维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0001-04

Wistar 大鼠插线法局灶性脑缺血/再灌注模型的实验研究

罗 勇，董为伟
（重庆医科大学临床学院神经内科 重庆 400016）

【摘 要】目的：局灶性脑缺血/再灌注模型是研究缺血性脑血管病的重要模型。本文介绍一种简便易行的插线法Wistar 大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的制备方法，并通过神经病学评分、TTC 染色、病理形态学变化的观察，对该模型的可靠性进行评价。方法：用头端处理过的尼龙钓丝，从颈外动脉向颈内动脉插入，可逆性阻断大鼠一侧大脑中动脉（MCA）。结果：大鼠MCA 阻断后1.5h，同时出现Horner's 征阳性、提尾悬空时梗塞对侧前肢屈曲、内收、自主运动时身体向偏瘫侧划圈的动物、TTC 染色能清楚地显示梗塞范围、且相对较稳定，光镜下可见脑缺血后的病理改变。阻断后3h 及再灌注3、6h 时的病理改变加重，神经病学评分同前。结论：该改良法制备的模型简便易行、稳定性好、结果可靠、是用于研究局灶性脑缺血/再灌注的较为理想的实验动物模型。

【关键词】局灶性脑缺血/再灌注；插线法；动物模型；Wistar 大鼠
【中国图书分类法分类号】R743.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-09-11

An experimental study on focal cerebral ischemia/reperfusion model in Wistar rats with suture method

LUO Yong, et al
(Department of Neurology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*: Focal cerebral ischemia/reperfusion model is an important model in studying ischemic cerebrovascular diseases. In this paper we introduce a simple suture method to produce the focal cerebral ischemia/reperfusion, and evaluate the reliability of this model in Wistar rats with the degree of neurologic impairment,TTC stain, histologic changes. *Methods*: Nylon thread was inserted into the internal carotid artery in Wistar rat to achieve an animal model of reversible middle cerebral artery occlusion(MCAO). *Results*: 1.5h after MCAO, the rat displays Horner's sign, forelimb flexion, circling behavior. TTC stain clearly indicates the infarction size and relative stability, and can observe histological changes of ischemia. 3h after MCAO and 3h, 6hr after reperfusion, the ischemic changes become heavier, but there is no change observed in the score of neurologic behavior. *Conclusion*: This improved model is simple, stable and reliable. It is advisable to use this experimental animal model to study focal cerebral ischemia/reperfusion.

【Key words】Focal cerebral ischemia/reperfusion; Suture method; Animal model; Wistar rats

大脑中动脉（MCA）阻塞为临床上缺血性脑血管病的多发部位，故MCA 阻断模型被广泛应用于脑梗塞的研究。其中，血管内直接插线闭塞法建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型具有不开颅、损伤小、操作简便、不需特殊设备、缺血区部位较恒定、可准确控制缺血和再灌注时间、易控制局部条件、全身影响小等优点，被广泛用于脑缺血/再灌注的研究中。但许多因素如动物品系、体重、鼠龄、线栓粗细、插线深度等均会影响实验结果。因此，规范化实验操作，减少干扰因素的影响十分重要。本文参照Longa、Kuge 等人报道的颈外动脉插线法制备大鼠MCA 闭塞模型，并加以改进，建立了不开颅、可复流、结果较稳定的Wistar 大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型，报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

Wistar 大鼠，体重220 - 330g，雌雄兼用，由本校实验动物中心提供。随机分为对照组、缺血3h 组、缺血3h/再灌注3h 组、缺血3h/再灌注6h 组。用于神经病学评分及脑

作者介绍：罗 勇（1965- ），男，博士、副教授，硕士生导师，主要研究方向：脑血管疾病。
基金项目：国家自然科学基金项目（30040013）、国家教育部《高等学校骨干教师资助计划》项目。

