



电凝法制作 Balb/c 小鼠局灶性脑缺血模型的实验研究

张雪梅¹ 李兵¹ 陈立杰¹ 焦卓敏¹ 黄山¹ 尚宏²

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院神经内科, 哈尔滨 150086)

(2. 哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科, 哈尔滨 150080)

摘要:目的 观察电凝法电凝小鼠大脑中动脉,引起大脑中动脉闭塞,建立小鼠脑缺血模型的可行性。方法 采用电凝法直接闭塞大脑中动脉(Middle cerebral artery, MCA)制作成年雄性 Balb/c 小鼠脑缺血模型(模型组, $n = 20$ 只);同时,同批次 Balb/c 小鼠经相同部位开颅,但不电凝闭塞大脑中动脉的小鼠作为假手术组(假手术组, $n = 20$ 只)。于术后第 24 h、72 h 采用神经功能缺损评分(modified neurological function severity score, mNSS)评估模型组及假手术组小鼠神经功能损伤情况。结果 术后第 24 h 取模型组 Balb/c 小鼠损伤区域脑组织切片,行苏木素-伊红染色,镜下显示缺血脑组织间质水肿,同时伴有空腔形成,局部脑组织结构变得疏松,且着色较淡,神经细胞数量明显减少,神经细胞胞体缩小,部分细胞轮廓欠清晰,可以见到不同程度的细胞变性坏死,核固缩,核仁消失现象。模型组在术后第 24 h 神经功能缺损评分明显低于假手术组($P < 0.05$),且这种差别可维持到术后第 72 h。结论 电凝法可以在 Balb/c 小鼠中成功制作小鼠局灶性脑缺血模型。

关键词:脑缺血模型; Balb/c 小鼠; 电凝法; 实验研究

中图分类号: R-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)03-0069-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.013

全球每年约有 9% 的死亡病例由脑卒中引起,而缺血性脑卒中的比例在其中约占 80%,其发病率仅次于缺血性心脏疾病。因此对缺血性脑卒中中进行有效防治具有重要的医学意义和社会贡献。现经临床证实唯一能缩小梗死体积、减轻神经损伤的治疗药物是重组组织型纤溶酶原激活物(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA),且其有效治疗时间窗只有 4.5 h,因而临床应用受到一定限制。其他药物如抗凝、应用神经保护剂等,都不能对受损脑组织产生修复作用。因此,卒中的治疗及预防成为当前神经科学研究的热点之一,特别是其发病机制、临床转归、新治疗手段等成为目前卒中的基础与临床研究的热点科学问题。在基础研究中如何简便,快速地建立卒中的动物模型成为一个较为棘手的问题。Balb/c 小鼠是白变种实验室老鼠,与众多常用亚系一样,起源于小家鼠 *Mus musculus*。Balb/c 小鼠的遗传背景为近交系,因而它们之间的个体差异较小,遗传基因更纯,整体素质更好。如果能够在

Balb/c 小鼠中成功地复制出卒中模型将为卒中的研究提供较好的动物模型。为此,本课题组拟采用电凝方法,通过阻断大脑中动脉(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的血流来成功复制 Balb/c 小鼠的局灶性脑缺血模型。为下一步进行脑缺血发病过程中脑保护、神经修复及发病机制等后续研究提供新的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 Balb/c 小鼠 40 只,体质量 22~25 g/只(哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供),动物质量合格证号:SCXK-(黑)2013-001,实验中对动物处置均符合中华人民共和国科学技术部 2016 年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[1]。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

收稿日期:2018-12-03

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No. 12511259)

作者简介:张雪梅(1976—),女,副主任医师、副教授,研究方向:神经发育与再生,阿尔兹海默病,脑血管病. E-mail: zxmjsz198@126.com

通信作者:张雪梅(1976—),女,副主任医师、副教授,研究方向:神经发育与再生,阿尔兹海默病,脑血管病. E-mail: zxmjsz198@126.com

主要试剂与仪器:2% 氯化三苯四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride, TTC),显微镜(BX41, Olympus, Japan)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型的制作:步骤同以往实验方法^[2],小鼠适应性喂养1周,术前12 h 禁食不禁水,称重后用10%的水合氯醛按450 mg/kg 腹腔麻醉小鼠,保持小鼠麻醉1.5~2.0 h,将小鼠侧卧固定于无菌手术台上,术中应用保温毯保持小鼠直肠温度在36.5~37.5℃。于小鼠左侧眼裂至左耳外耳道之间切口,剥离颞肌,于梨状骨与下颌骨交汇点向头侧1 mm,背侧3.5 mm 处用电钻钻一个直径为1.0~2.0 mm 的小孔。剥离硬脑膜暴露大脑中动脉,用电凝刀电凝阻断大脑中动脉近端以确保持久的破坏,然后用牙科粘合剂封闭小孔,缝合切口。术后将小鼠置于27~28℃恒温箱中饲养。

