

孙宇航,管博文,魏强,等. 缺血性脑卒中非人灵长类动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 123-130.
Sun YH, Guan BW, Wei Q, et al. Research progress of non-human primate model of ischemic stroke [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 123-130.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.08.017

缺血性脑卒中非人灵长类动物模型研究进展

孙宇航,管博文,魏 强,孟爱民*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,国家人类疾病动物模型资源库,北京 100021)

【摘要】 缺血性脑卒中因其高发病率、致残率和致死率,造成了严重的疾病负担,是医药研发人员关注的重点疾病之一。但脑卒中临床前研究结果向临床转化率低,凸显了对动物模型优化的迫切需要。非人灵长类动物(nonhuman primates, NHPs)在大脑解剖和生理学方面与人类相似性更高,因此,利用 NHPs 构建模型,有望促进缺血性脑卒中临床前研究向临床治疗的转化。本文对脑卒中 NHPs 模型的建模方法和评价指标以及模型应用进展进行综述,讨论近期所用模型及评价方法的优势和不足,并对未来 NHPs 模型研究需要克服的困难和可能的发展方向进行了展望。

【关键词】 缺血性脑卒中;非人灵长类;临床转化;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 08-0123-08

Research progress of non-human primate model of ischemic stroke

SUN Yuhang, GUAN Bowen, WEI Qiang, MENG Aimin*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine Beijing Engineering Research Center for Laboratory Animal Models of Human Critical Diseases, National Human Diseases Animal Model Resource Center, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Ischemic stroke, which has caused serious disease burden due to its high incidence rate, disability rate and mortality rate, is one of the key diseases that medical research and development personnel are concerned about. However, the conversion rate of preclinical research result of stroke to clinic is low, which highlights the urgent need for animal model optimization. Nonhuman primates (NHPs) have higher similarities with humans in brain anatomy and physiology. Therefore, building models with NHPs is expected to promote the transformation from preclinical research to clinical treatment of ischemic stroke. This paper reviews the modeling method, evaluation indexes and model application progress of stroke NHPs model, discusses the advantages and disadvantages of recent models and evaluation method, and looks forward to the difficulties and possible development direction of NHPs model research in the future.

【Keywords】 ischemic stroke; nonhuman primates; clinical transformation; animal model

脑卒中有较高的发病率和致残、致死率,其中球脑卒中患病人数、死亡人数和伤残调整寿命年逐年上升,造成了严重的疾病负担^[1]。为满足临床对缺血性脑卒中占 85%左右。1990 年到 2019 年,全

【基金项目】 国家重点研发计划(2017YFA0105204);国家自然科学基金(81972975)。

【作者简介】 孙宇航(1997—),女,硕士研究生,研究方向:比较医学。E-mail:751933683@qq.com

【通信作者】 孟爱民(1963—),女,研究员,研究方向:造血干细胞放化疗损伤机制研究。E-mail:ai_min_meng@126.com

缺血性脑卒中的防治需求,建立了多种动物模型用于机制研究及干预措施的评价。目前广泛使用啮齿类动物,通过阻塞大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)构建缺血性脑卒中模型。这类模型具有许多优点,如成本低、易操作、生理反应特性好、能够研究遗传信息和共病(如糖尿病、高血压)等^[2],但所有在啮齿动物脑卒中模型中有效的神经保护策略都未能成功转化到临床。NHPs 与人类在脑血管系统、脑代谢、灰质与白质比例以及认知和行为的复杂性等方面高度相似,使其可能比其他类型动物更适合模拟人类神经系统疾病^[3]。本文对缺血性脑卒中 NHPs 模型进行了总结,并传统啮齿类模型进行比较分析,这对于了解各种模型的优缺点,根据实验的具体条件和目的选择最佳 NHPs 模型至关重要。

1 常用缺血性脑卒中动物模型

脑卒中研究中最常用的是啮齿类动物模型,这类模型成本低,操作方便,伦理标准完善,近年来转基因技术的发展也使小鼠模型具备了更多优势。但啮齿动物在脑梗塞后只会出现暂时性偏瘫,康复过程中恢复很快^[4],且生理条件、大脑解剖结构和血管血液供应方面与人类有很大不同。缺血性脑卒中作为一种复杂疾病,梗死体积和神经系统功能缺失的严重程度取决于多种因素,如有无侧支循环建立和有无足够的血压保持灌注,梗死的病因及部位,年龄、性别、遗传背景,是否有并发症,是否经过药物治疗等。已经构建了多种模型用于各种影响因素的研究(表 1),对阐明脑卒中的分子、细胞和系统病理生理学机制发挥了重要的作用。然而,由于啮齿类动物缺血性脑卒中模型临床前研究成果向临床转化困难,需要构建与人类脑卒中相似性更高的模型以提高临床转化率。

