·论著·

改良线栓法建立SD大鼠局灶性脑缺血再灌注模型

陈超1, 聂郁林2, 陆心恬1, 林玥伶1, 龙颖1, 李金声1

摘要 目的:建立一种SD大鼠局灶性脑缺血再灌注改良模型,以降低模型制备难度,提高模型的稳定性。 方法:SD雄性大鼠30只,随机分为模型组24只和假手术组6只。采用经改良的颈外动脉进线栓法建立模 型,并通过神经功能缺损评分、伊文思蓝(EB)染色及TTC染色进行综合评价。结果:该改良方法建模成功 率为87.5%,梗死区可明显看到EB渗出,TTC染色显示梗死体积占大脑总体积的(10.65±4.41)%。结论:经 改良后,明确了颈总动脉结扎位置,以及颈外动脉结扎、剪断位置,采用颈外动脉残端直接进线栓建立模 型,降低了模型制备难度,提高了模型的稳定性和成功率。

关键词 脑缺血再灌注;颈外动脉;伊文思蓝染色;TTC染色

中图分类号 R741;R741.02;R743 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20230180 **本文引用格式:**陈超, 聂郁林, 陆心恬, 林玥伶, 龙颖, 李金声. 改良线栓法建立 SD 大鼠局灶性脑缺血再灌注 模型[J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18(10): 569-573.

Modified Thread Embolization Method for Establishment of Focal Cerebral Ischemia–Reperfusion Model in SD Rats CHEN Chao', NIE Yulin², LU Xintian¹, LIN Yueling¹, LONG Ying¹, LI Jinsheng¹. 1. Department of Hyperbaric Oxygen, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China; 2. Department of Hyperbaric Oxygen, The Second People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 518112, China

Abstract Objective: To establish a modified thread embolization method for the establishment of a model of focal cerebral ischemia-reperfusion in SD rats, to reduce the difficulty of model establishment and improve the stability of the model. **Methods:** Thirty male SD rats were randomly divided into a model group of 24 and a sham operation group of 6. The modified external carotid artery approach was used to establish the model, and comprehensive evaluations were performed by using neurological function scores, Evans blue (EB) staining, and TTC staining. **Results:** The successful rate of model establishment was 87.5%, and obvious EB extravasation could be observed in the infarction zone, and the infarction volume accounted for $(10.65 \pm 4.41)\%$ of the total brain volume according to TTC staining. **Conclusion:** After modification, the location of ligation of common carotid artery and external carotid artery, as well as the cutting position of external carotid artery were clarified. Direct application of the remaining external carotid artery to establish the model reduced the difficulty of model establishment, improved the stability and increased the success rate of the model.

Keywords cerebral ischemia-reperfusion; external carotid artery; Evans blue staining; TTC staining

脑卒中具有高发病率、高致残率、高死 亡率及高复发率的特点,其中缺血性脑卒中 约占80%^[1]。药物溶栓或机械取栓是治疗急 性缺血性脑卒中的有效治疗方法,但脑缺血 再灌注会加重缺血部位神经元损伤^[2]。建立 稳定可靠的脑缺血再灌注模型对研究脑缺 血再灌注损伤的预防、治疗及预后等具有重 要意义。

在现有文献中,颈外动脉进线建模方法 多在颈外动脉上打2个线结,在颈外动脉盲 端剪一"V"形切口,从"V"形切口进线栓,这 占用了较长的颈外动脉血管,如处理不当易 引起大出血;且在颈外动脉盲端上剪一小口 提高了手术的操作难度,切口剪大会造成牵 拉过程中血管容易断,切口过小不利于线栓 插入。此外,建模过程多以文字描述,如以 近心端、远心端或距离来表示线结结扎位 置,导致结扎部位不明确,不利于模型的重 复性和稳定性。针对上述问题,本研究对 Longa等^[3-9]建模方法进行优化,明确了颈总 动脉预结扎位置、以及颈外动脉结扎位置和 剪断位置,采用颈外动脉残端直接进线栓建 立模型,以期降低模型制备难度,提高模型 制备的稳定性和成功率。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物 6~7周龄、体质量160~ 180g的清洁级雄性SD大鼠购自广东省医 学实验动物中心。饲养在SPF级动物房中, 室内温度(22±3)℃,湿度(60±5)%,光照周 期为12h光照、12h黑暗,自由食水。

1. 深圳市人民医院 高压氧科 深圳 518020 2. 深圳市龙岗区第 二人民医院高压氧 室 深圳 518112 收稿日期 2023-03-09 通讯作者 李金声 zhizuchangle1964 @126.com

