栓塞法制作兔 MCA-O 模型

林 建 邵淑琴 （第三军医大学西南医院神经内科）630038

目前国际脑血管病委员会极力主张脑缺血的研究应建立在局部脑缺血模型的基础上[1]。从国内外已建立的各种大脑中动脉阻塞(MCA-O)模型看，有以下几种：①沙土鼠双侧颈内动脉(ICA)结扎形成的双侧前脑缺血模型；②绿光于大鼠局部硬膜外照射形成的局部皮层外 1/2 范围缺血性梗死的模型；③猫、狗、猴、兔、鼠经眼或经眶后途经行开颅术于 MCA 主干起始处用切断、电凝、血管内阻塞等方式形成的 MCA-O 模型[1]。1983 年后，出现了经一侧 ICA 注入带尾丝栓子到该侧 MCA 起始段以阻塞 MCA，并于选定时相点通过栓子后尾丝将栓子拨出以形成 MCA 再通的可少许再灌注 MCA-O 模型[2]。该模型在狗、猫、猴、大鼠已建立[3,4]，但常用实验动物兔还未有该模型报道。我们用此方法建立了兔的可再灌注 MCA-O 模型，现介绍如下：

1 材料和方法

1.1 手术方法

白色家兔 15 只，体重 2.0～2.5kg，雌雄各半，随机分为 3 组：假手术组 4 只，梗塞组 7 只，再通组 4 只。戊巴比妥钠 30mg/kg 静脉麻醉，仰卧固定于手术台，按无菌操作常规，于颈正中切口，分离出右侧颈总动脉（CCA），颈内动脉（ICA），颈外动脉(ECA)。在 CCA 分为 ICA 和 ECA 分支点近心端 1cm 处切开 CCA 壁，插入自制动脉插管并向前进入 ICA 达颅底，插管内预先安置好由 0 号缝线制成的长 1cm 的栓子，栓子后端连接 9-0 的尼龙丝线。用 2ml 生理盐水将栓子推注到同侧 MCA 主干，并使尼龙丝尾部保留在 CCA 切口外。用无创性血管夹夹闭 CCA 切口，局部撒硫酸链霉素粉防治感染，逐层缝合。假手术组除不推注栓子外，其余操作同前。再通组兔在 MCA-O 4 d 后，折开颈部缝线，从尼龙丝尾部将栓子拨出，CCA 切口缝扎。

术中不需行人工呼吸和输液等支持措施，术中出血在 1～2ml 内，操作中梗塞组和再通组均于右颈部注射 1%奴弗卡因 2ml 局麻，以利颈动脉扩张。操作顺利。术后兔存活良好。

1.2 观测指标

1.2.1 脑血管造影(CAG)证实 MCA-O 和再通：再通组兔 1 只，于 MCA-O 后 4 d 从对侧 ICA 推注 76%泛影葡胺 3ml，行正位摄片，拨出线栓后重复造影摄片 1 次。

1.2.2 栓子梗塞部位观察：梗塞组兔 6 只，于术后 8 日处死取脑，观察栓子所在部位。

1.2.3 兔神经功能障碍观察：按 Smith 分级方法观察[5]。

1.2.4 氯化-2,3,5-三苯基四氮唑(TTC)染色观察梗塞灶范围[6]：各组于术后 8 d 各处死兔 2 只，梗塞组于术后 4 d 另处死兔 1 只，取出全脑，以视交叉为中心，向前和向后均作 3mm 厚冠状切片 2 张，将脑片置于 2%TTC 液 37℃避光孵育 30min 后移至 10%福尔马林液固定，缺血区表现为 TTC 染色缺失。

2 结果

2.1 CAG 检查

拨栓前见右侧 MCA 不显影，余 Willis 环组成支显影好；拨栓后见颅内各大动脉均显影。

2.2 栓子部位观察

除 1 只兔见栓子头端刚进入右 MCA 外，其余 5 只见栓子进入 MCA 主干 3～4mm。栓子其余部分位于右 ICA 颅内段。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 神经功能障碍观察

