

食蟹猴缺血再灌注模型的建立及依达拉奉干预作用

潘梦鲜^{1,2}, 黄晓姣^{1,2}, 黄中理^{1,2}, 申果^{1,2}, 张鹏飞^{1,2}, 曾勇^{1,2}, 李文峰³, 周华波⁴, 韦祝梅^{1,2}

(1. 广西桂科院华仁济瀛生物科技有限公司, 南宁 530000; 2. 广西科学院医学与健康研究院, 南宁 530000; 3. 广西盛思蓝生物医药技术有限公司, 南宁 530000; 4. 南宁市华波宠物医院, 南宁 530000)

[摘要] 目的 建立食蟹猴大脑中动脉缺血再灌注模型, 并分析依达拉奉干预的疗效。**方法** 将15只成年雄性食蟹猴随机分为3组, 分别为假手术组 (Sham, $n=3$)、缺血再灌注模型组 (Model, $n=6$) 和依达拉奉治疗组 (Edaravone, $n=6$)。采用左侧大脑动脉M1段夹闭1h再灌注的方法建立成年食蟹猴大脑中动脉缺血再灌注模型, 再灌注2h后Edaravone组动物静脉注射0.5 mg/kg依达拉奉进行干预治疗, Sham组和Model组动物静脉注射等体积的生理盐水, 第2天至第7天, 每天2次。对食蟹猴进行行为学录像、临床表现观察以及神经功能缺损评分, 并对其脑水肿体积及脑梗死体积进行统计分析。**结果** 与Sham组相比, Model组食蟹猴均出现明显的缺血性脑卒中疾病典型症状, Model组在术后神经功能缺损评分显著升高 ($P < 0.01$), 脑组织水肿体积显著增大 ($P < 0.01$), 脑组织梗死体积显著增大 ($P < 0.01$)。与Model组相比, Edaravone治疗后神经功能评分降低 ($P < 0.05$), 脑组织水肿体积显著减小 ($P < 0.05$), 脑组织梗死体积显著减小 ($P < 0.05$)。**结论** 成功建立了食蟹猴大脑中动脉缺血再灌注模型, 证实依达拉奉可以缓解食蟹猴大脑中动脉缺血再灌注引起的损伤。

[关键词] 食蟹猴; 缺血性脑卒中; 缺血再灌注; 依达拉奉

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0136-09



Establishment of Ischemia-Reperfusion Model in Cynomolgus Macaques and Effects of Edaravone Intervention

PAN Mengxian^{1,2}, HUANG Xiaojiao^{1,2}, HUANG Zhongli^{1,2}, SHEN Guo^{1,2}, ZHANG Pengfei^{1,2}, ZENG Yong^{1,2}, LI Wenfeng³, ZHOU Huabo⁴, WEI Zhumei^{1,2}

(1. Guangxi Gui Academy of Science Huaren Jiyang Biotechnology Co., LTD., Nanning 530000, China; 2. Institute of Medicine and Health, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530000, China; 3. Guangxi Thinxon Biomedical Technology Co., LTD., Nanning 530000, China; 4. Nanning Huabo Pet Hospital, Nanning 530000, China)

Correspondence to: WEI Zhumei (ORCID: 0000-0002-1846-7501), E-mail: weizhumei@hrmtgroup.com

[ABSTRACT] Objective To establish an ischemia-reperfusion model in cynomolgus macaques and to analyse the effects of edaravone intervention. **Methods** A total of fifteen adult male cynomolgus macaques were randomly divided into three groups: sham operation (Sham group, $n=3$), ischemia-reperfusion model (Model group, $n=6$) and edaravone treatment (Edaravone group, $n=6$). Ischemic-reperfusion model of cynomolgus macaques was established by clamping the M1 branch of the left cerebral artery for 1 h. After 2 h of reperfusion, the animals in Edaravone group were injected with 0.5 mg/kg edaravone intravenously for intervention treatment, while the animals in Sham and Model groups were injected with an equal volume of normal saline intravenously, twice a day, from the 2nd to 7th day. The behavioral video recordings, clinical observations and neurological deficit scores of cynomolgus macaques were obtained, and brain edema volume and cerebral ischemia volume were statistically analyzed. **Results** Compared with the Sham group, the animals in Model group showed typical symptoms of ischemic stroke, with a significant increase in the neurological deficit score, the volumes of edema and infarct of brain tissue (all $P < 0.01$). Compared with Model group, the neurological deficit score, the volumes of edema and infarct of brain tissue were significantly reduced in Edaravone group (all $P < 0.05$). **Conclusion** An animal model of ischemia-reperfusion in cynomolgus macaques was successfully established,

[第一作者] 潘梦鲜(1991—),女,硕士,从事动物疾病模型研究。E-mail: meng@hrmtgroup.com。ORCID:0000-0002-2363-532X

[通信作者] 韦祝梅(1978—),女,硕士,兽医师,主要从事非人灵长类动物疾病模型研究。E-mail: weizhumei@hrmtgroup.com。ORCID: 0000-0002-1846-7501

and edaravone was confirmed to alleviate the damage caused by ischemia-reperfusion.

