

线栓法复制大鼠脑缺血后出血转化模型的研究

宁琰, 孙航, 周艳凯, 冯晋, 许春萍, 何芳雁

摘要 **目的:**探讨线栓法复制大鼠脑缺血后出血转化模型的最佳条件。**方法:**采用线栓法复制大鼠大脑中动脉阻塞模型(tMCAO),按脑血流变化情况及术后2 h的神经学评分结果选择造模成功大鼠并再随机分为3组,分别在在脑缺血3 h、6 h和9 h拔出线栓恢复脑血供,复制大鼠脑缺血后出血转化模型(tMCAO-HT)。术后48 h以脑组织梗死情况、HT发生率、脑组织出血量评分、脑组织血红蛋白含量以及死亡率为指标,评估筛选最佳的tMCAO-HT模型复制条件。**结果:**与假手术相比,各模型组脑组织缺血后5 min测得脑血流量均下降至基础值的42%~53%,再灌注后5 min测得脑血流量均显著提高;术后2 h神经学评分均明显升高($P<0.01$),且组间无明显统计学差异;术后48 h各模型组脑梗死灶明显,且均出现不同程度的HT;HT的出血量评分和血红蛋白含量均明显高于假手术组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且随着缺血时间的延长呈逐渐上升趋势;各模型组均有不同程度的大鼠死亡,且随着缺血时间的延长,大鼠死亡率呈增加趋势,其中缺血9 h组死亡率高达83.33%。**结论:**线栓法造模导致脑缺血后3 h、6 h、9 h再予以再灌注均能成功复制大鼠tMCAO-HT模型,但缺血9 h导致死亡率过高,研究用tMCAO-HT模型以脑缺血3 h或6 h后再灌注为宜。

关键词 脑缺血后出血转化模型;线栓法;再灌注

中图分类号 R741;R741.02;R743 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20210422

Study on Rat model of Hemorrhagic Transformation after Cerebral Ischemia by Suture Occlusion Method NING Long, SUN Hang, ZHOU Yan-kai, FENG Jin, XU Chun-ping, HE Fang-yan. School of Chinese material medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650000, China

Abstract **Objective:** To explore optimal conditions for the suture occlusion method to make the model of hemorrhage transformation after cerebral ischemia in rats. **Methods:** The rat model of transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) was established by the suture occlusion method. According to the changes in cerebral blood flow and results of neurological assessment 2 hours after operation, the rats that underwent successful model establishment were selected and randomly divided into 3 groups. The suture was removed at 3, 6, and 9 hours after cerebral ischemia to make hemorrhage transformation after cerebral ischemia (tMCAO-hemorrhagic transformation, tMCAO-HT). The cerebral infarction, incidence of HT, cerebral hemorrhage volume, hemoglobin content of brain tissue and mortality rate were used as indicators at 48 hours postoperatively to screen for optimal tMCAO-HT rat model replication conditions. **Results:** Compared with the sham operation group, the cerebral blood flow in each model group measured 5 minutes after cerebral ischemia decreased to 42%~53% of the baseline value; when measured 5 minutes after reperfusion, the blood flow in each model group was significantly increased. The neurological scores at 2 hours after operation were significantly increased ($P<0.01$), and there was no significant statistical difference between the groups. There was obvious cerebral infarction and HT in various degrees in each model group 48 hours after operation. The HT hemorrhage volume and hemoglobin content in each model group were significantly greater than those of the sham operation group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and these values gradually increased with the prolongation of ischemia. Each model group showed different degrees of mortality, and mortality rates increased with the increased ischemia time, in which the mortality rate of the 9-hour ischemia group reached 83.33%. **Conclusion:** The tMCAO-HT model in rats can be successfully replicated by reperfusion at 3, 6, and 9 hours after cerebral ischemia with the suture method. However, the mortality rate at 9 hours is too high, and reperfusion after 3 or 6 hours of cerebral ischemia is more appropriate in studies using the tMCAO-HT model.

