

# 花生四烯酸诱导建立大鼠弥漫性脑血栓模型

宁 珑, 孙 航, 冯 晋, 孟庆婷, 杨 茜, 何芳雁

(云南中医药大学中药学院, 昆明 650000)

**[摘要]** **目的** 建立并优化花生四烯酸诱导的大鼠弥漫性脑血栓模型。**方法** 经颈内动脉注射花生四烯酸, 建立大鼠弥漫性脑血栓模型; 同时设定假手术组作为对照。通过检测脑组织中伊文思蓝 (Evans blue, EB) 渗出含量以及 HE 染色法检测脑组织病理损伤程度评价建模效果。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠损伤侧脑组织中均出现弥漫性 EB 渗出 ( $P < 0.01$ ), 且渗出情况均一性较好。损伤侧脑组织病理表现为细胞排列混乱, 细胞核皱缩, 细胞间隙增大, 空泡细胞增多, 个别微血管呈红色条形管型的缺血病理损伤。**结论** 花生四烯酸可成功诱导弥漫性脑血栓模型, 且优化方法后模型稳定性较好, 死亡率较低。

**[关键词]** 弥漫性脑血栓; 花生四烯酸; 大鼠

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)02-0141-05

## Model of Diffuse Cerebral Thrombosis Induced by Arachidonic Acid in Rats

NING Long, SUN Hang, FENG Jin, MENG Qingting, YANG Qian, HE Fangyan

(School of Chinese Material Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650000, China)

Correspondence to: HE Fangyan, E-mail: 735137511@qq.com

**[ABSTRACT]** **Objective** Establishment and optimization of arachidonic acid-induced diffuse cerebral thrombosis model in rats. **Methods** Arachidonic acid was injected into the internal carotid artery to establish a diffuse cerebral thrombosis model in rats, while the sham operation group was set as the control. The model was evaluated by detecting the exudate content of Evans blue (EB) in brain tissue and the pathological damage degree of brain tissue by HE staining. **Results** Compared with the sham operation group, diffuse EB exudation was observed in the injured brain tissue of the model group ( $P < 0.01$ ), and the exudation was relatively uniform. The HE staining of brain tissue on the side of the injury showed ischemic pathological damage with disorganized cell arrangement, wrinkled nuclei, enlarged cell gaps, increased vacuolated cells, and red striped tubular shape of each individual microvessel. **Conclusion** Arachidonic acid can successfully induce diffuse cerebral thrombosis model, and the optimized model has better stability and lower mortality.

**[Key words]** Diffuse cerebral thrombosis; Arachidonic Acid; Rats

缺血性脑卒中 (ischemic stroke) 是我国脑血管疾病中发病率最高的病种。虽然在时间窗内 (<4.5 h) 使用组织纤维溶酶原激活物 (tissue-plasminogen activator, t-PA) 溶栓可改善大部分缺血性脑卒中患者的预后<sup>[1]</sup>, 但会增加患者出血转化 (hemorrhagic transformation) 的风险; 如超时间窗使用, 其风险将增加 10 倍, 死亡率提高 10%~40%<sup>[2]</sup>。由于缺血性脑卒

中临床病情复杂, 临床前研究需根据病因、缺血时间及损伤程度等选择适合的缺血性脑卒中模型, 同时还须考虑模型的稳定性、可靠性、易行性、经济性等特征。临床弥漫性脑血栓是造成缺血性脑卒中的主要原因之一。