[Key words] Cynomolgus macaques; Ischemic stroke; Ischemia-reperfusion; Edaravone

脑卒中又称中风, 具有致残率高、复发率高和病死率高等特点, 极大地危害人类健康^[1]。脑卒中是脑血管破裂或堵塞导致脑组织损伤的疾病, 分为出血性脑卒中和缺血性脑卒中, 其中脑缺血约占85%, 脑出血约占15%^[2]。脑缺血的治疗方法是通过对溶栓恢复大脑的血液供应, 然而快速再灌注会导致大脑区域进一步损伤, 这种情况被称为缺血再灌注损伤^[3]。缺血性脑卒中患者主要是单侧大脑中动脉闭塞引起运动障碍、感觉功能及语言功能障碍, 从而出现上下肢偏瘫、面瘫、言语不清的现象, 这些症状的轻重程度与病灶区的位置及大小相关^[4]。

动物模型是研究疾病机制和评价药物作用的重要方法, 在生物医学研究中发挥着核心作用。临床前动物模型对开发新的治疗方法以及阐明脑卒中期间和脑卒中后脑损伤及其修复的分子机制具有重要作用^[5-6]。啮齿类动物脑缺血再灌注的造模方法主要有开颅法、线栓法和栓塞法。啮齿类动物费用较少且易于饲养, 建模方便, 容易护理, 病理检测已相当成熟, 发病机制的研究也较为深入。现实中很多神经保护药物在啮齿类实验动物疾病模型中具有很好的保护作用, 但在临床前试验中却没有得到预期的保护作用。这可能是由于啮齿类动物的脑组织形态结构、生理功能及代谢与人类存在较大差异, 临床转化率通常低于10%。非人灵长类动物具有与人类相似的大脑解剖结构、脑回结构及相似的神经运动功能, 可以更好地反映缺血性脑卒中的临床症状和病理情况, 是探索人类治疗方法的理想模型^[7-8]。卒中治疗专业学术圆桌会议(Stroke Treatment Academic Industry Roundtable, STAIR)推荐使用非人灵长类实验动物作为临床前研究动物。研究表明, 啮齿类动物的缺血性脑卒中与人存在显著差异, 这些差异包括脑卒中的病理特征、急性缺血性损伤后炎症和分子途径的变化; 而非人灵长类动物的缺血性脑卒中模型与人类更相似^[9], 因此成熟的非人灵长类动物模型对于新药研究及人类脑卒中病理机制研究十分重要。

为了更好地模拟脑卒中患者, 大多数非人灵长类脑卒中模型是通过阻断大脑中动脉(middle cerebral artery occlusion, MCAO)构建的, 该方法可以实现良好的重现性和术后存活率。目前, MCAO造模方法主要包括水平段(M1)闭塞和脑岛段(M2)闭塞, 其中M1段闭塞的病灶区体积更大, 神经功能缺失评分更

高, 更能体现脑卒中后的症状^[10]。有研究发现, 大脑中动脉M1段内的缺血区域具有侧支流动, 卒中初始核较小, 皮层和皮层下结构均有大量的半暗带^[11], 有利于缺血性脑卒中发病机制的研究及新治疗方法的探索。

依达拉奉是一种抗氧化保护剂, 可以通过清除羟自由基、过氧自由基和超氧自由基, 缓解脑水肿, 抑制迟发性神经元死亡, 从而改善脑缺血引起的脑卒中^[12]。依达拉奉注射液于2001年在日本首次被批准用于治疗急性缺血性脑卒中患者, 现在中国已广泛使用, 是目前治疗脑卒中患者的常用药物^[13]。依达拉奉注射液在非人灵长类动物缺血再灌注模型的治疗效果尚少有报告。本研究通过夹闭食蟹猴大脑中动脉M1段建立脑动脉缺血再灌注模型, 并通过静脉注射依达拉奉进行干预治疗, 然后用神经功能缺损评分评价临床神经缺损程度, 根据磁共振成像检查以及脑组织2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色检测缺血模型动物的水肿体积及脑梗死体积, 评估脑缺血病灶区大小, 探究依达拉奉注射液对食蟹猴缺血再灌注模型的治疗效果, 以及其可否作为临床前非人灵长类动物缺血再灌注模型新药研究的阳性对照药, 并为脑缺血再灌注损伤机制及以食蟹猴作为脑缺血再灌注模型动物用于药物治疗的深入研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级雄性食蟹猴15只, 8~12岁, 体质量6.0~9.0 kg, 来源于广西雄森灵长类实验动物养殖开发有限公司[SCXK(桂)2016-0003], 动物质量合格证号为0002880。所有食蟹猴均由兽医进行健康检查, 确保体格健康、摄食正常、运动功能正常。动物食用全价猴-维持颗粒饲料, 自由饮水; 普通环境适应性饲养及操作训练14 d, 温度为(22±4)℃, 相对湿度为40%~70%, 12 h/12 h昼夜交替。动物实验在广西盛思蓝生物医药技术有限公司实验设施[SYXK(桂)2020-0008]中进行, 并通过广西盛思蓝生物医药技术有限公司实验动物福利与伦理委员会审查(IACUC编号: 006-SSLI2020)。

1.2 主要仪器及试剂

磁共振扫描仪为荷兰Philips公司产品(型号

Ingenia 3.0 T); 大动物麻醉机为北京众实迪创科技发展有限公司产品 (ZS-MW); 监护仪为深圳迈瑞器械有限公司产品 (PM-9000)。依达拉奉注射液购自南京先声东元制药有限公司; TTC 染色试剂购自美国 Sigma 公司; 曲马多注射液购自石药集团欧意药业有限公司; 酚磺乙胺注射液购自国药集团容生制药有限公司; 氨苄西林钠股购自山东鲁抗医药股份有限公司; 异氟烷购自江苏恒丰强生技术有限公司; 术眠灵 II 注射液购自南京农业大学小动物疾病研究室; 戊巴比妥钠购自国药集团化学试剂有限公司; 硫酸阿托品购自黑龙江省北安市飞龙动物药厂; 乳酸钠林格注射液购自安徽双鹤药业有限公司。

1.3 实验动物分组及给药方法

15 只食蟹猴随机分为假手术组 (Sham, $n=3$)、模型对照组 (Model, $n=6$) 和依达拉奉治疗组 (Edaravone, $n=6$)。Edaravone 组动物静脉滴注 0.5 mg/kg 依达拉奉, 给药质量浓度为 0.25 mg/mL, 10 min 滴注完毕; Sham 组和 Model 组动物静脉注射等体积的生理盐水 (即 0.9% NaCl 溶液)。缺血再灌注损伤后 2 h 第一次给药, 第 2~7 天, 每天 2 次, 共 6 d。