2 NHPs 脑卒中模型的优势和必要性

为了解决啮齿类动物和人类之间的差异导致的治疗反应性的差异,2009 年脑卒中治疗学术企业圆桌会议(Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, STAIR)建议首先选择啮齿类动物脑卒中模型进行初步研究,灵长类动物或猫作为第二物种开展后续试验^[8],以提高临床前研究的转化能力。

2.1 解剖学相似性

NHPs 具有与人类相似的复杂脑部结构及血管

系统。目前建立缺血性脑卒中模型的 NHPs 可分为缺脑回型(皮层光滑)如绒猴、松鼠猴等,以及多脑回型(皮层有卷曲的脑沟和脑回)如狒狒、恒河猴、非洲绿猴以及食蟹猴等。与缺脑回型相比,多脑回型 NHPs 脑结构,特别是管理运动和感觉功能的大脑皮层结构,以及灰质与白质的比例(>60%)与人类更为相似^[3]。研究发现,白质缺血性损伤是影响人类脑卒中预后的重要因素,NHPs 在脑缺血后灰质和白质的变化以及功能损伤方面比其他中风动物模型更近似人类,因此可以解决无白质结构的啮齿类动物无法复制白质损伤的问题^[9]。此外,NHPs 具有与人类相似的脑血管系统、颈内动脉和椎动脉分布,以及丰富的侧支循环系统,M1 栓塞主要导致基底节和白质缺血;而啮齿类动物由于侧支循环与人类差异较大,MCA 梗塞后损伤部位和性质都有不同^[10];猫、犬、绵羊、猪等由于许多分枝构成血管网结构(rete mirabile),不适合制备大脑中动脉阻塞模型^[3]。

2.2 病理生理学相似性

NHPs 脑卒中模型在免疫应答、血栓组成和梗死区域方面与人类相似性高。NHPs 免疫成分与人类相似性较啮齿类更高,脑卒中后可引发相似的免疫反应,针对人类脑卒中相关蛋白质/表位的免疫试剂,可以直接用于 NHPs 的相关检测,但其他低等哺乳动物通常不适用^[11]。其次,啮齿类动物的血小板缺乏人类普遍表达的血小板激活因子受体,在人类和灵长类动物 MCAO 过程中,缺血区发生中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte)聚集,但尚未在大鼠中发现该现象,而大鼠白细胞表面表达的整合素 $\alpha 4\beta 1$ 也未在人类和 NHPs 细胞上发现^[10]。NHPs 的血管止血成分主要包括血小板、血浆凝血蛋白、纤溶蛋白和抑制蛋白等,与人类脑血管中血栓成分更相似^[12]。此外,多脑回型 NHPs 脑部体积更大,结构更复杂,其大脑比大鼠大 5 倍,约占其体重的 2.7%,相当于人类的比例,适于针对性地观察不同区域损伤对预后的影响。Ramirez-Garcia 等^[13]将食蟹猴大脑 MCAO 半球分成 50 个相关区域,发现额叶、颞叶、枕叶、中白质、内囊、颞叶上回、颞叶中回和尾状核损伤均会导致模型评分差异,更符合人类脑卒中的复杂情况。因此,NHPs 脑卒中模型可以更全面地模拟人类脑卒中后病理生理变化。