1988 年 Cahn 等<sup>[3]</sup> 利用花生四烯酸 (arachidonic acid) 诱导血小板活化与聚集、血管内皮损伤, 其在体

**[基金项目]** 云南省中医药学科后备人才培养项目; 云南省科技厅科技计划项目 (202101AZ070001-009; 202101AT070264)

**[作者简介]** 宁 珑 (1998—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究。E-mail: 986244037@qq.com

**[通信作者]** 何芳雁 (1989—), 女, 实验师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: 735137511@qq.com

内可代谢为血栓素A<sub>2</sub>、白三烯等多种产物,使血栓素A<sub>2</sub>与前列腺素I<sub>2</sub>的比例失衡,促使血小板聚集、血管收缩,形成脑血栓;并且在花生四烯酸引起的脑血栓损伤后几分钟内即可发生血管源性脑水肿和血脑屏障损伤<sup>[4]</sup>。因此,通过该方法可以建立操作简单、手术时间短、对实验动物创伤程度低的大鼠弥漫性脑血栓模型。然而由于当时的操作细节不够完善,例如手术切口不合理、未规定花生四烯酸的保存方式、麻醉药物选用不合适等原因,该模型复制的稳定性差、死亡率高,限制了推广应用。

本实验总结了通过颈内动脉注射花生四烯酸建立大鼠弥漫性脑血栓模型的操作要点,完善操作细节,并以脑组织伊文思蓝(Evans blue, EB)渗出含量及缺血病理损伤程度为依据,对模型的成功率及稳定性进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

4~8周龄的SPF级雄性SD大鼠24只,体质量为250~300 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[SCXK(湘)2019-0004],质量合格证号为430727210100499718。动物饲养于云南中医药大学动物实验室[SYXK(滇)K2017-0005],饲养室温度为20~25℃,相对湿度为50%~65%,日光灯照明12 h,自由进食与饮水。动物实验方案经本单位实验动物伦理委员会审批通过(编号R-062019LH001)。

### 1.2 药物与试剂

花生四烯酸(批号XKN3C-JG)购自东京化成工业株式会社;阿托品(批号130404)购自上海禾丰制药有限公司;多聚甲醛(批号20100525)购自天津化学试剂研究所;异氟烷(批号217180101)购自深圳市瑞沃德生命科技与有限公司;肝素钠注射液(批号151607006A)购自常州千红生化制药股份有限公司;EB(批号L04D11J133367)购自上海源叶生物科技有限公司;苏木精(批号1612154094)、伊红(批号1612154094)均购自福州迈新生物技术开发有限公司;盐酸(批号20081215)购自成都市科龙化工试剂厂;中性树胶(批号20150202)购自上海标本模型厂。

### 1.3 主要仪器

石蜡包埋机(型号HISTOSTATS)和石蜡切片机(型号Microm HM)为赛默飞世尔科技(中国)有限公

司产品;显微镜(型号Nikon DS-U3)为日本NIKON公司产品;数字式超级恒温水槽(型号HSS-1B)为成都仪器厂产品;烘箱(型号DHG-9140A)为上海慧泰仪器制造有限公司产品;电子分析天平(型号AB204-S)为瑞士Mettler Toledo公司产品;小动物麻醉机(型号V1824301)为美国Marex公司产品。

### 1.4 花生四烯酸的配制及保持方法

向规格为50 mg/支的花生四烯酸中加入10 mL浓度为100 mmol/L的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,分装后冲氮气密封保存于-80℃冰箱备用;使用前用生理盐水(即0.9% NaCl溶液)将花生四烯酸稀释到质量浓度为0.5 g/L,现用现配。

