

陈秋燕,曹克刚,刘珍洪,等. 三种方式构建脑低灌注大鼠模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1093-1104.

CHEN Q Y, CAO K G, LIU Z H, et al. Comparative study of three methods for constructing rat models of cerebral hypoperfusion [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1093-1104.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.001

三种方式构建脑低灌注大鼠模型的比较研究

陈秋燕¹, 曹克刚², 刘珍洪², 高颖², 罗云^{1*}, 孙晓波^{1*}

(1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

【摘要】 目的 通过比较 3 种大鼠脑灌注不足模型的脑血流量、脑组织中神经细胞形态改变及血清氧化与炎症因子水平的变化, 为脑血管疾病及神经退行性疾病机制及治疗药物研究提供实验动物模型。**方法** 将 88 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组 ($n = 16$)、经典双侧颈总动脉结扎组 (经典 2-VO 组, $n = 24$)、改良 2-VO 组 ($n = 24$) 和线栓法组 ($n = 24$)。经典 2-VO 组行双侧颈总动脉结扎术, 改良 2-VO 组在结扎之前先从颈总动脉抽血 ($1 \text{ mL}/100 \text{ g}$), 线栓法组行大脑中动脉闭塞术。前 2 种模型的假手术组仅分离颈总动脉但不结扎, 线栓法模型的假手术组仅结扎颈总动脉近心端和颈外动脉, 但不插入栓线。术后 1、3 和 7 d 时检测 3 组大鼠的脑血流量、脑梗死体积、血清炎症因子水平、海马组织苏木素-伊红 (HE) 染色和超微结构。**结果** 激光散斑的结果显示: 改良 2-VO 组大鼠脑血流下降幅度较其他 2 组更明显。第 7 天时, 仅有改良 2-VO 组大鼠脑血流量相较于假手术组仍有显著性差异, 且仍处于低灌注状态 (与术前相比脑血流量下降 30%)。TTC 染色的结果显示: 随着造模时间延长, 3 组大鼠纹状体区域的白色梗死灶逐渐变大, 其中改良 2-VO 组大鼠有 4 只 (约 26.7%) 在皮层和纹状体都出现了白色梗死灶, 线栓法组有 10 只 (约 66.7%) 在患侧皮层和纹状体出现了白色梗死灶。ELISA 结果显示: 3 组模型大鼠造模后炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、hs-CRP 水平升高, 氧化因子 ROS 的水平升高, 抗氧化因子 SOD 水平下降。在术后第 7 天时, 经典 2-VO 组与线栓法组大鼠的 hs-CRP 与假手术组相比无显著性差异, 但改良 2-VO 组与假手术组相比上述所有指标仍有显著性差异。HE 染色的结果显示, 改良 2-VO 组相较于另 2 组能造成更严重的海马 CA1 和 CA3 区损伤。透射电镜的结果显示, 改良 2-VO 组相较于另 2 组能造成海马区细胞更严重的线粒体和内质网损伤。**结论** 成功构建脑低灌注大鼠模型, 相较于经典 2-VO 法和线栓法, 改良 2-VO 法能在相同的时间内造成更完全的脑低灌注和更严重的神经损伤, 更接近人类脑低灌注病理状态。

【关键词】 脑低灌注; 双侧颈总动脉结扎法; 线栓法; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1093-12

Comparative study of three methods for constructing rat models of cerebral hypoperfusion

CHEN Qiuyan¹, CAO Kegang², LIU Zhenhong², GAO Ying², LUO Yun^{1*}, SUN Xiaobo^{1*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; 2. Dongzhimen Hospital Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Corresponding author: LUO Yun. E-mail: ly20040423@126.com; SUN Xiaobo. E-mail: sun_xiaobo163@163.com

【Abstract】 Objective By comparing the changes in cerebral blood flow, neuronal morphology in brain tissue, and the levels of serum oxidation and inflammatory factors in models of cerebral hypoperfusion, three experimental rat models

【基金项目】 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项 (2022YFC3501105)。

Funded by National Key R&D Program of China (2022YFC3501105)。

【作者简介】 陈秋燕, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。Email: 1581451013@qq.com

【通信作者】 罗云, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理学。Email: ly20040423@126.com;

孙晓波, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药药理学。Email: sun_xiaobo163@163.com。

* 共同通信作者

were assessed for their suitability as subjects of studies on the mechanisms and therapeutic drugs of cerebrovascular diseases and neurodegenerative diseases. **Methods** A total of 88 male SD rats were randomly divided into a sham operation group ($n = 16$), classic bilateral common carotid artery occlusion group (classic 2-VO group, $n = 24$), modified 2-VO group ($n = 24$), and intraluminal thread technique group ($n = 24$). Bilateral common carotid artery ligation was performed on the classic 2-VO group, while blood was drawn from the common carotid artery before ligation in the modified 2-VO group (1 mL/100 g). Middle cerebral artery occlusion was performed on the intraluminal thread technique group. In the sham operation groups of the first two models, the common carotid artery was separated but not ligated, while the proximal end of the common carotid artery and the external carotid artery were ligated; in addition, the bolt thread was not inserted in the sham group of the intraluminal thread technique group. Cerebral blood flow, infarct volume, serum inflammatory factor levels, hematoxylin and eosin-stained morphology, and ultrastructure of the hippocampal tissue were assessed at 1, 3, and 7 days after the operations. **Results** Laser speckle interferometry showed a decrease in cerebral blood flow of the modified 2-VO group that was more obvious than that of the other two groups. On day 7, only the modified 2-VO group still had significant differences in cerebral blood flow compared with the sham group, and it remained in a state of hypoperfusion (cerebral blood flow decreased by 30% compared with that before the operation). TTC staining showed that infarcts in the striata of the three groups gradually increased with time after the operation; 4 rats (about 26.7%) in the modified 2-VO group and 10 rats (about 66.7%) in the intraluminal thread technique group had infarcts in both the cortex and striatum. ELISA showed that the levels of inflammatory factors, such as TNF- α , IL-1 β , and hs-CRP, in the three groups were increased after the operations, and levels of the pro-oxidation factor ROS were also increased. In contrast, levels of the antioxidant factor SOD decreased. On postoperative day 7, there was no significant difference in the hs-CRP of the classic 2-VO and intraluminal thread technique groups compared with that of the sham group. However, the modified 2-VO group still exhibited significant differences in all the above indicators compared with the sham group. Hematoxylin and eosin staining showed that the modified 2-VO group had more severe damage to the hippocampal CA1 and CA3 regions compared with the other groups. Transmission electron microscopy demonstrated that the modified 2-VO group showed more severe damage to the mitochondrial and endoplasmic reticulum in the hippocampal region compared with the other groups. **Conclusions** A cerebral hypoperfusion model was successfully established. Compared with the classic 2-VO and intraluminal thread techniques, the modified 2-VO method can induce more complete cerebral hypoperfusion and more severe neural damage within the same time frame, resembling the pathological state of human cerebral hypoperfusion more closely.

