

大鼠局灶性脑缺血模型评价方法间关联性分析

崔煦然, 刘钊, 张志斌, 钟菊迎*

(中国中医科学院医学实验中心分子生物实验室, 中国中医科学院医学实验中心国家重点实验室, 北京 100700)

【摘要】 目的 分析评价线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞模型成功的三种方法之间的相关性, 为评价该模型提供一种新的方法和标准。**方法** 雄性 SD 大鼠共 (30) 只, 随机分成假手术组 ($n = 15$)、模型组 ($n = 15$), 参照 Zea-Longa 线栓法稍加改进制备局灶性脑缺血模型, 于术前术后检测各组大鼠脑血流变化。以大鼠脑梗死面积为金标准, 分析该标准与脑血流变化之间的相关性。**结果** 模型大鼠脑梗死面积率与脑血流变化量呈正相关, 与行为学评分高低无关。**结论** 大鼠脑血流量变化可作为评价局灶性脑缺血模型成功的标准。

【关键词】 脑梗死面积率; 行为学评分; 脑血流量; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0506-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.012

Analysis of the correlation between three evaluation methods of rat models of focal cerebral ischemia/reperfusion

CUI Xu-ran, LIU Zhao, ZHANG Zhi-bin, ZHONG Ju-ying

(China Academy of Traditional Chinese Medicine Experimental Center for Molecular Biology Laboratory, State Key Laboratory of Medical Research Center of Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

【Abstract】 Objective To analyze the correlation between three evaluation methods of middle cerebral artery occlusion and focal cerebral ischemia, and to explore a new method and standard for the evaluation of the model. **Method** Thirty healthy adult male SD rats were randomly divided into a sham-operated group ($n = 20$) and model group. According to Zea-Longa procedure, we established the disease model to detect the changes in cerebral blood flow before and after surgery. The resulted cerebral infarction area was taken as gold standards. Then we analyzed the correlation between the standards and the changes in cerebral blood flow. **Results** The changes of infarction area ratio were positively correlated with the changes of cerebral blood flow in the model rats. **Conclusions** The changes of rat cerebral blood flow can be used to evaluate whether the cerebral ischemia model is successful or not.

【Key words】 Infarct area; Behavioral score; Cerebral blood flow; Rats

线栓法^[1]是制备大鼠局灶性脑缺血模型的常用方法。该方法无需开颅, 便于操控。评价该模型成功的方法常用大鼠行为学评分^[2]以及 TTC 染色法, 但行为学评分方法具有主观性, TTC 染色法存在操作繁琐等缺点。本实验对 Zea-Longa^[2]线栓法稍加改进, 制备大鼠脑缺血模型, 并在此两种评价方法的基础上, 监测大鼠脑血流量变化, 分析三种评价方

法之间的相关性。旨在探索一种客观、操作简便、创伤小且可行的评价方法。

1 材料与方法

1.1 动物来源与分组

清洁级雄性 SD 大鼠 30 只, 250 g 左右^[3], 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK

[基金项目] 中国中医科学院院自主课题 (ZZ2012012)。

[作者简介] 崔煦然 (1988 -), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理。Email: cxxkuaile@126.com

[通讯作者] 钟菊迎 (1981 -), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药药理研究。Email: zhongjuying@hotmail.com

(京)2012—0001】。动物实验在中国中医科学院基础理论研究所动物房【SYXK(京)2010-0032】进行。大鼠随机分成假手术组($n = 15$)、模型缺血组($n = 15$)。

1.2 模型建立^[4]