Key words hemorrhagic transformation after cerebral ischemia model; suture method; reperfusion

目前,脑卒中居我国居民死亡原因之首^[1],并以每年8.7%的速率增长^[2],其中以缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)发病率最高。研究表明,IS患者自发性出血转化(hemorrhagic transformation, HT)的发生率为13%~43%^[3];治疗时间窗内使用组织型

纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, t-PA)会使HT的发生风险增加2~3倍^[4];超时间窗(>4.5 h)使用t-PA会使HT的发生风险增加10倍,IS患者的死亡率增加10%~40%^[5]。降低IS后HT的发生率是抗IS的重要治疗策略之一。因此,建立成功

作者单位

云南中医药大学中药学院

昆明 650000

基金项目

云南省科技厅科技计划项目中医联合重点项目(No. 017FF117-004);

云南省科技厅科技计划项目基础研究专项(No. 202001AT070138);

国家自然科学基金资助项目(No. 81560664);

云南省科技厅科技计划项目中医联合青年项目(No. 2018FF001-074);

云南省科技厅基础研究专项-面上项目(No. 202001AT070554)

收稿日期

2021-10-22

通讯作者

何芳雁

735137511@

qq.com

率高、操作简单、病理特征明确的HT动物模型,对于探究HT的发生机制及治疗方法尤为重要。

IS发生后,缺血区可分为神经元不可逆性坏死的缺血中心区和以神经元凋亡为主的缺血半暗带(ischemic penumbra, IP)。如能在发病后4.5 h内(t-PA治疗时间窗)及时恢复血供,IP的组织可被挽救,否则将转化为不可逆的梗死区。但目前t-PA所诱导的HT与缺血持续时间之间的关系仍存有争议^[6],且其他诱导方法没有明确再灌注时间点的HT动物模型,实验研究多以t-PA的治疗时间窗4.5 h为依据,设置受试动物的HT诱导干预时间点。但是,IP的病理进程具有时空级联反应的特点,且动物与人之间存在一定差异。为确保研究结果的可靠性,我们前期参照美国卒中治疗学术工业圆桌会议(Stroke therapy academic industry roundtable, STAIR)建议的临床前研究规范技术标准,以脑血流量变化、神经学评分及脑梗死体积的相关性为评价指标,用线栓法复制大鼠大脑中动脉阻塞模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的稳定性研究,进行了IP出现及消失时间点的探索。研究表明:MCAO大鼠于缺血1 h时形成IP,持续至缺血6 h时IP基本消失,24 h完全消失(投稿中)。本研究将继续采用上述MCAO大鼠模型模拟IS损伤,选择缺血再灌后IP形成的3 h、IP基本消失的6 h及IP完全消失的9 h为时间点,拔出线栓实施再灌注,模拟临床t-PA溶栓、血栓自融等过程以诱导HT的发生,复制大鼠脑缺血后出血转化模型(transient Middle cerebral artery occlusion-hemorrhagic transformation, tMCAO-HT);并通过检测神经学评分、脑组织梗死情况、脑组织出血发生率、脑组织出血量评分、脑组织血红蛋白含量、死亡率来评价模型,以期筛选出最适宜的模型复制条件,用于后续研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠[许可证号: SCXK(川)2020-030,批号: 51203500016572],4~8周龄,250~300 g,购自成都达硕实验动物有限公司。动物饲养于云南中医药大学动物实验室,常规条件饲养,可自由进食与饮水。

1.1.2 主要药物与试剂 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)(批号 821W031)购于北京索莱宝科技有限公司; QuantiChrom™ Hemoglobin Assay Kit(批号 DIHB-250)购于美国

Bioassays公司。

1.1.3 主要仪器 MCAO线栓(型号2636A4)购于北京西浓科技有限公司;激光散斑血流成像仪(型号PeriCam PSI)购于瑞典帕瑞医学(中国)公司;酶标仪(型号Infinite M2000)购于瑞士Tecan公司;小动物麻醉机(型号V1824301)购于美国Marex公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将SD大鼠随机分为假手术组(12只)和手术组(36只),MCAO造模后按脑血流变化及术后2 h的神经学评分结果将手术组随机再分为:缺血3 h、6 h和9 h再灌注出血转化模型亚组(tMCAO3h-HT、tMCAO6h-HT和tMCAO9h-HT),每组12只。