2.3 检测和评价方法相似性

NHPs 有很强的学习记忆能力和执行复杂行为任务的能力,在感觉和运动功能方面与人类更为相

表 1 常用缺血性脑卒中动物模型
Table 1 Common animal models of ischemic stroke

模型 Model	建模方法 Method	优势 Advantage	缺点 Disadvantage
线栓模型 Suture-occluded	啮齿类动物缺血性脑卒中最常用的实验模型。沿颈内动脉插入线栓并向前推进,直到大脑中动脉起始部引起阻塞。 Most commonly used experimental model for ischemic stroke in rodents. A wire plug is inserted along the internal carotid artery and advanced until the middle cerebral artery starts to cause obstruction.	不需开颅手术,可用于模拟永久性局部缺血;退出线栓引起再灌注,构建再灌注时间点可变的局灶性脑缺血模型;定位表现准确,病理生理学基础与临床相似 ^[4] 。 It does not require craniotomy and can be used to simulate permanent local ischemia; exit wire bolus causes reperfusion and constructs a focal cerebral ischemia model with variable reperfusion time points; accurate localization performance and similar pathophysiological basis to clinical.	血管完全栓塞,无自发再灌注;通过撤除线栓引起再灌注与临床情况有差异;需要麻醉。 Complete vascular embolization without spontaneous reperfusion; reperfusion induced by withdrawal of wire embolus differs from clinical situation; requires anesthesia.
开颅手术模型 Surgical methods	通过外科手术方法切断、灼烧或结扎脑部血管,造成永久性栓塞,或通过直接栓塞脑表面血管诱导局灶性缺血。 Permanent embolism is caused by surgical methods to sever, cauterize, or ligate blood vessels in the brain, or to induce focal ischemia by direct embolization of blood vessels on the surface of the brain.	与人类缺血性脑卒中的病理改变较接近,形成缺血半暗带,可同时观测生理、生化、病理形态及行为学等指标;可实现短暂性或永久性缺血 ^[5] 。 Pathological changes are closer to those of human ischemic stroke, forming an ischemic semidark band that allows simultaneous observation of physiological, biochemical, pathomorphological and behavioral indicators; transient or permanent ischemia can be achieved.	操作复杂,需要麻醉和开颅,脑积液、脑组织损伤、感染的风险大。 Operation is complex, requiring anesthesia and craniotomy, with a high risk of cerebral effusion, brain tissue damage and infection.
光化学栓塞模型 Photochemical induction method	全身性给予光敏染料,然后用特定波长的光照射脑部,激活染料,形成氧和过氧化物,造成内皮损伤、血小板活化并聚集,引起末端动脉区域细胞缺血性死亡,导致脑皮质缺血损伤 ^[3] 。 Systemic administration of photosensitizing dyes followed by irradiation of the brain with specific wavelengths of light activates the dyes, forming oxygen and peroxides that cause endothelial damage, platelet activation and aggregation, causing ischemic cell death in the region of the terminal arteries and resulting in ischemic damage to the cerebral cortex.	操作简单,不需开颅,可重复性好,动物死亡率低;可通过控制实验参数改变梗死灶的大小和严重程度。 Simple operation, no craniotomy, good reproducibility and low animal mortality; the size and severity of the infarct foci can be changed by controlling the experimental parameters.	易引起细胞毒性水肿;缺乏缺血半暗带和旁支血流循环;血栓阻塞发生于终末动脉,与人类情况差异较大 ^[6] 。 Susceptible to cytotoxic edema; lack of ischemic semidark zone and collateral circulation; thrombotic obstruction occurs in the terminal artery and differs greatly from the human condition.
内皮素-1 模型 ET-1-induced occlusion method	内皮素-1 作用于血管,引起血管持续收缩诱导分支血管缺血。 ET-1 acts on blood vessels and causes sustained vasoconstriction inducing branch vessel ischemia.	在清醒动物身上建模;可通过调整内皮素-1 水平改变脑缺血的严重程度、持续时间从而控制梗死面积 ^[7] 。 Modeling in conscious animals; can change the severity, duration of cerebral ischemia and thus control infarct size by adjusting ET-1 levels.	用内皮素后局部缺血发展缓慢,且仅伴有轻度水肿,与人类脑卒中有差异。 Local ischemia develops slowly with endothelin and is accompanied by only mild edema, differing from human stroke.
血栓栓塞模型 Blood clot embolization method	将自发形成或凝血酶诱导的体外血栓凝块注入血管以模拟血管栓塞。 Spontaneously formed or thrombin-induced in vitro thrombotic clots are injected into blood vessels to simulate vascular embolism.	最接近人类脑卒中,病理生理学特征与人类缺血性脑卒中完全匹配;急性期和慢性恢复期均适用 ^[7] 。 Closest to human stroke, pathophysiological features exactly match human ischemic stroke; applicable in both acute and chronic recovery phases.	动物死亡率高,易引发脑出血;缺血程度难以控制。 Animals have high mortality and are prone to cerebral hemorrhage; the degree of ischemia is difficult to control.
球囊栓塞模型 Balloon inflation method	血管内置入不溶解的人工球体诱导永久性缺血。 Induction of permanent ischemia by intravascular placement of non-dissolving artificial spheres.	有缺血半暗带;可研究脑卒中后的病理情况;可以在 MRI 或 PET 扫描仪中完成造模,以便采集脑卒中全程的数据信息 ^[4] 。 There is an ischemic semidark band; the physiopathology after stroke can be studied; and the imaging can be done in an MRI or PET scanner in order to collect data information throughout the stroke.	无法实现再灌注;易引起血管源性水肿。 Inability to achieve reperfusion; susceptible to vasogenic edema.

似,进行神经行为测试时能更有效模拟临床评价指标^[14]。此外,NHPs 上肢结构与人类相似,在手部精细动作功能研究中具有不可替代的作用,故 NHPs 模型可用于研发各种手灵巧任务(hand dexterity task)相关的临床评价手段,检测脑卒中的功能损伤及干预效果^[15]。NHPs 的体型适用于人类临床影像检测技术,如计算机断层扫描(CT)、脑正电子发射断层扫描(PET)、脑磁共振成像(MRI)和血管造影(DSA)等,其中 MRI 对缺血性脑卒中发现早,敏感性高,是目前临床广泛使用的检测手段。卒中后残存行为能力与基于 MRI 成像的脑功能连接(functional connectivity, FC)变化关系密切。Hernandez-Castillo 等^[16]应用食蟹猴 MCA 卒中模型研究发现 3 个 FC 变化与行为显著相关,同侧 FC 减少与恢复不良相关。这提示 NHPs 脑卒中模型中静息状态网络的分析可以成为脑卒中转化医学领域的一种相关研究方法,可能会作为新的药物治疗的生物标志物,用于判断卒中后神经变化情况,或者为脑-机接口的实现提供信息,以恢复脑卒中后的功能损伤。