1.2.1 术前准备

(1)激光散斑血流监测视频系统:帕瑞医学科技(北京)有限公司,型号 PeriCam PSI。线栓:由北京沙东生物技术有限公司提供。

(2)动物准备:大鼠术前自由饮食,适宜条件下饲养。

(3)麻醉:采用 10% 水合氯醛腹腔注射全身麻醉(350 mg/kg)。

1.2.2 局灶性脑缺血模型的制备

参照 Zea-Longa 报道的线栓法,制备大鼠左脑局灶性永久性脑缺血模型。首先麻醉大鼠,将大鼠以俯卧位固定,剪开头皮处皮肤,剥离开筋膜,暴露出头骨十字,利用脑血流检测仪监测大鼠双侧脑部血流情况,之后将大鼠以仰卧位固定,颈前部消毒,取颈正中偏右一点切口剪开皮肤并钝性剥离皮下组织,暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA),用动脉夹暂时阻断 CCA 及 ICA 血流,探查颈外动脉在颈部发出第一分支处,在其远心端(偏嘴侧)约 0.2 cm 处用缝合线进行结扎。用 6 号注射器于 CCA 处作一小切口,将线栓从 CCA 插入 ICA,轻轻将线栓送入颅内,若不能顺利将线栓送入颅内,可调整线栓与 ICA 的角度,或更换线栓;若线栓插入过程中,线栓进入血管内的长度小于 1 cm 即遇阻力,同时大鼠出现轻微的右侧面肌抽动,则线栓误入翼腭动脉(pterygopalatine artery, PPA),须拔线栓至 CCA 处,再度调整线栓角度,重新插入。栓塞成功后,用手术线结扎 CCA 切口处,移去夹闭 CCA 的动脉夹,观察无活动性出血后缝合切口。将大鼠以俯卧位固定,再次监测其脑部血流变化。

1.2.3 假手术组

麻醉大鼠,首先以俯卧位固定,剪开头皮处皮肤,剥离开筋膜,暴露出头骨十字,利用脑血流检测仪监测大鼠双侧脑部血流情况,之后将大鼠以仰卧位固定,颈前部消毒,取颈正中偏右一点切口剪开皮肤并钝性剥离皮下组织,分离出右侧 CCA, ICA 和

ECA,之后缝合切口即可。再次监测大鼠头部血流变化。

1.3 行为学评分

分别于术前、术后 24 h 观察大鼠行为并进行评分。参照 Zea- Longa 评分方法:无行为障碍的记为 0 分;左侧前肢屈曲的记为 1 分;爬行时身体向左侧转圈的记为 2 分;身体向左侧倾倒的记为 3 分;不能自主行走并伴有意识障碍的记为 4 分。

1.4 大鼠脑梗死面积率^[5]

术后 24 h,将大鼠深度麻醉,断头取脑,将大脑置于 -20°C 冰箱中快速冷冻 10 min,以视交叉平面为中心连续冠状切片 5 张,将脑切片置于 2% TTC 染液中孵育约 30 min,梗死区域为白色,正常脑组织则被染为红色。用数码相机对脑切片拍照,利用 IPP 软件计算脑梗死面积率。脑梗死面积率 = 梗死区域面积/全脑面积 $\times 100\%$ 。

1.5 大鼠脑血流量变化

脑缺血模型组和假手术组大鼠于术前和术后 24 h 分别监测脑血流量变化。脑血流量变化 = [正常平血流均值 - (脑缺血平血流均值/脑缺血 24 h 平血流均值)/正常平血流均值 $\times 100\%$]。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 软件进行统计学分析。组间比较采用 T 检验的方法。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学评分

术后 24h,观察大鼠行为状态,同时进行评分。假手术组大鼠活动正常,模型组大鼠出现不同症状的形为障碍,平均行为学评分为 (2.1 ± 0.3) ,与正常组比较差异有显著性($P < 0.01$)。

2.2 大鼠脑梗死面积率

图 1 显示,TTC 染色结果,其中假手术组大鼠脑部无缺血部位,模型组大鼠左脑出现明显的梗死灶,呈现白色,利用 IPP 软件计算脑缺血面积率为 (27.05 ± 11.03) ,与模型对照组比较差异有显著性($P < 0.01$)。

2.3 大鼠脑血流量变化

术前,大鼠双侧脑血流平稳,术后大鼠左侧脑部血流量立即下降,下降明显,右侧大脑血流量基本无变化,24 h 后,大鼠左脑血流量与术后相比无明显变化,其右脑血流量基本正常。假手术组大鼠双侧

脑部血流量于术后术前相比无明显变化。具体数据见表 1、图 2、图 3。

2.4 相关性分析

将术后 24 h 时的大鼠脑梗死面积率与脑血流变化量进行对比,脑梗死面积率与脑血流变化量呈正相关。如图 4 所示。

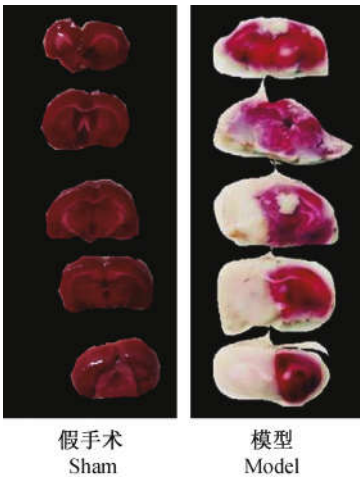


图 1 大鼠脑切片染色图
Fig.1 Staining pattern in the rat brain slices

表 1 大鼠脑血流量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)
Tab.1 Changes of cerebral blood flow in the rats

组别 Groups	术前血流量 Normal blood flow	24 h 血流量 24 h blood flow
左半脑 Left brain	327. 72 $\pm$ 31. 56	139. 05 $\pm$ 36. 53 **
右半脑 Right brain	324. 65 $\pm$ 37. 39	279. 48 $\pm$ 44. 66

注:与同侧脑术前血流量比较 ** $P < 0. 01$ 。
Note. Compared with preoperative ipsilateral cerebral blood flow, ** $P < 0. 01$.

