

席娅琳,王慧瑜,鹿树军. 局灶性缺血性卒中动物模型制作研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(2): 140-148.
Xi YL, Wang HY, Lu SJ. Research progress of focal ischemic stroke in production of animal models [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(2): 140-148.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.02.019

局灶性缺血性卒中动物模型制作研究进展

席娅琳,王慧瑜,鹿树军*

(滨州医学院附属医院神经内科,山东 滨州 256600)

【摘要】 脑血管病是影响人类健康的重大疾病,具有高患病率、高致残率、高死亡率、高复发率和高治疗成本等五大特点,其中缺血性脑卒中疾病约占80%。深入研究该疾病的病理生理反应、治疗反应机制及神经保护药物的开发,动物模型是必不可少的。动物缺血性卒中模型可分为全脑性与局灶性缺血性卒中模型两大类,其中对局灶性缺血模型的研究较多且更为深入。鉴于模型的多样性,研究者也可根据研究内容及实际需要自行选择所需的动物脑缺血制作模型。现对局灶性缺血性卒中动物模型制作进展作一综述,并对局灶性缺血性卒中模型动物的选择、各种模型的优缺点以及最常用的线栓法制作大鼠局灶性缺血性卒中模型注意事项进行简要阐述,为后续的脑缺血模型的制作与研究提供参考。

【关键词】 局灶性缺血性卒中;实验性卒中模型;线栓法;开颅;光栓;内皮素-1;氯化铁;自发性卒中

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 02-0140-09

Research progress of focal ischemic stroke in production of animal models

XI Yalin, WANG Huiyu, LU Shujun*

(Department of Neurology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, China)

【Abstract】 Cerebrovascular disease, which has high prevalence; high disability, mortality, and recurrence rates and is associated with high costs, is a major disease affecting human health. Ischemic stroke occurs in approximately 80% of cases. Animal model studies are essential if we want an in-depth understanding of the pathophysiology of the disease, therapeutic response mechanisms, and how to develop neuroprotective drugs. Animal models of ischemic stroke can be divided into global and focal ischemic stroke models, and there have been deeper explorations of focal ischemia models. Given the diversity of models, researchers can also choose an animal model of cerebral ischemia according to the research aims and other needs. The advances made in the production of animal models of focal ischemic stroke, the selection of animal models of focal ischemic stroke, the advantages and disadvantages of various models, and matters needing attention in the making of focal ischemic stroke rat model by intraluminal suture middle cerebral artery occlusion are briefly described. This review provides a reference for the production of and research using subsequent cerebral ischemia models.

【Keywords】 focal cerebral ischemia; experimental stroke model; fiber embolisation; craniectomy; photothrombosis; endothelin-1; ferricchloride; spontaneous stroke

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

《2019年中国脑卒中统计》显示,脑卒中为我国第三大死亡原因,其中缺血性脑卒中占脑卒中的69.6%,每10万人因脑卒中而丧失的生命年数 (years of life lost, YLLs)增加了14.6%;在中国25

[作者简介] 席娅琳(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:神经病学脑血管病。E-mail: xyl2423@126.com

[通信作者] 鹿树军(1971—),男,博士,主任医师,教授,硕士生导师,研究方向:缺血性脑血管病的介入诊疗及基础和临床研究。

E-mail: 13954338120@163.com

岁之前的终生卒中风险最高,可达 39.3%^[1]。显然,目前关于卒中疾病的临床前及临床实验研究仍必不可少。对于该类型动物卒中模型的制作也是临床前实验研究的前提,缺血性卒中的动物实验模型具有针对性与多样性的特点,并不断地进行改进与创新,力争制作的动物模型能无限接近真实的人类卒中,许多学者对缺血性卒中的动物实验模型研究进展也进行了阐述,本文将重点对模型动物的选择、动物局灶性缺血性卒中模型制作研究进展、各模型的优缺点、最常用的线栓法实验注意事项以及实验模型的展望等几个方面进行阐述。

1 局灶性缺血性卒中模型动物的选择

目前,大鼠、小鼠、猴、犬、兔、羊、猪等多种动物被用于制备局灶性脑缺血模型。其中,非人灵长类动物的皮层组织与人类更相似,在理解许多大脑自我修复机制方面,可能比啮齿类动物模型提供了更显著的优势,但由于动物伦理、昂贵的价格及一些国家对高等哺乳动物使用的法律限制,有关非人灵长类动物的缺血模型的研究比较罕见。但有不少关于其他科种哺乳类动物缺血性卒中模型的研究,如利用内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 诱导制作猪脑缺血模型,认为这是一种适合长期脑缺血卒中研究的模型^[2]。或是通过颅骨切除术暴露比格犬大脑 Willis 环,暂时闭塞大脑中动脉 (middle cerebral artery, MCA)、大脑前动脉 (anterior cerebral artery, ACA) 和眼动脉 (ophthalmic artery, OA) 1 h,同时烧灼远端 MCA 侧支血管,可获得一致且可重复的脑卒中模型^[3]。

然而,大鼠、小鼠才是目前公认的最常用于制备大脑中动脉闭塞或再灌注模型的动物,尤其是大鼠^[4]。选用大鼠的优点可概括为以下几点:(1)易得到、易繁殖、易饲养、所需饲养环境要求较低、生命力强;(2)生理功能及神经功能易于观察、易于记录;(3)体型大小适中、手术视野可、易于操作、可一人完成操作;(4)实验可重复性高;(5)与人类基因同源性高、脑血管结构与人类相似、与实际临床情况相似程度较高;(6)品种多,可供选择范围广。其中,Wistar 大鼠脑梗死病灶面积变异率最低,Fischer-344 (F344) 品种大鼠的脑缺血模型制作效果最好,但存在鼠源少的问题,选择此品种大鼠较少^[5]。而 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,是目前最常用的品种,其组织及血管易分离,且价格便宜,性情温