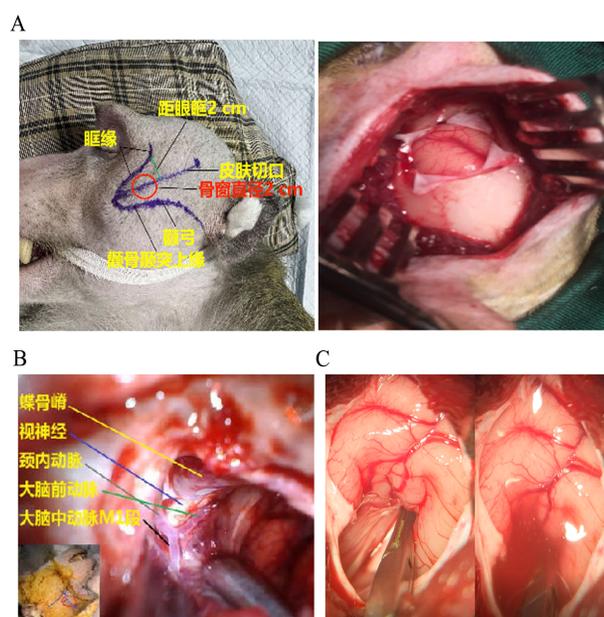
1.4 术前准备

动物实验前禁食不禁水 8~12 h, 麻醉前 15 min 给予硫酸阿托品注射液 (0.05 mg/kg), 肌肉注射 0.02 mL/kg 术眠灵 II 注射液进行诱导麻醉, 术野备皮, 开放静脉通道; 实施术前兽医基础用药, 即经肌肉注射氨苄西林钠 1 g/只、曲马多注射液 2.5 mg/kg、酚磺乙胺注射液 5 g/只, 气管插管后转移至手术台, 连接麻醉机使用异氟烷 (1%~2%) 气体维持麻醉, 心电监护, 静脉滴注乳酸钠林格注射液。体位摆放: 右侧卧位, 使颞骨体部位于术野最高点, 术者视线能垂直地沿蝶骨嵴到达前床突和鞍旁。用碘伏消毒术野 2 次, 铺好无菌手术创巾。

1.5 动物模型制作方法

采用手术方法, 建立食蟹猴左侧大脑中动脉 M1 段缺血再灌注损伤模型。自左侧眶缘后外侧 1 cm、颞骨颞突上缘处, 至左侧上颞线、眶缘后 2 cm 处, 切开头皮、皮下组织, 分离颞肌、筋膜、骨膜, 显露颅骨; 环绕蝶骨嵴外侧部切开颅骨 2 cm×2 cm, 以外侧裂为中心, “十”字形剪开硬脑膜, 显露额下回、颞上回和外侧裂, 用湿的脑棉片覆盖保护脑实质, 打开硬脑膜 (图 1A); 解剖脑池, 用脑压板轻柔牵开额叶和颞叶, 在显微镜下显露颈内动脉分叉部、大脑中动脉 M1 段 (MCA M1)、大脑前动脉水平段 (A1), 充分解剖暴露

MCA M1 起始端 (图 1B); 显微镜下再次确认后, 用无损伤血管钳夹闭 MCA M1 起始端, 确保完全夹闭血管, 计算开始时间, 可见 M1 段血管远心端较瘪且血液颜色变深 (图 1C)。用生理盐水浸润术野以避免脑组织干燥, 夹闭 1 h 后松开血管钳恢复血流, 缝合硬脑膜, 缝合肌肉和皮肤。Sham 组除不夹闭大脑中动脉 M1 段外, 其余操作同模型组一样。所有组动物进行术后特级护理, 包括消炎、止血、止痛、吸痰、保温、生命体征监护等。



注: A, 手术入路; B, 辨别大脑中动脉 M1 段 (MCA M1); C, MCA M1 夹闭后可见血管颜色变深。

Note: A, Surgical approach; B, Identify the middle cerebral artery M1 (MCA M1); C, After MCA M1 was clamped, blood vessels became darker.

图 1 食蟹猴左侧大脑中动脉 M1 段缺血再灌注损伤手术示意图
Figure 1 Surgical diagram of left M1-segment middle cerebral artery ischemia reperfusion injury in cynomolgus monkey

1.6 术后护理

术后 3 d 给予食蟹猴止痛药 (曲马多注射液, 2.5 mg/kg), 每天 2 次; 术后 5 d 给予消炎药 (氨苄西林钠, 1 g/只), 每天 2 次; 术后 2 d 给予止血药 (酚磺乙胺注射液, 5 g/只), 每天 1 次。观察发现动物流涎时, 使用电动吸引器清理口腔分泌物。每天将动物牵上猴椅, 用生理盐水清创, 然后碘伏消毒。若动物无法自主进食, 则需灌胃给予流食即牛奶+蛋白粉+米糊, 40~50 mL/只/次, 2 次/d; 同时, 静脉输入能量即肌酐+辅酶 A+Vb+ATP+Vc+KCl 2 mL+5% 葡萄糖溶液, 每天 1 次。

输液结束后, 使用50%硫酸镁对进针处行热敷治疗15 min, 保护动物四肢静脉。若动物出现偏瘫无法运动, 需每天给动物翻身并按摩以增加血液循环, 避免生疮。

1.7 神经功能评分

所有动物的神经功能活动视频采集分别于术前0天, 术后第1天、第3天、第5天、第7天进行, 根据录像中动物的行为学表现进行神经功能缺损评价 (neurological deficit score, NDS)。依据Zhu等^[14]的评价方法, 采取两人双盲评价。评价方法中含有四大类, 包括意识、骨骼肌协调性、感觉系统功能和运动系统功能, 满分为100, 各类别满分分别为28、18、22、32, 分数越高, 说明神经功能损害越严重, 详见表1。