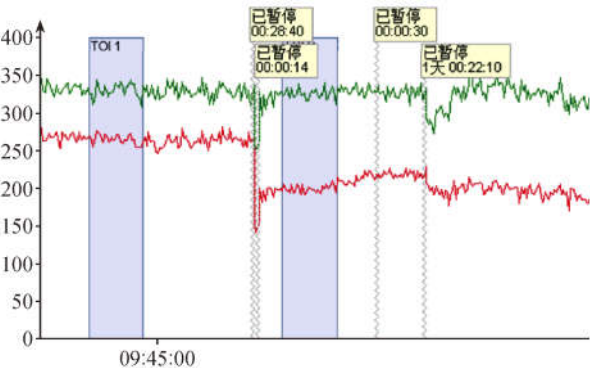


图 2 大鼠双侧脑血流量值变化
Fig.2 Changes of bilateral cerebral blood flow in the rats.

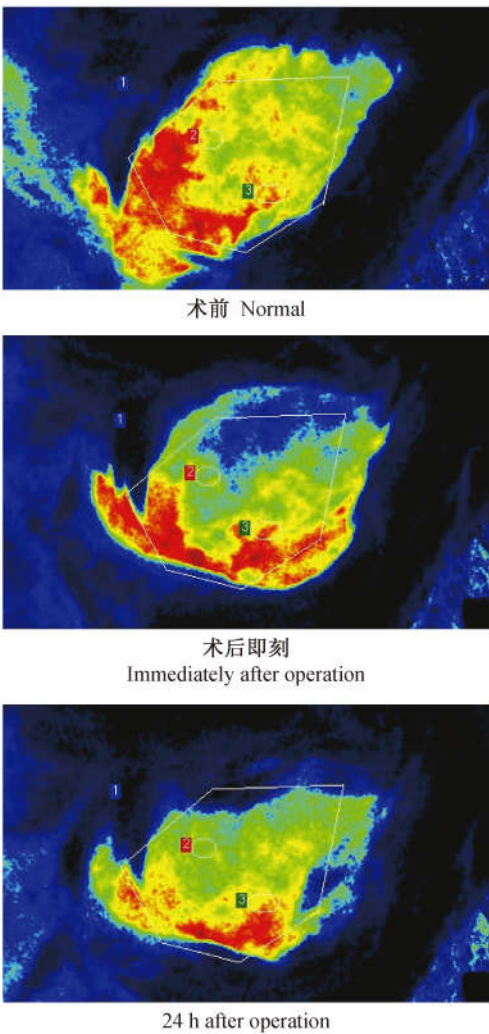


图 3 大鼠脑部血流变化实时监测图
Fig.3 Real-time monitoring of the changes of blood flow in the rat brain.

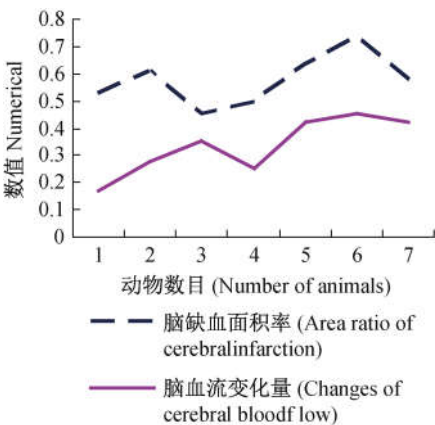


图 4 大鼠脑血流量变化量与脑梗死面积率比较
Fig.4 Comparison of cerebral blood flow and cerebral infarction area ratio in the rats.