顺,常使用 250~300 g (国内) 或 280~320 g (国外) 的健壮成年大鼠^[4]。虽选用高龄大鼠可能更接近真实的临床情况,但高龄大鼠动脉弯曲较多,血管变异率高,模型制作成功率会大打折扣。且有研究表明,大鼠体重越小,死亡率越高;体重过大则血管粗,模型制备的成功率也会降低^[6]。当根据鼠龄选择实验大鼠时,则需要实验者能保证大鼠周龄的准确性及饲养条件的标准性,但当实验动物的出生日期记录出现人为误差时,则可能会影响后续的实验,如线栓的选择与大鼠血管直径不匹配;若根据大鼠体重进行选择,则只需保证饲养条件的标准性,更为简便,但若饲养条件不合格或未达标,则通过大鼠体重估计的实际鼠龄也会出现偏差从而影响后续实验。一般大多数研究者能大致保证饲养条件的合格性,所以建议根据体重进行实验大鼠的选择,体重为 200~350 g (6~9 周) 的大鼠被认为是制作模型较为合适的选择^[4]。

2 局灶性缺血性卒中模型的制作方法

目前,线栓法、开颅法、栓子栓塞法、光化学法、FeCl₃ 诱导法、内皮素-1 诱导法和自发性卒中法为常用方法,其中线栓法为制作局灶性缺血性卒中模型最常用的方法,而模型的建立多采用大、小鼠。

2.1 线栓缺血性卒中模型

此模型利用纤细的丝线堵塞一侧 MCA 的入口,从而建立局灶性缺血性卒中模型。线栓法为现在制作局灶性缺血模型最常用的方法,可观察再灌注损伤,同时也可模拟永久性及短暂性脑缺血的两种缺血状态^[7]。而采用线栓法制作大、小鼠缺血性卒中模型已比较成熟,实验者为提高实验成功率,常使用前端有着光滑圆头的硅橡胶包被稍有弯曲弧度的尼龙线(弯曲的弧度是为方便再灌注时拔出),同时在线栓 18~20 mm (大鼠) 或 9~10 mm (小鼠) 位置有一处记号,以便实验者操作时插入合适长度,减小了蛛网膜下腔出血风险,增大了存活率。线栓法根据入线栓路径的不同,可分为经颈外动脉 (external carotid artery, ECA) 进栓与经颈总动脉 (common carotid artery, CCA) 进栓。

2.1.1 经 ECA 进栓

1986 年, Koizumi 等^[8]首次报道了一种相对无创的腔内细线闭塞可逆性缺血性卒中模型。1989 年, Longa 等^[9]对该模型进行了些许改进,为后续线栓法的实验研究奠定了基础,并展现了线栓法的大致

基本操作步骤。选用体重为 400~500 g 的成年雄性 SD 大鼠颈部做正中切口,逐层剥离组织,显露颈动脉、二腹肌和胸锁乳突肌,并将肩胛舌骨肌分开,充分暴露手术视野,电凝切断 ECA 的分支和颈内动脉(internal carotid artery, ICA)的颅外分支,夹闭 ICA 和 CCA,再经 ECA 引入一根尖端加热形成圆形的 4-0 号单丝尼龙缝合线,最后引入 ICA 闭塞 MCA,最后缝合皮肤,留出 1 cm 的可及缝合线,以便将其取出,通过尼龙线的插入与拔出可实现脑缺血和再灌注过程。但后续发现该模型诱导的脑梗死体积不一致, Belayev 等^[10]在缝合线外层涂覆聚-L-赖氨酸,以增加缝合线周围的粘合力,提升模型梗死率,大大增强模型的一致性。此种方法较经 CCA 进栓的方法复杂,技术难度更大,需要分离并结扎 ECA 及甲状腺上动脉,尤其是 ECA 近心端残端需要留出足够长的长度,有利于后续插线栓及拔线栓的操作。

2.1.2 经 CCA 进栓

1992 年, Csiba 等^[11]在 8-0 号手术缝线末端固定一个球形栓,经大鼠 CCA 和 ICA 引入 MCA,从而将 MCA 闭塞,然后通过拉动血管外手术线将球形栓拔出,实现再灌注。然而,无涂层尼龙丝制作缺血性卒中模型的成功率 < 60%,后有研究者在该模型制作基础上将直径为 0.26 mm 的尼龙丝插入内径为 0.28 mm 的聚乙烯管中,管内填充熔化的石蜡,使尼龙丝头端包覆着石蜡,使其尖端钝化,表面光滑,减少了对血管内膜的损伤并增大了线栓插入与抽出的顺畅性,增大了造模成功率^[12]。2014 年, Chen 等^[13]在大鼠右侧颈总动脉(right common carotid artery, RCCA)结扎位置与分叉之间剪出一个 V 形切口,并将一根 50 mm 长的尼龙线引入 ICA 管腔中,2 h 后拔栓实现再灌注,制作出大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。