1.8 磁共振成像检测

磁共振成像检查在广西医科大学琅东附属医院放射科进行。所有动物分别于术前0天、术后第3天、第7天进行磁共振检查, 共3次。肌内注射0.04 mL/kg 术眠灵麻醉动物后, 扫描序列有T1WI、T2WI、T2W FLAIR、DWI, 扫描结束后观察动物的苏醒情况, 以及动物的精神行为状况。用Weasis软件进行图像分析, 分别用T2W FLAIR和DWI序列分析水肿体积, 每层水肿体积为该层水肿面积和层厚的乘积, 各层的水肿体积之和为总的水肿体积。

1.9 TTC染色

在手术后的第8天, 静脉注射戊巴比妥钠(100 mg/kg)深度麻醉后实施安乐死; 取下大脑, -20℃速冻20 min后, 冠状方向切片, 每片脑组织的厚度为4 mm; 用2%的TTC, 37℃避光反应30 min, PBS清洗; 加入质量分数为4%的多聚甲醛固定液, 置于4℃冰箱中过夜, PBS清洗2次; 用扫描仪扫描组织片, 用Image J软件进行图像分析, 测量梗死面积, 每层梗死体积为该层梗死面积和层厚的乘积, 各层的梗死体积之和为总的梗死体积。

1.10 统计分析

使用SPSS 20.0软件进行数据分析, 使用GraphPad Prism 5.0软件作图。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组动物的临床观察及神经功能缺损评分

临床观察结果显示: Model组术后第3天死亡1只动物, 该组动物死亡率为16.7%; Sham组和Edaravone组无动物死亡, 死亡率为0。Sham组动物术后第1至第

2天精神状态较术前略差, 可自主进食, 术后第3至第7天逐渐恢复; Model组动物术后第1至第4天出现右侧上肢偏瘫无力、运动不协调、防御减退、轻微嗜睡, 食欲下降、无法自主进食、嘴角微偏左侧歪斜等现象, 术后第5至第7天动物可逐渐自主进食、坐立, 且精神状态逐渐恢复; Edaravone组动物术后第1天至第3天出现右侧肢体偏瘫无力、运动不协调、嘴歪斜、嗜睡、精神状态差、防御减退、食欲下降、无法自主进食等情况, 术后第4天至第7天逐渐可自主进食、坐立, 精神状态较好。

神经功能缺损评分显示: Sham组术后分值最高峰出现在第1天, 之后呈下降趋势, 术后第7天时神经功能基本恢复; 与Sham组比较, Model组术后第1、3、5、7天时评分差异显著 ($P < 0.01$), Edaravone组术后第1、3、5天时评分差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与Model组比较, Edaravone组术后第3天时评分具有显著性差异 ($P < 0.01$), 术后第5天和第7天时差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图2)。以上结果说明食蟹猴缺血再灌注后神经功能受到损伤, 而依达拉奉可以缓解神经功能损伤。

2.2 各组动物的脑缺血及水肿体积变化

磁共振成像扫描时间约30 min, 扫描结束后5~10 min动物苏醒 (有知觉, 可以动, 但无意识), 60~80 min动物可以自行坐立, 运动不协调, 有意识但情绪低落。磁共振成像的血管源性水肿体积 (T2W FLAIR) 数据分析显示, 所有动物在手术前脑组织完好, 无异常信号, 无水肿; 术后Sham组动物存在轻微水肿, Model组和Edaravone组动物水肿体积随时间推移呈下降趋势。T2W FLAIR序列分析 (图3A和C) 显示: 与Sham组比较, Model组和Edaravone组在术后第3天和第7天时水肿体积明显增大 (Model组 $P < 0.01$, Edaravone组 $P < 0.05$); 与Model组比较, Edaravone组水肿体积明显减小 (术后第3天时 $P < 0.05$, 术后第7天时 $P < 0.01$)。DWI序列的分析结果与T2W FLAIR序列相似 (图3B和D)。以上结果提示食蟹猴缺血再灌注后脑水肿体积显著增大, 而依达拉奉可以缓解脑水肿。

2.3 各组动物的脑组织缺血梗死体积

脑组织发生缺血梗死后TTC染色可显示白色, 而正常的脑组织则是红色。各组食蟹猴脑组织进行TTC染色的结果 (图4) 显示, 与Sham组比较, Model组梗死体积显著增大 ($P < 0.01$), Edaravone组梗死体积增大 ($P < 0.05$); 与Model组比较, Edaravone组梗死体积