3 建模方法及应用

构建 NHPs 缺血性脑卒中模型的方法可以分为手术法、血管内介入法和光化学诱导法,根据建模后能否产生再灌注,可分为永久性和短暂性栓塞模型。

3.1 外科手术法

通过手术暴露 MCA 的方法主要分为两种:经眶进入法和经颅进入法。外科手术模型的优点是精确地阻断了靶血管,因此可以降低病变变异程度和模型动物死亡率^[17]。然而,侵入性手术产生的创伤会影响模型应用,而人类缺血性脑卒中通常与头部创伤无关,且开颅手术与经眶手术不仅操作难度大,对动物心理生理有重大影响,还会影响术后神经和运动行为的评估。

3.1.1 微血管夹栓塞法

此法可以严格控制缺血及再灌注的位置和时间,但手术难度大,易引起血管痉挛和脑部循环障碍等问题。Meloni 等^[18]采用右侧翼点开颅术,在食蟹猴眶额支远端用 5 mm 钛动脉夹阻断右侧 MCA,通过 MRI 成像确定栓塞,阻断持续 90 min 后,取下动脉夹以恢复血流。该模型损伤可以持续数小时,恢复血流后发生了再灌注,使用该模型成功验证了

聚精氨酸肽-18(poly-arginine peptide-18, R18)的神经保护作用。R18 等神经肽具有多模式神经保护作用,如抗兴奋性毒物、抗炎、抗氧化和有毒分子清除、抗蛋白水解和线粒体稳定等。最近的三期临床实验中发现神经肽可改善急性中风血栓切除术后再灌注恢复情况,有效改善了预后,降低死亡率^[19]。使用食蟹猴血管夹 MCA 模型,发现神经保护剂 nerinetide(NA-1)能将突触后密度蛋白-95 从神经毒性信号通路中解耦联,在减少中风损伤、改善灵长类动物缺血再灌注模型的恢复方面显示出前景。三期临床试验验证了进行血管内血栓切除术后 NA-1 的神经保护作用^[19],尽管 NA-1 不适合已经接受溶栓的患者,但无疑为神经保护带来了新的希望。NHPs 实验结果为脑卒中新型药物开发提供了可靠依据。

3.1.2 化学物质诱导法

内皮素-1(endothelin-1, ET-1)是一种强效的血管收缩肽,立体定向注射到大脑的靶区可以收缩局部小动脉,通过改变 ET-1 的浓度或体积可以调整脑损伤的范围^[20],目前已构建了多种品系的大鼠及恒河猴、绒猴 ET-1 脑卒中模型。然而,这种方法的局限性在于不能严格控制缺血时间,且不同个体损伤程度差异大,死亡率高。Le Friec 等^[21]在中年绒猴初级运动皮层立体定向注射线粒体毒素丙二酸盐诱导形成局灶性病变,该方法安全、经济、易操作,丙二酸盐引起的感觉运动障碍在严重程度和持续时间方面重复性好,有利于脑卒中后慢性期的运动恢复治疗策略的研究。由于诱发性栓塞与人类脑血栓形成相似,可能适用于使用抗血小板和抗血栓药物的治疗康复研究。

近年来,干细胞疗法作为治疗中风的细胞替代疗法得到了广泛的探索,但一直存在长期植入后移植细胞的存活率较低的问题。Ge 等^[22]报告了一种通过 *NeuroD1* 基因治疗修复成年恒河猴缺血性脑卒中后受损大脑的体内神经再生方法,在恒河猴大脑双侧初级运动皮层每侧的六个部位显微注射 ET-1,以诱导局灶性缺血性损伤构建脑卒中模型,发现基于 *NeuroD1* 基因治疗的体内细胞转化,可以通过再生新神经元使成年恒河猴模型脑组织修复。与依赖外部细胞移植的干细胞疗法相比,该基因疗法更依赖于内部神经胶质细胞来再生新的神经元,这些神经元可以在 NHPs 大脑中存活超过 1 年,这种长期存活的中枢神经元有望有效修复脑卒中后受损的神

