



小鼠局灶性脑中风模型研究进展

闫峰¹, 左玮², 罗玉敏¹

(1. 首都医科大学宣武医院脑血管病研究室, 北京 100052; 2. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

【摘要】 中风是包括大脑缺血性中风, 大脑出血性中风 (ICH) 和蛛网膜下腔出血性中风 (SAH) 在内的一类神经系统性疾病, 其发病率和死亡率居高不下。制作方法简单, 可重复性好的动物模型是研究中风损伤发病机制和治疗方法不可或缺的载体, 损伤位置、体积、神经功能缺损和脑血流量变化, 都可以用来评估模型对于各种治疗方法的潜力。本文将对小鼠的缺血性中风、出血性中风模型的制作方法和经验进行总结同时介绍几种小鼠中风模型的评价方法。

【关键词】 小鼠; 脑出血; 脑缺血

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 02-0050-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 002. 013

Research progress of mouse models of focal cerebral stroke

YAN Feng¹, ZUO Wei², LUO Yu-min¹

(1. Xuan-Wu Hospital of Capital Medical University, Beijing, 100053, China;

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

【Abstract】 Stroke is a class of neurological disorders including cerebral ischemic stroke, cerebral hemorrhagic stroke (ICH) and subarachnoid hemorrhagic stroke (SAH), which has a high incidence of morbidity and mortality. Simple and reproducible animal model is indispensable for the study of pathogenesis and treatment after stroke insult. Location and size of injury, neurological deficits and cerebral blood flow changes can be used to assess the availability of the model for various treatment methods. Construction methods, designing experience as well as the methods of model assessment were summarized in this article.

【Key words】 Mouse; Model; Hemorrhagic stroke; Ischemic stroke; Cerebral stroke

中风具有高发病率、高致残率、高死亡率、高复发率的特点, 是目前人类死亡的三大主要疾病之一, 给社会和家庭带来沉重的负担^[1]。近年来随着基因工程的发展, 各种人造的基因缺失或者过表达的小鼠品系的出现为中风的研究带来了广阔的前景。脑中风模型的应用也逐渐由大鼠模型向小鼠中风模型发展, 利用小鼠中风模型进行神经保护的开创性实验取得了巨大的成功^[2-3]。本文将对小鼠

的缺血性中风、出血性中风模型的制作及评价方法进行综述。

1 小鼠缺血性中风模型的制作

1.1 颞肌下开颅大脑中动脉闭塞 (dMCAO) 模型

Tamura 等^[4]首次提出并建立一种开颅电凝的 MCAO 模型, 经典方法为: 小鼠麻醉后侧卧, 去除其一侧眼与耳之间的被毛, 剪开皮肤约 0.8 cm, 暴露

[作者简介] 闫峰 (1984 -), 男, 技师, 硕士研究生, 研究方向: 脑血管病, E-mail: yanfeng@ccmu.edu.cn。

[通讯作者] 罗玉敏 (1965 -), 女, 研究员, 研究方向: 脑血管病, E-mail: yumin111@ccmu.edu.cn。

颞肌,将颞肌从颅骨上分离,暴露颅骨后用电钻钻开颅骨,暴露大脑皮层供血动脉,分离近端动脉,用电凝或 10-0 手术丝线结扎大脑中动脉(MCA),造成脑梗死。在模型的制作过程中如果条件允许应对股动脉进行分离并插管,定时采集动脉血液对血气(pO_2 , pCO_2 , pH 等.)进行监测,使动物在正常的生理状况下进行手术。同时使用激光多普勒脑血流仪监测脑血流的变化情况,判断脑血流是否下降到预期值。此方法制作的缺血中风模型一般不可再灌,不适用于对再灌注损伤的研究。

Tamura-型永久性近端 MCAO 模型梗死体积取决于动物的种系,缺血时间以及动物处死的时间,如果在嗅束水平以上迅速进行 MCAO,纹状体动脉通常不会受累,如果在次级脑动脉水平进行 MCAO,则梗死体积相对较小,但是如果同侧颈内动脉永久闭塞且对侧颈动脉夹闭 1 h,则会增大梗死体积。