2.1.3 该模型的特点

优点:(1)此模型不需开颅,且可重复性高;(2)可通过控制拔出线栓的时间,随意控制脑缺血及再灌注的时间;(3)可实现缺血后再灌注,特别适合用于再灌注损伤的研究。缺点:(1)该模型结扎及手术技术难度大,结扎不紧或脱落,会大出血导致死亡;在不可视的状态下,进栓长度过长,易造成蛛网膜下腔出血,死亡率较高;而进栓长度不足,不能成功制作脑缺血模型;(2)当阻断血管达到 120 min 或更长时间时,会影响下丘脑的供血,导致自发性高热,影响实验结果^[14]。常通过此模型研究局灶性脑

缺血性卒中的病理生理机制或通过药物干预研究药物对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

2.2 开颅闭塞缺血性卒中模型

该模型通过最直接的方式,钻开动物的相应颅骨部位,暴露 MCA 及其附近的区域,在直视状态下,采用不同的手法闭塞脑血管,建立短暂或永久性局灶性缺血性卒中模型。开颅闭塞法对血管的处理可细分为电凝法、夹闭法、结扎法、抬高阻断法及直接压迫法五类。

2.2.1 电凝法

Robinson 等^[15]首次提出了开颅电凝法并制备了开颅闭塞模型。1981 年, Tamura 等^[16]通过大鼠颞下颅骨切除,再电凝切断 MCA 近端,导致皮质和纹状体梗死,制作 MCA 的永久性闭塞模型。后续,有研究者改良了开颅电凝法,开颅暴露左大脑中动脉(left middle cerebral artery, LMCA),用微双极电凝和连续盐水灌洗进行闭塞,梗死率可达 100%,并建立了一套神经分级系统,可快速准确地评估脑缺血对神经功能的影响^[17]。现电凝法较少使用,此法对操作者技术要求较高,电凝操作不慎可直接导致大鼠死亡,在血管阻塞后无法实现再灌注的研究,同时可造成不必要的热损伤,影响实验结果^[18]。

2.2.2 夹闭法

采用颈部正中切口暴露大、小鼠双侧或单侧 CCA,并用外科结扎线结扎双侧或单侧 CCA,钻孔颅骨暴露 MCA,采用微唇动脉夹短暂或永久夹闭 MCA,后撤去动脉夹子,制作出局灶性缺血/再灌注模型^[19]。夹闭法的明显优势即可实现再灌注的同时操作较简单,对血管的损伤相对较小。

2.2.3 结扎法

在大鼠鳞骨上钻孔后切开硬脑膜,暴露 LMCA,显微镜下,精细分离血管后,用 prolene 缝线结扎 LMCA 远端,并将双侧 CCA 或左颈总动脉(left common carotid artery, LCCA)闭塞^[18]。结扎法虽对血管损伤较小,但精细分离血管技术要求较高。

2.2.4 抬高阻断法

颅骨切除术后暴露大鼠 MCA,借助不锈钢丝将动脉抬高大脑表面,阻断血流导致闭塞,维持 2 h 后撤去钢丝恢复血流再灌注,制作出短暂性局灶性脑缺血模型^[20]。此法是四类方法中对血管处理最简单的,最易操作,重复性较高,对血管损伤最小,但需要保证将血管抬高大脑表面后,血流是完全阻断的,并维持该状态。

2.2.5 直接压迫法

暴露出小鼠头骨的左侧侧面,并用高速微钻钻出小孔,暴露 M1 部分,将柔性光纤放置于 M1 顶叶分支分叉表面,使用微操作器手持 30 G 钝针直接压迫 MCA^[21]。此法虽较简单,但当闭塞阻断血管时间越长,利用手持法压迫血管的方法越显困难,重复性难保证。

2.2.6 开颅法卒中模型特点

优点:(1)与人类脑梗死病理相近;(2)直视状态下,可精确的阻断血管血流;(3)可控制梗死区域,梗死面积固定,重复性好,成功率较高;(4)开颅术可降低颅内压,减轻脑水肿^[22]。缺点:(1)手术难度较大,需在手术显微镜下操作;(2)手术也可能导致颅内感染、脑脊液漏、大脑皮质扩散性凹陷及炎症等多种并发症。(3)开颅术打开硬脑膜后颅内压及温度都会发生变化,从而影响实验过程的病理生理^[22]。

2.3 栓子栓塞卒中模型

栓子栓塞卒中模型的栓子来源可为由粘性硅酮、胶原蛋白、二氧化钛和可伸缩银球形成的微球或大球非血栓性栓子;由动物自体或异体血液形成以及由凝血酶直接注射到 ICA 及 MCA 以诱导而成的血栓性栓子^[23]。

2.3.1 血栓栓塞模型

1982 年, Kudo 等^[24]最先制备出血栓栓塞模型,该模型也称作“非选择性”血栓栓塞模型。通过大鼠自体心脏穿刺取 0.1 mL 血液,体外室温保存 2 h 凝结形成血块,暴露 LCCA、左颈内动脉(left internal carotid artery, LICA)及 ECA,暂时夹闭 ECA 及 CCA,并将血栓栓子与生理盐水混合后轻柔缓慢地注入 CCA 内,随后撤去动脉夹及缝线后恢复再灌注。同时实验还得出,血液中栓子的数量和大小从 0.1 mL 到 0.2 mL 似乎最适合成年大鼠^[24]。采用自体血栓,更接近于人类卒中栓塞真实情况。后续, Dinapoli 等^[25]通过微导管将血栓栓子直接运送到 MCA,从而提高了大鼠 MCA 血栓放置的精准度,降低了栓塞位置的不确定性(栓子可能进入翼颌动脉及大脑前动脉等分支动脉),改良后所需的血栓数量少,栓塞成功率高,同时早期再通率高。2007 年, Orset 等^[26]与开颅术相结合,开颅暴露小鼠 MCA,利用移液管向 MCA 中注射 α -凝血酶,10 min 后形成原位血栓,20 min 后再经尾静脉注射组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA)实现再