作者单位

1.1.2 试剂与仪器 主要包括台式三目体式显微镜, 电子称,戊巴比妥钠(或水合氯醛),大鼠用手术台, 橡皮筋,脱毛膏,碘伏,眼科剪,眼科镊,系线镊,显微 镊,4-0丝线,7-0丝线,显微弹簧剪,圆针,角针,持针 钳,1 mL注射器,无菌棉签,无菌纱布,血管夹,电凝刀 (BDD-YE-DT-1型、宁波市舜业医疗器材有限公司), MCAO模型线栓(MSRC37B250PK50、深圳市瑞沃德 生命科技有限公司),伊文思蓝(Evans blue, EB) (IE0280-100 mg、北京索莱宝科技有限公司),TTC [A610558-0005、生工生物工程(上海)股份有限公司] 等。手术器械在建模前1天经高压蒸汽法灭菌并烘干。 1.2 方法

1.2.1 动物分组 SD雄性大鼠适应性饲养7d,术前 12h禁食,自由饮水。手术当天体质量以240~280g为 宜。30只大鼠随机分为模型组24只和假手术组6只。

1.2.2 改良线栓法建立模型

1.2.2.1 手术准备工作 2%戊巴比妥钠(0.3 mL/100 g) 或10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,翻正反 射消失后,仰卧位固定于手术台上,颈部延展。用脱毛 膏去除大鼠颈部鼠毛,碘伏进行颈部皮肤消毒。

1.2.2.2 颈总动脉分离、预结扎 在颈部正中位置剪 一约2 cm 切口。剪开并分离皮下组织,可看到由胸骨 舌骨肌、胸锁乳突肌和二腹肌形成的"三角形"(图1-①),然后钝性分离胸骨舌骨肌和胸锁乳突肌,沿胸锁 乳突肌内侧逐步分离肌肉筋膜,可看到颈总动脉和迷 走神经(图1-②)。在体式显微镜下小心钝性分离迷走 神经,剥离包裹在颈总动脉上的鞘膜。在该位置的颈 总动脉置一根4-0丝线,暂不结扎(图1-③)。



注:①胸骨舌骨肌、胸锁乳突肌和二腹肌;②颈总动脉(黑色箭头所指)和迷走神经(白色箭头所指);③颈总动脉处置一根 4-0丝线,暂不结扎。

图1 颈总动脉分离、预结扎

1.2.2.3 颈外动脉分离、结扎 沿颈总动脉逐步分离, 可看到颈外动脉及其分支(枕动脉、甲状腺上动脉)、颈 内动脉及迷走神经(图2-①),分离血管周围组织、迷走 神经,使其游离。用电凝刀依次烧断枕动脉、甲状腺上 动脉(图2-②)。在甲状腺上动脉分支位置的上方,用 7-0丝线结扎颈外动脉(图2-③)。血管分离完毕后,用 7-0丝线做一个线圈(图2-④),以备插线栓时用。



注:①颈总动脉,颈外动脉及其分支(枕动脉、甲状腺上动脉)、颈内动脉及迷走神经;②枕动脉残端、甲状腺上动脉残端; ③在甲状腺上动脉分支位置的上方,用7-0丝线结扎颈外动脉; 黄色虚线为剪断颈外动脉的位置;④7-0丝线做的线圈。

图2 颈外动脉分离、结扎

1.2.2.4 线栓头直接从颈外动脉残端进入 将颈总动脉上预留的4-0丝线打活结(或用血管夹夹闭),用血管夹夹闭游离的颈内动脉,在颈外动脉结扎部位与甲状腺上动脉分支之间,用显微弹簧剪垂直血管剪断颈外动脉(剪断位置见图2-③黄色虚线)。线栓头直接从颈外动脉残端插入,将预先准备好的7-0丝线圈,从线栓尾部进入并沿线栓直至颈外动脉残端处, 用其绑紧颈外动脉残端,以防线栓滑脱(图3-①)。移除颈内动脉的血管夹,用一只系线镊调整栓头的方向,使其进入颈内动脉(图3-②),然后用系线镊夹住线栓,缓慢推进线栓(图3-③)。



注:①线栓头直接从颈外动脉残端插入;②调整栓头的方向,使其进入颈内动脉;③用系线镊夹住线栓,缓慢推进线栓。 图3 线栓头直接从颈外动脉残端进入

1.2.2.5 脑缺血与再灌注 线栓进入18~20 mm(线 栓上的黑色标记),微遇阻力时即停止,扎紧颈外动 脉残端,打开颈总动脉的活结(图4-①)。记录缺血 开始的时间,用浸有生理盐水的纱布覆盖伤口。缺血 60 min后缓慢拔出线栓(图4-②),进行再灌注。结扎 颈外动脉残端(图4-③)。观察无内出血后,用4-0丝线 缝合皮肤,剪短线头,消毒,将大鼠放回笼子。



