

开放翼腭动脉改良制备大鼠自体血栓脑梗死模型比较

周震¹, 王雪岩², 王坤², 王凯², 张玉莲¹

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

【摘要】目的 利用大鼠自体血栓, 在开放翼腭动脉(pterygopalatine artery, PPA) 的情况下堵塞其大脑中动脉, 造成大脑中动脉远端供血区的脑梗死模型。**方法** 开放 PPA, 结扎颈外动脉(external carotid artery, ECA), 将栓子通过颈总动脉(common carotid artery, CCA) 血流将栓子冲入大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA) 远端, 造成梗死模型, 按 Bederson 评分对其神经功能进行评分, TTC 染色确定梗死体积。**结果** 两手术组模型比较, 评分均升高, 且出现白色梗死区, 经统计检测分析无明显差异。**结论** 开放 PPA 大鼠自体血栓制造脑梗死模型可缩短手术时间, 降低死亡率。

【关键词】 翼腭动脉; 脑梗死模型; 大鼠; 比较研究

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 09-0062-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 009. 014

A comparative study of opening the pterygopalatine arteries improved preparation of autologous blood clots in cerebral infarction model

ZHOU Zhen¹, WANG Xue-yan², WANG Kun², WANG Kai², ZHANG Yu-lian¹

(1. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

【Abstract】 Objective To open pterygopalatine artery using autologous blood clot clogged the middle cerebral artery, resulting in cerebral infarction model of middle cerebral artery in the distal blood supply area. **Methods** Open PPA, ligation of ECA, embolus through CCA blood flow, rushed into the MCA distal embolus, cause infarction model. According to Bederson rating score the neural function. TTC staining to determine the infarction volume. **Results** Comparison of two operation models, scores were increased, and white infarcted area appears. There is no significant differences detected by statistical analysis. **Conclusion** Open PPA manufacturing cerebral infarction model rats of autologous blood clots could shorten the operation time, reduce the mortality rate.

【Key words】 Pterygopalatine artery; Cerebral infarction model; Rats; Comparative study

脑梗死又称缺血性卒中, 本病系由各种原因所致的局部脑组织区域血液供应障碍, 导致脑组织缺血缺氧性病变坏死, 进而产生临床上对应的神经功

能缺失表现, 在整个卒中中占很大比例^[1]。脑梗死依据发病机制的不同分为脑血栓形成、脑栓塞和腔隙性脑梗死等主要类型。其中脑血栓形成是脑梗

【基金项目】 国家自然科学基金(81273942); 天津市应用基础及前沿技术 Research 计划(12JCZDJC25300); 天津市教委“十二五”创新团队培养计划(NO. TD12-5035)。

【作者简介】 周震, 医学博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为中医药治疗脑血管病的临床与机制研究, ; E-mail: zhouzhen7681@126. com。

【通讯作者】 张玉莲, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 从事中西医结合防治脑病工作, E-mail: zhy1220@126. com。

死最常见的类型,约占全部脑梗死的 60%^[2],因而通常所说的“脑梗死”实际上指的是脑血栓形成,迅速溶栓,恢复血流是最基本、最有效的方法^[3]。随着我国人民生活水平的不断提高,饮食结构、生活方式和疾病谱逐渐发生变化,青年脑梗死患病率有逐年上升的趋势^[4],给家庭和社会带来沉重负担。为探索血栓性疾病的原因、病理生理变化,开展新疗法,预测临床转归,动物模型的建立是不可缺少的手段,近年来,国内外学者通过不同方法建立了多种 MCAO 模型^[5],本文在 Busch^[6],张新江等^[7]的实验方法的基础上对模型做了进一步改良,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择健康 SD 大鼠 33 只,为保耐受度与均衡度,全部选用雄鼠,体重 200 g 左右,SPF 级,来源于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2009-0004】,由中国医学科学院放射医学研究所饲养【SYXK(津)2011-0008】,分为三组,其中对照组 3 只、普通手术组 15 只,改良手术组 15 只。实验中对动物的操作符合《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[8]。

1.2 实验材料

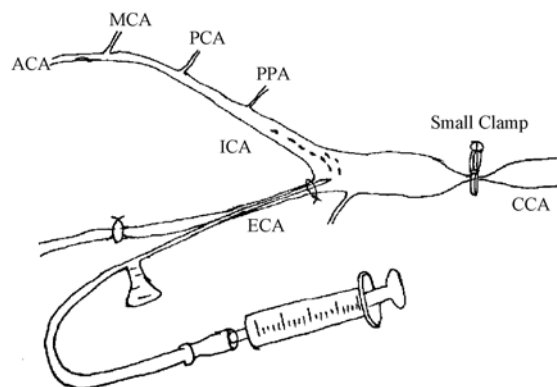
麻药(10%水合氯醛),2,3,5-氯化三苯基四氮唑(triphenyl tetrazolium chloride, TTC, Sigma)毛细玻璃管(0.5 mm),凝血酶,刀片(普通吉列剃须刀片),手术器材(手术剪一个,弯头镊子两个,缝合针,缝合线),5.5 号静脉输液针,动脉夹,载玻片,离心管,碘伏,庆大霉素。