(下转第 512 页)

全有效的^[15]。

总之,本研究结果进一步表明,麝香保心丸可明显降低大鼠力竭运动时血清和心肌中 CK、CK-MB、TnT、BNP 和 CRP 的水平,对力竭运动时具有防治心肌损伤和保护心脏功能作用。

参 考 文 献

- [1] 王晓伟,曹雪滨. 力竭性运动对心脏影响的研究进展[J]. 医学研究与教育, 2012, 29(2): 60-63.
- [2] Thomas DP, Marshall KI. Effects of repeated exhaustive exercises on myocardial subcellular membrane structure [J]. J Sports Med, 1988, 9(4): 257-264.
- [3] Tian Y, Nie J, Tong TK, et al. Changes in serum cardiac troponins following a 21-km run in junior male runners [J]. J Sports Med Phys Fitness, 2006, 46(3): 481-488.
- [4] 陈金良,张晶,樊欣娜,等. 新兵强负荷训练后血清心肌损伤标记物和 C 反应蛋白的变化[J]. 解放军医药杂志. 2014, 26(4): 103-105.
- [5] Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays [J]. N Engl J Med, 2009, 361(9): 858-867.
- [6] 吴广礼,容俊芳,温进坤,等. 过度训练致大鼠心肌和肾组织细胞凋亡及山莨菪碱干预的影响[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(1): 68-71.
- [7] 黄泼泼,刘江伟,张波,等. 沙漠干热环境下中暑大鼠的心肌酶及心肌组织形态学改变[J]. 中国实验动物学报, 2014(2): 11-15.
- [8] 王福文,胡志力,赵敬国,等. 反复力竭性运动后大鼠血清 cTnI 和心肌组织形态学的改变 [J]. 心脏杂志, 2011, 23(2): 197-199.
- [9] 许思毛,刘涛波,苏全生. 大负荷运动对大鼠心肌细胞膜钠钾泵、钙泵与肌浆网钙泵活性的影响 [J]. 体育科学, 2010, 30(12): 82-86.
- [10] Smith LL. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress [J]. Med Sci Sports Exerc, 2000, 32(2): 317-331.
- [11] 王仙,徐传新,朱慧娟. 麝香保心丸的心血管系统药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2012, 23(43): 4114-4115.
- [12] 韩凌,陈金良,周文燕,等. 麝香保心丸联合曲美他嗪对冠心病心力衰竭患者血管内皮功能及血浆脑钠肽影响临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(12): 1431-1433.
- [13] 张武宁,彭雪梅,高晓东,等. 麝香保心丸对 2 型糖尿病合并慢性心力衰竭患者心功能及 BNP 的影响 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(3): 234-236.
- [14] 张勇,唐海沁,李瑾. 麝香保心丸治疗冠心病的 Meta 分析 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(1): 13-17.
- [15] 魏姗姗,詹常森,邓中平. 麝香保心丸安全性研究概述 [J]. 中成药, 2015, 37(5): 1080-1082.

[收稿日期] 2015-04-13

(上接第 508 页)

3 讨论

脑卒中是一种常见的急症、重症。Zea-Longa 线栓法被广泛用于实验性局灶脑缺血模型的建立。对于模型成功与否的评价,普遍采用行为学评分以及 TTC 染色法,而对于该模型,大鼠脑血流量的变化则鲜有报道。大鼠行为学评分具有主观性,TTC 染色法虽能客观评价模型的成功性,但却需处死大鼠后取得结果,从而阻碍了后续实验的进行。同时消耗了大量的样本、试剂等。若采用大鼠脑血流量变化为评价标准,则避免浪费过多的样本,且能实时监测大鼠脑部变化,更具客观性。本实验以此为背景,制备了大鼠脑缺血模型,使用血流检测仪实时监测大鼠术前、术后即刻以及缺血 24 h 的脑部血流变化。同时以大鼠行为学评分为辅助标准,以脑梗死面积率为金标准,分析大鼠脑血流变化与脑梗死面积率间的关系。研究表明,大鼠脑梗死面积率与血

流减少量呈正相关。因此,大鼠脑血流量变化可以作为一种客观的评价标准应用于缺血模型成功的评价。

参 考 文 献

- [1] Koizumi J, Yodaide Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. Jpn J Stroke, 1986, 8(1): 1-8.
- [2] Zea-Longa E, Weinstein P, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke. 1989, 20(1): 84-91.
- [3] 李晶,郭利平. 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型的研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2008, 27(1): 54-56.
- [4] 朱继,万东,唐文渊. 改良线栓法制备大鼠局灶脑缺血模型 [J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(8): 685-687.
- [5] 赵浩,李永宁,王任直,等. 大鼠局灶性脑缺血模型的有效制备[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(6): 432-436.

[收稿日期] 2015-05-12