按 Smith 评分：假手术组为 0 分，梗塞组及再通组均为 3 分，术后 24～48 h 为 1～2 分。术后 72 h 仅于检查时感觉得到左后肢后蹬肌力较右侧差，评为 1 分，该体征在梗塞组和再通组均持续到术后 8 d。再通组拨栓前后活动无明显变化，评为 1 分。

2.4 TTC 染色观察梗塞灶

MCA-O 4 d 兔，见 TTC 染色缺失区位于右侧基底节区、右侧外侧皮质及皮质下白质，与着色区边缘清楚，各脑片上均见 TTC 缺失区，全部 4 脑片 TTC 缺失区范围平均值约占该侧脑片的 50%。MCA-O 8 d 兔的 TTC 缺失区与 MCA-O 4d 兔比较无明显扩大。再通组见 TTC 缺失边缘模糊，缺失范围与 MCA-O 8 d 兔相似。假手术组无 TTC 染色缺失。所有再通组和梗塞组兔右侧大脑体积均较左侧增大。

3 讨论

经开颅方式建立的 MCA-O 模型，由于开颅术常导致血流动力学模式改变，使局部动脉痉挛；在切断或电凝 MCA 时破坏了动脉壁上自我调节神经丛；抬起颞叶寻找 MCA 主干时对脑底动脉环穿通支的影响，这些因素致使这类模型不能形成固定部位和范围的脑梗塞[1]。经 ICA 注入栓子建立的 MCA-O 模型，手术不影响颅内环境，栓子进入 MCA 主干后，可同时阻塞 MCA 主干发出的支配大脑半球深部核团的几支深穿支和 ICA 颅内段发出到脑深部的其他穿通支，这样就避免了仅于 MCA 主干某一点阻断时深穿支供血因个体差异而造成梗塞区缺血程度不一的缺点。当栓子从 MCA 拨出形成再通后，对侧 ICA 和双侧 PCA 通过 Willis 环对再通 MCA 有效供血，兔脑并无病理、生化方面的缺血性改变[7]。因兔的 ACA 并不是左右各一，而是在 Willis 环前端合并为一根大脑前总动脉，所以梗塞侧大脑前动脉供血区不发生缺血。一侧 ECA 结扎后，因 ECA 分支与结扎部位近心端、与对侧 ECA 的丰富吻合网形成的侧支循环，该侧 ECA 供血区不发生缺血[3]。

因 MCA 的深穿支在 MCA 主干发出 1～2mm 范围内分出，当栓子进入 MCA 3～4mm 后，可确保其深穿支和 ICA 颅内段到脑深部的穿通支被同时阻塞[8]。MCA 阻塞远端通过 CAG 证实无直接血液供应，而在拨出栓子后，从对侧 ICA 注入的造影剂可充盈颅内各大血管，表明兔 Willis 环的血流平衡和血液再分布功能较灵长类强大。

神经功能障碍以梗塞 24 h 最明显，这与人的脑栓塞病程特点一致，此后由于 MCA 与 ACA，PCA 末梢吻合网的开放，神经功能障碍逐步减轻，到梗塞后 3 d 活动基本正常。兔的神经功能恢复较人更快，更完全。

TTC 染色是通过 TTC 与活性细胞代谢释放出的 H^+ 结合，形成深红色的甲臜(Formazen)。脑梗塞致使局部组织缺血缺氧，细胞代谢严重下降，所以可形成 TTC 染色缺失。本实验中 MCA-O 4 d 与 8 d 兔脑 TTC 缺失区无明显变化，而再通组 TTC 缺失边缘模糊增宽，表明梗塞 4～8 d 梗塞范围已基本稳定，而 MCA 再通血供恢复后，对不完全损害的半暗区细胞功能恢复有促进作用[5]。

兔脑血管构成较食肉类与人更接近，它的颅内外循环之间没有吻合网[9]，并且手术操作在无助手的条件下也能进行。所以，栓塞法制作的兔 MCA-O 能为脑梗塞的实验研究提供良好的动物模型。该模型的病理、生化、血流动力学改变等，我们将在进一步的实验中逐步报告。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