1.3 栓子制备

取健康大鼠一只进行内眦取血 0.5 mL,立即注入含有 0.75 μ L 柠檬酸钠(0.109 mol/L)的 EP 管内,混匀后 5000 r/min 离心 1 min。取贫血小板血浆 160 μ L, RBC 10 μ L 与 1 单位凝血酶(25 万单位/L)、30 μ L 氯化钙(0.5 mol/L)溶液混合,立即将其吸入毛细玻璃管中。为确保血凝的质量,取完血的毛细玻璃管平放,静置 2 min。2 min 后,用生理盐水浸润后将毛细玻璃管从中间掰断,并在保持血栓不被拉断的情况下轻轻至于载玻片上,载玻片上的所有操作要确保在生理盐水的浸润下进行。轻轻将所有的血栓全部拉出,最后用刀片将血栓切成 1~1.5 mm 大小的栓子,放在盛有生理盐水的培养皿中

备用。

1.4 模型制备



注:CCA = 颈总动脉,ICA = 颈内动脉,MCA = 大脑中动脉,
PCA = 大脑后动脉,ECA = 颈外动脉,
PPA = 翼腭动脉,ACA = 大脑前动脉。

图 1 手术示意图

Note:CCA = common carotid artery, ICA = internal carotid artery,
MCA = middle cerebral artery, PCA = posterior cerebral artery,
ECA = external carotid artery, PPA = pterygopalatine artery,
ACA = anterior cerebral artery.

Fig. 1 Schematic diagram of operation

改良手术组:采用 10% 水合氯醛(300mg/kg)腹腔麻醉后,颈正中切开皮肤,剥离肩胛舌骨肌、胸骨舌骨肌与胸骨乳突肌,暴露颈总动脉(CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)与颈外动脉(ECA)。分离左侧 ECA 与 ICA^[3-4]。游离 ECA 远端并结扎之,凝闭其分支,并再次在 ECA 下穿过缝合线,备用。用金属动脉夹暂时夹闭 CCA,用 5.5 号静脉输液针逆行穿刺左侧 ECA 至 CCA,稍过 ICA 起始处,然后用穿过备用的缝合线扎紧,随即用 1 mL 注射器缓慢推注栓子盐水悬液直至所用栓子全部进入 CCA,撤出输液针的同时扎紧进针孔。撤去动脉夹后恢复 ICA 的血供,使栓子通过 ICA,在动脉血恢复的瞬间冲击下进入颅内至大脑中动脉,缝合皮肤。肌注庆大霉素(0.5 mL/只)以抗感染。假手术组手术方法同模型制作,只在注射时以等量生理盐水代替栓子溶液(见图 1)。

普通手术组:在注入栓子之前结扎翼腭动脉,其余方法同改良手术组。

1.5 模型评价

1.5.1 动物苏醒后按 Bederson 评分^[9]:无神经损伤症状为 0 分;悬尾实验不能完全伸展对侧前爪为 1 分;前肢抵抗对侧推力能力下降为 2 分;向对侧转圈为 3 分。

表 1 Bederson 评分
Tab. 1 Bederson score

	样本数 Number	评分(分)Score	死亡 Death
对照组 Control group	3	0	0
普通手术组 The ordinary operation group	15	2.13 ± 0.74	1
改良手术组 The modified operation group	15	2.07 ± 0.70	2

表 2 梗死灶体积
Tab. 2 The size of infarction

	样本数 Number	梗死区体积(mm ³) The size of infarction
对照组 Control group	3	0
普通手术组 The ordinary operation group	13	209.99 ± 7.52
改良手术组 The modified operation group	14	214.81 ± 9.53

1.5.2 手术 24 h 后断头取材,完整剥离大鼠全脑, - 80℃ 冰冻 5 min,至于脑槽上切片后行 TTC 染色,计算梗死区体积。

1.6 统计方法

采用 SPSS13.0 统计分析软件进行处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据间的比较采用 t 检验分析方法, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 Bederson 评分