### 1.5 大鼠弥漫性脑血栓模型复制

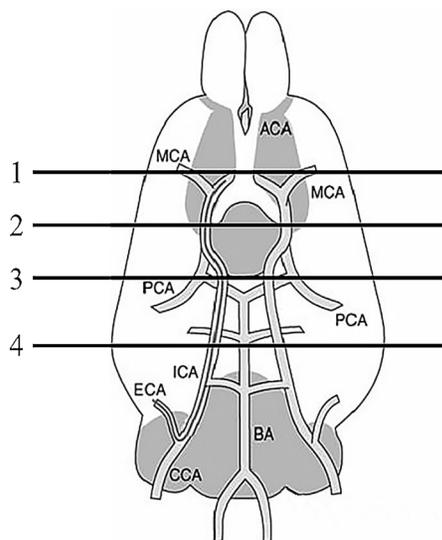
将大鼠随机分为假手术组和模型组,每组12只(一半用于EB染色,一半用于HE染色)。用异氟烷吸入麻醉,并肌内注射治疗剂量的阿托品。使右侧颈部皮下筋膜暴露,钝性分离右侧颈总动脉、颈外动脉,并结扎颈外动脉分支和颈总动脉近心端,在其远心端用动脉夹夹紧,显微剪在颈总动脉游离端剪一个小口,插入导管,去除动脉夹。将0.5 mg/kg花生四烯酸(0.1 mL/100 g体质量)经导管(使用前先经肝素-生理盐水抗凝处理)注入颈总动脉,后结扎远心端动脉,进行缝合。实验过程中使大鼠仰卧于加热垫上,保持肛温恒定在37℃<sup>[3,5]</sup>。假手术组钝性分离右侧颈总动脉、颈外动脉后即可进行缝合,不注入任何药物。

### 1.6 脑组织中EB含量测定

注入花生四烯酸后5 min立即注入0.2% (0.5 mL/100 g体质量) EB,再过5 min后立即用手术剪断头处死动物,开颅取出大脑,脑组织沿脑桥上界面切断,去除嗅球。按图1所示,在脑前极与视交叉连线中点、视交叉处、漏斗柄处以及漏斗柄与后叶尾极之间冠状方向将脑分为5块组织。拍照后将脑组织放入匀浆器中,加入5 mL 0.5% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>及丙酮(3:7)混合液制成匀浆液,试管密封静置60 min以上;经3 000 r/min离心10 min,取上清液在620 nm波长处测定吸光度值。以栓塞侧的吸光度值与脑质量之比表示EB的含量,反映脑血栓的严重程度。

### 1.7 HE染色观察脑组织病理改变

按1.6节方法取脑、切块后,4%多聚甲醛溶液固定过夜。次日将第2、3、4片脑组织放入镂空铝盒中,以流动的水浸泡2 h以上,依次经过梯度乙醇溶液脱水、二甲苯透明、浸泡石蜡,然后进行组织包埋及切



注：MCA为大脑中动脉，ACA为大脑前动脉，PCA为大脑后动脉，ICA为颈内动脉，ECA为颈外动脉，CCA为颈总动脉，BA为基底动脉；1、2、3、4表示脑组织分割线。

图1 大鼠弥漫性脑血栓模型的脑组织冠状切块示意图

Figure 1 Coronal slices of brain tissue in rats with diffuse cerebral thrombosis

片。石蜡切片在59~62℃烤箱内烘烤20 min后，进行常规脱蜡复水，依次为二甲苯1、二甲苯2、无水乙醇

1、无水乙醇2、95%乙醇溶液、90%乙醇溶液、80%乙醇溶液、70%乙醇溶液、自来水浸泡5 min。复水后的脑组织经苏木精染色5 min，用流动水冲洗10 min后，1%盐酸乙醇溶液分化。再用流动的水冲洗10 min，使用伊红染色25~35 s，梯度乙醇溶液脱水后中性树脂胶封固。最后用光学显微镜观察，并拍照。

## 1.8 统计分析

采用SPSS 26软件进行数据统计分析。结果数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用独立样本均数 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 弥漫性脑血栓模型大鼠脑组织渗出EB含量增多

建模过程中两组大鼠均未见死亡。与假手术组大鼠的脑组织中EB含量( $0.16 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ )比较，经花生四烯酸经颈内动脉注射建立的弥漫性脑血栓模型组大鼠缺血侧的EB含量( $0.25 \pm 0.10 \mu\text{g/g}$ )明显升高，差异有统计学意义( $n=6, P < 0.01$ )。两组大鼠脑组织经EB染色后的拍照结果见图2。



