技术创新

建立与青年大鼠神经功能损伤程度相同的老年大鼠大脑中动脉阻塞模型

李祥龙[1,2]，陈香州[1]，雷围程[1]，李立东[1]，李　尧[3]，杨福兵[1]，杨晓波[1,2]
1.西南医科大学附属医院 神经外科（泸州 646000）；2.四川省神经外科临床研究中心（泸州 646000）；3.西南医科大学 科技处（泸州 646000）

【摘　要】目的 建立青年、老年两个年龄组大鼠神经功能损伤程度相同的大脑中动脉阻塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型，以避免因动物模型偏倚引起的脑缺血药物疗效及毒理学机理等研究的实验结果不准确。**方法** 采用雄性SD大鼠，首先通过实验探索适合老年大鼠的线栓型号后，大鼠被随机分为4组：青年假手术组（n = 20），老年假手术组（n = 20），青年MCAO组（n = 20），老年MCAO组（n = 20）。建立青年MCAO组、老年MCAO组大鼠神经功能损伤程度相同的MCAO 模型。通过改良的神经功能评分（mNSS）、角测试评估、梗死区细胞凋亡情况评估大鼠脑损伤情况。**结果** 青年大鼠选用线栓型号为硅胶头直径0.32 mm、插入深度（18 ± 2）mm，老年大鼠线栓型号为硅胶头直径0.43 mm，插入深度（22 ± 2）mm。通过调整线栓位置，当青年大鼠局部脑血流量（regional cerebral blood flow，rCBF）为基线血流的15%、老年大鼠rCBF为基线血流的25%时，二者术后3 d内神经功能损伤水平差异无统计学意义（P > 0.05），梗死区域细胞凋亡程度相同（P > 0.05）。**结论** 通过调节大鼠rCBF能控制脑损伤程度，从而可建立青年、老年神经功能损伤程度相同的大鼠MCAO模型，用于脑缺血的相关研究，以避免因动物模型偏倚引起的脑缺血药物疗效及毒理学机理等研究的实验结果不准确。

【关键词】大脑中动脉阻塞；脑缺血；老年；脑血流；中风
【中图分类号】R743.33　　**文献标志码**　A　　DOI:10.3969/j.issn.2096-3351.2023.03.006

Establishment of a MCAO model in aged rats with the same degree of neurological impairment as in young rats

LI Xianglong[1,2], CHEN Xiangzhou[1], LEI Weicheng [1], LI Lidong[1], LI Yao[3], YANG Fubin[1], YANG Xiaobo[1,2]
1.*Department of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*; 2.*Neurosurgical Clinical Research Center of Sichuan Province, Luzhou 646000, China*; 3.*Department of Science and Technology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*

【Abstract】Objective Establishment of a middle cerebral artery occlusion (middle cerebral artery occlusion, MCAO) model in both young and aged rats with equivalent levels of neurological impairment, in order to avoid inaccurate experimental results of drug efficacy and toxicology caused by bias in animal models of cerebral ischemia. **Methods** Male Sprage-Dawley rats were used in this study. After exploring the suitable suture for aged rats, the rats were randomly divided into 4 groups: Young sham group (n = 20), Aged sham group (n = 20), Young MCAO group (n = 20), and Aged MCAO group (n = 20). The MCAO model with the same degree of neurological impairment was established in the Young MCAO group and the Aged MCAO group. Brain injury was evaluated by modified neurological function score (mNSS), Angle test and assessment of apoptosis in the infarct area. **Results** In young rats, the diameter of the silicone tip was 0.32 mm and the insertion depth was (18 ± 2) mm. In aged rats, the diameter of the silicone tip was 0.43 mm and the insertion depth was (22 ± 2) mm. By adjusting the suture position, when local cerebral blood flow (rCBF) was 15% of the baseline blood flow in young rats and 25% of the baseline blood flow in aged rats, there was no significant difference in the level of neurological injury within 3 days after operation (P > 0.05), and the degree of apoptosis in the infarcted area was equal (P > 0.05). **Conclusion** By regulating rat rCBF, it is possible to control the degree of brain damage and establish a rat MCAO model with the same level of neurological function damage in young and old rats, which can be used for related research on cerebral ischemia. This helps to avoid inaccurate experimental results of drug efficacy and toxicology mechanisms caused by bias in animal models of cerebral ischemia.