1.2.2 MCAO模型制作 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定,颈部常规剃毛、碘伏消毒后在颈正中偏右切约1.5 cm切口,将右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)和迷走神经分离至分叉处。结扎CCA近心端,动脉夹夹闭CCA远心端,在CCA上用缝合线打一活结,眼科剪在距分叉1 cm处剪一“V”形缺口,将肝素钠线栓插入。松开CCA上动脉夹,向右轻拉CCA近心端结扎线,调整进线角度使线栓成功到达较细的大脑前动脉,停止插栓,在脑缺血后3 h、6 h、9 h拔出线栓实施再灌注以诱导HT的发生。

1.2.3 模型评价 ①激光散斑血流成像仪监测脑血流量:麻醉大鼠,矢状位剪开额顶部皮肤,暴露颅骨前囟,用生理盐水保持颅骨湿润。将大鼠颅骨固定在激光散斑成像显微镜下,记录此时脑皮质血流动态图像并取正常脑血流量(cerebral blood flow, CBF)值为100%。术后5 min再次监测脑组织局部CBF下降至42%~53%即为缺血成功;拔出线栓后5 min再次监测脑组织局部CBF有恢复则再灌注成功。②神经学评分检测神经功能缺失症状:术后2 h参照改良的Longa评分标准^[7]评价大鼠的神经功能,0分:无神经功能缺损症状;1分:轻度局灶性神经功能缺损,即提尾悬空不能伸展左侧前爪;2分:中度局灶性神经功能缺损,即行走向左侧转圈;3分:重度局灶性神经功能缺损,即行走困难,向左侧倾倒,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。③TTC染色检测脑梗死:术后48 h,各组随机选取2只大鼠,麻醉后快速断头取脑,去除嗅球,连续冠状切片,共5片(约2 mm/片),将脑切片置入TTC溶液中,37℃恒温避光染色15 min后取出脑切片放入4%多聚甲醛溶液中固定过夜,取出脑片,拍照评价脑梗死情况。④脑组织HT指标检测:术后48 h,

麻醉后快速断头取脑,去除嗅球,连续冠状切片,共5片(约2 mm/片),统计脑组织HT发生率;后采用双盲法检测脑切片的出血量评分:0分:未见出血;1分:梗死边缘小点状出血;2分:梗死区内点片状出血;3分:出血面积<梗死的30%;4分:出血面积≥梗死的30%。每个切片得分相加为总分。完成出血量评分后,取缺血侧脑组织并称重。1 mg脑组织加入9 μL PBS溶液,充分匀浆后,以低温离心机3500 转/min离心20 min,收集上清后按Hemoglobin Assay Kit试剂盒说明书要求检测脑组织血红蛋白含量,检测波长:400 nm。

1.3 统计学处理

采用SPSS 26.0软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本均数t检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组脑血流量比较

与造模前相比,各模型组脑组织缺血后5 min测得CBF均明显下降至基础值的42%~53%,缺血3 h、6 h和9 h组的CBF分别降为基础值的51.48%、53.23%和52.99%,提示缺血造模成功;再灌注后5 min测得CBF均显著提高,缺血3 h、6 h和9 h组的CBF分别提升至基础值的78.19%、74.58%和66.24%,提示血流恢复,再灌注成功,见表1、图1。

2.2 各组神经功能比较

与假手术组相比,缺血2 h后各模型组均出现明显的神经功能缺失症状,神经学评分显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);各模型组间神经学评分差异无统计学意义($P>0.05$),提示分组均匀,见表2。