[Keywords] cerebral hypoperfusion; 2-vessel occlusion; intraluminal thread technique; animal models

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

缺血性卒中是严重危害国民健康的重大慢性非传染性疾病,具有高死亡率、高致残率、高发病率的特点^[1]。血管再通术可显著降低死亡率并改善患者的预后,但受限于严格的治疗时间窗,能够接受血管内治疗的患者人数极低(静脉溶栓率 5.64%,血管内治疗率 1.45%),超过 92%的缺血性卒中患者无法接受溶栓治疗^[2]。这类非溶栓患者在大血管急性闭塞后,供血区血流灌注量迅速下降,形成梗死核心,周围组织血流灌注量不满足神经细胞维持正常功能所需达到的生理阈值而处于休眠状态,称为缺血半暗带,也常被认为是卒中后处于低灌注状态的脑组织。若血流灌注不能及时恢复,这些处于低灌注的脑组织将逐渐发生不可逆的死亡,导致梗死面积进一步扩大,造成永久的神经功能缺损^[3]。脑低灌注引起的血流动力学障碍

使得附壁血栓选择性地进入分水岭区终末血管引起梗死,即低灌注性脑梗死^[4]。这是一种由于血流灌注不良引起的特殊类型的缺血性脑卒中。因此,改善低灌注区域的血流灌注及时挽救濒临死亡的脑组织是目前血管内治疗领域研究的热点之一。

动物模型一直是临床与基础研究工作紧密结合的重要工具,不同课题组需综合考虑建模周期、成模效率和实验成本等多方面因素,制备出最接近人类卒中后低灌注发病机制和经济且简单可行的动物模型。目前,国内外文献报道的脑低灌注动物模型以大鼠的双侧颈总动脉闭塞(bilateral common carotid artery occlusion, B CAO)、大脑中动脉部分闭塞(intraluminal thread technique, ITT)也称线栓法,和小鼠的双侧颈总动脉狭窄(bilateral common carotid artery stenosis, BCAS)模型为主^[5-6]。ITT 栓线进入

部位与留置时间对实验结果影响较大,稳定性较差^[7]。BCAS 会对血管内皮产生不利影响,且用到的弹簧微线圈大大增加了实验成本。大鼠 BCAA 模型仍是目前应用最广泛的脑低灌注模型,不仅是因为其相对更简便的操作和低成本,与小鼠和沙鼠相比,大鼠脑血管解剖结构与人类最为接近,具有完整的大脑动脉环(Willis 环),可以通过侧支循环提供不间断的血流。但这同时也是它的一个缺陷,BCAO 仅造成不完全性的脑缺血,与临床卒中后低灌注患者的病理特征不符。线栓法虽然相比 BCAA 更贴近临床患者局灶性低灌注的状态,但目前其应用仅停留在超急性期(24 h)^[6]。基于以上 2 种模型,本研究团队通过比较它们各自的优缺点,建立了一种新的脑低灌注模型(后称改良 2-VO 法),旨在建立一种制备方法简便、症状稳定且更接近临床特征的脑低灌注模型。

为此,研究人员比较了 3 种方法,并通过检测大鼠的脑血流量、血清炎症与氧化因子水平、脑梗死体积大小、苏木素-伊红(HE)染色结果和透射电镜下各细胞器的形态等指标对比了在双侧结扎的条件下降低大鼠血容量(即改良型 2-VO 法)和单纯仅结扎双侧颈总动脉(后称经典 2-VO 法)以及线栓法 3 种处理手段建立的脑低灌注实验动物模型,为今后脑低灌注的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

88 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 220 ~ 240 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。饲养在中国医学科学院药用植物研究所动物中心【SYXK(京)2023-0008】,动物实验设施持续保持屏障环境标准。主要环境指标的控制范围:室温 20 ~ 26 ℃,日温差 ≤ 4 ℃。相对湿度 40% ~ 70%。最小换气次数每小时 15 次,光照明:暗 = 12 h:12 h。饲养于标准盒内,每盒 5 只,其饲养空间符合中华人民共和国国家标准 GB14925-2010 中关于实验动物所需最小空间的规定。所有动物均由培训合格的人员进行饲养管理,整个饲养过程中保持动物饮食活动自由。本研究方案经中国医学科学院药用植物研究所实验动物伦理委员会审批通过后开展实验(SLXD-20230505012)。

1.1.2 主要试剂与仪器

肝素钠(上海源叶生物科技有限公司,货号:S12004-100 g);1%戊巴比妥钠(50 mg/kg);组织固定液(北京九州岛柏林生物科技有限公司,BLC-01);HE 染液套装(Servicebio,G1003);Gluta 固定液(北京索莱宝科技有限公司,#P1126);TTC 染液(Sigma,T8877-10G);肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 酶联免疫吸附测定试剂盒(北京华英生物技术研究所以, HY-H0019);白介素 1 β (IL-1 β) 酶联免疫吸附测定试剂盒(北京华英生物技术研究所以,H-H0001);C 反应蛋白(CRP)酶联免疫吸附测定试剂盒(北京华英生物技术研究所以, HY-I0024);超氧化物歧化酶(SOD)酶联免疫吸附测定试剂盒(北京华英生物技术研究所以, HY-M0001);活性氧(ROS)酶联免疫吸附测定试剂盒(北京华英生物技术研究所以, HYI-0087)。非吸收性外科缝合线(扬州源康医疗器械有限公司,型号:4-0);2 mL 注射器;尼龙栓线(北京西浓科技有限公司,1720-A2JC);体重秤(上海菁华科技仪器有限公司,YP2002N);激光散斑成像仪(英国 Moor Instruments, MoorFLPI-2);恒温培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司,ZXDP-A2080);脱水机(意大利 DIAPATH, Donatello);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,JB-P5);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,RM2016)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模

根据大鼠体重,随机将 88 只 SD 大鼠分为 4 组,即假手术组($n = 16$),经典 2-VO 组($n = 24$),改良 2-VO 组($n = 24$)和线栓法组($n = 24$)。具体操作如下:经典 2-VO 组:用戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠,逐层分离出双侧颈总动脉,使用 4-0 外科缝合线结扎颈总动脉后离断,消毒缝合。改良 2-VO 组:麻醉大鼠后首先静脉推注肝素钠溶液使大鼠全身肝素化。逐层分离出双侧颈总动脉,结扎颈总动脉近心端,再在距结扎处 2.5 cm 处用 1 根缝合线绕过远心端,打 1 活结。取 2 mL 注射器,从两结中间位置扎破血管,在血管内后抽血(100 g/mL)。止血,扎紧之前系好活结,为了防止缝合线脱落每次打 4 次结,然后用手术剪在两结之间剪断颈总动脉,另一侧颈总动脉操作同上,消毒缝合。线栓法组:分离大鼠右侧颈总动脉和颈外动脉,用微动脉夹夹闭颈总动脉,用双极电凝笔电凝颈外动脉的分支。游离颈外动脉主干,在距颈总动脉分叉 3 ~ 4 mm 处结

扎。微动脉夹暂时夹闭颈内动脉,眼科剪将颈外动脉剪 1 小口,插入直径 0.175 mm 的栓线,在颈外动脉剪口处打 1 松结以阻断颈内动脉的血液返流,去除颈内动脉的微动脉夹,轻推尼龙线进入颈内动脉,部分阻断大脑中动脉 (middle cerebral artery, MCA) 的开口,插入深度 18 ~ 22 mm。去除颈总动脉的微动脉夹,消毒后逐层缝合皮下组织和皮肤。另外,各造模方法的假手术组具体操作:经典 2-VO 组和改良 2-VO 组:仅分离颈总动脉但不结扎;线栓法组:除了不插入栓线外其他操作与模型组一致。