【Key words】Middle cerebral artery occlusion; Cerebral ischemia; Aged; Cerebral blood flow; Stroke

脑梗塞是老年人群常见疾病，是人类最常见的致残原因。大脑中动脉阻塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型是研究脑缺血性中风的常见动物模型[1-2]，主要用于探索发病机制及新药研发。

在青老年两个年龄组之间的动物对照性实验已经用于一些药物的研发。遗憾的是，在这些对照实验中，

基金项目：四川省科技厅计划项目（2020YJ0188）；西南医科大学校级课题（2018-ZRQN-120）
通信作者：杨晓波，E-mail：xbyang710@swmu.edu.cn
引用本文：李祥龙，陈香州，雷围程，等. 建立与青年大鼠神经功能损伤程度相同的老年大鼠大脑中动脉阻塞模型[J]. 西南医科大学学报，2023，46(3)：213-216. DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2023.03.006

两组动物模型的脑损伤程度不一致导致了一些干预措施或治疗效果的评估结果不准确。因此，一些在动物实验中效果良好的药物进入临床试验后，效果不尽人意[3-4]，动物模型的偏倚大大浪费了研发资源。本研究通过调整脑血流量的方法[5-6]，控制大鼠脑损伤程度，从而建立一种与青年大鼠神经功能损伤程度一致的老年大鼠MCAO模型。用在青年、老年组之间的对照实验，研究药物疗效及毒理学机理等，避免了因动物模型偏倚引起的实验结果不准确。

1 实验动物与方法

1.1 实验动物

青年雄性SPF级SD大鼠（2月龄，280～300 g）及老年雄性SPF级SD大鼠（20～22月龄，750～800 g）被饲养在湿度（63%～65%）及温度（23～25 ℃）适宜的环境里，定时喂养。在实验中，使用专用动物麻醉装置（R540，瑞沃德，中国）通过异氟烷吸入麻醉大鼠。所有实验流程都获得西南医科大学附属医院伦理委员会审批通过（编号：KY2017035）。

1.2 通过实验确定老年大鼠线栓规格

本研究中的MCAO模型制作是参考LONGA和KUTLUAY报道的方法[7-9]。线栓经右侧颈总动脉分叉处‘*a*’点插入颈内动脉直至大脑中动脉起点‘*b*’，从而阻断大脑中动脉的血流。参考已有研究，该实验中青年大鼠的线栓硅胶头直径和插入深度‘*ab*’分别是0.32 mm和（18 ± 2）mm[8-10]。通过解剖15只老年大鼠头颅，测得‘*ab*’长度为（22 ± 2）mm，见图1A。为了获得线栓硅胶头直径大小，本研究纳入30只老年大鼠，采用不同硅胶头直径建立3组MCAO模型：0.32 mm组，0.43 mm组，0.52 mm组。通过术后第3 d TTC染色，结果提示，0.52 mm组大鼠脑梗死严重（45.9 ± 5）%，0.32 mm组脑梗死不明显（0 ± 1）%，0.43mm组脑梗塞面积为（16.2 ± 8）%，见图1B。术后7 d内大鼠生存率统计提示0.52 mm组大鼠死亡率为80.2%，明显高于0.43 mm组大鼠（29.6%），见图1C。因此，0.43 mm硅胶头更适合用于老年大鼠MCAO模型，用于后续实验。

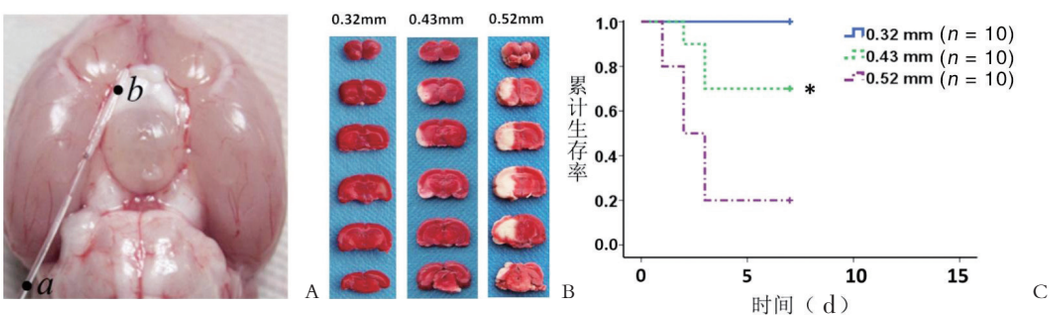


图1 不同型号线栓引起老年大鼠脑梗死情况

Figure 1 Degree of cerebral infarction caused by different size of suture in aged rat