2.3 各组脑梗死及脑出血比较

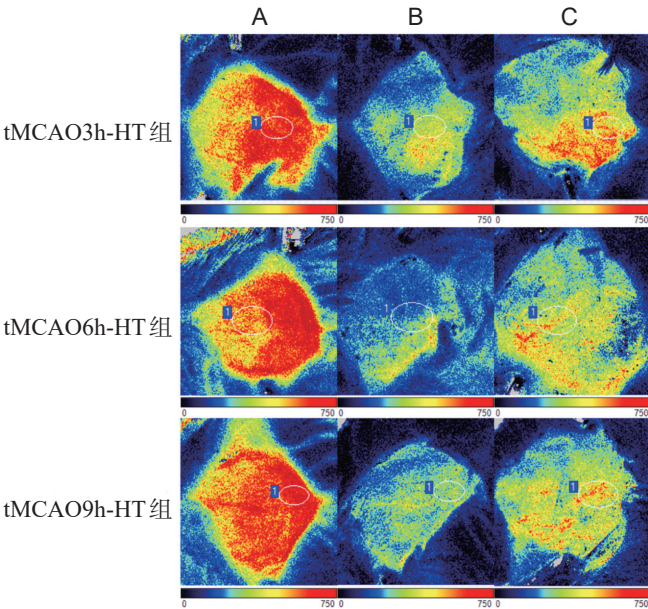
与假手术组相比,各模型组脑梗死灶明显,随缺血时间延长脑梗死面积呈增加趋势,见图2A;各模型组均出现不同程度的HT,见图2B。各模型组脑组织HT的出血量评分和血红蛋白含量均明显高于假手术组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且随着缺血时间的延长,HT的发生率、脑组织出血量评分和血红蛋白含量呈逐渐上升趋势,见表3。

2.4 模型大鼠的死亡率

假手术组大鼠死亡率为0;各模型组均有大鼠死亡,且死亡率随缺血时间的延长呈增加趋势;缺血3 h、6 h和9 h组的死亡率分别为33.3%(4/12)、50.0%(6/12)和83.3%(10/12),均高于假手术组($P<0.05$)。

表1 tMCAO-HT模型大鼠CBF值(mL/100g/min, $\bar{x}\pm s$)

组别	基础值	缺血后 5 min	再灌注后 5 min
tMCAO3h-HT组	556.08±54.68	283.93±5.84	434.97±46.02
tMCAO6h-HT组	569.73±19.70	303.05±24.91	425.38±35.76
tMCAO9h-HT组	551.85±20.35	292.17±4.08	363.64±38.76



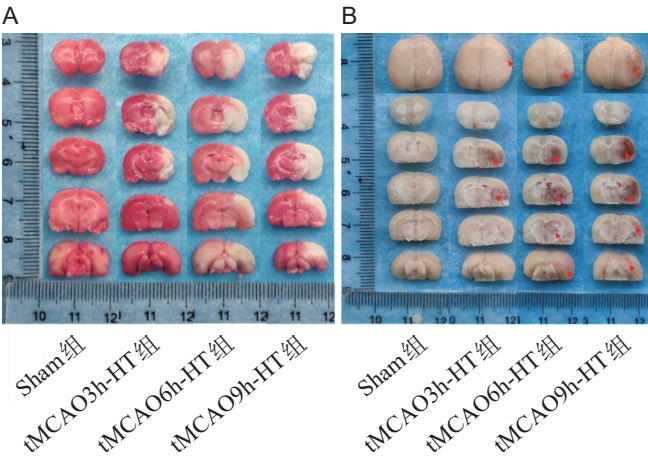
注:(A)基础值;(B)缺血后5 min;(C)再灌注后5 min

图1 各组大鼠脑血流量激光散斑图

表2 各组大鼠术后2 h神经学评分(分, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	神经病学评分
假手术组	12	0.00±0.00
tMCAO3h-HT组	12	1.83±0.39 ^①
tMCAO6h-HT组	12	1.75±0.45 ^①
tMCAO9h-HT组	12	1.75±0.45 ^①

注:与假手术组比较, ^① $P<0.01$



注:(A)TTC染色显示脑梗死(白色部分);(B)可见不同程度脑出血灶(红色箭头所指)

图2 各组大鼠脑组织切片

表3 各组大鼠HT情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	发生HT [只(%)]	出血量 评分/分	血红蛋白 含量/(g/L)
假手术组	12	0(0)	0.00±0.00	7.74±0.34
tMCAO3h-HT组	8	6(75.0)	2.00±1.55 ^②	8.85±2.21
tMCAO6h-HT组	6	5(83.3)	3.33±2.80 ^①	10.87±2.62 ^②
tMCAO9h-HT组	2	2(100.0)	3.50±0.58 ^②	8.09±0.72

