的肢体瘫痪[16,20-21],和本实验结果不一致。在"电凝位置2"阻断MCA,梗死部位不仅有感觉皮层,而且有基底节侧区,因此大鼠肢体瘫痪比较明显,这与前人的结果同样一致[18,5]。在MCA起始部和嗅束之间,MCA分出了几条穿通动脉,供应基底节血液[4]。因此在嗅束附近阻断MCA,影响了穿通动脉对基底节的供血,导致基底节侧区也出现了明显的梗死。在"电凝位置1"之后,MCA仅供血给大脑皮层,因此阻断后仅表现为皮层梗死。大脑的ACA, MCA, PCA存在许多远端吻合支(anastomotic junctions)[22],是脑梗死后侧枝循环的主要组成部分。在"电凝位置1"阻断MCA,侧枝循环开放,所以血管远端没有明显梗死。国内学者利用嗅束和ICV为界线,把MCA分为三段[23],"电凝位置2"位于MCA起始段和中段的交界处,"电凝位置1"位于MCA中段。这两篇文献均认为MCA中段是阻断的最佳位置[23],但是忽略了阻断MCA中段后,仅有小面积的皮层梗死,而且有大鼠肢体无明显瘫痪的缺点。

Bederson等[10]使用电凝法完全阻断MCA起始部后,脑梗死率仅有13%,而且87%的大鼠没有出现肢体瘫痪,也无动物死亡。线栓法也是阻断MCA起始部,但线栓法容易造成大面积的脑梗死,大鼠的肢体功能瘫痪比较明显,死亡率也比较高[3]。线栓法和电凝法同样是阻断MCA起始部,但是结果相差甚远。ACA、MCA、PCA是颈内动脉(internal carotid artery, ICA)的直接分支。线栓从ICA插入,不但阻断了MCA血流,也可能干扰了PCA血流[2],及其ACA血流,导致ACA、PCA与MCA的远端吻合支血流减少,侧枝循环受到影响。所以和电凝法相比,线栓法易造成更大面积的脑梗死。国内也有研究者证实,干扰ACA和PCA血流能够提高线栓法的成功率[24]。所以线栓法可能干扰了整个大脑半球的血液循环,因此线栓模型和临床上少见的大面积、致死性,半球梗死的患者更加接近[4]。与线栓法比较,电凝模型更加接近临床,而且可以通过阻断MCA不同的位置,实现不同面积,不同部位的脑梗死,可以满足不同的实验目的。

总之,和线栓法相比,电凝法拥有阻断MCA更加直观可靠,梗死面积和部位可以人为控制,梗死面积均一性好,大鼠的存活率高,制作的模型临床模拟度好等优点。但是电凝法也存在需要开颅,改变了颅内压,无法实现再灌注,手术过程比较复杂,对大鼠的损伤较大,同时对设备的要求也较高等缺点。使用改良电凝法,在某种程度上减少了传统电凝法的某些缺点,更加有利于电凝法的推广和应用于科学研究。

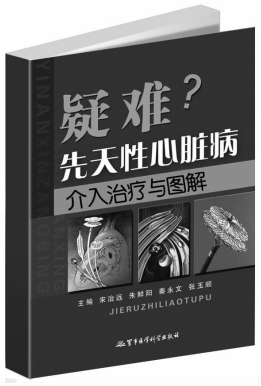
参考文献:

[1] Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, *et al*. The lifetime risk of