注：*表示与0.52 mm组比较，$P < 0.05$。

1.3 建立与青年大鼠神经功能损伤程度一致的老年大鼠MCAO模型

大鼠被随机分为4组：青年假手术组（$n = 20$），老年假手术组（$n = 20$），青年MCAO组（$n = 20$），老年MCAO组（$n = 20$）。青年MCAO组大鼠在显微镜下被分离右侧颈动脉，并用动脉瘤夹夹闭颈总动脉，将线栓硅胶头直径0.32 mm、插入深度（18 ± 2）mm插入右侧大脑中动脉起始部，老年MCAO组采用线栓硅胶头直径0.43 mm、插入深度（22 ± 2）mm插入右侧大脑中动脉起始部，线栓均在1 h后取出。青年假手术组、老年假手术组行颈总动脉解剖暴露，用动脉瘤夹夹闭10 s后松开，不塞入线栓[11]。收缩压（systolic blood pressure，SBP）、pH值、动脉血氧分压（PaO_2）、二氧化碳分压（$PaCO_2$）、血糖值在整个造模操作中持续监测。

右侧大脑中动脉供血区皮质的局部脑血流量（regional cerebral blood flow，rCBF）通过激光多普勒血流仪（Module LDF100c Biopac Systems，Inc.，USA）持续监测[12-13]。在大脑中动脉阻塞前、阻塞后即刻开始分别监测5 min，阻塞前的rCBF值作为基线值，阻塞后的rCBF值与基线值的比值作为阻塞后脑血流量，以此用于统计分析。激光多普勒血流仪探头通过一个头皮切口放置于青年大鼠右侧冠状缝后方2 mm，旁开6 mm处（老年大鼠为右侧冠状缝后3 mm，旁开8 mm）[14-15]，通过调节线栓位置控制rCBF值。

1.4 损伤程度的一致性评价

术前、术后第1、3、7、21 d作为神经功能评价的时间点，用改良的神经功能评分（modified Neurology Severity Score，mNSS）、角测试评估大鼠神经功能损伤情况[16-18]。mNSS采用18分评分系统，主要从运动、感觉、平衡、反射四方面评价，分数越高损伤越重。角测试中，将大鼠放在成30°夹角的两块木板间，大鼠爬进夹角后转弯爬出，正常大鼠从左侧或右侧爬上木板，而脑缺血损伤的大鼠则偏向于从非瘫痪侧（本实验中为右侧）爬上木板，然后转头返回出口。每只大鼠重复检测10次，从右侧转向的次数记为R，从左侧转向的次数记为L，因此R + L = 10，而R/R + L则表示大鼠的瘫痪程度，值越大表示瘫痪越严重，值越小表示瘫痪越轻微。

通过TUNEL试剂盒（Roche Applied Science，Ger-

many）检测建模后第3 d缺血损伤区细胞死亡的情况[19-21]。大鼠脑标本在切片机上切为6 μm厚度的切片用于检测，共聚焦荧光显微镜下，通过Image-Pro Plus 6.0（Media Cybernetics，USA）系统计数细胞及采集图片，每张切片取6个视野计数TUNEL-阳性细胞。

1.5 统计学分析

使用SPSS 23.0统计学软件分析数据，连续性变量资料以$\bar{x} \pm s$表示，通过单因素方差分析进行组间比较，用log-rank 检验进行生存率比较。以$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

通过调节线栓深度，大鼠rCBF被控制在一个稳定的水平，青年大鼠调节为基线血流的（15 ± 3）%，老年大鼠调节为基线血流的（25 ± 2）%，见图2。

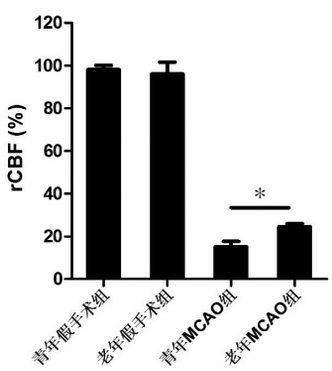


图2 各实验组大鼠的rCBF值

Figure 2 rCBF values of rats in each experimental group

注：青、老年MCAO组rCBF明显低于青、老年假手术组，青年MCAO组rCBF明显低于老年MCAO组。*表示$P < 0.05$。

通过mNSS及角测试，MCAO大鼠神经功能在脑缺血后第1 d和第3 d损伤明显，且青年MCAO组与老年MCAO组差异无统计学意义（$P > 0.05$），随后大鼠神经功能开始恢复，但老年大鼠比青年大鼠恢复慢，21 d时，老年MCAO组神经功能比青年MCAO组差，见图3。