灌注。后续的研究者在之前的模型基础上加以改进,在不开颅的情况下,利用导管将凝血酶或凝血酶经 ECA 精确运送至 MCA,形成稳定的血栓,此改进创伤小同时缩短了手术时间,具有低变异性和低死亡率^[27]。以及将磁性纳米颗粒与凝血酶相交联,运用磁铁定位功能,将凝血酶精准运送至颈动脉,交联体积聚在颈动脉中并诱导血栓形成,同时该模型对溶栓药物具有出色的反应^[28]。将磁性纳米颗粒与凝血酶相交联,大大降低了血栓被血流冲散的可能,也大大降低了多发与异位血栓的形成。

血栓栓塞模型的优点:(1)无需行开颅手术,创伤小;(2)其栓塞的机制与人类的血栓栓塞的病理生理机制相似;(3)更适用于测试溶栓剂,探索溶栓后的病理生理过程,以及评估接受溶栓治疗的缺血病变^[23]。缺点:(1)未与磁性纳米颗粒相交联形成的血栓性栓子易自溶,同时易被血流冲散,异位性及变异性强;(2)未加入纤维蛋白原的凝血酶所诱导形成的凝块栓子成分与人类自发性形成的血栓栓子大不相同,可能会影响病理生理过程^[26]。

2.3.2 非血栓性球形栓子栓塞模型

非血栓性栓子栓塞中,微球诱导的微栓子栓塞的研究较广泛,在手术缝线的末端固定了一个由牙蜡或苯乙烯制作的球形栓,经大鼠 CCA-ICA 由血流引入 MCA,从而将 MCA 闭塞,然后通过拉动血管外的细线将球形栓拔出,实现再灌注^[11]。人类栓塞多由人类自体的血栓引起,会激活内源性 t-PA,有自发性再灌注,而非血栓性栓子的特点为不可溶,会导致永久性缺血,背离了现实,所以非血栓栓子并不能更好地模拟人类栓塞的情况^[26]。

2.4 光化学卒中模型

光化学卒中模型是在大鼠身上开发的,在不开颅情况下,在颅骨的特定区域给予光敏染料,光照后染料被激活产生高活性单线态氧产物,并破坏血管内皮细胞膜的成分,随后血小板聚集和血栓形成,在给定的皮质区域内诱导永久性局灶性的缺血性损伤^[29]。

1977 年,由 Rosenblum 等^[30]首次提出这种方法。1985 年, Watson 等^[31]制作出该缺血模型,并为后续该模型的制作奠定了基础。选体重 290~370 g 之间的雄性 Wistar 大鼠切开头皮,暴露头骨,并经尾静脉注射光敏染料(孟加拉玫瑰红染料溶液),后将大鼠置于弧光灯照射系统装置上,使头部对准光束聚集处,用光源波长为 560 nm 的绿光照射暴露颅

骨左侧的顶骨中心处 20 min, 形成缺血灶。该模型允许缺血病变在大脑皮层的任何位置。1995 年, Wester 等^[32]改良了此模型, 采用环形激光照射大鼠暴露的颅骨, 引起血小板阻塞导致环形栓塞病灶, 该环形病灶可能与临床血栓栓塞性卒中半暗带的演变有关, 可用于对空间定义区域的重复性研究。2005 年, Maxwell 等^[33]利用不透明的电工胶带制作出不同形状的模具, 模具可明确勾勒出所需要研究的脑皮质区域, 可用来探索皮质层内不同形状的特定功能区域。Sigler 等^[34]及 Kuroiwa 等^[35]又进一步改进研究设备, 利用二极管泵浦激光对准单个表面微动脉进行定向光活化, 使得作用的区域更精准; 以及改用冷光光纤照射特定区域来制作模型, 与激光光源相比, 冷光光纤更容易操作, 成本更低。后续, 在大鼠无麻醉的情况下监控其情况, 可实时分析急性脑卒中病程中许多相关的重要参数^[36]。

此模型的优点: (1) 死亡率小, 可重复性高; (2) 耗时少, 成本低; (3) 所需外科手术技术知识少, 微创无需开颅术, 操作简单; (4) 梗死面积小, 边界清晰, 有助于研究缺血或完整皮质区域内的细胞反应; (5) 梗死范围精确, 有益于对特定细胞的特征或功能进行研究; (6) 也特别适用于评估大脑损伤后的皮质可塑性及修复机制^[29]。缺点: (1) 缺乏侧支血流, 无缺血再灌注, 对急性脑卒中过程中缺血再灌注损伤的研究有一定限制。(2) 人类急性卒中是细胞毒性水肿, 此模型是细胞毒性水肿和血管性水肿几乎同时发生, 与人类急性卒中情况相比存在差异。(3) 其中缺血机制是否是由血小板活化引起, 尚未可知。

2.5 ET-1 诱导缺血性卒中模型

ET-1 作为血管收缩肽, 直接作用于 MCA、颈动脉及脑组织表面的特定区域或注射入脑实质中诱发血管收缩, 导致缺血性卒中, 随着 ET-1 在血流中被冲刷, 浓度变小, 又恢复血流灌注, 从而建立短暂性缺血性卒中模型^[37]。