维普资讯 http://www.cqvip.com

梗塞体积测定的各组动物数为7 只，用于组织病理学观察的各组动物数为 6 只。动物术前 12h 禁食，自由饮水。

1.2 大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的制备

将一长35mm、直径0.23mm 的尼龙钓丝的一端约0.5cm 长度上均匀地涂上一层聚胺酯，使其直径达0.25 ~ 0.26mm 左右，凉干后备用。参照Longa、Kuga 等人报道的方法[1,2]采用颈外动脉插入线栓法造模。Wistar 大鼠用3.5%水合氯醛（350mg/kg 体重，i.p.）麻醉，仰卧固定。颈部正中切开皮肤，钝性分离右侧颈总动脉（CCA）、颈外动脉（ECA）、颈内动脉（ICA），仔细分离避免损伤迷走神经。由CCA 分叉处向头端依次游离，并用电热烧灼器烧断ECA 的所有分支，使其主干游离备用。然后分离ICA 至颅底，并分离出ICA 颅外段的唯一分支翼腭动脉（PPA），用蛙心夹夹住PPA，以免插线时栓子误入PPA。用蛙心夹夹住CCA 和ICA，并在ECA（靠近CCA 分叉处）上剪一小口，将尼龙钓丝涂有聚胺酯的一端（预先蘸上肝素钠溶液）沿切口插入ECA，经CCA 分叉处，并将预先放置于ECA 根部的丝线缚紧，以防止其中的钓丝滑出和出血，然后移去夹在ICA 上的蛙心夹，将钓丝缓慢地向ICA 入颅内的方向推进约19 ~ 21mm，微遇阻力时停止，使钓丝头端通过MCA 起始处，到达较细的大脑前动脉（ACA），此时即完成一侧MCA 的阻塞（MCAO）。再灌注时缓慢地轻拉钓丝使其头端回到ECA 内，即可实现MCA 再灌注。拔回栓子后，MCA 即可得到前交通动脉、后交通动脉血供，而不影响ICA 血供，故更有利于 MCA 供血区脑血流的恢复，引起再灌注（图 1）。

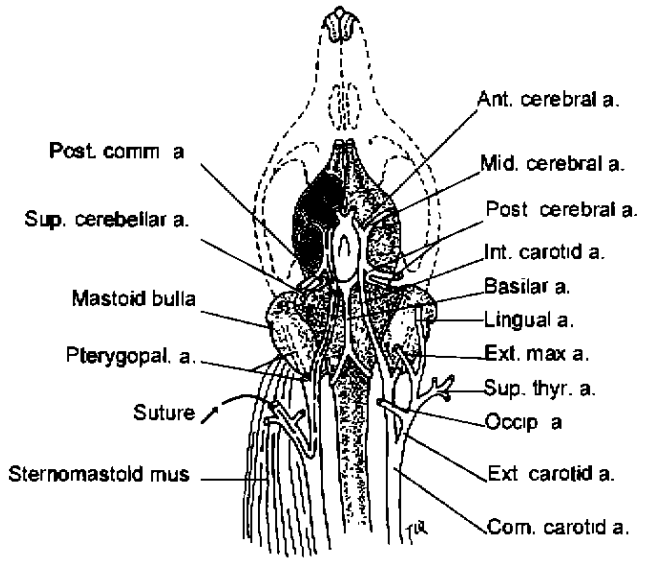


图 1 可逆性鼠 MCA 闭塞 / 再灌注模型脑血管解剖示意图

1.3 神经病学评分

参考Kuluz[3]神经缺陷三级评分标准，稍加改进，手术动物清醒后，分别于大鼠脑缺血1.5、3h、缺血3h 再灌注3、6h 进行评分。评分标准如下：0 级：无缺陷、活动正常；1 级：右侧Horner's 征阳性；2 级：提尾悬空时左前肢屈曲、内收；3 级：自主运动时，身体向偏瘫侧（左侧）划圈。脑缺血后1.5h 时，上述三项体征均有的动物才视为造模成功，进入下一步实验。