Tamura 型 MCAO 的众多优点之一是可以部分颅骨切除来检测到 MCA 区域血管的异常,还可以在缺血区给大脑减压。因此这个模型脑水肿的体积比线栓模型要低。大脑水肿可以使用脑内部的压力(ICP)升高,并导致脑内毛细血管灌注下降,从而进一步提高缺血损伤的体积。小鼠的 Tamura 模型的整体特点为术后死亡率低(0% 到 1%)和重复性高^[5]。术后小鼠可能表现出摄食困难,这可能是由于部分颅骨切除时造成的颞肌以及下颞骨损伤造成的,表现为术后体重下降,如果进行长期研究需要关注动物的营养情况,以免造成不必要的死亡。

1.2 线栓法大脑中动脉闭塞(MCAO)模型

Koizumi 等^[6]在 1986 年首次提出并建立线栓法 MCAO 模型首先建立,随后 Zea Longa 等^[7]一些列学者对其进行了进一步推广及改进,使其逐渐广为接受和使用。虽然 Zea Longa 等使用的是大鼠,但其手术方法也同样适用于小鼠模型的制作,只是对于手术者的要求要高很多。其经典术式为:将动物常规麻醉后仰卧固定,颈部正中切口,分离颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),结扎 ECA 后,临时阻断 CCA 和 ICA,将 ECA 结扎处近心端剪断,使 ECA 游离,使之与 ICA 成一直线。对尼龙线进行包被,包被材料可以使用硅胶或者多聚赖氨酸。将包被好的线栓从 ECA 切口处经过 ICA 进入颅内区域,行进约 8-9mm 略感阻力,提示线栓头部到达大脑前动脉(ACA)区域,从而阻断 MCA

供血区的血流。如果在缺血后将线栓留动脉血管内不再拔出,则是永久性缺血模型;如果在缺血一段时间后将动脉内的线栓完全拔出则为缺血再灌注模型。动物的年龄、体重、品系以及线栓的粗细、材质都严重影响着模型的成功率。作为实验室模型可重复性的一部分,配合小鼠动脉血管直径选择包被不同图层厚度的线栓更是十分重要的。虽然现在小鼠线栓已经商品化,但仍有不少实验室使用自制的线栓也取得了很好的稳定性。如果条件允许所有的短暂性脑缺血实验都要通过激光多普勒血流仪来监测皮层局部脑血流量(rCBF)的变化,以确认在插入线栓时脑血流下降到预期数值,拔出线栓后血流恢复,能够在 MCA 区域重新建立脑血流。

小鼠的手术过程较大鼠操作困难,线栓的位置在不足 1 mm 的空间内即可影响模型的最终结果,故要特别注意插入线栓的深度和手感。首先线栓的头部要避免进入翼腭动脉(PPA)残端,可以在尽可能靠近 ICA 的地方用 10-0 单丝尼龙线结扎翼腭动脉。线栓的图层材料过厚会阻碍线栓进入 ICA 的颅内部分或者移动过后海马动脉。这种情况下,如果线栓停留超过 24 h,可能会导致后海马上部的损伤,故应选择合适线栓进行模型制作。

术后对模型的评价也极为重要,梗塞大脑一侧半球会影响对侧肢体的活动。因此,如果在皮层右侧以及尾状核诱导损伤,则小鼠左侧前肢和后肢会变弱。轻轻的掐尾巴,动物会试图逃离,小鼠会逆时针方向转圈。如果动物从麻醉状态清醒过来,顺时针转圈而手术是针对右侧大脑,则有可能是形成了水肿。这些观察结果加上局部脑血流量读数的变化可以验证模型是否成功。线栓模型的优势在于其利用了血管内介入技术进行 MCA 阻断,而不需要进行部分颅骨切除。目前普遍认为,线栓阻断 MCA 区供血的方法不开颅、创伤面小,对动物体温、血压、血气以及缺血损伤引起的水肿和颅内压增高无明显影响,因此优于开颅法。此外由于线栓 MCAO 法再灌注十分方便,因此在研究脑缺血再灌注损伤中被广泛应用^[8-10]。这个模型的缺点是脑水肿的发生率、技术并发症发生率和死亡率稍高。

1.3 栓塞法和血栓法 MCAO 模型

栓塞法和血栓法制作小鼠 MCAO 模型原理与线栓法基本相同,均是使用物理手段将 MCA 阻断以达到使之供血部位缺血的目的,这其中模型成功与否的关键因素是栓子的制备。栓子的制备材料有