注：每组6只大鼠，每只大鼠的脑组织分别在脑前极与视交叉连线中点、视交叉处、漏斗柄处以及漏斗柄与后叶尾极之间冠状方向分割成5块(自上而下)进行EB染色。

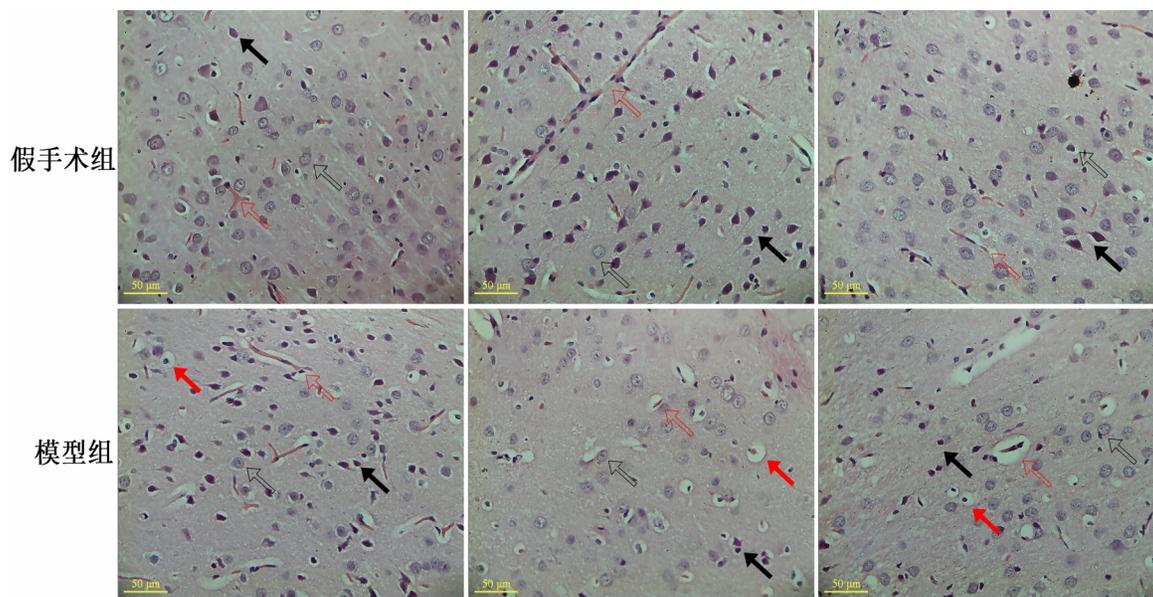
图2 弥漫性脑血栓模型大鼠脑组织的依文思蓝染色结果

Figure 2 Evans blue (EB) staining images of brain tissue in rats with diffuse cerebral thrombosis

### 2.2 弥漫性脑血栓模型大鼠脑组织病理学变化

HE染色结果显示，假手术组大鼠的脑组织细胞排列整齐，细胞间隙均匀，细胞形态完整，神经元形态完整，微血管腔无阻塞；与假手术组相比，模型组大

鼠的脑组织细胞排列混乱，细胞间隙增大，细胞核皱缩，空泡细胞增多，神经细胞出现凋亡，个别微血管呈红色条形的管型。图3是各组随机选3只大鼠的HE染色结果。



注：各组分别显示3只大鼠的HE染色结果。图中红色虚线箭头指示血管，红色实线箭头指示空泡细胞，黑色虚线箭头指示细胞形态，黑色实线箭头指示神经元形态。比例尺大小均为50 μm。

图3 弥漫性脑血栓模型大鼠脑组织的HE染色结果(×40)

Figure 3 HE staining of brain tissue in diffuse cerebral thrombosis model rats (×40)