1.4 脑梗塞体积的测定

Wistar 大鼠麻醉后断头，3min 内取出全脑，将脑组织置-20 ℃冰箱10min 后取出，切去额极1mm，间隔2mm 作5 个大脑连续冠状粗切片，立刻置于2% 氯化-2,3,5 —三氮苯基四氮唑（TTC）生理盐水溶液中，37 ℃避光、恒温孵育30min，进行组化染色。可见正常脑组织呈深橙红色，梗塞区未被染色而呈白色。随即用10% 中性福尔马林液后固定、根据苍白区观察梗塞灶范围[4]。用求积仪（Lasico L-10 型）测定各区面积。参照Nedergaard 脑体积计算公式[5]，略作修改，按李敬诚等介绍的方法[6]计算体积：

$$V=\sum \frac{(A1+A2)}{2}\cdot d\,(mm^3)$$

式中V 为总体积；A_1、A_2分别表示切块嘴、尾侧面面积（mm^2）；d 为切块厚度（mm）。脑梗塞体积（IV）以其占脑总体积的百分比来表示。各冠状切块脑梗塞体积求和，即为脑梗塞总体积（%）。

1.5 组织病理学观察

切片厚5 μm，常规HE 染色，封片，光镜下观察病变区病理变化并拍照。

1.6 数据分析和统计处理

实验数据组间比较采用 t 检验。结果以均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，显著性差异水平为 <0.05。

2 结 果

2.1 大鼠 MCAO/ 再灌注不同时相神经病学评分

右侧MCAO 后1.5h 时评分为3 级的动物、在MCAO 后3h 内体征无明显变化，仍表现为右侧Horner's 征阳性，提尾时左前肢屈曲、内收，爬行时向左划圈（3 级）。再灌注后3、6h，动物体征均表现为右侧Horner's 征阳性，左前肢屈曲、内收，爬行时向左划圈。

2.2 大鼠MCAO/ 再灌注不同时相脑梗塞体积

大鼠局灶性脑缺血/ 再灌注不同时相脑梗塞体积大小见表 1。

MCAO/ 再灌注组大鼠脑冠状切面可见较大的苍白梗塞区，与正常脑组织（红色）界线较明显。

表 1 MCAO/ 再灌注后脑梗塞百分体积（IV%）（$\bar{x}\pm s$）

n	MCAO 3h	MCAO 3h	
		再灌注 3h	再灌注 6h
7	17.96 ± 3.93	20.21 ± 4.26*	19.34 ± 3.82*

*P >0.05 与 MCAO 3h 比

维普资讯 http://www.cqvip.com

缺血3h 组、缺血3h/ 再灌注3h 组、缺血3h/ 再灌注6h 组TTC 染色结果如图2 所示。MCAO/ 再灌注后3、6h 的脑梗塞体积（%）与MCAO 3h 组相比均有上升趋势，但无统计学意义（P >0.05）。对照组脑组织未见梗塞灶。