关键词 疾病模型，动物；脑缺血；栓塞

参考文献

1. Julio H, Carcia MD. Experimental ischemic stroke:a reriew. Stroke,1984;15:5～11
2. Okada Y,Shima T,Yamamoto Y,et al. Regional cerebral blood flow, sensory evoked potentials and intracranial pressure in dogs with MCA occlusion by embolization or trapping. J. Neurosurg,1983;58:500～507
3. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologicin changes in a new rat model of middle cerebral artery occlution. Stroke,1989;20:1037～1042
4. Alfonso M,Bremer MD,Robert S,et al. Artificial embolization of the middle cerebral artery in primates. Stroke,1975;6:387～390
5. Smith AL,Hoff JT,Nielsen SL,et al. Barbitarate protection in acate focal cerebral carotid artery. Surgery,1969;65:862～865
6. 赵卫国 张天锡。兔 MCA-O 型局灶脑缺血模型的建立。中国神经精神疾病杂志,1990;16:143～145
7. 贾 兰 游国雄。脑缺血急性期血液流变改变的机制探讨和临床意义。国际脑血管病学术研讨会汇编资料(唐山),1991:44
8. 周定标。脑底动脉环的穿通支。国外医学：神经病学及神经外科病学分册,1989;16(1):3～5
9. 赵合庆。脑梗塞的血流再开通。国外医学：神经病学及神经外科病学分册,1989;16(2):59～61
10. 顾正中。脑循环与临床。上海：上海科技出版社,1982:12

(收稿:1992-12-10;修回:1993-03-03)

一种生物素探针杂交技术

姚家慧 陈鸿书 (第三军医大学基础部分子生物学实验室) 630038

生物素标记的 DNA 探针由于其稳定、便宜及非放射性特点而日益受到重视。为提高生物素探针灵敏度，Gregersen 等[1]和 Chan 等[2]均做了较多工作。本文综合两者之所长，并作部分修改，建立了一套生物素探针标记、杂交及检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

含 1.8kb c-myc cDNA 与 pBR322 重组质粒的大肠杆菌菌株(HB101)(上海肿瘤研究所提供)；碱性磷酸酶标记的抗生物素蛋白(AAP)(Sigma)；DNase Ⅰ、DNA 聚合酶Ⅰ、非标记的 dNTP(华美生物工程公司)；Bio-11-dUTP(北京医科大学药厂)。

1.2 生物素 DNA 探针的制备

提取的质粒 DNA 用二步缺口翻译法[3]标记：1μl DNA(0.1～0.5μg)、1μl 3×NT 缓冲液[1×NT：5mmol/L Tris-HCl,10mmol/L $MgSO_4$,0.1mmol/L DTT,0.05% BSA(W/V),pH 7.5]、0.3u DNase Ⅰ，加水至 3μl，混匀，37℃保温 15min。加入 6u DNA 聚合酶Ⅰ，5.7μl 10×NT，加 dCTP、dATP、dGTP 及 Bio-11-dUTP水溶液使终浓度均为 20μmol/L，加水至终体积为 60μl，14℃保温 2h 或更长时间。加 EDTA(pH8.0)终止液，终浓度为 10mmol/L。标记好的探针不必纯化而可直接进行以下实验。

1.3 在硝酸纤维素滤膜(NC 膜)上点样

质粒 DNA 或生物素标记 DNA 用含载体 DNA 的 2×SSC(1×SSC：0.15mol/L NaCl,0.015mol/L 柠檬酸钠,pH 7.0)梯度稀释后热变性，点在 20×SSC 处理过的 NC 膜上，80℃真空烘烤 1 h。

1.4 斑点杂交

制好的膜放入预杂交液[50%甲酰胺，5×SSPE，5×Denhardts 溶液(不含 BSA)，0.1% SDS，100μg/ml 载体 DNA]，42℃保温 4 h；转入杂交液(预杂交液中加入探针，探针终浓度 150ng/ml)，保

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net