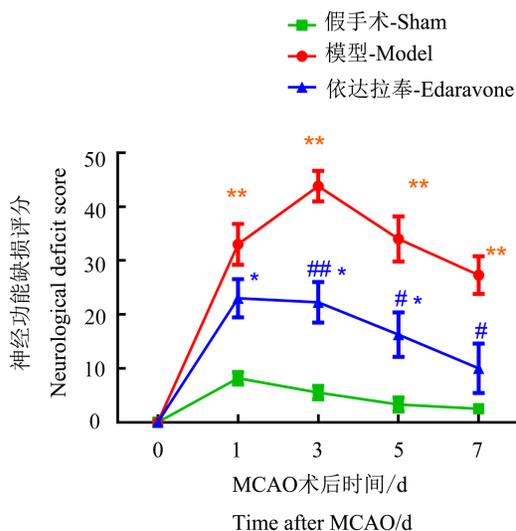
表1 食蟹猴脑卒中后神经功能缺损评分表

Table 1 Neurological deficit scoring for cynomolgus macaques after stroke

类别 Category	神经功能 Neurological function	分数 Score
意识 Consciousness	正常警觉性,有强的攻击性和逃离倾向	0
	有意识,但情绪稍低落,尚有较强的攻击性	2
	有意识,且有较弱的攻击性	4
	有意识,且有轻微反抗和明显逃离倾向	6
	有意识,但情绪低落,且不反抗	8
	昏昏欲睡,声音刺激能唤醒	10
	昏昏欲睡,声音刺激能睁眼	16
	昏迷,持续声音刺激能唤醒	20
	轻度昏迷,仅有反射运动	24
	深度昏迷,没有运动	28
骨骼肌肉协调 Skeletal muscle coordination	正常,行走正常	0
	总体运动协调性有轻微异常(共济失调发生为一过性间歇性)	2
	最小程度的共济失调,步态有轻微异常	4
	共济失调,但能攀登铁笼	6
	受到威逼刺激能够行走,攀爬困难	8
	本能的站立,行走几步就倒下	10
	坐着(不能站立),受到威逼刺激只能旋转身体	12
	坐着或趴着(不能站立或长时间保持坐姿),对威逼刺激有反应	14
	只能侧躺或仰面躺,对威逼刺激有反应	16
	没有活动,对威逼刺激几乎没有反应	18
感觉系统 Sensory system		L/R
面部反应 Facial sensation	面部对威逼刺激有明显的协调反应(攻击、威胁、躲避、示好等)	0/0
	面部对威逼刺激的协调反应性降低(攻击、威胁表情明显减少)	1/1
	面部对威逼刺激的协调反应性明显降低(示好表情明显减少)	2/2
	感觉缺失,接触刺激面部时任何部位都没有反应	3/3
耳颤反射 Pinna reflex	耳朵颤动能力正常	0/0
	动耳朵能力轻微降低,对声音刺激有动耳反应	1/1
	动耳朵能力明显降低,对声音刺激没有动耳反应	2/2
疼痛反射(下肢) Pain reflex (lower limb)	感觉缺失,接触刺激时不表现出耳朵颤动	3/3
	脚趾对接触刺激有完全、快速的收缩反应	0/0
	脚趾对接触刺激有较快速的收缩反应	1/1
	脚趾对接触刺激有较慢的收缩反应	2/2
	脚趾对接触刺激有弱的、慢的、不完全的、不协调的收缩反应	3/3
脚趾对接触刺激有极弱的、慢的收缩反应	4/4	
感觉缺失,脚趾对接触刺激没有收缩反应	5/5	
运动系统 Motor system		L/R
手 Hand	正常	0/0
	轻微运动障碍(速度稍慢、力量稍弱、准性稍差)	1/1
	力量/技巧减弱(运动障碍相对明显)	2/2
	较重度的运动障碍(速度很慢、力量很弱、准性很差)或不动	3/3
	麻痹/无运动能力	4/4
腿 Leg	正常	0/0
	轻微运动障碍(速度稍慢、力量稍弱、准性稍差)	1/1
	膝盖弯曲站立(运动障碍相对明显)	2/2
	较重度的运动障碍(速度很慢、力量很弱、准性很差)	3/3
	能动,但不能站立	4/4
	能动,不能站立,但几乎不动	5/5
麻痹/无运动能力	6/6	
手指 Finger	正常	0/0
	轻度痉挛和无力(表现为手指抓握时有翘指)	1/1
	中度痉挛和无力(表现为手指抓握时有持续翘指)	2/2
	明显痉挛和无力	3/3
脚趾 Toe	正常	0/0
	轻度痉挛和无力(表现为脚趾抓握时有翘趾)	1/1
	中度痉挛和无力(表现为脚趾抓握时有持续翘趾)	2/2
	明显痉挛和无力	3/3

注:L/R指该类别的评分以左侧与右侧分别评分,结果是左右侧评分的总和。

Note: L/R shows the scores on the left side and the right side respectively, and the results are the sum of the left and right side scores.



注: 15只食蟹猴随机分为假手术组 ($n=3$)、阻断大脑中动脉模型对照组 ($n=6$) 和依达拉奉治疗组 ($n=6$)。与假手术组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 与模型组比较, $^*P<0.05$, $^{##}P<0.01$ 。

Note: 15 cynomolgus monkeys were randomly divided into Sham group ($n=3$), middle cerebral artery occlusion (MCAO) Model group ($n=6$) and Edaravone treatment group ($n=6$). $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, compared with Sham group; $^*P<0.05$, $^{##}P<0.01$, compared with Model group.

图2 各组食蟹猴的神经功能缺损评分比较
Figure 2 Comparison of neurological deficits scores among the three groups of cynomolgus macaques