注:①线栓进入18~20 mm,扎紧颈外动脉残端,打开颈总动脉的活结;②缺血60 min后缓慢拔出线栓;③结扎颈外动脉 残端。

图4 脑缺血与再灌注

1.2.3 假手术组 大鼠麻醉后除不结扎血管和插入线 栓外,其他操作与上述方法相同。

1.2.4 模型评价

1.2.4.1 神经功能缺损评分 在大鼠清醒后(建模完成后约1h),参考Longa的评分标准进行神经功能评分。0分:无神经功能缺损症状;1分:轻度局灶性神经功能缺损,即提尾悬空对侧前爪不能完全伸展;2分:中度局灶性神经功能缺损,即行走向对侧转圈;3分:重度局灶性神经功能缺损,即行走困难,向对侧倾倒或不能自发行走;4分:不能自发行走,意识水平下降;5分:死亡。评分1~3分视为模型制备成功。

1.2.4.2 EB染色 脑缺血再灌注 72 h后,经尾静脉注 入 2%EB 溶液(4 mL/kg),2 h后经腹腔深度麻醉,4 ℃ 预冷的生理盐水进行心脏灌注,取脑,拍照。将大脑置 于-20 ℃冰箱冷冻 20 min,然后用锋利双面剃须刀片 做连续冠状切片,拍照。

1.2.4.3 TTC染色 脑缺血再灌注 72 h 后,经腹腔深 度麻醉大鼠,4℃预冷的生理盐水进行心脏灌注,取 脑,将大脑置于-20℃冰箱冷冻 20 min,然后用锋利 双面剃须刀片做连续冠状切片。将脑片置于含 1% TTC 的培养皿内,37℃恒温培养箱避光染色,间隔 5 min 翻动脑片。染色结束后,去除 TTC,用 PBS 轻柔 冲洗2遍,拍照。使用 ImageJ 分析脑梗死体积^[10]。

1.3 统计学分析

采用GraphPad Prism 8软件处理数据。符合正态 分布以及方差齐性的计量资料以(x±s)表示,组间比较 采用独立样本均数 t检验; P<0.05为差异有统计学意 义。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分

模型组在术后1h神经功能缺损评分为(1.79±0.41)分,建模第2天死亡3只(其中2只为蛛网膜下腔 出血,另1只原因不明),模型成功率为87.5%;假手术 组术后1h神经功能缺损评分为(0.00±0.00)分,无神经 缺损症状,无死亡。2组神经功能缺损评分差异有统计 学意义(P<0.001)。

2.2 EB 染色

脑缺血再灌注72h后,模型组在皮质下和部分皮质的梗死区可明显看到EB渗出(为更好展示EB渗出,脑冠状切片做了正反调整),见图5-③④。假手术组无EB渗出。



注:①②为假手术组:无EB渗出;③④为模型组:梗死区可 明显看到EB渗出(为更好展示EB渗出,脑冠状切片做了正反 调整)。

图5 EB染色

2.3 TTC 染色

脑缺血再灌注72h后,模型组大脑皮质下和部分 皮质的梗死区呈苍白色(为更好展示梗死区,脑冠状切 片做了正反调整),见图6-②④。经ImageJ分析,模型 组脑梗死体积占大脑总体积的(10.65±4.41)%,与假手 术组(0%)比较,差异有显著统计学意义有显著性差异 (P<0.001)。



注:①③为假手术组,大脑呈鲜红色;②④为模型组,大脑 皮质下和部分皮质的梗死区呈苍白色(为更好展示梗死区,脑 冠状切片做了正反调整)。

图6 TTC染色

3 改良线栓法与传统线栓法的比较

3.1 手术操作过程

本改良线栓法在甲状腺上动脉分支上方剪断颈外动脉,线栓头直接从剪断的颈外动脉残端进入,插线栓 过程中不接扎翼腭动脉,其它手术过程与传统线栓法 基本相同,详见图7。



注:(a-c)传统线栓法操作步骤,摘自《实验卒中模型方法 学》^[11];(d)本改良线栓法。

图7 改良线栓法与传统线栓法模式图

3.2 模型成功率

本改良线栓法的模型成功率为87.5%,高于文献 报道的传统线栓法(Longa法)的模型成功率60%^[7]、 46%(插线成功率为63%)^[10]。

3.3 脑梗死体积

本改良线栓法的脑梗死体积占大脑总体积(10.65±4.41)%,与文献报道的传统线栓法(Longa法)脑梗死 体积占大脑总体积的比例(12.89±5.74)%相似^[7]。