经回路。基于 *NeuroD1* 的基因疗法在 NHPs 模型中的成功应用可能会缩小动物模型与未来临床试验之间的差距。

3.1.3 电凝法

常用的 MCA 栓塞模型有助于揭示皮质缺血对脑功能的损害,但对脑卒中患者进行影像学研究发现,白质损伤对脑卒中后运动功能恢复的影响比皮质损伤更大。电凝法建模梗死部位明确可控,较血管夹栓塞法对目标血管空间要求小,适于研究不同缺血位置对疾病的影响。Puentes 等^[23]建立了一种利用电凝法诱导绒猴脉络膜前动脉栓塞的方法,用于研究非人灵长类脑卒中后的白质损伤和行为变化。结果显示,用双极电凝系统切断脉络膜前动脉能诱发绒猴白质梗死并导致运动障碍,有助于深入了解白质损伤,寻找脑卒中后运动功能缺陷恢复新策略。然而,尽管绒猴在系统发育上与人类相似性较啮齿类或其他低等哺乳动物更高,但绒猴缺乏脑回,其大脑结构与人类仍有较大差异,且模型构建成功率较低,手术后约 40% 绒猴未出现神经损伤,可能限制该模型的进一步应用。

Ouyang 等^[24]使用多脑回型 NHPs 食蟹猴构建了电凝 MCAO 模型,研究脑卒中后运动功能障碍与脑内 A β 蛋白沉积的关系。研究发现中风 12 个月后,模型同侧丘脑和海马中没有细胞外淀粉样蛋白 A β 沉积的迹象,即 A β 斑块沉积可能不是卒中后认知障碍的病理基础,这与在啮齿动物中获得的结果相反。引起差异的原因可能是啮齿动物淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein)的结构与人类并不相似,已有研究表明 A β 肽不会在鼠类啮齿动物中聚集,因此本质上不会形成斑块,相反,NHPs 和人类一样,脑内的 A β 肽具有聚集和形成老年斑的能力。因此,多脑回型 NHPs 可以为研究脑卒中病理生理学和人类脑疾病的基本分子机制提供更适用的动物模型^[25]。

早期非人灵长类脑卒中模型多利用手术方法建立,对脑卒中后缺血组织的病理生理过程及干预措施研究起到了重要作用。具有定位准确,模型重现性好,梗死成功率高等优点。但是存在着以下局限性:外科手术创伤会对动物心理产生影响;手术失败率和动物死亡率较高;容易引起神经损伤和血管痉挛;有时梗死灶的范围和体积不可预测等。

3.2 血管内介入栓塞法

血管内介入栓塞法是借助影像学成功建立局

灶性脑梗塞的技术,通常是将引导导管插入股动脉并穿过胸主动脉、主动脉弓和颈总动脉到达颈内动脉,将栓子传送到 MCA 的特定位置以诱发局灶性缺血。常用的栓子有微导管、自体血凝块、充气球囊、弹簧线圈或手术缝合线等。此外,还可以通过导管将粘合剂直接注射到目标位置以形成栓塞,此法对目标血管闭塞完全,模型构建成功率高,但无法进行溶栓操作,不能有效模拟临床治疗过程^[26]。

3.2.1 自体血凝块法

将动物自身血液凝结成的凝块输送到 MCA 以形成闭塞,与临床情况相似性最高,是分析取栓和溶栓最理想的动物模型,特别适于探究局部或区域输注纤溶药物、神经保护药物或新型给药方式的安全性和可行性,以及干细胞植入和脑卒中治疗后的长期生存情况。可以通过此类脑卒中模型在基因、细胞和电生理水平上进一步分析大脑神经系统疾病的发生发展机制。

Wu 等^[27]使用自体血栓诱导建立恒河猴脑卒中模型,通过微导管将血栓插入恒河猴右大脑中动脉 M2 段的末端,术后通过血管造影和 MRI 确认模型构建成功,使用该模型验证了鼻内递送鼠尾草素 A 可有效减小梗死体积,并改善神经系统预后。鼻内给药可以将药物直接输送到中枢神经系统,研究前景广阔,因 NHPs 给药方法和装置与人类临床情况相似,能更加准确地评估受试药物的安全性和有效性。Ramsay 等^[28]使用自体血栓诱导的两只雄性恒河猴卒中模型,发现了卒中前后在大脑和血液中高度差异表达的九个基因,通过测定血液转录组学,有望确定用于评估神经保护的生物标志物,以对卒中发生发展进行及时有效的表征。

3.2.2 微导管/球囊法

使用微导管或球囊构建 NHPs 脑卒中模型相对容易,但成本较高^[29],使用固定尺寸的微导管或球囊难以阻塞不同尺寸和角度的 MCA。但是,在再灌注之前或之后通过该模型中的微导管局部输注纤溶剂或神经保护药物,靶组织中药物浓度更高^[30],因此可能更适用于新型药物的功效验证研究,或用于局部药物输注作为血栓切除术的辅助治疗手段研究。

Wu 等^[31]用 16 只恒河猴对比了两种血管内缺血模型的梗死面积、神经功能和生存率。与血栓栓塞组相比,微导管或球囊栓塞的动物偏瘫更为严重、梗死面积更大、Spetzler 评分更低、死亡率更高。