1993 年, MacRae 等^[38]首次提及此方法, 即大鼠行颞下颅骨切除术, 并依次切开硬脑膜、蛛网膜及软脑膜, 暴露 LMCA, 放置套管后, 将大鼠置于立体固定框架中, ET-1 注射在其外膜附近, 并将清除电极的双侧植入腹外侧纹状体, 计算其血流量, 结果提示 ET-1 在注射区域可诱导脑血管收缩并呈剂量依赖性的低灌注效果, 能够在体内诱导可逆性脑血管闭塞。后续, Moyanova 等^[39]改进了该模型, 使得

侵入性减小, 只需头皮背侧切开, 简单开颅术后并对导向套管进行立体定位, 将 ET-1 植入至 LMCA 背侧 1 mm 的梨状皮层中。2001 年, Biernaskie 等^[40]实验得出在注射 ET-1 后 16 ~ 22 h 脑血流量 (cerebral blood flow, CBF) 仍在下降, 表明再灌注是逐渐的, 而在大多数 MCA 闭塞模型中出现的是快速再灌注, 此模型更接近于发生在人类卒中的 CBF 持续减少和逐渐再灌注的情况。

该模型的优点: (1) 损伤小, 操作相对简单; (2) 该模型可在动物清醒状态下完成脑缺血的步骤制作, 可动态观察其引起的组织学损伤和神经功能缺损的程度, 适用于研究药物对脑缺血性卒中的神经保护作用; (3) 可通过控制注射的浓度, 改变缺血时长及严重程度, 操作较简便; (4) 该模型呈逐渐性再灌注, 更接近人类卒中的真实情况。缺点: (1) 脑梗死体积变异性高; (2) 难以精确控制自发性再灌注, 使得血管闭塞时间有限, 可重复性差^[40]; (3) 缺血发展缓慢, 产生水肿较轻微, 无法准确模拟人类急性缺血性卒中情况。(4) 应用 ET-1 可诱导星形胶质细胞的增殖, 为增强轴突发芽创造有利环境, 但可能会干扰卒中后的恢复机制^[41]。

2.6 氯化铁 (ferric chloride, FeCl₃) 诱导缺血性卒中模型

该模型是将在 FeCl₃ 溶液中浸泡的滤纸直接放置于暴露的 MCA 或 CCA 上诱发血栓形成, 建立脑缺血卒中模型。

2011 年, Karatas 等^[42]第一次提出用 FeCl₃ 诱导大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 制作脑缺血模型。切开大鼠头皮, 暴露颞弓和鳞骨交界处头骨, 用高速钻头钻开该位置头骨并显露硬脑膜及 MCA 的痕迹, 用浸润在 10% FeCl₃ 溶液中的滤纸紧密接触并覆盖之上, 17 min 即可诱导局部血栓形成, 制作出 MCA 完全闭塞的脑卒中模型。后续, 有研究者改用 20% FeCl₃ 溶液, 4 min 后可使 MCA 全闭塞^[43]。Syera 等^[44]还增加卒中后 14 d 大鼠运动功能行为评分 (网格行走试验及圆柱实验), 结果未观察到严重的运动行为障碍。现也有较多研究者采用 FeCl₃ 溶液制作缺血性卒中模型并探索缺血性卒中病理生理及其药物治疗等相关重要问题。关于适宜的浓度, 梁辰等^[45]将 20%、35%、50% 及 75% 四组浓度的 FeCl₃ 溶液制作的慢性缺血性卒中模型进行比较, 结果表明中浓度 (35% 及 50%) FeCl₃ 溶液能形成较好的慢性缺血性卒中模型。

此模型的优点:(1)方法相对简单,成本低,侵入性较小;(2)适用于了解溶栓治疗后血管再通和相关组织灌注变化的活体成像,在显微镜下可直接研究溶栓。缺点:(1)该方法的动物模型只出现了轻微和短暂的运动行为缺陷,即 FeCl_3 诱导的缺血性卒中模型不适合将运动行为的功能恢复作为卒中预后的研究^[42-44];(2)需要通过溶栓才能实现再灌注,且溶栓成功率不高,不适用于需要可靠再灌注的神经保护剂疗效的研究。

2.7 自发性缺血性卒中模型

该模型旨在模拟人类真实世界里脑卒中的主要病因,即高血压病。现分为脑卒中易发性自发性高血压大鼠(stroke-prone spontaneously hypertensive rats, SPSHR)及脑卒中易发性肾血管性高血压大鼠(stroke-prone renovascular hypertensive rats, RHRSP)两类。

2.7.1 SPSHR 大鼠

1969 年, Louis 等^[46]开发了一种自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR), 该种大鼠类似于人类原发性高血压。像遗传性高血压一样, SHR 是由血压有一定程度升高的大鼠之间近亲繁殖产生的,而后代的血压明显高于它们双亲。即给予出生 6 周的 Wistar 大鼠高盐饮食,并逐渐形成高血压病,持续 6 周后,大鼠已形成恶性高血压病,又从中挑选出年轻大鼠进行交配,再对子代鼠互配,通过对其观察,保留因脑卒中而死亡的大鼠的子代鼠,并在交配 10 代后,脑梗死率高达 90%,即为 SPSHR 大鼠。该大鼠卒中发病机制与人类病理机制相同,最后形成小血管性动脉粥样硬化,逐渐形成皮下层下梗死灶,形成腔隙性脑梗死,同时 SPSHR 被认为是目前为止可模拟人类腔隙性脑卒中最好的动物模型^[47]。常用于研究高血压病卒中及其血管的病理生理机制。

