

小鼠脑缺血再灌注模型的构建及条件优化*

王梧霖^{1,2} 史小军^{2△} 侯天德¹ 米锡阳²

(1 西北师范大学生命学部 甘肃 兰州 730000 2 清华大学深圳研究生院生命科学与海洋生物学实验室 广东 深圳 518055)

摘要 目的 构建小鼠的脑缺血再灌注模型 并对其进行优化。方法 通过对线栓法缺血再灌注脑损伤模型的各个因素的对比实验,在线栓位置、线径、进线深度、小鼠种类等方面对该方法进行了优化改进。结果 造模后的脑片经 TTC 染色 梗死区域清晰,神经功能评分的体征明显。现有条件下构建的小鼠 MCAO 模型,成功率可以达到 80% 以上,成活率可以达到 90% 以上。与对照组相比,小鼠 MCAO 模型组血清 SOD 活性及 MDA 水平有显著变化($P < 0.01$)。结论 经改进和优化,小鼠脑缺血再灌注模型的成功率和成活率大大提高且症状明显,对缺血缺氧性神经损伤研究具有一定的参考价值。

关键词 小鼠;脑缺血再灌注模型;优化

中图分类号:Q95-3, R743.31, R965.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2010)01-70-04

Establishment and optimization of mice brain ischemia Reperfusion model*

WANG Wu-lin^{1,2}, SHI Xiao-jun^{2△}, HOU Tian-de¹, MI Xi-yang²

(1 northwest normal university life strand, Gansu lanzhou 730000, China;

2 Life science and ocean biology laboratory of Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China)

ABSTRACT Objective: Establish and optimize the mice brain ischemia reperfusion model (also known as MCAO model). **Methods:** Factors of this model, such as the position of line, the diameter of line, the depth of line and mice type, were altered to optimize ischemia-reperfusion brain damage model using mice brain ischemia reperfusion model as comparative experiments. **Results:** The brain slices of improved model were found clear infarction area and obvious neurobehavioral scores of signs after TTC dyeing. The livability could reach 80% under existing MCAO model conditions, whereas, the survival rate of improved model achieved more than 90%. Meanwhile, there were significant change of MDA and SOD activity in serum of the improved MCAO model ($P < 0.01$), compared with the control group. **Conclusion:** The higher success rate, survival rate and clear symptoms were observed after the improvement and optimization of cerebral ischemia reperfusion. The improved model provide certain reference value for research on oxygen deficiency nerve injury.

Key words: Mice; brain ischemia reperfusion model; optimization

Chinese Library Classification: Q95-3, R743.31, R965.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2010)10-70-04

前言

随着人口老龄化速度加快以及生活方式的改变,脑血管意外呈逐年增高趋势。其中,缺血性脑血管病(Ischemic cerebrovascular disease, ICVD)占脑血管病的 80%~85%。线栓法构建大鼠脑缺血再灌注模型(MCAO)是缺血性脑血管病研究中常用的经典模型。此模型由 Koizumi 等在 1986 首创^[1],后经 Zea-Longa 等^[2]改良,具有制作简单,成功率高,术后感染少,结果稳定,且可根据实验需要控制脑缺血及再灌注时间^[3-5],一直为研究者青睐。近些年来小鼠 MCAO 模型因其具有成本低,重复性好等特点逐渐广泛应用于实验研究^[6]。由于大鼠、小鼠体质、血管韧性、解剖结构等各方面的差异,构建 MCAO 过程尚有技术细节需斟酌。本文旨在介绍一种小鼠脑缺血再灌注模型

的条件优化,以便提供科学简洁的一种研究缺血性脑损伤实验手段。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验中所用的 bl/c 小鼠和昆明小鼠均购自广州医学院实验动物中心。

1.2 实验仪器试剂

实验仪器:体式显微镜(Leica 公司,德国),紫外可见分光光度计(Jenway 公司,英国),台式高速冷冻离心机(Beckman Coulter Inc,美国)。

实验试剂:水合氯醛(北京化学试剂公司),TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)(AMRESCO,美国),SOD、MDA 试剂盒(南

* 基金项目 深圳市国际科技合作资助计划项目(ZYA200903270135A)