1.2.2 动物处理

为了全面探究 3 种造模方法对大鼠产生的影响,增加其应用价值,实验人员设置了 3 个时间点,

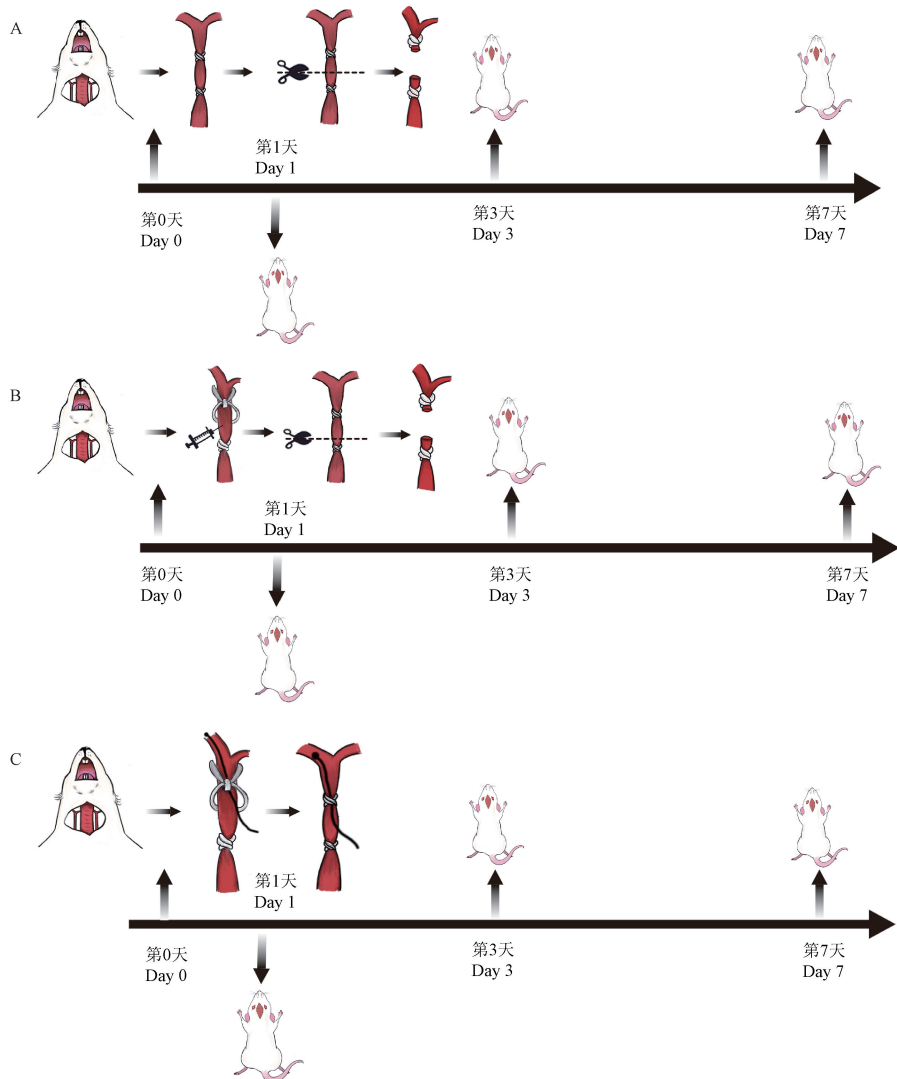
即术后 1、3、7 d,每个时间点取 9 只大鼠作为研究对象。实验模型构建示意图如图 1 所示。

1.2.3 激光散斑血流仪检测大鼠脑血流量

实验人员检测了 60 只大鼠的脑血流量。麻醉大鼠后,剪开顶部皮肤,清理干净残留毛发。再用扩胸器撑开大鼠头皮,将大鼠头部正对激光散斑血流仪摄像头下连续检测 3 min,大鼠脑血流量下降至缺血前 40% ~ 30% 以下视为缺血成功。

1.2.4 TTC 染色

大鼠测完脑血流后,腹主动脉取血后立即断头,将脑组织剥离后放冷冻至稍微硬化,除去小脑和脑干,再用刀片连续切 6 片 (每片约 2 mm),将脑片放入提前预热的 37 ℃ 2% TTC 溶液中避光孵育



注:A:经典 2-VO 组;B:改良 2-VO 组;C:线栓法组。

图 1 步态模型构建示意图

Note. A. Classic 2-VO group. B. Modified 2-VO group. C. Intraluminal thread technique (ITT) group.

Figure 1 Schematic diagram of gait model construction

15 min。孵育完成后将脑片在 4%多聚甲醛中固定过夜后,将脑片取出依次排列在白色滤纸上,拍照。

1.2.5 ELISA 法检测大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、hs-CRP、SOD 和 ROS 的表达

取得的血液样本($n = 88$)经 4℃ 3000 r/min 离心 15 min 后取上清液得到大鼠血清样品,按照 ELISA 试剂盒说明书对大鼠血清进行检测。

1.2.6 大鼠脑组织 HE 染色

每种模型取 12 只大鼠,腹主动脉取血后立即断头,取出脑组织经生理盐水灌注后在 4%组织固定液中固定过夜。随后依次进行 HE 染色,光学显微镜观察病理变化。

1.2.7 透射电镜检测大鼠海马组织超微结构

每种模型取 12 只大鼠,腹主动脉取血后立即处

死,将脑组织置于冰袋上,用镊子小心分离出海马组织,放置于 Gluta 电镜固定液中固定 2 h。然后迅速行透射电镜观察。

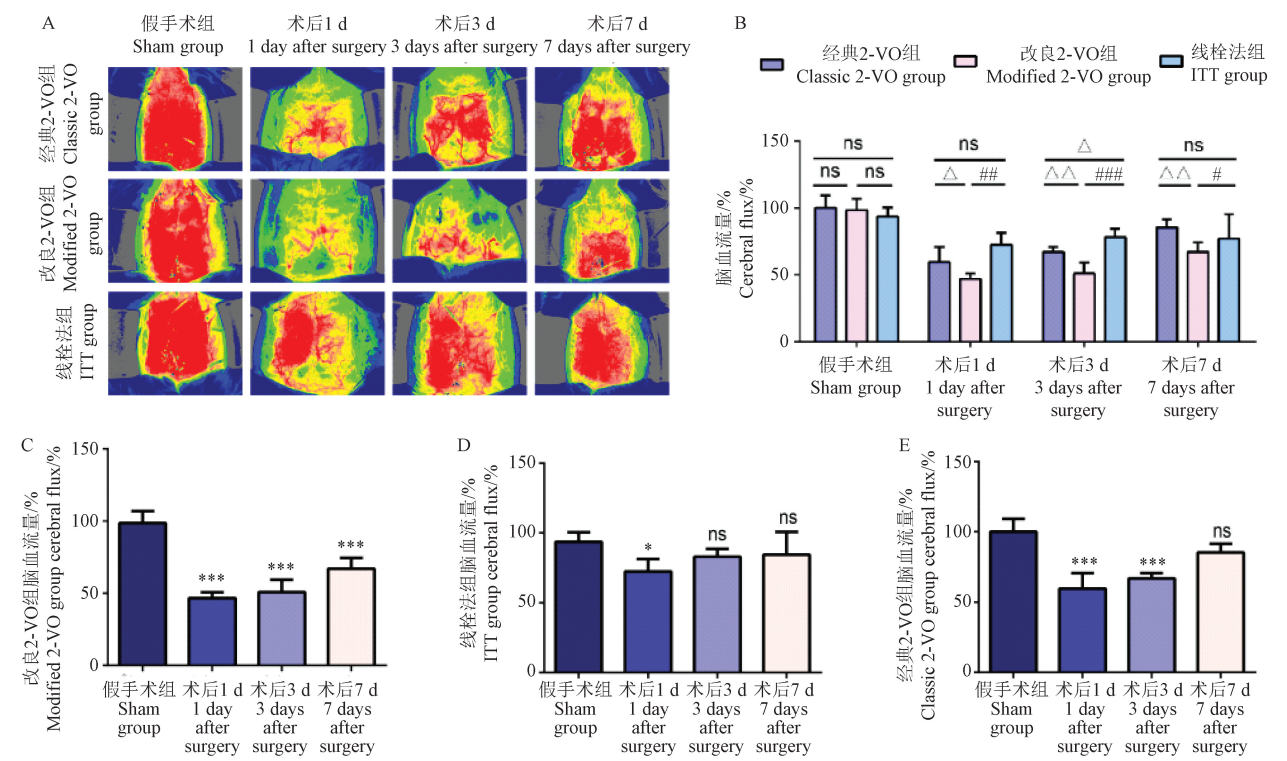
1.3 统计学分析

本实验数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,用 GraphPad Prism 6.02 软件进行统计学分析。确保数据呈正态分布的条件下,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脑血流变化情况