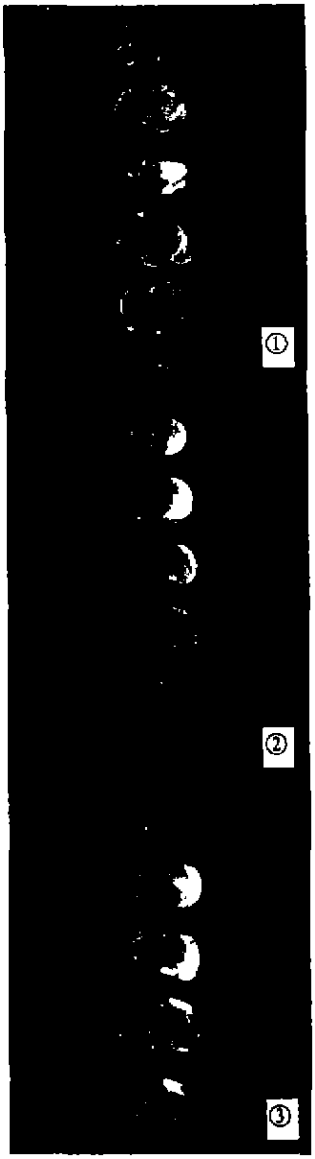


图 2 插线法 MCA 闭塞 / 再灌注模型脑组织冠状切面 TTC 染色示意图

1、示脑缺血 3h；2、示脑缺血 3h/ 再灌注 3h；3、示脑缺血 3h/ 再灌注 6h

2.3 大鼠MCAO/ 再灌注不同时相组织病理学观察

正常对照组脑组织光镜下所见正常。MCAO 3h 动物、光镜下见基底节外侧区、顶叶、颞叶皮质（部分累及）神经元出现缺血性损害，胞浆空泡形成，核固缩均质化，核周体消失等，但有一定数量基本正常神经元存在。MCAO 3h/ 再灌注3h，神经元缺血性损害加重，核固缩更明显，胞浆空泡加大，细胞间间隙加宽。MCAO 3h/ 再灌注6h，神经元缺血性损害进一步加重，核固缩更为明显，胞浆空泡进一步加大，细胞间间隙加宽更为明显。各组组织病理学结果见图 3。

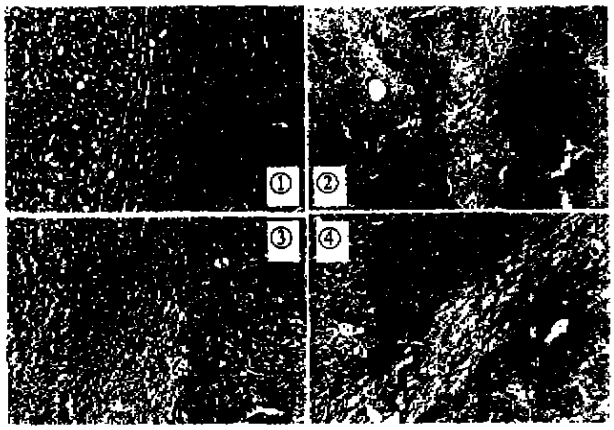


图 3 MCA 闭塞 / 再灌注各组脑组织病理学结果

1、示正常对照（×33）；

2、示脑缺血3h（×33）；

3、示脑缺血3h/ 再灌注3h（×33）

4、示脑缺血3h/ 再灌注6h（×33）

3 讨 论

缺血性脑血管病的实验动物模型是研究缺血性脑损伤和脑保护必不可少的工具。建立操作简便、损伤小、成本低廉、重复性及稳定性好、结果可靠、能模拟人类发病病理过程的动物模型是进行相关研究的基本条件。有关大鼠局灶性脑缺血的动物模型，包括经颞下或经眶入路直接电凝或结扎MCA 法、光化学诱导MCA 血栓法等。其中，线栓法近年来为越来越多的国内外研究者所采用[1,2,7~16]。自1985 年Koizumi 等[12]首次报道非开颅法可逆性MCA 闭塞动物模型以来，1989 年Nagasawa 等[13]进一步完善了该模型，并对该模型的组织学改变与脑血流（CBF）的相关性作了探讨，同年Longa 等[14]又对上述两法做了比较，并对CBF 和脑组织学作了对比研究。除外对SD 大鼠该模型的制作进行了探讨以外、尚有部分国内学者对Wistar 大鼠该模型的制作进行了探讨，但心得不尽相同[7~11]。我们实验室也对Longa 等建立的大鼠MCA 线栓法局灶性脑缺血/ 再灌注模型做了部分改进[7]，并以此模型为基础进行了系列的局灶性脑缺