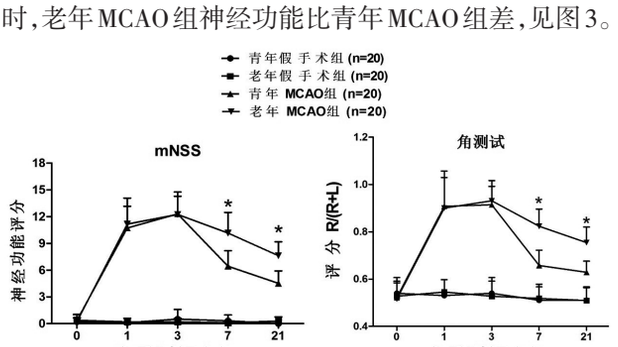


图3 mNSS及角测试对大鼠的神经功能评估

Figure 3 Neurological function of rats was evaluated by mNSS and Corner test

注：两组方法均显示MCAO组大鼠在术后第1 d、第3 d神经功能缺失最明显，且青年MCAO组与老年MCAO组差异无统计学意义（$P > 0.05$）。

术中监测显示，4个实验组大鼠的SBP、pH值、PaO_2、$PaCO_2$、血糖值在MCAO术前、术后无明显波动，差异无统计学意义（$P > 0.05$），见表1。

表1 各组大鼠术中生理参数对比

Table 1 Comparison of physiological parameters in each group during operation

组别	收缩压（mmHg）	pH	PaO_2（mmHg）	$PaCO_2$（mmHg）	葡萄糖（mmol/L）
Ⅰ组					
术前	104 ± 11	7.39 ± 0.04	97 ± 3	39 ± 4	6.3 ± 2.0
术后	105 ± 10	7.40 ± 0.05	96 ± 6	42 ± 2	5.8 ± 1.7
Ⅱ组					
术前	109 ± 14	7.36 ± 0.03	96 ± 7	43 ± 5	5.8 ± 1.0
术后	112 ± 12	7.42 ± 0.04	95 ± 3	42 ± 3	6.3 ± 2.7
Ⅲ组					
术前	109 ± 14	7.38 ± 0.06	93 ± 6	40 ± 4	6.6 ± 2.2
术后	115 ± 15	7.36 ± 0.06	91 ± 5	40 ± 3	6.0 ± 1.8
Ⅳ组					
术前	113 ± 16	7.38 ± 0.04	98 ± 3	39 ± 5	5.6 ± 1.1
术后	116 ± 16	7.37 ± 0.06	96 ± 7	41 ± 5	6.8 ± 2.0

注：Ⅰ、Ⅱ组为青年、老年假手术组；Ⅲ、Ⅳ组为青年、老年MCAO组。

TUNEL试剂盒检测结果显示，在缺血损伤后第3 d，青年MCAO组、老年MCAO组脑梗死区域的细胞死亡率（青年MCAO组为31%，老年MCAO组为32%）差异无统计学意义（$P > 0.05$），见图4。

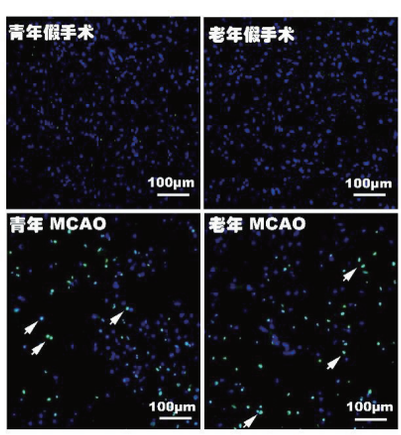


图4 大鼠脑梗塞区域细胞死亡情况

Figure 4 Cell death in cerebral infarction area of rats

注：假手术组大鼠无明显细胞死亡，青年MCAO组、老年MCAO组细胞死亡率差异无统计学意义（$P > 0.05$）。箭头所示为TUNEL—阳性细胞。

3 讨论

啮齿类动物MCAO模型由于其操作简便、成本低廉，被广泛用于脑缺血疾病的研究[22-24]。该模型能模拟人类缺血性脑中风的病理生理过程，且脑缺血损伤程度可控，无需开颅操作避免了脑组织机械性损伤[14,25-26]，减少了动物模型导致的实验结果偏倚。然而，现有的研究多数都使用的青年啮齿类动物，特别是在青老年群体对比性研究中，缺乏两年龄段损伤程度一致的模型，导致实验结果评估不准确。人脑缺血性中风后，脑水肿在发病后3 ~7 d内最严重，神经功能缺失也最明显[27]，这反映了早期脑损伤的严重程度，直接决定后期神经功能的恢复情况。本文建立青年、老年