很多,如空气、碳素颗粒、石蜡以及自体血栓等等,其中自体血栓制备的血块最普遍^[11-15]。但栓塞法最大的缺点是栓子制备及注入过程中的随机性,无法预测栓塞的部位和大小。

栓塞法模型制作时除用于堵塞血管的物质外,手术方法可参见线栓法模型,在 ECA 上剪以斜行的小口后,插入内装制备好的自体血栓的导管,将导管经 ICA 插至颅脑底部,随后将血栓顺着导管的走向注入,即可实现 MCA 供血区的缺血损伤。Traystman 等^[16]采用自体血制备的血栓栓子纤维蛋白可用来制作大鼠 MCAO 模型。血栓制作过程为:将动物麻醉后从股动脉抽取动脉血液至内径为 0.2 mm 的导管内,导管两端连接充满生理盐水的注射器轮流向导管加压,使血液在导管内移动凝固,但并不粘附在导管上,后将导管置于 37 摄氏度的水浴锅中 2 h,后移入 4 摄氏度冰箱中 22 h,使用前将血栓表面红细胞洗去置于生理盐水中备用即可。为了更精准的保证高血栓块安置的位置, Dinapoli 等^[17]在多普勒成像技术的指导下借助显微导管输送栓子进入 MCA 特定部位,成功的建立更为均一的梗死灶。此类模型的优点是:(1)较接近于人类大脑栓塞;(2)可测试溶栓药物的作用。缺点:(1)缺血范围和部位难以预见,再灌过程难以建立;(2)术中污染诱发感染等炎性反应;(3)严重影响侧支循环,神经功能评分等分析较差;(3)适用范围窄,仅适用于一些特殊的研究如溶栓治疗等。

1.4 诱导蛛网膜下腔出血的线栓模型

制作蛛网膜下腔出血线栓模型(SAH),使用 6-0 或者 7-0 尼龙线栓闭塞 Willis 环并插入大脑前动脉,此过程与 MCAO 模型的制作方法相同。当线栓前进受到阻力时,再继续插入 1 mm 以确保动脉穿孔,栓线头部刺穿动脉后立即拔出进行再灌。如果在制作出血模型的过程中持续监测脑血流可以发现刺破血管后脑血流出现阶梯状下降的特征图形。

1.5 通过注射胶原酶诱导出血性中风模型

血管壁的主要构成成分有蛋白聚糖和多种类型的胶原。胶原酶可被分为 I~VIII 型,是一类特殊的金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)能够降解细胞外间质以及基底膜中的胶原。IV 型和 VII 型胶原酶广泛用于制备动物的脑出血模型。胶原酶注入 20min 后即可通过降解脑血管基底膜上的胶原蛋白造成血管壁的损伤,导致渗血现象的发

生,4 小时左右即发展为片状出血。胶原酶使用的剂量决定了出血区面积的大小。

其手术具体方法为常规麻醉后将小鼠俯卧,头顶备皮后在正中做 1 cm 切口,暴露小鼠颅骨,将小鼠固定于立体定位仪上,确定其前囟中点,以前囟为 0 点,向前 0.7 mm,向右 2 mm 处为尾状核于颅骨投影处,用 32G 针头的 1 μ L 微量注射器刺破入颅骨 4~5 mm,将计算好剂量的胶原酶(0.15 U/ μ L)生理盐水溶液 0.5 μ L 缓慢注入即可,注射时间应大于 20 min^[18]。胶原酶自身就具有一定的毒性,导致大脑出血区细胞出现坏死,此外出血区周围的水肿部位可观察到炎性细胞的浸润。该模型属于渗出性模型,水肿程度较均一,神经功能缺陷较明显,成为脑出血研究中广泛应用动物模型之一。

2 中风的行為學評估

在临床上,习惯将中风患者的神经功能损伤大致分为一般功能损伤和局灶性功能损伤。前者反应的是患者生命状态和整体神经功能,后者反应损伤造成的定位性功能缺陷,本文将介绍 3 种国内外常用的中风后小鼠的行为学评估的标准。分别为 Bederson 小鼠行为学评分^[19],Clark 评分小鼠一般功能损伤评分和 Clark 评分小鼠局灶功能损伤评分^[20]。需要注意的是:严重行为缺陷的小鼠容易出现严重的低温,因此需要持续维持恒温的环境。低温对短暂性缺血的影响要明显大于对永久性缺血的影响,另外和大鼠不一样,前臂肢体屈曲不是一个可靠的小鼠行为学迹象,因此不包括在数据分析统计中。