1.2.2 模型制作成功评价方法采用Longa的5级4分法标准^[3]:0分:无神经功能缺损症状;1分:轻度局灶性神经功能缺损,即提尾不能伸展右侧前爪;2分:中度局灶性神经功能缺损,即行走向右侧转圈;3分:重度局灶性神经功能缺损,即行走困难,并向右侧侧倒;4分:不能自发行走,意识水平下降。手术后神经功能评分为1~3分的小鼠入选本次研究。术后第2天随机取2只小鼠,1只取出脑组织放入切脑模具中,间隔2.0 mm 连续冠状切片,再将脑片放入含2%氯化三苯四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride, TTC)的磷酸盐缓冲液中(PBS, pH=7.4),37℃恒温避光孵育30 min 后可见正常组织呈粉红色,梗死灶呈白色。另1只小鼠取缺血区域脑组织进行切片,经HE染色确定缺血情况。

1.2.3 神经功能损伤评分:小鼠的神经功能损伤情况采用神经系统疾病严重程度评分(mNSS)进行评估^[4]。实验前按评分方法对小鼠进行一定的训练,选取评分为0分的正常小鼠,造模后24 h、72 h 采用双盲法分别进行mNSS评分评估各组动物神经功能损伤状况。mNSS包括运动试验和平衡木试验,根据所能完成任务的分值统计得分。mNSS总分为12分,评分越高表明神经功能损伤越严重。

1.2.4 实验脑组织的提取:10%的水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,迅速开胸暴露心脏,行主动脉插管,剪开右心耳为灌注液流出口,在10~20 min 内经左心

室用37℃生理盐水200 mL 快速冲洗,然后用4%多聚甲醛/0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(4℃, pH=7.4)300 mL 灌注固定,40 min 内灌注完,迅速断头取脑,放入4%的多聚甲醛固定液,在4℃环境中放置24 h。然后将脑组织进行冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋,以前囟为起始,切成等厚(15 μm)冠状切面脑片,每10张取1张进行HE染色。染色后显微镜下观察组织形态学变化。

1.3 统计方法

采用SPSS12.0进行统计学处理,神经功能缺损平分结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 χ^2 检验分析, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 MCAO 模型评估

MCAO 术后小鼠出现右侧前肢屈曲内收,前进不能,向右绕圈,站立不稳,平衡能力明显减弱,表明造模成功。

2.2 小鼠脑缺血区组织病理学检测

术后24 h 小鼠脑组织切片TTC染色,假手术组织染成粉红色,未见梗死灶(见图1,H-L),模型组左侧大脑皮质梗死灶呈白色(见图1,C-G),显示手术半球明显缺血。取小鼠损伤区域脑组织切片行HE染色以确定损伤情况(见图1,M-O),结果显示梗死病灶及周围组织结构变得疏松,间质水肿伴随空腔形成,且着色较浅,神经细胞数量明显减少,胞体皱缩,部分细胞轮廓欠清,有程度不等的神经细胞变性坏死,核固缩,核仁消失现象。证实脑缺血模型制作成功。

2.3 行为学观察结果

如表1所示,局灶性脑缺血后存活动物均有不同程度的神经功能缺损。随着存活时间的延长,神经功能在短时间内并没有得到恢复。模型组在术后第24 h 神经功能缺损评分明显高于假手术组,且这种差别可维持到术后第72 h ($P<0.05$)。

表1 电凝法对小鼠MCAO后神经学评分
Table 1 Evaluate the Neurological Scores of MCAO Mice using the Electrocoagulation Method

组别	假手术组		模型组	
时间	24 h	72 h	24 h	72 h
评分	2.35±0.14	1.98±0.18	10.35±0.21	10.22±0.16