### 3 讨论

EB为偶氮基荧光染料，进入血液后与血浆白蛋白高度结合，正常情况下该结合物无法透过血脑屏障；当血脑屏障被破坏时，通透性升高，该结合物方可透过血脑屏障进入脑组织。脑损伤程度与血脑屏障通透性呈正相关，损伤越严重，血脑屏障的通透性越高，即EB透过的量越多，染蓝程度越深。因此检测脑组织中EB渗出的含量可判断脑损伤的程度<sup>[6-7]</sup>。HE染色为经典的组织病理检查方法<sup>[8]</sup>，操作简单，结果可靠，其中伊红染料可使不同形态的细胞因其成分不同呈现出深浅不一的粉红色<sup>[9-10]</sup>。缺血性脑卒中发生后，脑组织细胞质浓缩红染；神经细胞出现凋亡，排列紊乱，数量减少；细胞核皱缩、碎裂；微血管呈红色条管型；细胞肿胀，可见胶质水肿，并出现凋亡，形成大量空泡细胞<sup>[11-12]</sup>。

相较于经典方法<sup>[3]</sup>，本研究有以下创新之处：(1) 规定进行右侧切口，较正中切口更便于颈总动脉、颈外动脉的分离，减少动物出血和对气管的刺激，避免气管痉挛和过多分泌物的产生，减少动物死亡率<sup>[5]</sup>。而且左侧迷走神经直接分布于心脏，进行手术将影响心脏功能，于右侧操作可减少不必要的脑外因素。(2) 改进动物麻醉方式，采用异氟烷吸入麻醉代

替戊巴比妥钠麻醉，避免动脉收缩压和平均动脉压升高而造成动物心率降低，并在术中、术后对动物进行保温，减轻呼吸及心脏功能抑制，降低死亡率。(3) 改进花生四烯酸的保存方式，将花生四烯酸充氮气密封存于-80℃冰箱，造模液(花生四烯酸-生理盐水)现用现配，提高花生四烯酸的稳定性。(4) 规范造模方式，用7~8周龄(体质量为250~300g)的雄性SD大鼠实施手术。(5) 用肝素-生理盐水对手术引导管进行抗凝处理，防止血凝块阻塞引导管。

本实验结果显示，较假手术组，模型大鼠缺血侧出现弥漫性EB渗出量明显增加( $P < 0.01$ )；且缺血侧脑组织细胞排列紊乱，部分皱缩，染色加深，空泡细胞增多，神经细胞出现凋亡。结果提示缺血侧血脑屏障被破坏，大鼠弥漫性脑血栓模型复制成功，且模型大鼠死亡率低、稳定性好。

目前临床脑血栓的发生受多因素、多途径诱导，血管内皮细胞损伤与收缩、血小板活化与聚集、纤维蛋白凝固、血管壁炎症反应、斑块的不稳定性增加、斑块破裂、局部栓子形成等都与脑血栓的形成密切相关<sup>[13]</sup>。因此，用花生四烯酸诱导建立脑血栓模型适用于由血小板活化与聚集、血管内皮损伤导致的血栓栓塞性相关疾病的研究。

**【作者贡献】**

宁珑: 负责主要实验工作, 文章资料收集、整理及撰写;  
 孙航: 负责主要实验工作, 协助资料收集和论文撰写;  
 冯晋: 对全文数据进行分析, 参与实验及文章修改;  
 孟庆婷: 对文章图片进行处理, 参与实验及文章修改;  
 杨茜: 对全文数据及图片进行校对, 参与实验;  
 何芳雁: 负责实验设计及指导, 并对文章进行修改把关。

**【利益声明】**所有作者均声明本文不存在利益冲突。

**【参考文献】**

- [1] KANAZAWA M, TAKAHASHI T, NISHIZAWA M, et al. Therapeutic strategies to attenuate hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator treatment for acute ischemic stroke[J]. J Atheroscler Thromb, 2017, 24(3): 240-253. DOI: 10.5551/jat.RV16006.
- [2] LEES K R, BLUHMKI E, VON KUMMER R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials[J]. Lancet, 2010, 375(9727):1695-1703. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60491-6.
- [3] CAHN J, BORZEIX M G. The sodium arachidonate-induced cerebral infarct in the rat: a model for the study of drugs[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1982, 2(Suppl 1): S74-S77. DOI: 10.1016/0018-506X(82)90054-X.
- [4] 李泓. 花生四烯酸代谢、血小板激活因子、血小板膜蛋白与脑缺血[J]. 国外医学-神经病学神经外科学分册, 1996, 23(2): 80-83. DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1996.02.009.
- [5] 何芳雁, 韩春妮, 李艳, 等. 制作线栓法大鼠脑缺血再灌注模型的要及体会[J]. 实验动物科学, 2013, 30(4):46-48. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2013.04.012.
- [6] LEE B R, JOO K I, CHOI E S, et al. Evans blue dye-enhanced imaging of the brain microvessels using spectral focusing coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. PLoS