经改良后的建模方法,一定程度上降低了模型的 制备难度,提高了模型的成功率和稳定性。

4 讨论

血管再通是目前治疗脑缺血的有效手段,主要是 通过溶栓或机械取栓等实现早期再灌注,但恢复脑血 管血液流通后,可能出现更严重的脑功能障碍,即脑缺 血再灌注损伤^[12]。建立合适的脑缺血再灌注模型对研 究脑缺血再灌注损伤的预防、治疗及预后有重要意义。

脑缺血再灌注动物模型的制备方法有线栓法、血 栓法和光化学法等^[13]。其中线栓法制备SD大鼠脑缺 血再灌注模型具有不需开颅、损伤小,不需特殊设备, 缺血部位较恒定、可准确控制缺血和再灌注时间等优 点^[14],应用广泛。线栓法建模方式常见有2种,分别为 从颈总动脉进线栓和从颈外动脉进线栓建立模型,两 者在梗死体积上无显著性差异^[9,10]。从颈外动脉进线 栓建立模型,手术操作难度虽略大,但该建模方式在血 管重新开放时,再灌注几乎立即发生,随后血流恢复到 卒中前的基线水平或低灌注状态,能较好地模拟机械 取栓后脑血流的状况^[15],再灌注后的灌注量和半暗带 血管直径明显高于从颈总动脉进线栓建模^[10,16]。因此, 从颈外动脉进线栓建立模型的方式是研究血管内取栓 术后再灌注的理想模型,本研究也采用此方式建模。

但现有文献报道的模型成功率较低。因此,本课 题组从减少手术步骤、降低手术难度、提高模型稳定性 和成功率角度对建模细节进行了改良,具体如下:①明 确了预结扎颈总动脉位置:如图1-③所示,预结扎位置 位于胸骨舌骨肌和胸锁乳突肌覆盖的位置,这可以预 留出较长的血管,有利于后面的线栓操作。②明确了 结扎颈外动脉位置和剪断颈外动脉位置:如图2-③所 示,在甲状腺上动脉分支的上方结扎颈外动脉,在颈外 动脉结扎位置与甲状腺上动脉分支之间剪断颈外动 脉,保留较长的颈外动脉残端,有利于后续调整线栓头 方向,使线栓进入颈内动脉。③改良了线栓头插入颈 外动脉的方式:如图3-①所示,线栓头从剪断的颈外动 脉残端直接插入;颈外动脉残端孔径较大,有利于线栓 进入;相比在颈外动脉剪一"V"切口,改良后的方式简 单、直接,减少了手术操作步骤,一定程度上降低了手 术难度,也有利于保留较长的颈外动脉残端。④本研 究采取图文并茂方式描述模型建立过程,可以给实验 初学者更直观的建模参考。

此外,结合个人体会与文献报道,针对颈外动脉进 线栓建立模型有以下几点建议:①结扎颈外动脉宜采 用7-0丝线或6-0丝线,这样丝线打结后占用的血管 短,且线结不易滑脱。②在手术过程中要防止大出 血。比如在血管分离过程中,要注意枕动脉、甲状腺上 动脉,采用电凝刀依次烧断。颈内动脉周围组织尽量 分离干净,使其处于游离状态,使用血管夹夹闭时,稍 稍拎起血管可以较好的夹闭血管;否则,会因血管夹不 能完全夹闭血管造成大出血。在剪断颈外动脉前,确 保颈总动脉和颈内动脉均已被阻断,以防大出血。颈 外动脉残端插入线栓后,在去除颈内动脉上的血管夹 前,要适度收紧颈外动脉残端处的丝线,以防因血压增 大导致线栓被冲出引起大出血;同时也不能绑太紧,以 防线栓头被卡住,造成后续不能进线栓。③线栓调整 方向:在进线栓的过程中,可能会误入翼腭动脉,这时 需回抽一部分,略微调整栓头角度后重新尝试,也可更 换线栓,切记不可用力过大,使栓头弯曲,影响后续尝 试,或免刺破血管,导致建模失败。④手术过程中,SD 大鼠出现知觉后,可再次进行麻醉;麻醉药剂量宜控制 在原来总剂量的1/3~1/2。

本实验颈外动脉改良线栓法建立SD大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,经神经功能缺损评分、EB染色和

TTC染色,证实模型是成功的。与传统线栓法相比较, 改良线栓法一定程度上降低了手术操作难度,提高了 模型的稳定性和成功率,因线栓阻塞方式一致,2种建 模方法在梗塞时间相同的情况下,梗死灶体积应无差 异,后续我们将进一步深入研究,以获得确切结论。

参考文献

[1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国缺血性卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南2022[J].中华神经科杂志,2022,55(10):1071-1110.