结果如图 2,研究团队采用激光散斑血流仪监测术后不同时间段大鼠脑血流量的变化,脑血流量



注:A:激光散斑检测术后不同时间点3种模型大鼠的脑血流量变化;B:3组大鼠在不同时间点的脑血流量变化对比;C:改良2-VO组大鼠术后不同时间点脑血流量变化;D:线栓法组大鼠术后不同时间点脑血流量变化;E:经典2-VO组大鼠术后不同时间点脑血流量变化。与假手术组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与改良2-VO组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;与经典2-VO组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。(下同)

图2 大鼠经三种造模方法造模后脑血流变化情况($n = 5$)

Note. A. Laser speckle was used to detect the changes of cerebral blood flow at different time points after operation. B. Changes of cerebral blood flow at different time points in the three groups. C. Changes of cerebral blood flow at different time points after operation in modified 2-VO group. D. Changes of cerebral blood flow at different time points after operation in the intraluminal thread technique group. E. Changes in cerebral blood flow at different time points after operation in rats of the classic 2-VO group. Compared with sham group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with modified 2-VO group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. Compared with classic 2-VO group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes of cerebral blood flow in rats after three methods of modeling($n = 5$)

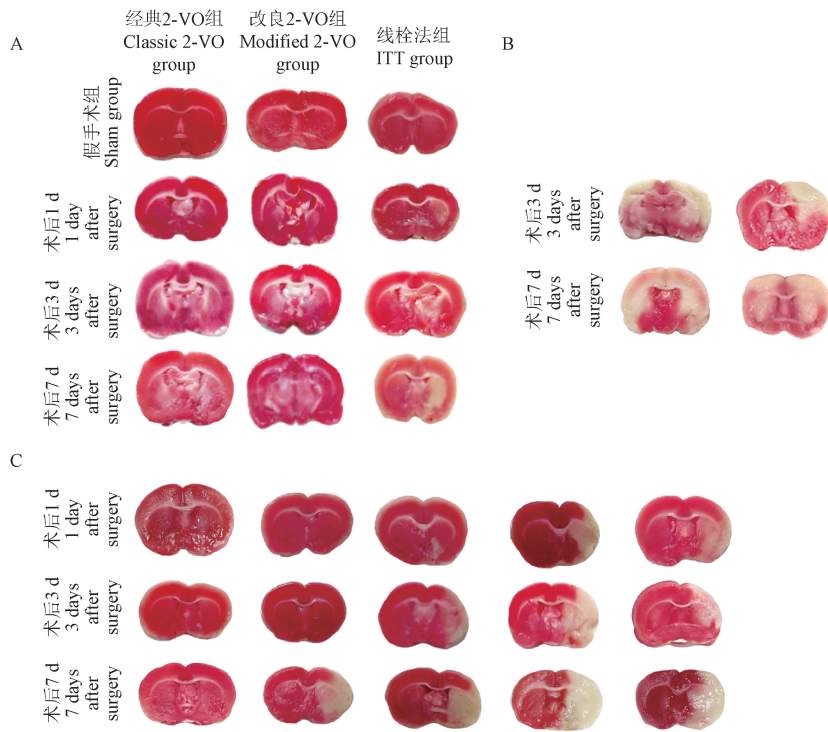
下降至缺血前 40% ~ 30%以下视为造模成功。

3 种模型的 Sham 组大鼠脑血流灌注充沛,未出现缺血情况。造模后,大鼠脑血流明显下降,其中改良 2-VO 组降幅最大。术后 1 d,该组脑血流仅为假手术组的 46.66%,明显低于其他 2 组。术后 3 d,经典 2-VO 组和改良 2-VO 组的脑血流分别上升至假手术组的 $66.98\% \pm 3.74\%$ 和 $50.75\% \pm 8.61\%$,线栓法组患侧脑血流量上升至健侧的 $78.12\% \pm 6.26\%$,此时前 2 组的脑血流量仍显著低于假手术组 ($P < 0.001$),线栓法组患侧与健侧之间的差值与假手术组相比无显著性差异。除此之外,改良 2-VO 组大鼠脑血流量显著低于另 2 组,经典 2-VO 组大鼠脑血流量虽然显著高于改良 2-VO 组,但相较于线栓法组来说仍具备一定优势。术后 7 d,经典 2-VO 组以及线栓法组与各自对照组相比脑血流均已无显著性差异,而改良 2-VO 组的脑血流量不仅仍显著低于假手术组 ($P < 0.001$),还低于另外 2 种模型大鼠的脑血流量,并且仍处于低灌注所定义的脑血流量范围 $67.10\% \pm 7.36\%$ 。

总之,术后 7 d 时,仅有改良 2-VO 组大鼠的脑血流量符合本研究对低灌注的定义,说明改良 2-VO 法可延长模型处于低灌注的时间,可用于较长给药周期的脑低灌注基础实验研究。

2.2 大鼠脑梗死体积情况

有研究指出一般情况下,不同于有栓子型的 ITT 模型,无栓子型的经典 2-VO 引起的不完全性脑缺血不易引起大脑皮层大面积梗死^[8]。在本研究中,经典 2-VO 组的大鼠在术后 3 d 和 7 d 时显示纹状体出现大小不等的白色梗死灶,这与文献结果相符,假手术组和经典 2-VO 组术后 1 d 时未显示明显染色异常(图 3A)。改良 2-VO 组和线栓法组均在术后 1 d 就出现纹状体梗死灶,并且梗死体积随着时间延长而增加。也就是说,与经典 2-VO 组相比,改良 2-VO 组与线栓法组能在更短的时间内形成梗死灶。除此之外,改良 2-VO 组还大约有 26.7% 的大鼠(4/15)分别在术后 3 d 和术后 7 d 在皮层和纹状体区域都出现了大面积的白色梗死灶(图 3B),而这一现象没有在经典 2-VO 组中观察到。



注:A:3 种造模方法不同时间点的脑组织 TTC 染色结果;B:改良 2-VO 组 4 只染色异常大鼠的 TTC 染色结果;C:线栓法组 15 只大鼠 TTC 染色情况,其中有 10 只大鼠在皮层和纹状体出现了大小不等的梗死灶。

图 3 TTC 染色检测 3 种方法不同时间点大鼠脑缺血情况

Note. A. TTC staining results of brain tissue at different time points of the three methods. B. TTC staining results of four rats with abnormal staining in the modified 2-VO group. C. TTC staining was performed in 15 rats in ITT group, and 10 of them showed infarcts of different sizes in cortex and striatum.