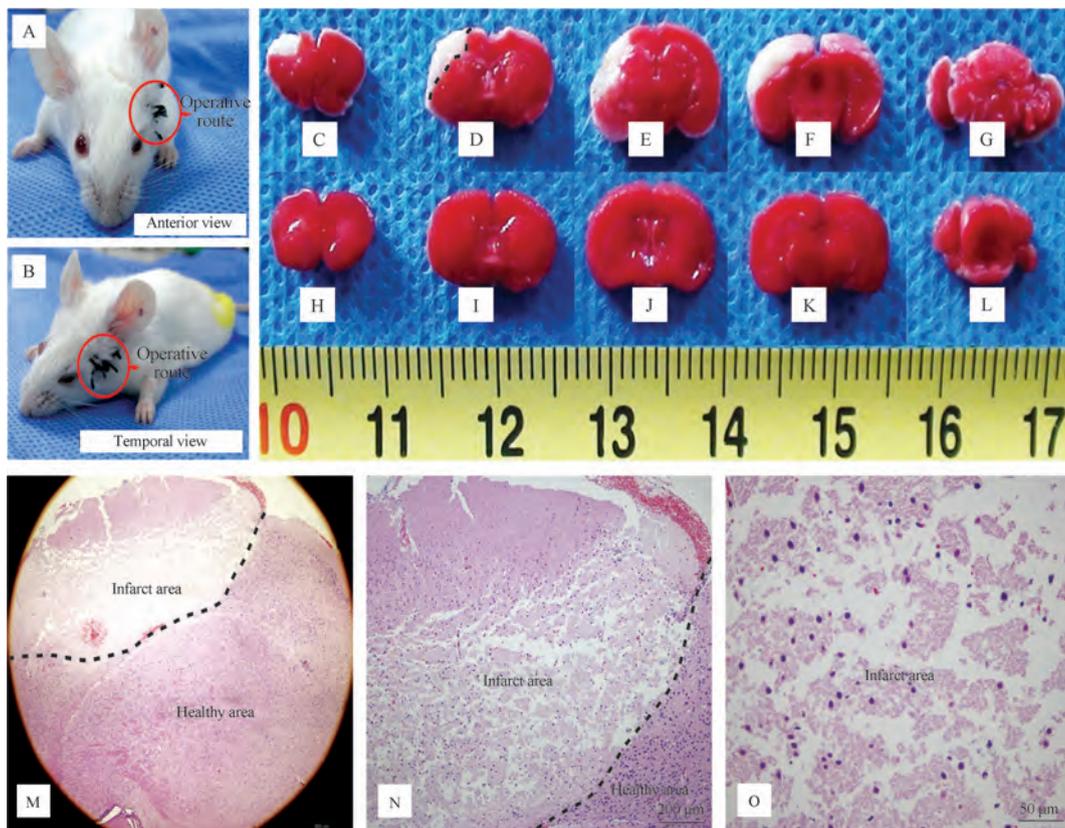


图 1 小鼠脑缺血区组织病理学检测

注:A-B,活体观察;C-L,TTC染色;M-O,HE×10

Fig.1 Histopathological examination of cerebral ischemic tissue in rats

Note:A-B, somatoscopy; C-L, TTC staining; M-O, HE×10

3 讨论

在发达国家,随着人口的逐步老龄化,卒中成为发病率和死亡率都较高的疾病之一。缺血性卒中是由于脑血管(主要为大脑中动脉)或其分支的血栓性或栓子性阻塞所致,约占所有类型卒中的80%^[5]。药物或是机械再灌注治疗是缺血性发作急性期最有效的治疗方法,其中50%~70%患者都有很好的愈后。然而因为治疗时间窗短等各种严格的限制,这些治疗方法仅适用于不到10%的患者中^[6]。卒中的治疗及预防成为当前神经科学研究的热点之一,特别是其发病机制、临床转归、新治疗手段等成为目前卒中的基础与临床研究的热点科学问题。而建立一种可靠的模拟人类缺血性脑血管病的实验动物模型对脑缺血的发病机制研究至关重要。