[2] Wu M, Gu X, Ma Z. Mitochondrial Quality Control in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury[J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(10): 5253-5271.

[3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
[4] Lopez MS, Vemuganti R. Modeling Transient Focal Ischemic Stroke in Rodents by Intraluminal Filament Method of Middle Cerebral Artery Occlusion[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1717: 101-113.

[5] 何芳雁,韩春妮,李艳,等.制作线栓法大鼠脑缺血再灌注模型的要 点及体会[J].实验动物科学,2013,30(4):46-48.

[6] 范瑞娟, 罗亚非, 孙玉凤. 新式线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注 模型的建立[J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(2): 26-27.

[7] 孙念霞,高维娟,易忠良.改良线栓法制作SD大鼠局灶性脑缺血再

灌注模型[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(2): 225-230.

[8] 吴琳, 刘娅楠, 张娜, 等. 大鼠脑缺血再灌注模型制作流程详述及经验总结[J]. 实验动物科学, 2021, 38(3): 62-65.

[9] 王东亮, 王冬, 何天鵬, 等. 两种线栓法制作小鼠大脑中动脉栓塞模型的比较[J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2019, 5(6): 358-364.

[10] 李勇,徐卓,王建,等.颈总与颈外插线构建大脑中动脉栓塞大鼠模型脑微循环灌注的比较[J].中国组织工程研究,2023,27(11):1683-1691. [11] 杨国源,金坤林,张志君.实验卒中模型方法学[M].上海:上海交通 大学出版社,2019.

[12] L L, X W, Z Y. Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies[J]. Biochem Pharmacol (Los Angel), 2016, 5(4): 213.

[13] McCabe C, Arroja MM, Reid E, et al. Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra[J]. Neuropharmacology, 2018, 134(Pt B): 169-177.

[14] Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, et al. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(8): 1412-1431.

[15] Sutherland BA, Neuhaus AA, Couch Y, et al. The transient intraluminal filament middle cerebral artery occlusion model as a model of endovascular thrombectomy in stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2016, 36(2): 363-369.

[16] Morris GP, Wright AL, Tan RP, et al. A Comparative Study of Variables Influencing Ischemic Injury in the Longa and Koizumi Methods of Intraluminal Filament Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148503.

(本文编辑:唐颖馨)

৯৮৯০ চেএচ এই ১৯৮৯ চন চন্দ্র হিরাজে চেরাজে চেরাজি চেরাজি চেরাজি চেরাজি মাজ

(上接第568页)

[11] Street JS, Qiu Y, Lignani G. Are Genetic Therapies for Epilepsy Ready for the Clinic[J]? Epilepsy Curr, 2023, 23: 245-250.

[12] Persico I, Fiscarelli I, Pelle A, et al. Phenotype reversion as "natural gene therapy" in Fanconi anemia by a gene conversion event[J]. Front Genet, 2023, 14: 1240758.

[13] Olson TS, Walters MC. Allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation versus gene therapy for haemoglobinopathies[J]. Lancet Haematol, 2023, 10: e798-e800.

[14] Malvasi M, Casillo L, Avogaro F, et al. Gene Therapy in Hereditary Retinal Dystrophies: The Usefulness of Diagnostic Tools in Candidate Patient Selections[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 13756.

[15] Wang Y, Shao W. Innate Immune Response to Viral Vectors in Gene Therapy[J]. Viruses, 2023, 15: 1801.

[16] Liu J, Guo Y, Zhang Y, et al. Astrocytes in ischemic stroke: Crosstalk

in central nervous system and therapeutic potential[J]. Neuropathology, 2023. Online ahead of print.

[17] Xie X, Liu J. New role of astrocytes in neuroprotective mechanisms after ischemic stroke[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2023, 81: 748-755.

[18] Li L, Zhou J, Han L, et al. The Specific Role of Reactive Astrocytes in Stroke[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 850866.

[19] Sompol P, Gollihue JL, Weiss BE, et al. Targeting Astrocyte Signaling Alleviates Cerebrovascular and Synaptic Function Deficits in a Diet-Based Mouse Model of Small Cerebral Vessel Disease[J]. J Neurosci, 2023, 43: 1797-1813.

[20] McKay LK, White JP. The AMPK/p27Kip1 Pathway as a Novel Target to Promote Autophagy and Resilience in Aged Cells[J]. Cells, 2021, 10: 1430.

(本文编辑:唐颖馨)