2.7.2 RHRSP 大鼠

1998 年, Zeng 等^[48]提出并建立了 RHRSP 模型,采用环状银夹夹住雄性 SD 大鼠的双侧收缩肾动脉后,制作了无遗传缺陷的易发生卒中的肾血管性高血压大鼠模型,6 个月后大鼠的血压可达至 200~240 mmHg,肾动脉收缩后 40 周内自发性卒中的发生率为 56.4%。2007 年, Liu 等^[49]通过将 RHRSP 大鼠进行 3 d 冷处理来诱导自发性脑卒中,大大缩短了模型制作的时间。该模型也能较好地模拟人类高血压病引起的易发性脑卒中情况,并常用于一

些药物功能疗效的评估。

2.7.3 模型的特点

优点:(1)易于建立,不需要精细的手术流程,相对简单,成本低廉;(2)高血压发病率最高可达 100%;(3)该模型的发病病理生理学机制与人类高血压病相似;(4)特别适合用于高血压疾病及动脉硬化的病理研究。缺点:(1)模型制作时间长;(2)卒中类型多变,发生时间及部位不定^[22,24]。

3 大鼠线栓法模型制作注意事项

(1)对于大鼠的体重与周龄,范围在 6~9 周或 200~350 g 的雄性 SD 大鼠被认为是制作线栓法缺血性卒中模型合适的选择^[4]。现国内常选用 250~300 g (7~8 周)大鼠,而国外常选用 280~320 g (7.5~8 周)成年雄性 SD 大鼠,两者除选用的体重在不同的小范围内波动的差异外,大鼠的解剖及生理均无明显差异。

(2)一般选用硅胶头线栓可提高造模成功率,线栓的选择一定要与鼠的体重相符,如体重为 240~269 g 的大鼠,则选用的线栓线体直径可为 0.26 mm,线栓的硅胶线头直径为 (0.40 ± 0.02) mm;若体重为 270~300 g 的大鼠,则需用的线栓线体直径可为 0.26 mm,而线栓的硅胶线头直径为 (0.43 ± 0.02) mm。

(3)对于线栓滞留的时间,10 min 内不出现脑梗死,1 h 则梗死范围固定,滞留时间越长,死亡率越高,一般采用 120 min 的滞留时间。

(4)对于麻醉剂的选择也比较重要,因为一些麻醉剂可能具有神经保护作用,或是有血管扩张的作用,如异氟醚。一般选用浓度为 3% 戊巴比妥钠麻醉药腹腔注射,价格低廉、原料易得。剂量一般为 0.15 mL/100 g,对于个别大鼠耐受情况,可按 0.2 mL/100 g 剂量给予,若手术途中大鼠趋于清醒(大小便失禁或有吞咽舔舌等动作),可加量 0.1 mL 左右,尤其是从 ECA 进线栓入 ICA,在不结扎同侧 CCA 及缝合皮肤的情况下行再灌注拔栓时,大鼠可能会苏醒,可在进线栓后即刻再加量 0.1 mL 麻醉药,保证在拔栓或缝合时大鼠处于麻醉状态,否则难以操作使死亡率上升。注意补麻药不要过量,避免因呼吸衰竭死亡。腹腔注射时可采用手持大鼠的传统注射方式,也可将大鼠置于自制的塑料锥型筒内,剪去顶部的一部分,留出可供大鼠呼吸的通道,当大鼠用力向上蹿动时,塑料锥筒可将大鼠紧

紧卡住,注射器针头对准大鼠生殖器左或右侧 45°斜上方 1 cm 处,注意是否回抽无血,勿损伤大鼠膀胱等其它腹腔器官。也有建议采用机械通气下吸入式麻醉,可更好地控制参数,同时可降低死亡率^[50]。

(5)当从 ECA 路径入线栓时,注意需要将甲状腺上动脉结扎,否则不易操作的同时还易导致出血模糊手术视野,尽量选用较细的 6-0 号手术缝线结扎,避免因缝线太粗打结滑脱,有条件可以使用电凝器电凝闭塞。

(6)在手术部位用剃毛刀剃须,对皮肤有微磨损,若清理擦拭不净,残留毛发碎片,则增加了炎症感染概率,影响卒中的病理生理机制。推荐使用无毒无味,成分安全的医用褪毛剂,注意尽量擦拭清除手术区域的毛发。

(7)若插线栓失败,其主要原因可能是插入至翼颞动脉中,此时可将线栓后退出少许,重新调整方向(线栓退出时可能会有少许出血),将线栓前端朝向内上方,此时可以垫高大鼠颈部位置,使操作视野更大,血管暴露更充分,易于插栓,同时线栓线体凹面朝上,可提高进栓成功率。

(8)暴露和分离 CCA 和 ECA 时,应避免损伤附近的气管和迷走神经,这可能会增加梗死面积,降低存活率^[7]。

(9)在术中也可将大鼠的舌头向外拉出口腔并置于牙齿的一侧,避免麻醉状态大鼠的舌体后坠导致窒息而发生死亡。

(10)保持鼠的体温是至关重要的,可以利用反馈控制的加热垫使大鼠核心温度维持正常,可实时监测大鼠肛温是否在(37±0.5)℃正常范围内^[27]。当拔栓缝皮后放于笼中,也可以将大块纱布或木屑覆盖于大鼠身上,尽量维持其正常体温。

(11)关于降低人为因素的误差,需要操作者可靠的诱发缺血性病变所需的手术技能,同时为减少由不同操作者所带来的技术误差,尽可能让熟练掌握该手术技术的操作人员独立完成模型的制作。