stroke: estimates from the Framingham Study[J]. Stroke, 2006, 37(2): 345-350.
[2] Memezawa H, Minamisawa H, Smith M L, *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.
[3] Longa E Z, Weinstein PR, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
[4] Tamura A, Graham D I, McCulloch J, *et al*. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1981, 1(1): 53-60.
[5] Yamamoto M, Tamura A, Kirino T, *et al*. Behavioral changes after focal cerebral ischemia by left middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Brain Res, 1988, 452(1/2): 323-328.
[6] Harvey J, Rasmussen T. Occlusion of the middle cerebral artery; an experimental study[J]. AMA Arch Neurol Psychiatry, 1951, 66(1): 20-29.
[7] Imai H, Konno K, Nakamura M, *et al*. A new model of focal cerebral ischemia in the miniature pig[J]. J Neurosurg, 2006, 104(2 Suppl): 123-132.
[8] Yamori Y, Horie R, Handa H, *et al*. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans[J]. Stroke, 1976, 7(1): 46-53.
[9] 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.
[10] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, *et al*. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
[11] Hisaki H, Okazaki T, Kubota M, *et al*. L-PDMP improves glucosylceramide synthesis and behavior in rats with focal ischemia[J]. Neurol Res, 2008, 30(9): 979-984.
[12] 槐雅萍, 杨永轩, 贾子善, 等. 探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质巢蛋白及突触素表达的影响[J]. 中国全科医学, 2010, 13(5): 501-505.
[13] Coyle P. Middle cerebral artery occlusion in the young rat[J]. Stroke, 1982, 13(6): 855-859.
[14] 谭县辉, 曲宏达, 彭康, 等. 补阳还五汤对缺血性脑卒后遗症大鼠神经增殖作用的影响[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(2): 189-192.
[15] 马向阳, 贾子善, 槐雅萍, 等. 探索学习对局灶性脑梗死大鼠学习记忆和新生血管的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(12): 1086-1088.
[16] 槐雅萍, 杨永轩, 贾子善, 等. 探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质巢蛋白及神经生长因子表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(11): 977-980.
[17] 王中琳. 首乌仙海片对缺血性卒中模型大鼠脑组织 GFAP、GAP-43 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(8): 537-539, 560.
[18] Butcher S P, Bullock R, Graham D I, *et al*. Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1990, 21(12): 1727-1733.
[19] Chen S T, Hsu C Y, Hogan E L, *et al*. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction[J]. Stroke, 1986, 17(4): 738-743.
[20] 朱美玲, 彭爱军, 那晓东, 等. 脐血有核细胞移植治疗脑卒中的动物实验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(33): 6629-6632.
[21] 贾子善, 李阔, 槐雅萍, 等. 不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(7): 578-580.
[22] Coyle P, Jokelainen P T. Dorsal cerebral arterial collaterals of the rat[J]. Anat Rec, 1982, 203(3): 397-404.
[23] 张成英, 陈前芬, 田鹤村. 用大鼠制作脑缺血模型血管阻断部位的选择[J]. 四川解剖学杂志, 2002, 10(1): 12-16.
[24] 张成英, 陈传好, 邵正仁, 等. 大鼠颈内动脉的解剖及其在脑缺血模型中的应用[J]. 解剖学杂志, 2002, 25(6): 581-583.

(**收稿**:2011-02-23;**修回**:2011-05-25)
(编辑 栾 嘉)

欢迎订购《疑难先天性心脏病介入治疗与图解》



由宋治远、朱鲜阳、秦永文、张玉顺等教授主编的《疑难先天性心脏病介入治疗与图解》已于2011年1月由军事医学科学出版社正式出版。该书编者均为国内一流先天性心脏病介入治疗专家,具有丰富的临床经验,总结了临床常见及少见的疑难先天性心脏病介入治疗方法。全书共10章,收集了各种疑难先天性心脏病180例患者的800余幅影像资料,系统介绍了室间隔缺损、房间隔缺损、动脉导管未闭、主动脉缩窄以及复合畸形等复杂先天性心脏病介入治疗操作技巧与经验教训。本书贴近临床、图文并茂、形象具体、通俗易懂,既有临床操作技巧,又有经验教训分享,是一本难得的具有先进水平的临床参考书,相信会成为广大先天性心脏病介入治疗医师的良师益友。

本书定价198.00元,如需购买请与本刊编辑部联系。

联系人:王 红 **电话**:(023)68752189-84

E-mail:whong@mail.tmmu.com.cn