注:与假手术组比较, ^①P<0.05, ^②P<0.01

3 讨论

在医学研究中,动物模型与研究对象的相似性是该模型具有实用价值的基础。因此要尽量选择与生理、病理状态下人体结构、功能、代谢相似的实验动物,选择合适的实验方法,建立与人类疾病相似度高的实验模型,以提高研究结果的可靠性。线栓法复制大鼠tMCAO模型,具有无需开颅、可准确控制缺血及再灌注时间、梗死部位较明确等优势^[8]。神经学评分可反映大鼠神经功能的损伤程度。TTC可通过与非梗死组织中的脱氢酶反应产生红色的甲臢反应,而梗死组织内脱氢酶活性下降无法反应而呈苍白色的原理来判断脑梗死灶,是最常用的脑梗死评价指标^[9,10]。

本研究在激光散斑监测CBF的情况下,以神经学评分和TTC染色为指标,评价tMCAO模型的复制情况。结果表明,模型组大鼠缺血后CBF均降低到基础值的42%~53%;且模型组均有不同程度的神经功能缺失症状,神经学评分明显升高;TTC染色结果显示有明显的脑梗死,提示tMCAO模型复制成功。

血红蛋白是存在于血液中运输氧的特殊蛋白质,脑组织发生HT后可大量渗入脑组织,故检测脑组织血红蛋白含量可在一定程度上评价脑组织HT的严重程度。本实验在缺血后不同时间点拔出线栓以模拟临床血栓脱落、血栓自溶等过程造成缺血再灌注损伤,进而诱导脑组织发生HT,完成大鼠tMCAO-HT模型的复制,后比较各tMCAO-HT模型组脑组织HT的发生率、出血量评分、血红蛋白含量及死亡率,分析模型复制情况。结果表明,各模型组脑组织出血量评分和血红蛋白含量均上升,提示脑缺血3h、6h、9h实施再灌注均能成功复制大鼠tMCAO-HT模型。但结合各组大鼠的死亡情况考虑,tMCAO9h-HT组的死亡率过高(高达

83.3%)。故后期若进行缺血半暗带相关研究可选择脑缺血3h后再灌注以诱导tMCAO-HT模型为宜,若为超时间窗用药相关研究则选脑缺血6h后再灌注。

本研究还显示,控制再灌注时间而诱导出的HT发生率与缺血的持续时间呈正相关趋势。随着缺血时间延长,血脑屏障损伤加重,在缺血发生的几分钟其结构开始破坏,相继出现血管内皮细胞固缩或凋亡、基底膜断裂、血管管腔变形狭窄、内皮细胞间紧密连接蛋白降解或再分布,屏障通透性升高,血液、炎症因子等从受损部位进入脑组织^[11],最终再灌注所造成的HT发生率及死亡率都将升高。本研究中,缺血9h组血红蛋白含量与假手术组差异无统计学意义,可能与该组死亡率过高,纳入统计的大鼠只数偏少有关。

综上所述,线栓法复制大鼠tMCAO-HT模型的最佳缺血再灌注时间可能为3h或6h。但本研究未对不同缺血时间点大鼠的病理生理进行探讨,后续将进一步深入探索,以获得确切结论。

参考文献

[1] 《中国脑卒中防治报告》编写组.《中国脑卒中防治报告2019》概要[J]. 中国脑血管病杂志, 2020, 17: 272-281.

[2] 乔寒子, 廖文静, 倪小佳, 等. 缺血性卒中药物防治相关中国指南的系统评价[J]. 中国卒中杂志, 2018, 13: 327-332.

[3] Jickling GC, Liu D, Stamova B, et al. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2014, 34: 185-199.

[4] Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials[J]. Lancet, 2010, 375: 1695-1703.

[5] IST-3 collaborative group, Sandercock P, Wardlaw JM, et al. The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2012, 379: 2352-2363.

[6] Copin J C, Gasche Y. Effect of the duration of middle cerebral artery occlusion on the risk of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator injection in rats[J]. Brain Res, 2008, 1243: 161-166.

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

[8] 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及体会[J]. 实验动物科学, 2013, 30: 46-48.

[9] 李粮辉, 陈文华, 郑宏. 改进的TTC染色法显示大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22: 75-78, 13.

[10] 孟萌, 吴江, 邢英琦. 脑梗死后出血性转化-动物模型制备及评估的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30: 1041-1044.

[11] Yan C, Lihong L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2012, 64: 640-665.

(本文编辑:唐颖馨)