在各项研究中,鼠实验性急性脑缺血模型使用

最为广泛^[7],其中大脑中动脉阻塞(MCAO)模型是目前最常用的模拟人类缺血缺氧性脑病的实验动物模型。目前较为常用的方法有Tamura等在1981^[8]年提出的电凝法和Longa等^[9]于1989年提出的线栓法,其他方法还有光化学法^[10],微栓子栓塞法^[11]等。目前线栓法是应用最多的造模方法^[12],但是其缺点是模型之间梗死面积差异较大,均一性较低,梗死面积大,死亡率高^[9]。电凝法也是应用较多的一种造模方法,它具有均一性高,术后死亡率低,模型存活时间较长等优点^[8]。

目前MCAO模型的制备多采用大鼠,但是随着脑缺血研究逐步向基因领域的延伸,并鉴于大多数转基因实验动物来源于小鼠,因此迫切需要建立一种小鼠的局灶性脑缺血模型,以便于在基因水平进行脑缺血损伤的病理生理改变的机制,预后及药物治疗作用的研究。但由于小鼠颈总动脉较细,线栓插入困难,模型制作成功率低,小鼠死亡率高。我们采用开颅机械闭塞大脑中动脉法在直视下操作准确

可靠,与人类缺血性卒中的病理改变较为接近,即 MCA 阻断而侧支循环尚存,受累脑组织包括严重缺血的中心区(梗塞灶)、缺血受损伤的周围区(半暗带)及接近正常的外围带,梗死模型成功率较高,梗死范围稳定,梗死效果较好,动物存活时间长。

因此本研究采用小鼠,小鼠体质量差异小,并且电凝法建立小鼠 MCAO 缺血模型操作简便,手术时间短,提高了模型制作的成功率,减少了术后动物死亡率,提高了模型制作的稳定性,缩短了模型制作的操作时间。为系统地研究脑缺血的病理生理及观察药物的治疗作用提供了一个较接近临床的、重现性好、可控的脑缺血模型。

脑组织厚片 TTC 染色是研究脑缺血梗死灶常用的染色方法。TTC 与完整的线粒体氧化酶系反应,诱发产生深红色产物而使正常组织染色;缺血组织的线粒体损伤^[13],不能诱导染色反应而呈白色,容易鉴别,因此我们采用此方法来观察脑组织梗死灶。术后 24 h 小鼠脑组织切片 TTC 染色,可见大脑皮质梗死灶呈白色,手术半球明显缺血。由于卒中引起的脑损伤通常与运动、感觉和认知功能受损等相关,很多实验室的研究集中于评估与动物模型的脑缺血相关的认知和行为学改变。到目前为止,没有单一的一种评价标准被普遍承认,大多数研究室都采用多种不同的评价标准来评价缺血效果。多种神经行为学评分系统被用于评价神经功能障碍的严重程度^[14-15]。在本研究中,我们采用的神经行为学观察性评分指标包括运动试验和平衡木试验,对小鼠总体神经行为学评分的分析显示,缺血损伤可明显增加缺血后小鼠的神经行为学评分。此结果与 TTC 染色和镜下病理组织变化结果相一致。

以上结果提示,我们采用的电凝法可以在 Balb/c 小鼠中成功制作小鼠局灶性脑缺血模型。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意

- 见(2006),306052006025,北京:科学出版社.2006-09-30
- [2] Mutsuki K T F. Direct experimental middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice[J]. *Exp Anim*,2009,**58**(1): 19-29.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989,**20**(1): 84-91.
- [4] Mahmood A L D, Wang L. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells[J]. *Neurosurgery*,2001,**49**: 1196-1204.
- [5] Warlow C P. Epidemiology of stroke [J]. *Lancet*, 1998, **352** (Suppl3): SIII1-SIII4.
- [6] Tomsick T A, Khatri P, Jovin T, *et al.* Equipose among recanalization strategies [J]. *Neurology*, 2010, **74** (13): 1069-1076.
- [7] 杨慧,董小黎. 脑缺血动物模型研究进展[J]. *实验动物科学*, 2007, **24**(1):38-40.
- [8] Tamura A, Graham D I, McCulloch J, *et al.* Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1981, **1**(1):53-60.
- [9] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, **20**(1):84-91.
- [10] 杨渊,郭瑞友,张苏明,等. 光化学诱导老年大鼠局灶性脑梗塞模型的研究[J]. *中国老年学杂志*,2001,**21**(1): 35-38.
- [11] 郑冲. 局灶性脑缺血动物模型制作方法的概述[J]. *中国卒中杂志*,2008,**3**(8): 603-607.
- [12] 翟小虎,王斌,宋亚刚,等. 线栓法制备大鼠脑缺血模型的研究进展与思路[J]. *实验动物科学*, 2015, **32**(5):55-58.
- [13] Anderson M F, Sims N R. Mitochondrial respiratory function and cell death in focal cerebral ischemia[J]. *J Neurochem*, 1999, **73** (3):1189-1199.
- [14] Corbett D N. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia[J]. *Prog Neurobiol*, 1998, **54**: 531-548.
- [15] DeVries A C, Nelson R J, Traystman R J, *et al.* Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research will improve useful [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, **25**(4): 325-342.