以上介绍的 3 中评价方法各有优缺点, Bederson 评分方法因其简单实用,评价准确而在国内被广泛应用;Clark 评分对多项神经功能进行了较为全面的评价,操作性好,对动物模型的评价更具体。

3 总结

在许多种类的动物中都可以成功的重复中风模型:松鼠猴,沙鼠,兔,猫和狗。作为一个经验法则,动物物种越大,缺血损伤的大小和定位的差异性越大。如丰富的大脑侧支循环使得狗很难用于中风的研究,需要夹闭很多动脉分支才能很好的复制脑缺血损伤的模型。小动物比如小鼠和大鼠,则更容易操作,经济性更好而且随时可以得到。另

外,采用廉价、血管解剖近似于人的小鼠为实验对象还有其他优势,例如脑组织小生化、组化检测费用低,节约实验耗材等。小鼠的脑中风模型为系统研究中风的病理生理损伤及各种治疗干预提供了一个重现性好、可控的研究载体。

参考文献:

- [1] Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease [J]. N Engl J Med, 2013, 369(5): 448–457.
- [2] Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T, et al. Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis [J]. Circulation, 2013, 127(7): 842–53.
- [3] Yoshizawa T, Sakurai T, Kamiyoshi A, et al. Novel regulation of cardiac metabolism and homeostasis by the adrenomedullin-receptor activity-modifying protein 2 system [J]. Hypertension, 2013, 61(2): 341–51.
- [4] Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al. Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1981, 1(1): 53–60.
- [5] Robinson R. Differential behavioral and biochemical effects of right and left hemispheric cerebral infarction in the rat [J]. Science, 1979, 205(4407): 707–710.
- [6] Koizumi J, Yoshida 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.
- [7] Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia [J]. ILAR J, 2003, 44(2): 85–95.
- [8] Nakano Y, Suzuki Y, Takagi T, et al. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) as a novel neuroprotective factor in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Neuroscience. 2014, 26(277): 123–131.
- [9] Guo ZL, Cao G, Yang H, et al. A combination of four active compounds alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in correlation with inhibition of autophagy and modulation of AMPK/mTOR and JNK pathways [J]. J Neurosci Res. 2014, 92(10): 1295–306.
- [10] Lee SV, Choi KH, Choi YW, et al. Hexane extracts of Polygonum multiflorum improve tissue and functional outcome following focal cerebral ischemia in mice [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4): 1415–21.
- [11] Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, et al. Experimental models of cerebral ischemia [J]. Rev Neurol, 2008, 47(8): 414–426.
- [12] Yang Y, Yang T, Li Q, et al. A new reproducible focal cerebral ischemia model by introduction of polyvinylsiloxane into the middle cerebral artery: a comparison study [J]. J Neurosci Methods, 2002, 118(2): 199–206.
- [13] Toshima Y, Satoh S, Ikegaki I, et al. A new model of cerebral-microthrombosis in rats and the neuroprotective effect of a Rho-kinase inhibitor [J]. Stroke, 2000, 31(9): 2245–2250.
- [14] 姚国杰, 马廉亭, 吴佐泉. 经颈内动脉内注入真丝线段建立大鼠局灶性脑梗死模型 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(3): 397–417.
- [15] 李建生, 刘敬霞, 于海滨. 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, 18(5): 272–274.
- [16] Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia [J]. ILAR J, 2003, 44(2): 85–95.
- [17] Dinapoli VA, Rosen CL, Nagamine T, et al. Selective MCA occlusion: a precise embolic stroke model [J]. J Neurosci Methods, 2006, 154(1–2): 233–238.
- [18] Zhu W, Gao Y, Chang CF, et al. Mouse models of intracerebral hemorrhage in ventricle, cortex, and hippocampus by injections of autologous blood or collagenase [J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e97423.
- [19] Ridenour TR, Warner DS, Todd MM, et al. Mild hypothermia reduces infarct size resulting from temporary but not permanent focal ischemia in rats [J]. Stroke, 1992, 23(5): 733–738.
- [20] Clark WM, Lessov NS, Dixon MP, et al. Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse [J]. Neurol res, 1997, 19(6): 41–648.

[修回日期]2014-10-27