Figure 3 TTC staining was used to detect cerebral ischemia at different time points of the three methods

相较于前 2 个模型,线栓法组大鼠更易发生患侧皮层和纹状体区域都出现大面积白色梗死灶的现象(10/15),且梗死体积大小与造模时间呈正相关,见图 3C。研究人员推测这可能与 2 种因素有关:(1)栓线反复进出的过程会损伤血管内皮细胞,影响血管内膜完整性,诱发血栓形成完全堵塞血管;(2)与阻断的供血血管有关:大脑中动脉是颈内动脉的最大分支,承担大脑半球 80%的血供,阻塞大脑中动脉会导致包括纹状体和皮质在内的大量梗死^[9]。

TTC 染色结果表明:相较于经典 2-VO 组引起的相对温和的脑血流量下降,改良 2-VO 组引起的脑血流量下降幅度更大。线栓组不同于前面 2 组,线栓插入的深浅以及大鼠的血管内径对实验结果影响较大,且线栓的插入过深可导致脑血流急剧下降,这个结果往往是无法通过大鼠自身代偿来抵抗的,因此该模型相较于前 2 个模型来说稳定性较差。

2.3 3 组大鼠血清炎症及氧化因子的表达

如表 1 所示,线栓法组 TNF-α、IL-1β、hs-CRP

及 ROS 水平均随着造模时间延长先升后降,SOD 则是先降后升,术后 3 d 为转折点。术后 7 d 时,hs-CRP 下降至 3.06 ± 0.67 mg/L,与假手术组的差异无显著性。

改良 2-VO 组与经典 2-VO 组的变化规律较为相似,均表现为随着造模时间延长,促炎因子 TNF-α、IL-1β、hs-CRP 和氧化因子 ROS 水平逐渐下降,抗氧化因子 SOD 含量逐渐上升。但是,经典 2-VO 组 hs-CRP 水平在第 3 天时与对照组相比差异无显著性,术后 7 d 时含量进一步下降。而改良 2-VO 组各项指标在术后 7 d 时与对照组的差异仍具有显著性。

3 种造模方法均可引起大鼠的炎症和氧化应激反应,其中改良 2-VO 法能稳定地、持久地使大鼠的血清细胞因子保持在一个病理状态。

2.4 大鼠海马组织病理变化

通过 HE 染色评价 2 种造模方法在不同时间点对大鼠海马组织 CA1 区和 CA3 区的神经细胞形态的改变。如图 4 所示,3 种方法的假手术组海马神

表 1 不同时间点 3 组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、hs-CRP、SOD 和 ROS 含量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of serum levels of TNF-α, IL-1β, hs-CRP, SOD and ROS among three groups at different time points($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	TNF-α/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	hs-CRP/(mg/L)	SOD/(U/mL)	ROS(MFI/mL)
经典 2-VO 假手术组 Classic 2-VO Sham group	28.57 ± 3.21	15.68 ± 1.70	2.90 ± 0.58	78.24 ± 10.67	147.38 ± 6.77
改良 2-VO 假手术组 Modified 2-VO Sham group	25.02 ± 4.01	14.10 ± 0.85	2.49 ± 0.12	85.37 ± 3.91	133.49 ± 5.45
线栓法假手术组 ITT Sham group	24.30 ± 3.48	13.72 ± 0.43	2.34 ± 0.20	89.26 ± 1.82	87.24 ± 17.84
经典 2-VO 组术后 1 d Classic 2-VO group 1 day after surgery	52.20 ± 4.04 **	31.45 ± 1.41 ***	4.59 ± 0.76 *	67.62 ± 7.00 *	282.45 ± 20.86 ***
经典 2-VO 组术后 3 d Classic 2-VO group 3 days after surgery	48.31 ± 0.29 ***	30.75 ± 0.87 ***	3.88 ± 0.48	72.11 ± 4.87 *	277.89 ± 22.43 ***
经典 2-VO 组术后 7 d Classic 2-VO group 7 days after surgery	45.03 ± 4.02 **	30.08 ± 2.63 **	3.45 ± 0.88	78.78 ± 0.74 **	270.12 ± 11.09 ***
改良 2-VO 组术后 1 d Modified 2-VO group 1 day after surgery	36.65 ± 2.46 **	25.67 ± 2.69 ***	4.00 ± 0.84 *	60.68 ± 0.64 ***	234.29 ± 6.79 ***
改良 2-VO 组术后 3 d Modified 2-VO group 3 days after surgery	35.28 ± 3.58 **	24.38 ± 8.69 *	3.80 ± 0.87 *	64.86 ± 4.62 ***	206.09 ± 4.62 ***
改良 2-VO 组术后 7 d Modified 2-VO group 7 days after surgery	34.73 ± 8.82 *	22.58 ± 4.67 *	3.58 ± 0.48 **	71.21 ± 7.24 *	198.98 ± 33.10 *
线栓法组术后 1 d ITT group 1 day after surgery	36.57 ± 10.98 *	23.33 ± 6.41 *	2.87 ± 0.49 *	81.28 ± 4.87 *	248.54 ± 33.34 **
线栓法组术后 3 d ITT group 3 days after surgery	53.60 ± 9.47 **	27.64 ± 1.51 ***	4.27 ± 0.20 ***	66.76 ± 6.27 **	275.54 ± 45.01 **
线栓法组术后 7 d ITT group 7 days after surgery	43.28 ± 12.28 *	22.08 ± 6.29 *	3.06 ± 0.67	69.09 ± 8.69 **	224.80 ± 60.87 **

注:与假手术组相比, ** P < 0.01。
Note. Compared with sham group, ** P < 0.01.

神经元数量丰富、形态规则、排列整齐密集、胞核大而圆、呈均匀淡蓝色或蓝色、核仁清楚。

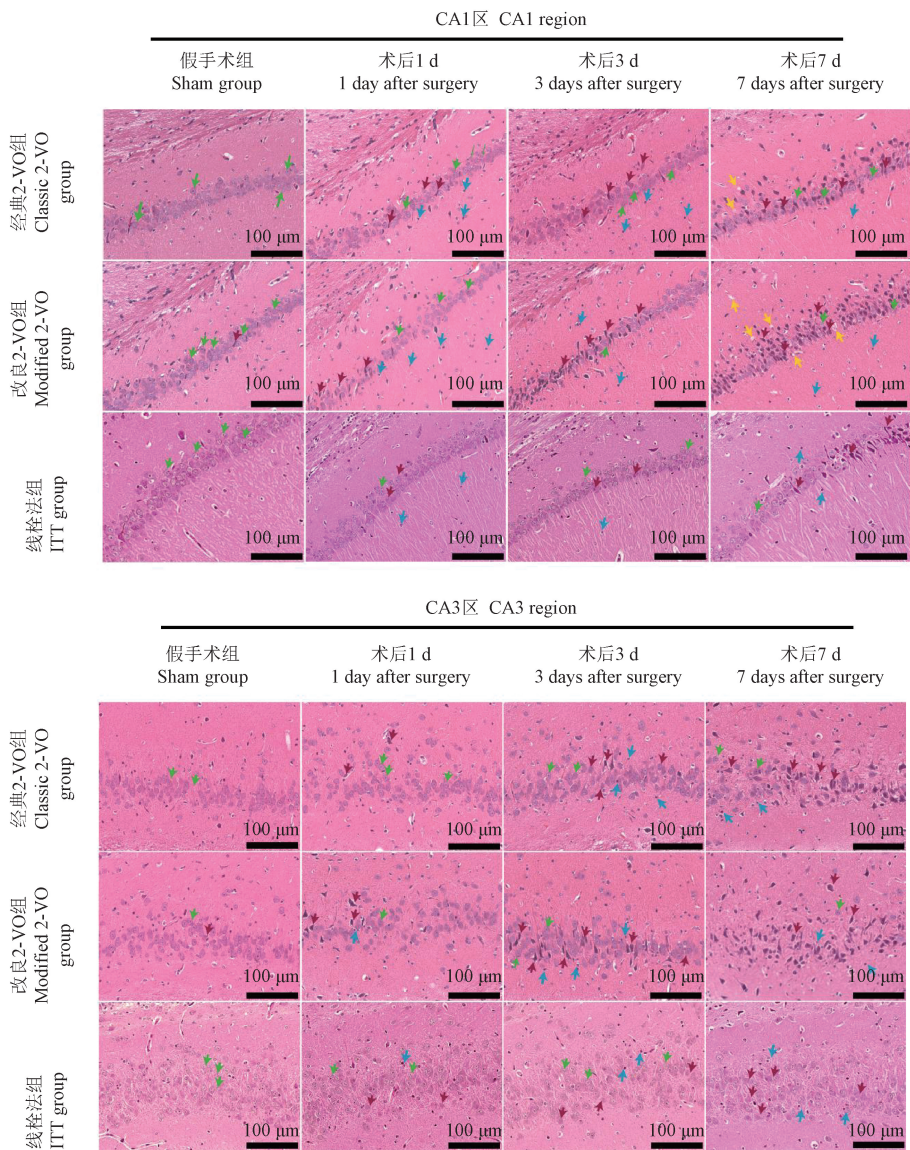
术后 1 d, 各组海马区域的变化如下: 经典 2-VO 组: 极少数神经元体变形、皱缩深染(红色箭头), 少数炎症细胞增生(蓝色箭头)。线栓法组: 少量细胞核淡染, 细胞间距增大。改良 2-VO 组: 相较于前 2 组, 皱缩神经元核炎症细胞数量增加。