4 小结与展望

制作局灶性缺血性卒中动物模型的方法有多种,各有优缺点,而实验的成功与否,与实验中的动物品种、实验室温度、空气湿度、麻醉药种类、剂量及实验员技术熟练程度等多种因素均有关联。例如实验动物的年龄,年龄越大的动物其神经功能恢

复的能力越差,也会直接导致实验的成功率大大降低,而无法进行后续实验,为保证实验结果的重复性,则在实验中一般选用青壮年健康动物,这与现实世界中的大龄共病患者情况不相符,在此基础上,实验结果本身就可能出现了偏差;对于实验动物的性别,雌性动物的卵巢激素对神经有保护作用,有利于神经功能的恢复,但一般实验多数会选择雄性动物,这会使得动物实验结果与临床试验的结果出现偏差;对于实验动物的体温,一些研究者可能对于动物体温的管控并不严格,未引起重视,但体温对梗死范围是有影响的,低温会降低梗死面积,高温则会增加梗死面积^[7]。

眼观局灶性缺血性卒中动物模型仍在不断地改进创新并不断地完善,但同时也需要总结及重视一些可能被忽略的部分内容。即使动物模型可以极大程度上模拟人类卒中的情况,但不同地域、不同民族之间的卒中亚型分布存在差异,可能一种模型所带入的实验研究结果并不能代表所有的情况。同时大多数研究者对动物模型与现实存在误解,在现实世界人类卒中后,多数会发生长期性自发性再灌注,而在短暂闭塞或压迫血管的动物模型中,即刻的再灌注是模拟脑血管手术或介入性血栓切除术后的情况,与自发性再灌注的病理生理有一定的差异。以及由《2019 年中国脑卒中统计》提示我国脑卒中逐渐年轻化,这对于动物缺血性卒中模型的建立会带来一定程度的影响^[1]。其中可能由于常选择青壮年动物制作缺血性卒中模型从而可缩小现实世界发病人类与模型动物之间的年龄差异;同时青中年卒中的病因与老年卒中病因不尽相同,青中年缺血性卒中的病因除了动脉粥样硬化之外,还包括炎症性和非炎症性脑血管病变、心脏疾病、脑静脉血栓形成以及药物滥用等多种复杂的原因,可能会导致传统造模方式对青中年卒中的病因诠释不完全或不准确,从而导致相对应的病理生理与之有差异。具体实际情况及影响有待进一步的实验研究。同时为顺应脑卒中年年轻化的趋势,造模时可尽量选用在适宜体重范围内同时又相对较轻的动物,例如适宜范围为 200~350 g 的大鼠可以选用 200~230 g 的雄性大鼠。

至今仍未找到可以完全模拟现实世界中人类缺血性卒中情况的动物模型,在现实世界中大多数患者还存在高血压病、糖尿病、肥胖、吸烟史及药物滥用等多种危险因素,同时随着时代的变迁,青中

年卒中增多,其危险因素复杂多样,甚至多重危险因素共存,在制作模型的同时可以考虑与这些危险因素或基础疾病相结合,更接近现实世界中的患病情况。

参考文献:

- [1] Wang YJ, Li ZX, Gu HQ, et al. China stroke statistics 2019: a report from the national center for healthcare quality management in neurological diseases, China national clinical research center for neurological diseases, the Chinese stroke association, national center for chronic and non-communicable disease control and prevention, Chinese center for disease control and prevention and institute for global neuroscience and stroke collaborations [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2020, 5(3): 211-239.
- [2] Zhang R, Bertelsen LB, Flø C, et al. Establishment and characterization of porcine focal cerebral ischemic model induced by endothelin-1 [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 635: 1-7.
- [3] Vasquez CA, Moen SL, Juliano MJ, et al. Development of a novel canine model of ischemic stroke: skull base approach with transient middle cerebral artery occlusion [J]. *World Neurosurg*, 2019, 127: e251-e260.
- [4] Li Y, Zhang J. Animal models of stroke [J]. *Animal Model Exp Med*, 2021, 4(3): 204-219.
- [5] Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, et al. Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats [J]. *Stroke*, 1993, 24(2): 286-292.
- [6] 杨赞章, 陈虹. 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型的改进与体会 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(9): 2189-2190.
- [7] Chiang T, Messing RO, Chou WH. Mouse model of middle cerebral artery occlusion [J]. *J Vis Exp*, 2011, 48: 2761.
- [8] 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]. *Nosocchu*, 1986, 8: 1-7.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] Belayev L, Alonso OF, Busto R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model [J]. *Stroke*, 1996, 27(9): 1616-1622.
- [11] Csiba L, Bereczki D, Shima T, et al. A modified model of reversible middle cerebral artery embolization in rats without craniectomy [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 1992, 114(1-2): 51-58.
- [12] Zuo XL, Wu P, Ji AM. Nylon filament coated with paraffin for intraluminal permanent middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 519(1): 42-46.
- [13] Chen L, Zhao Y, Zhang T, et al. Protective effect of Sheng-Nao-Kang decoction on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 228-236.
- [14] Gerriets T, Stolz E, Walberer M, et al. Complications and pitfalls in rat stroke models for middle cerebral artery occlusion: a comparison between the suture and the macrosphere model using magnetic resonance angiography [J]. *Stroke*, 2004, 35(10): 2372-2377.
- [15] Robinson RG, Shoemaker WJ, Schlumpf M, et al. Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour [J]. *Nature*, 1975, 255(5506): 332-334.
- [16] Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al. Focal cerebral ischaemia 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.
- [17] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [18] Shmonin A, Melnikova E, Galagudza M, et al. Characteristics of cerebral ischemia in major rat stroke models of middle cerebral artery ligation through craniectomy [J]. *Int J Stroke*, 2014, 9(6): 793-801.
- [19] Ejaz S, Williamson DJ, Ahmed T, et al. Characterizing infarction and selective neuronal loss following temporary focal cerebral ischemia in the rat: a multi-modality imaging study [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 51: 120-132.
- [20] 孙伟, 樊海艇, 唐小杭, 等. 开颅法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的改良研究 [J]. *神经解剖学杂志*, 2016, 32(5): 591-596.
- [21] Morancho A, García-Bonilla L, Barceló V, et al. A new method for focal transient cerebral ischaemia by distal compression of the middle cerebral artery [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2012, 38(6): 617-627.
- [22] 何学令, 尹海林. 脑缺血动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(4): 248-252.
- [23] Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007, 87(1): 179-197.
- [24] Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, et al. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats [J]. *Stroke*, 1982, 13(4): 505-508.
- [25] 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.
- [26] Orset C, Macrez R, Young AR, et al. Mouse model of *in situ* thromboembolic stroke and reperfusion [J]. *Stroke*, 2007, 38(10): 2771-2778.
- [27] Chen Y, Zhu W, Zhang W, et al. A novel mouse model of thromboembolic stroke [J]. *J Neurosci Methods*, 2015, 256: 203-211.
- [28] Li H, Yang Z, Tang Q, et al. Embolic stroke model with magnetic nanoparticles [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021,