The Establishment of Cerebral Ischemia Model by Electrocoagulation in Balb/c Mice

ZHANG Xuemei¹, LI Bing¹, CHEN Lijie¹, JIAO Zhuomin¹, HUANG Shan¹, SHANG Hong²

(1. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

(2. Department of Neurology, Forth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150080, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of establishment of focal cerebral ischemia model in Balb/c mice by electrocoagulation. **Method** The model of mice about focal cerebral ischemia was mimicked with direct MCA occlusion. Forty adult male Balb/c mice were randomized into experimental group and control group. Twenty-four hours and 72 hours after middle cerebral artery occlusion, the neurological function was evaluated according to the modified neurological function severity score (mNSS). **Result** At 24 hours, the neurological function scores in the experimental group were decreased compared with control group, the difference could sustain to 72 hours later. Specifically, in the experimental group we can find the interstitial edema, cavitation, partly architecture become rarefaction, the number of nerve cells was decreased, the pigmentation of nerve cells was fairly tasteless, and the cell degeneration, karyopyknosis, nucleoli abolition could be found in ischemia brain tissues. **Conclusion** Modified electrocoagulation method mimicked with direct MCA occlusion can help us establish focal cerebral ischemia model in experimental research.

Key words: Ischemic brain injury; Balb/c mice; electrocoagulation approach; experimental research

(上接第 68 页)

Genetic Study of Guangxi *Macaca fascicularis* Using Microsatellite DNA Markers

ZHANG Jiehong, QIN Huiyan, LI Bin, YANG Hui, WANG Fang, CHEN Huafeng

(Guangxi Autonomous Regional Center for Disease Control and Prevention, Guangxi, Nanning 530028, China)

Abstract: Objective To genetic monitoring of Guangxi *Macaca fascicularis* from different breeding groups, and analyze their genetic background, provide basic information for establishing the genetic quality monitoring method and population repository of Guangxi *Macaca fascicularis*. **Method** Twenty microsatellite DNA markers and capillary electrophoresis were adopted to genetic detect Guangxi *Macaca fascicularis* from three different breeding groups, and the genetic variation parameters within and between populations were calculated. **Result** A total of 237 alleles were detected in the Guangxi *Macaca fascicularis*, the observed allelic number was ranging from 5 to 19, with a mean of 11.85. The mean expected heterozygosity was 0.85, and the mean polymorphism information content was 0.817. In the three different breeding groups (F, N and W), respectively, 158, 158 and 173 alleles were detected, the mean expected heterozygosity was 0.8371, 0.8318 and 0.8642, and the mean polymorphism information content was 0.7692, 0.7653 and 0.8001. The three breeding groups showed the high genetic diversity. The Hardy-Weinberg equilibrium test for 3 breeding groups showed that most loci were in H-W equilibrium. Respectively, the average F_{is} , F_{it} , F_{st} of all loci was 0.0235, 0.0628, 0.0402, the index of gene flow was 5.9616, which implied that 3 breeding groups was nearly under the random mating system and had low genetic differentiation. The genetic distance was ranging from 0.2556 to 0.3223, the genetic similarity was 0.7245 to 0.7745. Cluster analysis showed that F population first clustered with N population, after that clustered with W population, it is conformed to their historical introduction. **Conclusion** The study effectively analyzed the genetic diversity and genetic relationship of Guangxi *Macaca fascicularis*, and the 20 microsatellite DNA markers selected in this study could be used to detect genetic quality of *Macaca fascicularis*.

Key words: *Macaca fascicularis*; Microsatellite DNA markers; Genetic monitoring