在血栓组中,血栓要么靠近注射部位(M1),要么被冲到 MCA 的上部(M2),未见血栓溶解。M2 栓塞所有动物均存活,M1 血栓栓塞组有 50% 的动物死亡。微导管法的优点包括栓塞部位、梗死面积易于控制,缺血诱导时间较短、缺血再灌注时间可控;缺点是梗死范围较大和 MRI 检测出现伪影。血栓注射法的优点包括发病机制与临床有可比性,梗死面积较小,死亡率低并且可能用于溶栓治疗的评价研究,缺点是操作技术更为复杂和难以控制栓塞确切位置。两种模型在临床上的重要差异,为进一步研究急性缺血性卒中的血栓栓塞提供了技术支撑。

3.2.3 线栓模型

该法是将一端涂有热熔性粘合剂的尼龙线插入颈内动脉,并推进至 MCA 构建缺血性脑卒中,可以通过抽出尼龙线诱导再灌注^[32]。这种方法手术过程简单,创伤小,可以严格控制缺血时间,因此在构建啮齿类动物脑卒中模型中广泛应用。在临床上很难研究闭塞血管再通后,伴随人类大脑相关变化的细胞病理改变,NHPs 线栓 MCAO 模型可以帮助我们更好地理解这一点。Yeo 等^[33]使用恒河猴线栓模型,揭示了表达 CD68 的小胶质细胞/巨噬细胞可能通过分泌 TGF- β 引起长期抗炎作用,因此调节内源性 CD68⁺ 小胶质细胞/巨噬细胞可能是潜在的治疗靶点。但临床脑卒中患者的血管栓塞通常不完全,且伴随着缓慢的自发性再灌注,进行溶栓治疗时完全溶解也需要 30 min 到数小时^[34],与拔出线栓引起的即刻再灌注完全不同,而且用于制备模型的线栓直径对动物体重有严格的要求。这种模型不适合用于溶栓研究,但是栓塞再灌注损伤与临床血栓剥离手术后的再灌注类似。

与手术方法相比,血管内介入方法对实验动物的创伤较小;模型重复性较好;直接在血管内进行阻塞,更接近于人类脑卒中的病变微环境,因此逐渐得到广泛应用。但是也存在梗死部位不精确;手术技术要求高;使用成本高等局限性。

3.3 光化学诱导法

光化学诱导法手术创伤小,死亡率低,可以控制梗死的部位、大小和程度,具有良好的可操作性和可重复性。使用大鼠构建光化学模型时,其神经功能会在诱导后 2 周内恢复,而在绒猴中的研究发现 NHPs 光化学模型恢复较慢,可导致持续的运动功能缺陷,因此更适用于研究卒中后运动功能恢复及用于临床评分标准的建立^[35]。目前已经建立了

食蟹猴、绒猴和恒河猴等多种光化学诱导的 NHPs 脑卒中模型。Yang 等^[36]证实 circSCMH1 可显著改善光化学法诱导的恒河猴脑卒中模型的神经功能损伤程度并促进运动功能恢复,从环状 RNA 层面揭示了缺血性脑损伤后神经功能修复的新机制,并且为环状 RNA 的中枢靶向递送策略研究提供了新思路。然而,光化学法诱导的梗死部位通常位于远端,溶栓剂可诱导再灌注,但再灌注时间却难以控制。

4 总结与展望

NHPs 脑卒中模型经过多年发展,已经在疾病防控、机制探索、治疗及预后等研究中广泛应用。最早用于研究脑卒中的 NHPs 模型是经眶放置充气球囊的狒狒永久性大脑中动脉闭塞模型^[2],永久性模型具有典型的脑损伤特征,常用于卒中后脑部病理生理学研究。电凝法也用于构建永久性脑卒中模型,且梗死部位明确,适用于闭塞皮质表面小血管。为了更好地了解继发性再灌注损伤和随后的微血管衰竭,NHPs 缺血再灌注模型受到关注,较常用的如立体定向注射 ET-1、丙二酸盐诱导血栓形成模型,适用于抗血小板和抗血栓药物的治疗康复研究;血管内介入法放置自体血凝块,是分析取栓和溶栓最理想的动物模型;使用微导管或球囊构建 NHPs 脑卒中模型,更适合用于神经保护药物功效评价;而使用 NHPs 构建线栓模型,更适用于研究脑卒中发生和再通前后脑部细胞和免疫变化。伴随着建模手段的发展,研究使用的 NHPs 种类也逐步增加,较早使用的缺脑回物种如绒猴、松鼠猴等多用于运动及神经功能损伤情况研究,且光滑皮层更适合进行电生理检查,多脑回物种狒狒、恒河猴、非洲绿猴以及食蟹猴等与人类更相似,可以有效评估学习运动等高级功能。然而,对于哪一种 NHPs 中风模型最接近模拟人类病理和生理状况,目前还没有共识^[4]。