- 13(37): 43993-44001.
- [29] Labat-Gest V, Tomasi S. Photothrombotic ischemia; a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies [J]. *J Vis Exp*, 2013(76): 50370.
- [30] Rosenblum WI, El-Sabban F. Platelet aggregation in the cerebral microcirculation; effect of aspirin and other agents [J]. *Circ Res*, 1977, 40(3): 320-328.
- [31] Watson BD, Dietrich WD, Busto R, et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis [J]. *Ann Neurol*, 1985, 17(5): 497-504.
- [32] Wester P, Watson BD, Prado R, et al. A photothrombotic "ring" model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion [J]. *Stroke*, 1995, 26(3): 444-450.
- [33] Maxwell KA, Dyck RH. Induction of reproducible focal ischemic lesions in neonatal mice by photothrombosis [J]. *Dev Neurosci*, 2005, 27(2-4): 121-126.
- [34] Sigler A, Goroshkov A, Murphy TH. Hardware and methodology for targeting single brain arterioles for photothrombotic stroke on an upright microscope [J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 170(1): 35-44.
- [35] Kuroiwa T, Xi G, Hua Y, et al. Development of a rat model of photothrombotic ischemia and infarction within the caudoputamen [J]. *Stroke*, 2009, 40(1): 248-253.
- [36] Lu H, Li Y, Yuan L, et al. Induction and imaging of photothrombotic stroke in conscious and freely moving rats [J]. *J Biomed Opt*, 2014, 19(9): 96013.
- [37] Reid JL, Dawson D, MacRae IM. Endothelin, cerebral ischaemia and infarction [J]. *Clin Exp Hypertens*, 1995, 17(1-2): 399-407.
- [38] MacRae IM, Robinson MJ, Graham DI, et al. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow; dose dependency, time course, and neuropathological consequences [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1993, 13(2): 276-284.
- [39] Moyanova S, Kortenska L, Kirov R, et al. Quantitative electroencephalographic changes due to middle cerebral artery occlusion by endothelin 1 in conscious rats [J]. *Arch Physiol Biochem*, 1998, 106(5): 384-391.
- [40] Biernaskie J, Corbett D, Peeling J, et al. A serial MR study of cerebral blood flow changes and lesion development following endothelin-1-induced ischemia in rats [J]. *Magn Reson Med*, 2001, 46(4): 827-830.
- [41] Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose [J]. *NeuroRx*, 2005, 2(3): 396-409.
- [42] Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, et al. Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl₃ (3) application; a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(6): 1452-1460.
- [43] Le Behot A, Gauberti M, Martinez De Lizarrondo S, et al. GpIIb/IIIa-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice [J]. *Blood*, 2014, 123(21): 3354-3363.
- [44] Syeara N, Alamri FF, Jayaraman S, et al. Motor deficit in the mouse ferric chloride-induced distal middle cerebral artery occlusion model of stroke [J]. *Behav Brain Res*, 2020, 380: 112418.
- [45] 梁辰, 陈本宏, 王福文. FeCl₃ 诱导大鼠颈总动脉血栓制备慢性脑缺血模型的探索 [J]. *生命科学研究*, 2017, 21(1): 46-50.
- [46] Louis WJ, Tabei R, Sjoerdsma A, et al. Inheritance of high blood-pressure in the spontaneously hypertensive rat [J]. *Lancet*, 1969, 1(7604): 1035-1036.
- [47] Hainsworth AH, Markus HS. Do *in vivo* experimental models reflect human cerebral small vessel disease? A systematic review [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(12): 1877-1891.
- [48] Zeng J, Huang R, Su Z. Stroke-prone renovascular hypertensive rats [J]. *Chin Med J (Engl)*, 1998, 111(8): 741-744.
- [49] Liu CL, Liao SJ, Zeng JS, et al. DI-3n-butylphthalide prevents stroke via improvement of cerebral microvessels in RHRSP [J]. *J Neurol Sci*, 2007, 260(1-2): 106-113.
- [50] Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R. Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia; mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions [J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2002, 9(2): 112-121.

[收稿日期]2022-05-18