术后 3 d, 经典 2-VO 组 CA1 和 CA3 区少量神经元胞体变形皱缩深染, 较多炎症细胞增生(蓝色箭头)。线栓法组 CA1 区多数细胞胞核消失, 细胞数量减少, CA3 区结构层次紊乱。改良 2-VO 组较

其他 2 组损伤进一步增加, 主要表现在: 海马 CA1 和 CA3 区更多的神经元胞体变形皱缩深染成三角形或不规则的形状, 神经元数量减少, 炎症细胞浸润增加。

术后 7 d, 经典 2-VO 组 CA1 和 CA3 区大量神经元皱缩深染, 周围少见不规则空泡(黄色箭头), 改良 2-VO 组皱缩神经元数量进一步增加, 偶见少量正常细胞(绿色箭头), 神经元排列更加紊乱。线栓法组相较其他两组损伤较轻, 主要表现为 CA1 和 CA3 区神经元皱缩和排列紊乱, 无空泡化现象。

总的来说, 3 种方法均可导致大鼠海马 CA1、



注: 红色箭头: 异常神经元; 绿色箭头: 正常神经元; 蓝色箭头: 炎症细胞; 黄色箭头: 不规则空泡。

图 4 3 种造模方法术后 1、3、7 d 时大鼠海马组织 CA1 和 CA3 区 HE 染色

Note. Red arrow. Abnormal neurons. Green arrow. Normal neurons. Blue arrow. Inflammatory cells. Yellow arrow. Irregular phagocytosis.

Figure 4 Hippocampal CA1 and CA3 regions of rats were stained with HE at 1, 3 and 7 days after operation

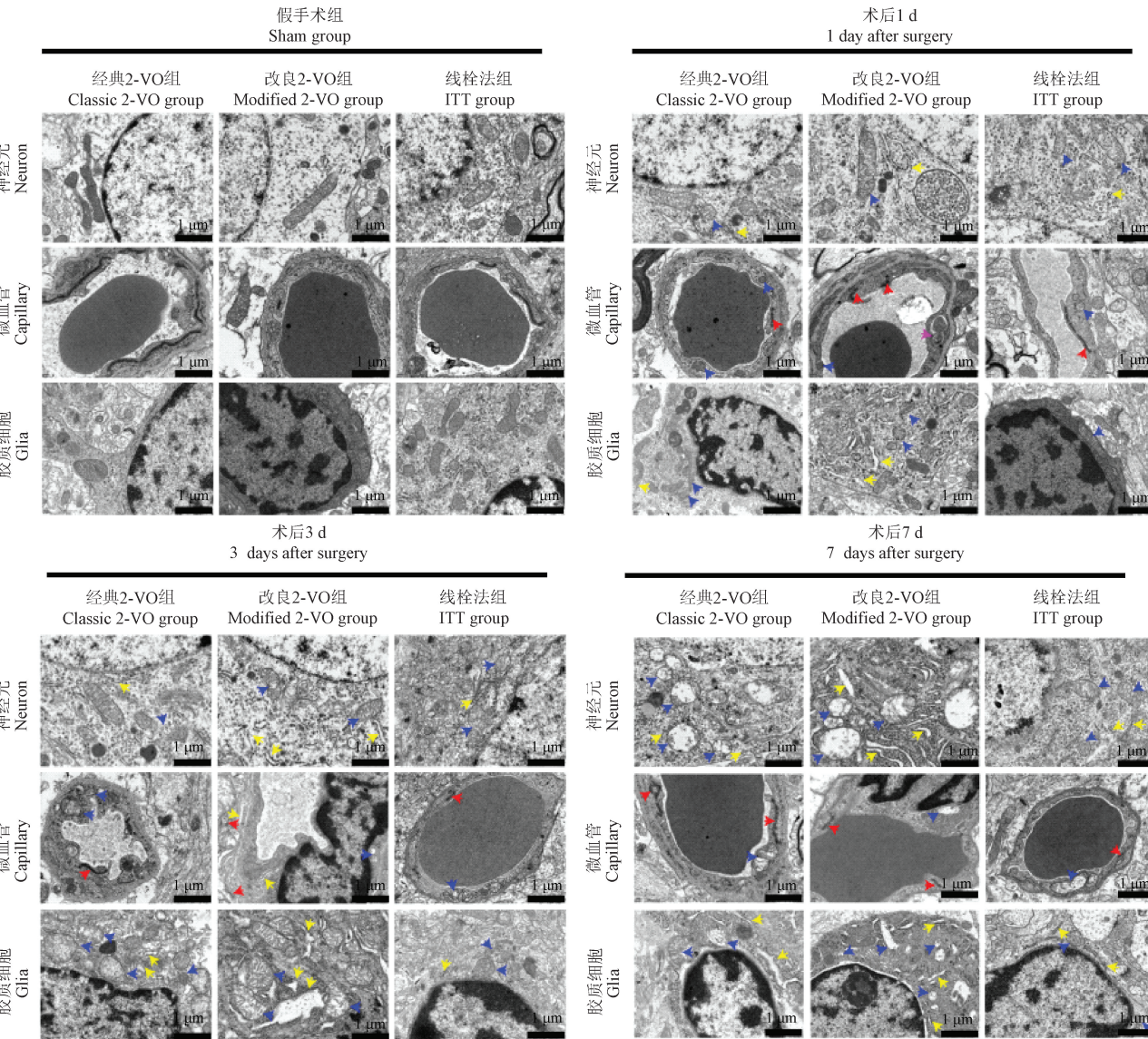
CA3 区受损, 损伤程度与造模时间呈正相关。其中, 改良 2-VO 组对比另外 2 组在相同造模时间内能造成海马组织更明显的病理损伤, 主要表现为术后第 3 天即出现大量皱缩深染坏死的神经元, 以及更多的炎性细胞浸润。

2.5 大鼠海马组织超微结构改变

如图 5 所示, 3 种造模方法的假手术组未显示明显病理性改变。术后 1 d, 3 种方法均可引起线粒体轻度损伤。改良 2-VO 法额外引起内质网腔扩张。具体体现为: (1) 神经元: 经典 2-VO 组与改良

2-VO 组线粒体均呈现轻度肿胀, 后者的内质网腔略有扩张。线栓法组线粒体嵴轻微肿胀, 部分内质网断裂。(2) 微血管: 3 种模型的微血管基底膜和内皮细胞结构正常, 线粒体嵴结构正常, 双层膜结构清晰, 紧密连接未被破坏。(3) 胶质细胞: 经典与改良 2-VO 组均表现线粒体嵴轻微肿胀, 排列紊乱。但后者内质网腔扩张更明显。线栓法组胶质细胞未见明显病理性改变。

术后 3 d, 3 种方法均可引起线粒体中度肿胀。但除此之外, 改良 2-VO 法还能造成内质网腔中度



注: 蓝色箭头: 线粒体超微结构改变; 黄色箭头: 内质网超微结构改变; 红色箭头: 紧密连接完整性; 紫色箭头: 自噬小体。

图 5 3 种造模方法术后 1、3、7 d 对大鼠海马组织不同细胞超微结构影响的代表性图像 ($n = 3$)

Note. Blue arrow. Ultrastructural changes of mitochondria. Yellow arrow. Ultrastructural changes of endoplasmic reticulum. Red arrow. Integrity of tight junctions. Purple arrow. Cytolysosome.