迄今为止,大多数 NHPs 脑卒中模型尚未考虑共病因素,例如糖尿病和高血压,构建共病模型对提升临床相关性非常重要。此外,目前的 NHPs 模型都主要用来研究急性期神经保护剂的效果以及再灌注引起的神经功能改变^[37],但神经修复阶段的相关研究,则需要在亚急性和慢性阶段进行,此类 NHPs 模型标准化还需要进一步推进。值得注意的是,目前唯一一种成功转化的缺血性脑卒中治疗方

法——溶栓术,其临床数据来自兔模型,而在猕猴脑中模型治疗中显示阳性结果的药物 NXY-059,却并未在临床研究中显示出神经保护作用^[3],多物种多因素的实验研究不可或缺。总之,临床前研究应着眼于将脑卒中有效治疗手段从实验室成功转化到临床,采取“啮齿类动物-NHPs-人类”的思路有望有效提升转化效率,降低治疗风险。

参考文献:

- [1] Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25): 2982–3021.
- [2] Kaiser EE, West FD. Large animal ischemic stroke models: replicating human stroke pathophysiology [J]. Neural Regen Res, 2020, 15(8): 1377–1387.
- [3] Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality [J]. Acta Neuropathol, 2017, 133(2): 245–261.
- [4] Zhang Z, Wang S, Du L, et al. A pilot behavioural and neuroimaging investigation on photothrombotic stroke models in rhesus monkeys [J]. J Neurosci Methods, 2021, 362: 109291.
- [5] 彭英, 马飞, 许婷婷, 等. 缺血性卒中药物临床前研究的挑战及其对策 [J]. 药学报, 2017, 52(3): 339–346.
- [6] Fan J, Li Y, Fu X, et al. Nonhuman primate models of focal cerebral ischemia [J]. Neural Regen Res, 2017, 12(2): 321–328.
- [7] 王晋晨, 熊晓星. 缺血性脑卒中动物模型研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(10): 1881–1886, 1892.
- [8] Khateeb K, Yao Z, Kharazia VN, et al. A practical method for creating targeted focal ischemic stroke in the cortex of nonhuman primates [J]. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc, 2019, 2019: 3515–3518.
- [9] Bihel E, Roussel S, Toutain J, et al. Diffusion tensor MRI reveals chronic alterations in white matter despite the absence of a visible ischemic lesion on conventional MRI: a nonhuman primate study [J]. Stroke, 2011, 42(5): 1412–1419.
- [10] Fukuda S, del Zoppo GJ. Models of focal cerebral ischemia in the nonhuman primate [J]. ILAR J, 2003, 44(2): 96–104.
- [11] Tajiri N, Dailey T, Metcalf C, et al. *In vivo* animal stroke models: a rationale for rodent and non-human primate models [J]. Transl Stroke Res, 2013, 4(3): 308–321.
- [12] Dehkharghani S, Fleischer CC, Qiu D, et al. Cerebral temperature dysregulation: MR thermographic monitoring in a nonhuman primate study of acute ischemic stroke [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2017, 38(4): 712–720.
- [13] Ramirez-Garcia G, Harrison KA, Fernandez-Ruiz J, et al. Stroke longitudinal volumetric measures correlate with the behavioral score in non-human primates [J]. Neuroscience, 2019, 397: 41–55.
- [14] Bakken TE, Miller JA, Ding SL, et al. A comprehensive transcriptional map of primate brain development [J]. Nature, 2016, 535(7612): 367–375.
- [15] 朱华, 刘颖, 李秦, 等. 上肢精准测试系统在食蟹猴脑缺血研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(8): 53–56, 60.
- [16] Hernandez-Castillo CR, Nashed JY, Fernandez-Ruiz J, et al. Increased functional connectivity after stroke correlates with behavioral scores in non-human primate model [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6701.
- [17] Cook DJ, Teves L, Tymianski M. Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain [J]. Nature, 2012, 483(7388): 213–217.
- [18] Meloni BP, Chen Y, Harrison KA, et al. Poly-arginine peptide-18 (R18) reduces brain injury and improves functional outcomes in a nonhuman primate stroke model [J]. Neurotherapeutics, 2020, 17(2): 627–634.
- [19] Hill MD, Goyal M, Menon BK, et al. Efficacy and safety of nerinetide for the treatment of acute ischaemic stroke (ESCAPE-NA1): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial [J]. Lancet, 2020, 395(10227): 878–887.
- [20] Dai P, Huang H, Zhang L, et al. A pilot study on transient ischemic stroke induced with endothelin-1 in the rhesus monkeys [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45097.
- [21] Le Fric A, Desmoulin F, Demain B, et al. A reproducible new model of focal ischemic injury in the marmoset monkey: mri and behavioural follow-up [J]. Transl Stroke Res, 2021, 12(1): 98–111.
- [22] Ge LJ, Yang FH, Li W, et al. *In vivo* neuroregeneration to treat ischemic stroke through neuroD1 AAV-based gene therapy in adult non-human primates [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 590008.
- [23] Puentes S, Kaido T, Hanakawa T, et al. Internal capsule stroke in the common marmoset [J]. Neuroscience, 2015, 284: 400–411.
- [24] Ouyang F, Chen X, Chen Y, et al. Neuronal loss without amyloid- β deposits in the thalamus and hippocampus in the late period after middle cerebral artery occlusion in cynomolgus monkeys [J]. Brain Pathol, 2020, 30(1): 165–178.
- [25] 胡新天, 仇子龙, 顾勇, 等. 非人灵长类模型 [J]. 中国科学院院刊, 2016, 31(7): 773–782.
- [26] 吴迪, 何小夺, 陈健, 等. 血管内介入方法制备非人灵长类动物局部脑缺血模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(5): 16–20.
- [27] Wu L, Wu D, Chen J, et al. Intranasal salvinin A improves neurological outcome in rhesus monkey ischemic stroke model using autologous blood clot [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2021, 41(4): 723–730.
- [28] Ramsay L, Quillé ML, Orset C, et al. Blood transcriptomic biomarker as a surrogate of ischemic brain gene expression [J]. Ann Clin Transl Neurol, 2019, 6(9): 1681–1695.
- [29] 吴婷婷, 屈会化, 王雪茜, 等. 非人灵长类局部脑缺血动物模型研究现状 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(3): 263–