两年龄组大鼠神经功能损伤一致的MCAO模型，能模拟人脑3～7 d神经功能缺失最严重的状态。该模型可用于早期药物干预效果及机制研究，直接观察干预手段对两个年龄组个体的作用差异及其机理，避免两组模型损伤程度差异造成的结果偏倚。

在本研究中，通过调节rCBF控制脑缺血损伤程度，建立青年、老年两年龄组大鼠术后3 d内神经功能损伤程度一致的MCAO模型，克服了以往研究中该模型的缺点。本研究分两部分完成，线栓硅胶头直径和插入深度是最关键的参数，以往研究中没有相关文献，第一部分实验通过探索获得了较为理想的老年大鼠线栓相关数据：硅胶头直径0.43 mm，插入深度为（22±2）mm。第二部分实验中，通过调节rCBF，建立两年龄组损伤程度相同的MCAO模型。

以前研究报道，在青年大鼠MCAO模型中，rCBF一般降低至基线值的30%可以获得比较合适的脑损伤程度[14-15]。本研究通过调整线栓的位置来控制rCBF大小，结果发现，在两个年龄组中，不同的rCBF可以获得一致的神经功能损伤程度，可能是青年大鼠比老年大鼠有更强的脑缺血代偿能力所致。结果显示青年及老年MCAO组大鼠在手术后1、3 d神经功能损伤严重，且程度一致，之后开始逐渐恢复，老年大鼠恢复更差。青年假手术组、老年假手术组rCBF分别降低为基线值的94.9%、92.5%，可能是颈动脉夹闭后血管痉挛所致。术中生命体征持续监测结果显示SBP、pH、PaO_2、$PaCO_2$、血糖值在线栓插入前后无明显差异，提示该实验中线栓型号合适，能在维持稳定的生命体征前提下获得理想的脑梗塞程度。在缺血损伤后第3 d，TUNEL检测发现青年MCAO组与老年MCAO组脑梗死区域的细胞死亡率相同，证明本研究方法能在病理层面做到损伤程度一致，为以后脑中风机制研究提供了参考依据。

4 结论与启示

本研究成功建立了神经功能损伤程度相同的青年、老年大鼠MCAO模型，可避免因动物模型偏倚引起的脑缺血药物疗效及毒理学机理等研究的实验结果不准确。但本研究中使用的大鼠年龄及重量是有限定要求的，其他年龄及重量的大鼠还需要进一步实验证明，这也是本研究的局限性。