Figure 5 Representative images of the effects of three methods on the ultrastructure of different cells in the rat hippocampus at 1, 3 and 7 days after operation ($n = 3$)

扩张以及紧密连接受损。具体体现为:(1)神经元:3 组线粒体均表现为嵴部分溶解,双层膜结构模糊,中等程度肿胀。且改良 2-VO 组内质网腔扩张程度更严重。(2)微血管:经典 2-VO 组微血管基底膜结构部分溶解,紧密连接完整。改良 2-VO 组微血管基底膜溶解,紧密连接模糊,线粒体基质重度肿胀甚至出现空泡化;线栓法组与经典 2-VO 组病理改变类似。(3)胶质细胞:与前面的结果相似,除了线粒体表现出的肿胀外,改良 2-VO 组相较于另外 2 组内质网腔扩张更严重。

术后 7 d,改良 2-VO 组线粒体、内质网以及紧密连接的损伤程度均大于经典 2-VO 组和线栓法组。具体体现为:(1)神经元:经典 2-VO 组和改良 2-VO 组线粒体基质空泡化加剧,经典 2-VO 组内质网腔轻微扩张,有部分断裂;改良 2-VO 组在此基础上表现出更严重的内质网腔扩张。(2)微血管:经典 2-VO 组微血管内皮细胞基底膜中度溶解,紧密连接轻度受损。改良 2-VO 组微血管内皮细胞基底膜和紧密连接均被严重破坏,线粒体嵴几乎完全溶解。(3)胶质细胞:经典 2-VO 组线粒体破裂,部分基质空泡化,核膜扩张,内质网腔重度扩张;改良 2-VO 组相较于经典 2-VO 组线粒体碎片增多,空泡化更严重。线栓法组的超微结构改变虽然相较于 1 d 和 3 d 时有所加重,但损伤程度不如另外 2 种模型。

总的来说,在相同的造模时间内,改良 2-VO 组造成的海马区细胞损伤更严重,主要体现在:更明显的线粒体肿胀、空泡化现象;术后 1 d 即出现内质网应激;术后 3 d 即表现出紧密连接破坏。

3 讨论

经典 2-VO 法是目前使用最广泛,建立最成熟的低灌注模型之一,具有操作简单、成本低、动物存活率高等优点^[10]。但它造成的是一种不完全性脑缺血,主要归因于 SD 大鼠具有完整的 Willis 环,可在双侧颈总动脉结扎后持续为大脑提供不间断但逐渐减少的血液供应^[11],难以达到理想的脑缺血效果。沙鼠和大多数品系的小鼠会因为 Willis 环缺失导致 2-VO 术后出现严重的脑缺血甚至死亡^[12-13],说明了 Willis 环对 2-VO 模型的影响非常大。这将直接导致造模大鼠的组织学脑损伤程度差异较大,因为每个个体的 Willis 环发育情况和侧支代偿能力不同。对于一些具有良好的 Willis 环和血液储备能力的个体来说,仅仅 2-VO 不足以造成脑低灌注,从

而影响实验结果。因此,PULSINELLI 等^[14]在 1979 年提出了 1 种 4-VO 模型(双侧颈总动脉夹闭+椎动脉闭塞),大鼠术后前脑半球严重缺血缺氧,血流量降低至 3% 甚至更少,在短时间内与智能相关脑区严重受损且伴有感觉运动障碍,该模型为全脑缺血的研究作出了巨大的贡献。但这种 4-VO 模型具有如下缺点:操作困难,对手术操作者熟练度要求很高,且术后易感染,动物死亡率高,因此并没有被广泛接受用于研究^[9]。考虑到以上模型的特点,本研究团队构建了 1 种改良 2-VO 模型,即在 2-VO 的基础上给予低血压的条件,从而进一步降低脑灌注压,可使 2-VO 这种相对温和的不完全性脑缺血转为更严重的脑缺血,但又不同于 4-VO 模型的近乎全脑无血流供应,更符合临床低灌注性脑卒中患者低压的发病特征。已有研究报道,在夹闭双侧颈总动脉的基础上通过腹腔注射硝普钠来降低血压^[15-16],但硝普钠扩血管的作用在 30 min 后消失,模型大鼠无法维持较长时间的低压状态,并且外周血管的收缩舒张受环境温度因素影响较大,模型稳定性较差。在本研究中,研究人员通过从 SD 大鼠颈总动脉抽血直接降低大鼠总血容量来达到降低脑灌注压的目的,这种方法制备的低灌注模型相较于 2-VO+硝普钠模型具有稳定性高、可重复性强的优点;相较于 4-VO 模型具有操作简便、动物存活率高的优点;并且能造成比 2-VO 模型更完全的脑缺血,一定程度上规避了因个体脑血流储备能力差异带来的影响。除了全脑低灌注模型以外,莫大鹏等^[6]在 2005 年建立的局部脑低灌注模型(即本文的线栓法)造成的病理学改变类似于传统意义上脑低灌注期的 I ~ II 期之间,即急性期,所以他们仅研究了 24 h 内局部低灌注对大鼠的影响。为了更充分研究脑低灌注各分期不同的病理生理学特点,本研究团队在莫大鹏等^[6]的基础上延长了造模时间,并且将其与全脑低灌注模型比较。

大脑血液循环系统由前循环系统和后循环系统两大系统组成,其中颈内动脉系统构成的脑血管网络常被称为前循环,经典 2-VO 造模后能有效降低大脑前循环脑血流量^[17]。有研究表明在经典 2-VO 术后 2 ~ 6 周在皮层和纹状体的神经元数量急剧减少,说明这两个区域受慢性缺血的影响较大^[8,18],在本研究中,经典 2-VO 组仅在纹状体观察到轻微梗死,未在皮层观察到梗死灶,这可能是因为大脑皮层拥有更为复杂的血管网络,这样的结构

特点可能使得皮层相对于纹状体更具有抗缺血性损伤的能力,由经典 2-VO 法引导的较温和且短时间的缺血(0 ~ 7 d)可能不足以引起皮层的梗死。而改良 2-VO 法中大约有 26.7% 的大鼠在皮层和纹状体都出现了梗死,这可能是因为改良 2-VO 法引起了更严重的前循环血流量下降,造成了相较于经典 2-VO 法更严重的神经功能损伤。线栓法相较于前面所述的 2 种模型更易形成皮层和纹状体大面积梗死,这可能与不同模型阻断的供血血管不同有关,栓线直接插入大脑中动脉根部能有效降低相应脑区的血供量,这与结扎双侧颈总动脉不同。需要注意的是,SD 大鼠大脑前动脉近端的内径一般为 0.2 mm,在保证插入相应深度的前提下,不损伤血管内膜,也不完全阻塞血管是本研究的目的,因此需要考虑栓线的直径和插入深度。本研究采取直径 0.175 mm 的栓线,在插入深度为 18 ~ 22 mm 的情况下完成造模,但由于大鼠个体间解剖学差异较大,插入相同深度和直径的栓线对中动脉的阻塞程度是不同的,这也解释了线栓法制备低灌注模型不稳定的原因。研究团队曾尝试利用 MoorFLPI-2 激光散斑成像仪实时监测大鼠的脑血流量以调整栓线深度,但受限于成像仪较低的时空分辨率,并且无法显示出细微的脑血流量变化而无法达到理想效果。需要在今后的实验中进一步改进和完善。