与对照组比较,两个手术组评分均明显升高,说明两个手术组均出现神经功能损伤,两个手术组之间比较,没有表现出明显差异($P > 0.05$)。

2.2 梗死灶的体积

手术 24 h 后 TTC 染色见普通手术组与改良手术组均出现白色坏死区域,并且两组梗死体积相差不大($P > 0.05$),对照组无白色梗死区出现(图 2)。

3 讨论

3.1 关于 PPA 的结扎问题

在以往的实验研究中实验者倾向于将同侧翼腭动脉(PPA)同时结扎^[10],但是 PPA 的位置特别深,大约在 ICA 与 ECA 分叉上 1 ~ 1.5 cm 处,实验操作中不容易分离及操作,同时也因为它是 ICA 的分支,并且直径远远小于 ICA,所以本实验通过控制栓子的大小而不需要结扎来避免栓子通过 PPA。通过实际试验操作及结果来看,不接扎 PPA 并不影响实验结果。

3.2 关于不同体重大鼠的选择问题

大鼠的重量是影响本实验的一个关键因素。在实验过程中发现,体重过大的大鼠 ECA 及 CCA

过于粗壮,栓子不容易造成梗塞,体重过小又不利于针头穿刺进入 CCA 进行栓子注入,所以选择大鼠时控制体重在 200 g 左右。

3.3 关于栓子的制备问题

栓子的大小要严格控制在 1 ~ 1.5 mm 之间,因为太小的栓子不能确保大于 PPA 的直径,从而有从 PPA 通过的可能,太大的栓子不容易从 5.5 号静脉输液针头通过,容易堵塞针头而影响注射。其次,将栓子吸入 5 mL 注射器时应先将针头拔下再吸入,不可用针头直接吸入,这样避免了吸入率低及容易产生气泡等问题。栓子吸入以后先将输液针管内注满生理盐水然后靠栓子重力缓慢滑至针头尾端,并且保证每个栓子之间有一定距离从而使它们依次被注入血管。

3.4 关于 ECA 结扎问题

远端结扎线尽量靠上,留出足够的空间进行针尖穿刺;近端结扎线尽量靠近分叉口,可以防止栓子流回 ECA。

3.5 关于实验结果问题

通过最后对大鼠形态的评分比较及 TTC 染色可以明显体现两个手术组与对照组的区别($P < 0.05$),表明实验结果有意义;并且两个手术组之间没有明显差别($P < 0.05$)

3.6 关于本实验的优缺点问题

本实验沿用张新江等^[11]的栓子制备方法,可造成 MCAO 的同时而不发生自溶,并且易被溶栓剂溶解。同时由于控制了栓子大小的前提下,开放 PPA 不接扎,并且在注入栓子的操作中,用普通输液针头代替留置针,采用双线分段结扎,动脉夹单独夹闭 CCA 的方法,使得实验更简便易行,节省操作时间,降低手术死亡率。

参考文献:

- [1] Yu HL, Zhang ZL, Chen J, *et al.* Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice [J]. PLoS One, 2012, 7(3): 33584.
- [2] 王文化, 赵冬, 吴桂贤, 等. 北京市 1984 - 1999 年急性脑出血和脑血栓发病率变化趋势分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2002, 23 (5): 352 - 355.
- [3] 王左生, 连亚军, 赵莘瑜, 等. 脑梗死患者溶栓治疗前后经颅多普勒检测及其临床意义 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 11: 699.
- [4] 杜娟, 蔡艺灵, 崔永强, 等. 青年脑梗死的病因及预后分析 [J]. 中国脑血管病杂志, 2009, 12: 626 - 630.
- [5] 陈俊抛, 田时雨, 于微微, 等. 多发性脑梗塞痴呆模型的研究. 中华神经精神科杂志, 1994, 27(6): 311.
- [6] Busch E, Kruger K, Hossmann KA. Improved model of thrombotic stroke and r-tPA induced reperfusion in the rat. Brain Res, 1997, 778(1): 16.
- [7] 张新江, 常丽英, 张苏明, 等. 大鼠自体血栓大脑中动脉闭塞模型的改良 [J]. 卒中与神经疾病, 2003, (01): 12 - 15.
- [8] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006 - 09 - 30.
- [9] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke. 1986; 17(3): 472 - 476.
- [10] 李建生, 刘敬霞, 于海滨, 等. 大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉制备脑缺血模型的建立与评价 [J]. 中国危重病急救医学, 2006, (05): 272 - 274.
- [11] Vanderschuern S, Vlaenderen IV, Collen D, *et al.* Intravenous thrombolysis with recombinant staphylokinase versus tissue-type plasminogen activation in a rabbit embolic stroke model. Stroke, 1997, 28(7): 1383.

〔修回日期〕2014-08-25