5 参考文献

[1] 暴玉振，李凤，李华岚，等. 急性脑梗死大鼠脑部MMP-1、MMP-9预测神经功能的价值[J]. 中国老年学杂志，2021，41（9）：1940-1943.
[2] HU QR，LUO LJ，YANG P，*et al*. Neuroprotection of boropinol-B in cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammation and apoptosis[J]. Brain Res，2023，1798：148132.
[3] NEUHAUS AA，RABIE T，SUTHERLAND BA，*et al*. Importance of preclinical research in the development of neuroprotective strategies for ischemic stroke[J]. JAMA Neurol，2014，71（5）：634-639.
[4] REWELL SSJ，CHURILOV L，SIDON TK，*et al*. Evolution of ischemic damage and behavioural deficit over 6 months after MCAo in the rat：selecting the optimal outcomes and statistical power for multi-centre preclinical trials[J]. PLoS One，2017，12（2）：e0171688.
[5] 李凡，邢海英，金海强，等. 脑血流自动调节研究发展史[J]. 中国现代神经疾病杂志，2021，21（1）：9-13.
[6] 李坤航，张旭东，赵丹，等. 小鼠脑外伤后脑血流的动态变化及其与行为学恢复的相关性[J]. 中国医科大学学报，2021，50（5）：408-412.
[7] LONGA EZ，WEINSTEIN PR，CARLSON S，*et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke，1989，20（1）：84-91.
[8] ULU K，MIRANPURI A，KUJOTH GC，*et al*. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat[J]. J Vis Exp，2011（48）：1978.
[9] 马和硕，吕杰，刘淼，等. 葛根增效丹参在脑缺血再灌注中的保护作用研究[J]. 西南医科大学学报，2019，42（6）：523-526.
[10] 张秀丽，雷昌，刘洋，等. MCAO大鼠皮质小胶质细胞极化的研究及脑泰方Ⅱ号的干预[J]. 中国药理学通报，2020，36（9）：1298-1303.
[11] 刘秀娟，罗礼容，江玉. 风药、活血化瘀药对脑缺血大鼠血脑屏障保护作用的研究[J]. 西南医科大学学报，2020，43（1）：10-14.
[12] STILLMAN CM，JAKICIC JM，ROGERS RJ，*et al*. The relationship between fat mass and obesity associated gene polymorphism rs9939609 and resting cerebral blood flow in a midlife sample with overweight and obesity[J]. Front Hum Neurosci，2022，16：904545.
[13] ZHENG TX，LAI XL，LU JJ，*et al*. Three dimensional-arterial spin labeling evaluation of improved cerebral perfusion after limb remote ischemic preconditioning in a rat model of focal ischemic stroke[J]. Front Neuroanat，2022，16：893953.
[14] GUPTA S，SHARMA U，JAGANNATHAN NR，*et al*. Neuroprotective effect of lercanidipine in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats[J]. Exp Neurol，2017，288：25-37.
[15] WEN ZY，XU XM，XU LL，*et al*. Optimization of behavioural tests for the prediction of outcomes in mouse models of focal middle cerebral artery occlusion[J]. Brain Res，2017，1665：88-94.
[16] CHEN J，SANBERG PR，LI Y，*et al*. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. Stroke，2001，32（11）：2682-2688.
[17] ZHANG L，SCHALLERT T，ZHANG ZG，*et al*. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia[J]. J Neurosci Methods，2002，117（2）：207-214.
[18] 张勇，程敬亮，郑瑞平，等. 脑梗死大鼠脑水肿程度的磁共振DTI序列评估[J]. 郑州大学学报（医学版），2020，55（4）：580-584.
[19] YUAN ML，ZHANG Y，WANG L，*et al*. Study on the mechanism of Tong-Qiao-Huo-Xue decoction regulating apoptosis via ASK1/MKK4/JNK pathway in MCAO/R rats[J]. Phytomedicine，2022，106：154437.
[20] 盛志娟，姜专基，张斌明，等. 环状RNA含有16A的脱水酶结构域分子-微小RNA-1237-5p-细胞凋亡相关酪氨酸激酶轴调控乳腺癌细胞密歇根癌症基金会7号细胞凋亡[J]. 中华实验外科杂志，2019，36（12）：2176-2178.
[21] 张榜军，屠振鹏，冯伊伊，等. [C8mim]Cl对HepG2细胞凋亡和内质网应激通路的影响[J]. 中国环境科学，2021，41（6）：2932-2938.
[22] 孙春晓，黄嘉慧，谯丽，等. 大黄对MCAO模型大鼠的神经保护作用[J]. 中国药理学通报，2021，37（4）：584-589.
[23] 袁巧，谢丽英，陈朝俊. 黄芪多糖减轻大脑中动脉闭塞模型大鼠的血脑屏障损伤：基于抑制P2X7R通道[J]. 南方医科大学学报，2022，42（11）：1705-1711.
[24] 陈兴，王开万，储德海，等. 连翘酯苷B抑制小鼠脑缺血/再灌注引起的氧化应激损伤：基于激活AMPK/DAF-16/FOXO3通路[J]. 南方医科大学学报，2023，43（2）：199-205.
[25] CAI Q，XU G，LIU JH，*et al*. A modification of intraluminal middle cerebral artery occlusion/reperfusion model for ischemic stroke with laser Doppler flowmetry guidance in mice[J]. Neuropsychiatr Dis Treat，2016，12：2851-2858.
[26] 周琛云，朱晓霞，徐子林，等. 超声造影及多普勒超声用于MCAO大鼠早期颅内动态监测的实验研究[J]. 四川大学学报（医学版），2020，51（4）：515-520.
[27] BEEZ T，MUNOZ-BENDIX C，STEIGER HJ，*et al*. Decompressive craniectomy for acute ischemic stroke[J]. Crit Care，2019，23（1）：209.

（利益冲突：无）

（收稿日期：2022-09-21；修回日期：2022-12-03）