作者简介:王梧霖(1983-),男,硕士研究生,主要研究方向:生物毒素对神经损伤的修复作用

电话:15293152718, E-mail:wwlin_happy@163.com

△通讯作者:史小军, E-mail: shixj@sz.tsinghua.edu.cn

(收稿日期 2009-11-05 接受日期 2009-11-30)

京建成生物工程研究所)。

1.3 线控制作

将尼龙线消毒处理后,剪切为长度是 2 cm 的线段,利用记号笔将线段一侧完全涂黑,涂黑的长度为 1 cm,通过记号笔的涂黑,以便准确的控制进线的深度。最后用硅橡胶将线段的前端处理光滑。

1.4 手术步骤

将小鼠麻醉后仰卧于手术台上,颈部正中中进行切口,分离暴露颈部血管(图 1),将颈外动脉(ECA)、颈总动脉(CCA)结扎,颈内动脉(ICA)轻微系扎。在颈总动脉上做一切口,将制作好的尼龙线插入颈内动脉,继续进线直到略感阻力为止(图 2、3)。此时,尼龙线前端已经阻断大脑中动脉(MCA)起始段及其所有血液供应,造成 MCA 局灶性缺血,缝合皮肤。经过 2 小时的梗塞后,轻轻的将尼龙线拉出 MCA 起始段,进行再灌注。

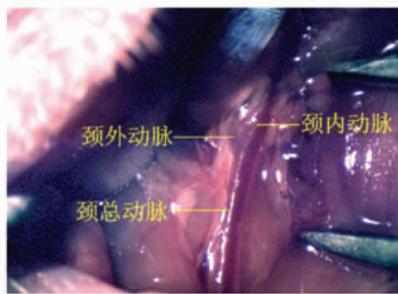


图 1 分离暴露颈部血管
Fig. 1 exposure Neck vessels

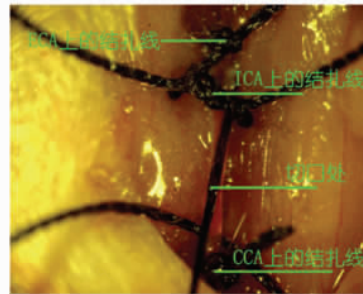


图 2 插线开始(黑色标记大部分未插入)
Fig. 2 Start into line

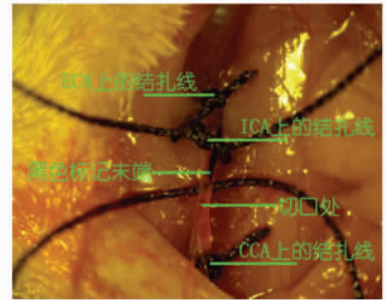


图 3 插线结束(黑色标记已大部分插入)
Fig. 3 Plug wire ends

1.5 术后的神经功能评分

整个评分采用单盲法,即评分者不知道实验动物分组情况。采用 longa 的 5 分评分标准^[2]。

2 结果

2.1 小鼠种类对 MCAO 模型的影响

目前实验室用的较广泛的小鼠有 bl/c 和昆明小鼠,我们各取 10 只进行造模比较。通过术后的神经功能评分和 TTC 染色表明,bl/c 小鼠的造模成功率和死亡率分别为 70%、40%,而昆明小鼠的则为 80%、20%。虽然 bl/c 小鼠易于分离血管、结构清晰,但血管较脆,容易造成蛛网膜下腔出血,同时术后恢复慢、费用高,不利用大批实验。因此建议采用昆明小鼠(表 1)。

表 1 小鼠种类实验结果

Table 1 Mice type experimental results

Mice type	success rate(%)	mortality(%)
bl/c	70	40
Kong ming	80	20

2.2 线栓线径对 MCAO 模型的影响

我们通过初步的筛选确定了线径分别为 0.104 mm、0.128 mm、0.148 mm 的三种尼龙线可以较为轻松的进入小鼠的颈部血管^[7,8]。之后取三组小鼠,每组 10 只,三组小鼠分别以上述三种尼龙线制作的线栓进行造模。通过术后的神经功能评分和 TTC 染色表明:线栓材料为线径 0.104 mm 尼龙线的造模组其成功率和死亡率分别为 50%和 10%,材料为线径 0.128 mm 尼龙线的造模组其成功率和死亡率为 80%和 10%,材料为线径 0.148 mm 尼龙线的造模组其成功率和死亡率为 70%和 40%。线径为 0.104 mm 的尼龙线线径太细,不能完全阻断 MCA,导致模型成功率低,且由于线径太细,没有足够的硬度和韧性,使得进线也较为困难。线径为 0.128 mm 尼龙线的效果最好,可以较好的阻断 MCA 的同时还有着适当的硬度和韧性,使得进