减少 ($P<0.05$)。以上结果说明食蟹猴缺血再灌注后脑组织梗死体积显著增大, 而依达拉奉可以缓解脑组织梗死。

3 讨论

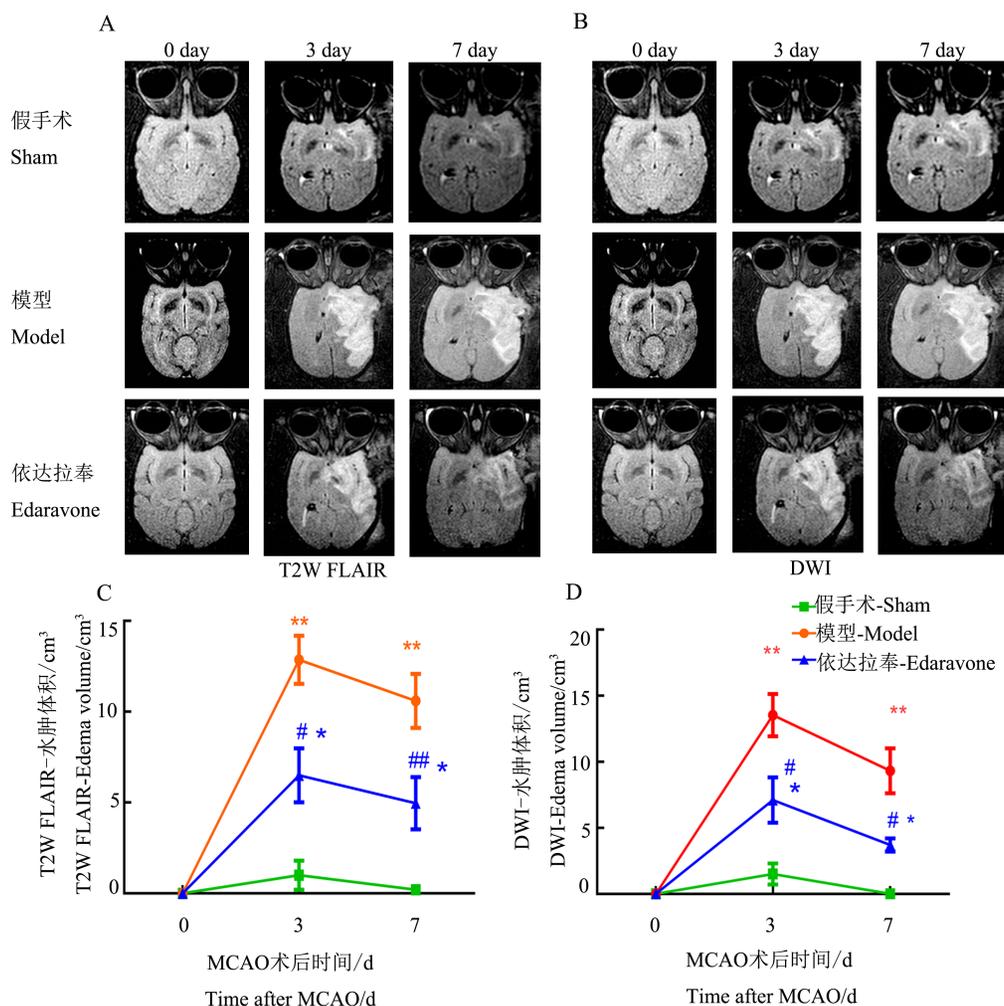
缺血性脑卒中引起人们死亡的主要原因之一, 也是成人残疾的主要原因。临床上大多数患者在发生脑卒中后 48 h 内会进行溶栓治疗, 存在一定程度的疏通后再灌注, 所以缺血再灌注模型可以更好地模拟临床病情发生。再灌注血流重建是目前针对缺血性脑卒中患者的一种标准临床治疗方法。尽管血流再灌注对缺血组织的挽救至关重要, 但再灌注也会加剧神经元损伤^[15]。啮齿类动物模型被广泛应用于脑缺血引起的运动功能影响及发病机制的研究, 然而由于该模型存在局限性, 不能较好地模拟人类脑卒中, 因此临床转化意义不大。例如研究表明, 啮齿类动物脑卒中模型与人类脑卒中存在大脑复杂程度及缺血性病理的差异, 导致啮齿类动物脑卒中神经保护剂对人类治疗效果不

显著^[16]。非人灵长类动物在遗传学、神经解剖学、生理学和免疫学方面都比啮齿类动物更接近人类, 其缺血性脑卒中模型更符合人脑缺血后的生理症状和变化^[17]。因此, 非人灵长类动物被认为是复制人类缺血性脑卒中各个方面的理想临床前模型。

大脑中动脉的解剖结构从前到后分为水平段 (M1)、脑岛段 (M2)、岛盖段 (M3)、终末段 (M4), 同时供血范围逐渐缩小, 因此夹闭部位越靠近大脑前动脉, 缺血体积就越大^[18]。有研究者认为, MCAO 模型夹闭 M1 段比夹闭 M2 段得到的脑卒中症状更重, 病灶区体积更大^[10]。灵长类动物 MCAO 模型 M1 段夹闭缺血 90~120 min 可以出现明显的脑卒中症状^[10, 19-20]。本研究前期发现, 采用 M1 段夹闭 90 min 后动物死亡率高, 而 M1 段夹闭缺血 60 min 后食蟹猴模型的死亡率低, 术后出现运动不协调、上下肢偏瘫、面瘫等 MCAO 模型的典型症状, 且神经功能缺损评分显著升高。本研究共有 15 只食蟹猴参与实验, Sham 组 3 只, Model 组和 Edaravone 组各 6 只, 既减少动物的数量, 又满足比较药效的统计学要求。整个实验过程中仅 Model 组死亡 1 只动物, 死亡率仅 6.7%, 得益于本研究细致的术后护理, 体现了动物伦理和福利。例如: 术后 3 d 内肌肉注射止痛药 2 次/d, 减少动物术后疼痛; 术后 5 d 内肌肉注射消炎药 2 次/d, 每天给动物进行清创处理 2 次, 减少动物术后感染; 不能自主进食的动物每天灌胃流食 2 次, 同时静脉输入营养液 1 次, 满足动物对能量的需求。

在小鼠 MCAO 模型中, 缺血再灌注 1 d 时缺血体积最大, 在灌注第 3 天、第 7 天时缺血体积略减少, 但无显著差异^[21]。猕猴 MCAO 模型缺血再灌注第 30 天时, 较第 3 天的脑梗死体积减少^[22]。使用右翼开颅术对猕猴进行 MCAO, 与 MCAO 术后 24 h 相比, MCAO 术后 28 d 的脑梗死病灶体积明显减小^[23]。本研究中磁共振成像数据分析显示, 食蟹猴在缺血再灌注第 3 天时的病灶区水肿体积较第 7 天大。以上文献及本研究结果显示, 在不同的动物模型中, 随着缺血再灌注时间的推移, 脑梗死体积会逐渐减小。本研究中 TTC 染色测量的脑梗死体积与磁共振成像的脑水肿体积具有一致性, 这一结果与之前研究报告相似^[24], 说明本研究成功构建了脑缺血再灌注食蟹猴模型。

依达拉奉注射液是当今治疗脑卒中患者的有效药物之一。目前对于依达拉奉注射液治疗脑卒中的作用



注：A和B为阻断大脑中动脉术前（0天）以及术后第3天、第7天的大脑磁共振成像扫描图（A为T2W FLAIR序列分析，B为DWI序列分析）；C和D分别为T2W FLAIR、DWI序列分析获得的脑水肿体积统计分析结果。15只食蟹猴随机分为假手术组（ $n=3$ ）、阻断大脑中动脉模型对照组（ $n=6$ ）和依达拉奉治疗组（ $n=6$ ）。与假手术组比较， $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ ；与模型对照组比较， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ 。

Note: A and B show MRI scans of brain before middle cerebral artery occlusion (MCAO) (day 0), after MCAO day 3 and day 7 (A was T2W FLAIR sequence, B was DWI sequence); C and D were statistical analysis of brain edema volume by T2W FLAIR and DWI sequence. 15 cynomolgus monkeys were randomly divided into Sham group ($n=3$), MCAO Model group ($n=6$) and Edaravone treatment group ($n=6$). $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, compared with sham group; $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, compared with model group.