慢性脑灌注不足引起的葡萄糖和氧气中断会导致 Ca^{2+} 稳态被破坏,引起活性氧急性和慢性产生^[19],过多的活性氧攻击线粒体引起线粒体结构损伤和功能障碍,因此脑低灌注被认为是导致细胞能量代谢紊乱的重要原因。经典 2-VO 组的透射电镜结果显示,造模后随着时间的延长,海马区细胞的线粒体损伤逐渐加重。在改良 2-VO 组中,研究人员不仅观察到了逐渐加重的线粒体损伤,还发现了较经典 2-VO 组更严重的内质网肿胀现象。内质网在蛋白质和脂质合成中起着重要作用,也是细胞内最大的 Ca^{2+} 库,在细胞内 Ca^{2+} 稳态的维持中具有重要作用。线粒体相关膜 (mitochondrial associated membrane, MAM) 是内质网和线粒体 Ca^{2+} 信号传递中的专用微结构域,在生理条件下 MAM 控制着线粒体和内质网之间的 Ca^{2+} 稳态;在病理条件下,胞质内的 Ca^{2+} 可转运到应激的内质网并富集在 MAM 处,促进内质网-线粒体 Ca^{2+} 大量转移,然后线粒体通透性转换孔打开,过量的 Ca^{2+} 积累会激活促凋亡因子释放到胞质引起细胞凋亡^[20-21]。在缺血缺氧

的条件下,内质网应激可进一步加重线粒体结构和功能损伤,从而诱导一个更坏的结局^[22]。本实验的结果显示,改良 2-VO 法在另外 2 种方法尚未引起内质网异常的时间内(术后 1 d)即诱导出内质网应激现象,并且造成更严重的线粒体损伤。从超微结构改变的角度说明了在相同的造模时间内,改良 2-VO 法相较于经典 2-VO 法和线栓法能更快速诱导出符合临床低灌注特点的动物模型。

综上所述,本研究建立的改良 2-VO 模型具有以下优点:(1)更稳定,易重复。(2)能模拟出更完全的脑灌注不足状态。(3)能更快速诱导出神经功能损伤。该模型也存在一定的不足,例如:(1)放血时需要严格把控放血量,放血过多可能会使动物死亡率升高。(2)注射器针尖需要不断在血管内调整位置以便血液流出,这增加了手术难度,延长了手术时间,抽血过程还可能会对血管内皮产生影响。

本研究通过比较 3 种脑灌注不足动物模型制备的方法,明确了 3 类模型的适用范围及各自的优缺点,为后续脑灌注不足的病理机制及治疗药物研发提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] 《中国脑卒中防治报告》编写组.《中国脑卒中防治报告 2019》概要 [J]. 中国脑血管病杂志, 2020, 17(5): 272-281.
Report on Stroke Prevention and Treatment in China Writing Group. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2019 [J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2020, 17(5): 272-281.
- [2] YE Q, ZHAI F, CHAO B, et al. Rates of intravenous thrombolysis and endovascular therapy for acute ischaemic stroke in China between 2019 and 2020 [J]. Lancet Reg Health West Pac, 2022, 21: 100406.
- [3] HEISS W D. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? [J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1268: 26-34.
- [4] MOMJIAN-MAYOR I, BARON J C. The pathophysiology of watershed infarction in internal carotid artery disease: review of cerebral perfusion studies [J]. Stroke, 2005, 36(3): 567-577.
- [5] WASHIDA K, HATTORI Y, IHARA M. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: from mouse to primate [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): E6176.
- [6] 莫大鹏, 凌锋, 李萌, 等. 大鼠脑局灶性低灌注模型的建立 [J]. 中国脑血管病杂志, 2005, 2(7): 316-320.
MO D P, LING F, LI M, et al. Study of establishing a model of regional cerebral hypoperfusion in rats [J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2005, 2(7): 316-320.
- [7] 刘伟, 胡鹏, 冯波. 血管性痴呆大鼠模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 805-809.

- LIU W, HU P, FENG B. Research progress of rat models of vascular dementia [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(6): 805–809.
- [8] LAPI D, MASTANTUONO T, SAPIO D, et al. Pial microvascular responses induced by transient bilateral common carotid artery occlusion in Zucker rats [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2013, 54(4): 415–429.
- [9] GARCIA J H, LIU K F, HO K L. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex [J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 636–642.
- [10] 宋元毓, 陈英华, 李俊峰, 等. 血管性痴呆动物模型的研究概述 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(12): 75–85.
SONG Y Y, CHEN Y H, LI J F, et al. A review of animal models of vascular dementia [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(12): 75–85.
- [11] 孙伟, 耿悦, 陈叶婷, 等. Sprague-Dawley 与 Wistar 大鼠双侧颈总动脉结扎后大脑病理变化和认知功能的差异 [J]. *生理学报*, 2019, 71(5): 705–716.
SUN W, GENG Y, CHEN Y T, et al. Differences of brain pathological changes and cognitive function after bilateral common carotid artery occlusion between Sprague-Dawley and Wistar rats [J]. *Acta Physiol Sin*, 2019, 71(5): 705–716.
- [12] TAMAKI M, KIDOGUCHI K, MIZOBE T, et al. Carotid artery occlusion and collateral circulation in C57Black/6J mice detected by synchrotron radiation microangiography [J]. *Kobe J Med Sci*, 2006, 52(5): 111–118.
- [13] 李长龙, 杜小燕, 王冬平, 等. 长爪沙鼠脑缺血模型近交系的培育及其发病机制研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(4): 512–517.
LI C L, DU X Y, WANG D P, et al. Advances in research of the establishment of an inbred Mongolian gerbil model of cerebral ischemia and its mechanism of pathogenesis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(4): 512–517.
- [14] PULSINELLI W A, BRIERLEY J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267–272.
- [15] WU S, HUANG R, ZHANG R, et al. Gastrodin and gastrodigenin improve energy metabolism disorders and mitochondrial dysfunction to antagonize vascular dementia [J]. *Molecules*, 2023, 28(6): 2598.
- [16] 王蕊, 杨秦飞, 唐一鹏, 等. 大鼠拟“血管性痴呆”模型的改进 [J]. *中国病理生理杂志*, 2000, 16(10): 914–916.
WANG R, YANG Q F, TANG Y P, et al. Improvement of a rat vascular dementia model [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2000, 16(10): 914–916.
- [17] KATO H, KANAI Y, WATABE T, et al. Quantitative measurement of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in a rat model of cerebral hypoperfusion [J]. *Brain Res*, 2019, 1719: 208–216.
- [18] JING Z, SHI C, ZHU L, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces vascular plasticity and hemodynamics but also neuronal degeneration and cognitive impairment [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(8): 1249–1259.
- [19] RAJEEV V, CHAI Y L, POH L, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: a critical feature in unravelling the etiology of vascular cognitive impairment [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2023, 11(1): 93.
- [20] SZYMAŃSKI J, JANIKIEWICZ J, MICHALSKA B, et al. Interaction of mitochondria with the endoplasmic reticulum and plasma membrane in calcium homeostasis, lipid trafficking and mitochondrial structure [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1576.
- [21] ZHENG S, WANG X, ZHAO D, et al. Calcium homeostasis and cancer: insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications [J]. *Trends Cell Biol*, 2023, 33(4): 312–323.
- [22] WANG D P, KANG K, HAI J, et al. Alleviating CB2-dependent ER stress and mitochondrial dysfunction improves chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive impairment [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2024, 19(1): 1.

[收稿日期] 2024-04-30