维普资讯 http://www.cqvip.com

血/再灌注损伤机制及药物和其他手段干预脑缺血/再灌注的研究。

我们的体会是，大鼠线栓法MCAO/再灌注模型，操作较简便，手术时间短，不需开颅，创伤小，术中不引起血压、体温、血气的异常变化，不影响缺血后脑水肿和颅内压病理变化的自然过程；优于开颅结扎MCA 法，同时避免了颈内动脉注射线段闭塞MCA 法[15]所带来的栓子的随机性，且缺血及再灌注时间可准确控制，是研究局灶性脑缺血和再灌流损害的较好动物模型。因此，有学者认为该法将逐渐取代开颅闭塞MCA 模型。既往，有关脑缺血1、2h 及再灌注和长时间缺血研究较多，但缺血3h 及再灌注早期（3、6h 内）研究相对较少。Nagasawa 等[13]观察到，MCAO 3h 后再灌注3h 的病灶较MCAO 3h 未再灌注的病灶损伤程度加重，但他们没有对再灌注后更长时间的病理损害情况进行观察。郑健等[7]观察到，MCAO 3h 后再灌注，随时间延长，病灶内神经元损害程度加重。本实验也观察到，缺血3h、缺血3h/再灌注3h、缺血3h/再灌注6h 病灶内神经元损害程度依次加重。参照其他作者的文献[11,16]、结合本实验室既往的工作[7]、本实验TTC 染色结果，我们体会线栓后同时出现同侧Horner's 征和缺血后一定时间出现血管闭塞对侧前肢运动障碍（屈曲和向梗塞侧对侧划圈）能够反映MCAO 成功，且梗塞范围相对可靠。可以认为，神经病学评分是评价局部脑缺血及缺血性脑损害最重要的终末指标之一。脑梗塞体积是评价局部脑缺血及缺血性脑损害程度最重要的客观指标之一。我们在实验中曾观察到，如仅有提尾时血管闭塞对侧前肢轻度屈曲，TTC 染色梗塞范围可较小，甚至可为阴性结果。但是，不同实验室应用该方法制备的模型的成功率、梗塞体积、蛛网膜下腔出血（SAH）发生率、动物早期死亡率等方面不尽相同。因此，该模型的应用尚应进一步标准化，以减少因大鼠的种属、鼠龄、体重、栓子粗细及头端大小、质地、插入深度等因素对实验结果的影响[1,2,14]、以进一步增加造模成功率，增加该模型造成脑损伤的可靠性及重复性。

参 考 文 献

[1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989;20:84-91.

[2] Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, et al. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Stroke, 1995;26:1655-1658.

[3] Kuluz JW, Prado RJ, Dietrich D, et al. The effect of nitric oxide synthase inhibition on infarct volume after reversible focal ischemia in conscious rats[J]. Stroke, 1993;24:2023.

[4] Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, et al. Evaluation of 2, 3,5 triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats[J]. Stroke, 1986; 17:1304-1307.

[5] Nedergaard M , Mechanisms of brain damage in focal cerebral ischemia[J]. Acta Neurol Scand, 1987;77:81-101.

[6] 李敬诚，董为伟，傅雅各. Sprague-Dawley 鼠大脑中动脉闭塞模型 [J]. 重庆医科大学学报，1992;12:113,118-120.

[7] 郑 健，董为伟. 介绍一种大鼠大脑中动脉阻塞/再灌流模型 [J]. 中国应用生理学杂志，1996;12:359,373.

[8] 李东亮，程晓虹，沈 虹，等. 大鼠大脑中动脉可逆性阻塞的实验研究 [J]. 动物学报，1993;39:176-180.

[9] 杨世方，闵宝珍，周锡英. 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的研究 [J]. 中风与神经疾病杂志，1996;13:15-17.

[10] 陈春富，李劲松. 栓线法大鼠局灶性脑缺血模型的研究 [J]. 中风与神经疾病杂志，1996;13:18-19.

[11] 刘亢丁，苏志强，李毅平，等. 实验性局灶性脑缺血再灌注动物模型的改进及评价[J]. 中风与神经疾病杂志，1997;14:87-89.

[12] Koizumi J, Nakazawa T, Yoshida Y. Reperfusable brain infarction model in the rat. Proceedings of the 10th Meeting of the Japanese Stroke Society, Kyoto, Japanese April 18-19,1985. 159.

[13] 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;20:1037-1043.

[14] Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW, et al. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats: which method works best? [J]. Stroke, 1993;24:294-298.

[15] Tekeda T, Shima T, Okada Y, et al. Pathophysiological studies of cerebal ischemia produced by silicone cylinder embolization in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1987;7:s66.

[16] Matsuo Y, Izumiyama M, Onodera H, et al. Effect of a novel thromboxane A_2 receptor antagnist, S-1452, on postischemic injury in rats[J]. Stroke, 1993;24:2059.