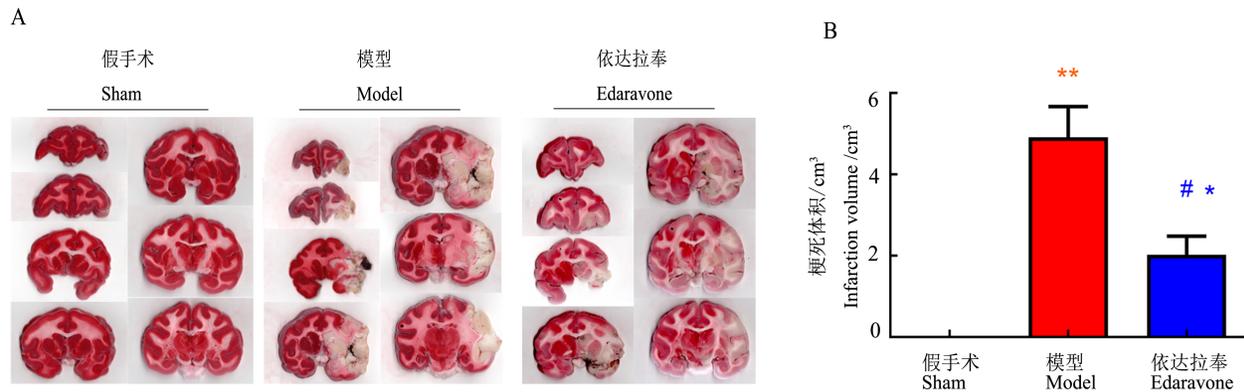
图3 各组食蟹猴的磁共振成像 T2W FLAIR 序列和 DWI 序列结果

Figure 3 Analysis of T2W FLAIR and DWI in each group of cynomolgus macaques

机制研究主要集中在啮齿类动物上^[25-28]，而非人灵长类的机制研究尚未有报告。本研究结果显示，在神经功能缺损评估中，与 Model 组动物比较，Edaravone 组动物的神经功能得到了很好的恢复；在磁共振成像评估中，Edaravone 组动物的脑水肿体积减少，在缺血再灌注后第3天和第7天时差异明显；在 TTC 染色评估中，Edaravone 组动物的脑梗死体积较 Model 组明显减少。以上结果显示依达拉奉注射液在食蟹猴 MCAO 模

型中具有神经保护作用，同时提示食蟹猴 MCAO 模型可以作为依达拉奉药物作用机制研究的理想模型，而且依达拉奉注射液可作为食蟹猴缺血再灌注模型新药研究的阳性对照药。

综上所述，本研究成功构建了食蟹猴脑缺血再灌注模型，证实了依达拉奉注射液在食蟹猴 MCAO 模型中具有神经保护作用，可作为作用机制相似的新药用非人灵长类实验动物进行药效研究的阳性对



注: A为2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色(每组一只动物的7张脑组织切片); B为各组脑组织梗死体积的统计结果。15只食蟹猴随机分为假手术组($n=3$)、阻断大脑中动脉模型对照组($n=6$)和依达拉奉治疗组($n=6$)。与假手术组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与模型对照组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: A shows 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining (seven pictures of brain tissue from one animal in each group); B shows statistical analysis of infarct volume in brain tissue. 15 cynomolgus monkeys were randomly divided into Sham group ($n=3$), middle cerebral artery occlusion (MCAO) Model group ($n=6$) and Edaravone treatment group ($n=6$). $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, compared with sham group, $^{\#}P < 0.05$, compared with Model group.

图4 各组食蟹猴脑组织缺血梗死体积比较

Figure 4 Comparison of brain ischemic infarcts volume tissue of cynomolgus macaques among the three groups

照药物。本研究为脑缺血再灌注的机制研究提供了新的动物模型,也为依达拉奉作用机制的深入研究提供了基础数据。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过广西盛思蓝生物医药技术有限公司实验动物福利与伦理委员会批准(IACUC编号:006-SSLI2020)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Animal Care and Use Committee in Guangxi Thinxon Biomedical Co., Ltd. (Approval Letter No. 006-SSLI2020), and all experimental protocols were carried out in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018).

[作者贡献 Author Contribution]

潘梦鲜负责文章的材料收集和整理,并结合实践进行文章撰写及后期修改;

黄晓姣和黄中理负责实验动物的造模、护理及检测;

申果负责文章摘要的翻译;

张鹏飞、曾勇负责全文的数据准确性确认,并提出修改建议;

李文峰提供实验设施,并给予经费支持;

周华波提供手术技术支持;

韦祝梅对全文内容提供指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] ROGER V L, GO A S, LLOYD-JONES D M, et al. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2011, 123(4): e18-e209. DOI: 10.1161/CIR.0b013e3182009701.
- [2] BENJAMIN E J, VIRANI S S, CALLAWAY C W, et al. Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2018, 137(12): e67-e492. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000558.
- [3] VONGSFAK J, PRATCHAYASAKUL W, APAIJAI N, et al. The alterations in mitochondrial dynamics following cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(9):1384. DOI: 10.3390/antiox10091384.
- [4] HOPE T M H, SEGHER M L, LEFF A P, et al. Predicting outcome and recovery after stroke with lesions extracted from MRI images[J]. *Neuroimage Clin*, 2013, 2:424-433. DOI: 10.1016/j.nicl.2013.03.005.
- [5] WEN Z, XU X, XU L, et al. Optimization of behavioural tests for the prediction of outcomes in mouse models of focal middle cerebral artery occlusion[J]. *Brain Res*, 2017, 1665:88-94. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.04.001.
- [6] BROWN A, WOODS S, SKINNER R, et al. Neurological assessment scores in rabbit embolic stroke models[J]. *Open Neurol J*, 2013, 7:38-43. DOI: 10.2174/1874205X01307010038.
- [7] COOK D J, TYMIANSKI M. Nonhuman primate models of stroke for translational neuroprotection research[J]. *Neurotherapeutics*, 2012, 9(2): 371-379. DOI: 10.1007/s13311-