- One, 2017, 12(10): e0185519. DOI: 10.1371/journal.pone.0185519.
- [7] CANGALAYA C, BUSTOS J A, CALCINA J, et al. Perilesional inflammation in neurocysticercosis - relationship between contrast-enhanced magnetic resonance imaging, Evans blue staining and histopathology in the pig model[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(7): e0004869. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004869.
- [8] 常颖慧, 樊小农, 石学敏. HE染色光镜观察法在脑组织形态学研究中的应用[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(5): 777-779. DOI: 10.13192/j.ljtc.2010.05.14.changyh.078.
- [9] XIAO A J, HE L, OUYANG X, et al. Comparison of the anti-apoptotic effects of 15- and 35-minute suspended moxibustion after focal cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2018, 13(2):257-264. DOI: 10.4103/1673-5374.226396.
- [10] FANG X, LI Y, QIAO J, et al. Neuroprotective effect of total flavonoids from *Ilex pubescens* against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Mol Med Rep, 2017, 16 (5):7439-7449. DOI:10.3892/mmr.2017.7540.
- [11] LI X J, LIANG L, SHI H X, et al. Neuroprotective effects of curdione against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2017, 13: 1733-1740. DOI: 10.2147/NDT.S139362.
- [12] WAN J Y, WAN H F, YANG R B, et al. Protective effect of Danhong Injection combined with Naoxintong Capsule on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 211: 348-357. DOI: 10.1016/j.jep. 2017. 10.002.
- [13] 刘抒雯, 刘敬霞, 任非非, 等. 脑血栓的形成机制与中医药治疗脑血栓的优势[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(10):2026-2029. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2015.10.079.

(收稿日期: 2021-05-08 修回日期: 2021-09-31)

(本文编辑: 富群华, 张俊彦, 任益凡)

\*\*\*\*\*

## 《实验动物与比较医学》2022年征订启事

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)由上海科学院主管, 上海市实验动物学会和上海实验动物研究中心联合主办, 是我国实验动物科学及比较医学领域创刊最早的一本专业学术期刊。本刊目前是中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊), 并被美国“Chemical Abstracts”、中国核心期刊数据库、中国科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网和万方医学网等收录, 2020年入选中国医师协会发布的中国医药卫生“核心期刊”目录。

本刊兼顾理论与实践、普及与提高, 刊登实验动物科学和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息。期刊内容主要涉及人类疾病动物模型、实验动物资源开发与利用、实验动物管理、实验动物福利与伦理、动物实验技术与方法、实验动物医学、比较医学方法研究, 以及以实验动物为基础的生物医药各领域基础与应用研究。设置栏目包括专家论坛、研究论著、综述、经验交流、实践与探索、技术与平台、政策与法规、标准与指南、人物、简报、动态与书讯等。读者对象为生物学、医学、药学、动物学和农学等各领域从事实验动物生产、繁育、检测和管理, 以及应用实验动物进行比较医学研究的广大科技工作者、教育工作者和医学工作者。欢迎订阅!

本刊为双月刊, 大16开, 铜版纸, 彩色印刷; 全年出版6期, 每期定价30元/本, 全年定价180元/套。读者可在各地邮局订阅, 邮发代号为4-789; 也可以联系本刊编辑部购买, 联系电话: 021-50793657。E-mail: bjb50793657@163.com。编辑部地址: 上海市浦东新区金科路3577号(邮编201203)。期刊官网地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部