- 268.
- [30] Han Z, Liu X, Luo Y, et al. Therapeutic hypothermia for stroke: Where to go? [J]. *Exp Neurol*, 2015, 272: 67-77.
- [31] Wu D, Chen J, Wang B, et al. Endovascular ischemic stroke models of adult rhesus monkeys: a comparison of two endovascular methods [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31608.
- [32] Bihel E, Pro-Sistiaga P, Letourneur A, et al. Permanent or transient chronic ischemic stroke in the non-human primate: behavioral, neuroimaging, histological, and immunohistochemical investigations [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(2): 273-285.
- [33] Yeo HG, Hong JJ, Lee Y, et al. Increased CD68/TGF β co-expressing microglia/ macrophages after transient middle cerebral artery occlusion in rhesus monkeys [J]. *Exp Neurobiol*, 2019, 28(4): 458-473.
- [34] McCabe C, Arroja MM, Reid E, et al. Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134: 169-177.
- [35] Ikeda S, Harada K, Ohwatashi A, et al. A new non-human primate model of photochemically induced cerebral infarction [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60037.
- [36] Yang L, Han B, Zhang Z, et al. Extracellular vesicle-mediated delivery of circular RNA SCMH1 promotes functional recovery in rodent and nonhuman primate ischemic stroke models [J]. *Circulation*, 2020, 142(6): 556-574.
- [37] 王强, 张通, 赵春禹, 等. 血管内栓塞大鼠中动脉制作非人灵长类卒中慢性期模型的研究 [J]. *中国康复理论与实践*, 2012, 18(5): 401-405.

[收稿日期]2022-01-21

中国实验动物学会“猴痘病毒沙龙——One Health 与猴痘防治”成功举办

在访谈环节, Professor Geoffrey L Smith 进一步指出, 猴痘病毒在人类之间的传播需要密切接触, 没有证据表明导致 2022 年疫情的毒株更具传染性。同时总结了猴痘目前预防和治疗的概况。陆家海教授重申了“One Health”的理念, 中国应加强联防联控等机制, 践行“One Health”的理念。中国政府“人民至上、生命至上”的抗疫理念和“内防反弹、外防输入”的防疫策略是一个负责任大国应有的责任与担当。中国将秉持人类卫生健康共同体的理念, 齐心协力、守望相助、携手应对, 坚决遏制疫情蔓延势头, 打赢疫情防控全球阻击战, 护佑世界和人民康宁。Dr. Judy MacArthur Clark 指出, 我们需要更好地教育和培训相关人员接受“One Health”的理念, 更需要全球医学组织和政府更好的合作。同时介绍了索尔斯基基金会如何通过“同一健康”奖学金来支持相关研究。

中国实验动物学会编辑部张钰博士在会议上, 介绍了三本期刊的基本情况以及猴痘专题文章组稿方案, 鼓励以“专家”为主体, 为期刊进行专题组稿。

最后, 理事长秦川教授做沙龙活动总结, 本次沙龙为广大科研工作者搭建了猴痘研究及防控的国际学术交流平台, 学术报告内容丰富, 让我们对猴痘病毒及猴痘的防治有了更深入的了解, 也更加深刻认识到“One Health”策略在传染病防控中的重要作用。访谈部分, 三位嘉宾就科研工作者和社会大众关心的问题, 进行了深入剖析和解答, 让我们受益匪浅。再次感谢各位专家百忙之中, 积极参与此次学术沙龙活动。并表示编辑部将定期举办学术沙龙, 欢迎科研工作者积极提供沙龙主题, 申请成为沙龙主讲者, 与中国实验动物学会共同推进学术交流与合作。