- 012-0115-z.
- [8] HUTCHISON RM, EVERLING S. Monkey in the middle: why non-human primates are needed to bridge the gap in resting-state investigations[J]. *Front Neuroanat*, 2012, 6: 29. DOI: 10.3389/fnana.2012.00029.
- [9] KWIECIEN T D, SY C, DING Y C. Rodent models of ischemic stroke lack translational relevance... are baboon models the answer? [J]. *Neurol Res*, 2014, 36(5): 417-422. DOI: 10.1179/1743132814Y.0000000358.
- [10] ZHAO B, SHANG G W, CHEN J, et al. A more consistent intraluminal rhesus monkey model of ischemic stroke[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(23):2087-2094. DOI: 10.4103/1673-5374.147936.
- [11] ROITBERG B, KHAN N, TUCCAR E, et al. Chronic ischemic stroke model in cynomolgus monkeys: behavioral, neuroimaging and anatomical study[J]. *Neurol Res*, 2003, 25(1):68-78. DOI: 10.1179/016164103101200950.
- [12] LIU W P, WANG L L, LIU C W, et al. Edaravone ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by downregulating ferroptosis via the Nrf2/FPN pathway in rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2022, 45(9):1269-1275. DOI: 10.1248/bpb.b22-00186.
- [13] XU J, WANG A X, MENG X, et al. Edaravone dextran versus edaravone alone for the treatment of acute ischemic stroke: a phase III, randomized, double-blind, comparative trial[J]. *Stroke*, 2021, 52(3): 772-780. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.031197.
- [14] ZHU H, LI Q, FENG M, et al. A new cerebral hemorrhage model in cynomolgus macaques created by injection of autologous anticoagulated blood into the brain[J]. *J Clin Neurosci*, 2011, 18(7):955-960. DOI: 10.1016/j.jocn.2010.11.038.
- [15] WU M M, GU X P, MA Z L. Mitochondrial quality control in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(10):5253-5271. DOI: 10.1007/s12035-021-02494-8.
- [16] O'COLLINS V E, MACLEOD M R, DONNAN G A, et al. 1, 026 experimental treatments in acute stroke[J]. *Ann Neurol*, 2006, 59(3):467-477. DOI: 10.1002/ana.20741.
- [17] LIN X, WANG H, CHEN J Y, et al. Nonhuman primate models of ischemic stroke and neurological evaluation after stroke [J]. *J Neurosci Methods*, 2022, 376: 109611. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2022.109611.
- [18] CIMFLOVA P, ÖZLÜK E, KORKMAZER B, et al. Long-term safety and efficacy of distal aneurysm treatment with flow diversion in the M2 segment of the middle cerebral artery and beyond[J]. *J Neurointerv Surg*, 2021, 13(7): 631-636. DOI: 10.1136/neurintsurg-2020-016790.
- [19] SASAKI M, HONMOU O, RADTKE C, et al. Development of a middle cerebral artery occlusion model in the nonhuman primate and a safety study of i. v. infusion of human mesenchymal stem cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26577. DOI: 10.1371/journal.pone.0026577.
- [20] RAMIREZ-GARCIA G, HARRISON K A, FERNANDEZ-RUIZ J, et al. Stroke longitudinal volumetric measures correlate with the behavioral score in non-human primates[J]. *Neuroscience*, 2019, 397: 41-55. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.11.026.
- [21] LIU F D, SCHAFER D P, MCCULLOUGH L D. TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion[J]. *J Neurosci Methods*, 2009, 179(1):1-8. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.12.028.
- [22] MATSUURA S, EGI Y, YUKI S, et al. MP-124, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitor, ameliorates ischemic brain damage in a non-human primate model[J]. *Brain Res*, 2011, 1410:122-131. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.05.069.
- [23] MELONI B P, CHEN Y N, HARRISON K A, 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. DOI: 10.1007/s13311-019-00809-1.
- [24] LIU Y T, D'ARCEUIL H E, WESTMORELAND S, et al. Serial diffusion tensor MRI after transient and permanent cerebral ischemia in nonhuman Primates[J]. *Stroke*, 2007, 38(1): 138-145. DOI: 10.1161/01.STR.0000252127.07428.9c.
- [25] MA H F, ZHENG F, SU L J, et al. Metabolomic profiling of brain protective effect of edaravone on cerebral ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 814942. DOI: 10.3389/fphar.2022.814942.
- [26] WANG X X, WANG F, MAO G H, et al. NADPH is superior to NADH or edaravone in ameliorating metabolic disturbance and brain injury in ischemic stroke[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(3):529-540. DOI: 10.1038/s41401-021-00705-5.
- [27] YU H, WU Z D, WANG X Z, et al. Protective effects of combined treatment with mild hypothermia and edaravone against cerebral ischemia/reperfusion injury via oxidative stress and Nrf2 pathway regulation[J]. *Int J Oncol*, 2020, 57(2): 500-508. DOI: 10.3892/ijo.2020.5077.
- [28] ZHAO L Q, PARIKH A, XIONG Y X, et al. Neuroprotection of oral edaravone on middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(4):995-1006. DOI: 10.1007/s12640-022-00520-8.

(收稿日期:2022-10-28 修回日期:2023-02-10)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,任益凡)

[引用本文]

潘梦鲜, 黄晓姣, 黄中理, 等. 食蟹猴缺血再灌注模型的建立及依达拉奉干预作用[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(2): 136-144. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.165.

PAN M X, HUANG X J, HUANG Z L, et al. Establishment of ischemia-reperfusion model in cynomolgus macaques and effects of edaravone intervention[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(2): 136-144. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.165.