线也很方便。而线径为 0.148 mm 的尼龙线虽然可以很好的阻断 MCA,但是因其硬度和韧性太大,使得不能很好的把握进线的深度,容易刺破血管,从而导致较高的死亡率(表 2)。

表 2 线径实验结果

Table 2 Gauge experimental results

Gauge(mm)	success rate(%)	mortality(%)
0.104	50	10
0.128	80	10
0.148	70	40

2.3 进线的位置对 MCAO 模型的影响

两组小鼠(每组 10 只)分别采用不同的进线位置造模。结果发现 ECA 进线的模型组成功率 and 死亡率分别为 70%和 20%,CCA 进线的模型组成功率 and 死亡率分别为 80%和 10%。实验过程中发现 ECA 进线可以确保 CCA 的完整,从而使得术后手术侧的 CCA 重新恢复供血实现再灌注,但 ECA 进线却使得线栓容易发生弯曲,不易进线,难于控制深度,同时由于需要对 ECA 进行较完整的分离,则有可能会损伤颈部神经。CCA 进线虽然不能使手术侧的 CCA 术后恢复供血,但是小鼠脑底的 Willis 环也完全可以实现再灌注功能,实验效果与 ECA 进线相同。同时 CCA 具有进线容易,易于控制深度,不需要完整分离 ECA(表 3)。

表 3 进线位置的结果

Table 3 Line position results

Line position	success rate(%)	mortality(%)
ECA	70	20
CCA	80	10

2.4 进线深度对 MCAO 模型的影响

首先经解剖发现小鼠的 MCA 距离 CCA 分叉处约为 0.8 cm 至 1 cm 之间,将小鼠随机分为 4 组,每组 10 只,分别按照

0.75 cm、0.8 cm、0.9 cm、1.0 cm 的进线深度造模。神经功能评分和 TTC 染色确定造模结果(表 4)。

表 4 进线深度的实验结果
Table 4 Line length results

Line length(cm)	success rate(%)	mortality(%)
0.75	20	0
0.8	80	10
0.9	70	10
0.1	70	40

2.5 线栓前端处理方式对 MCAO 模型的影响

实验用线栓前端因为剪切等操作会变的比较尖锐,极易刺破血管,影响造模。我们采用三种办法对线栓前端进行处理,分

别是型号为 704 的硅橡胶包裹处理、石蜡包裹处理、白炽灯泡表面的前端熔化处理。通过实验对比可以看出三种处理方法产生的线栓均有着较高的成功率和成活率,实验效果大致相同。石蜡和白炽灯法处理,过程较繁琐,线栓前端的形状具有一定的随意性。硅橡胶处理过程简单,实验者还可以根据自己的要求对前端形状进行修改。

2.6 条件优化后的 MCAO 造模方法结果检测

2.6.1 TTC 法观察试验结果 TTC 染色是常用的检测脑损伤的方法,通过 TTC 和活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶反应,生成红色的甲氧蓝,可以将正常的脑组织染成红色,而梗死区域的脑组织则不着色,呈白色。通过 TTC 染色可以有效判断模型是否成功(图 4、5)。

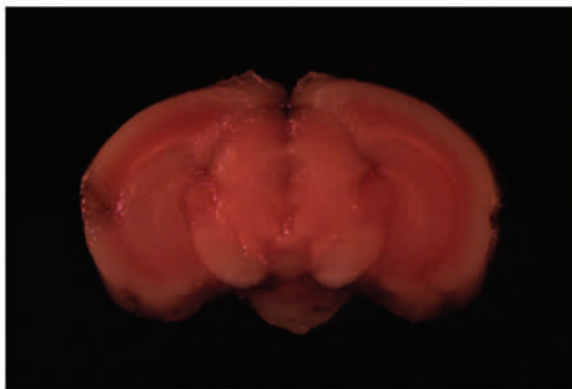


图 4 正常脑组织的 TTC 染色

Fig. 4 The normal brain tissue by TTC dyeing

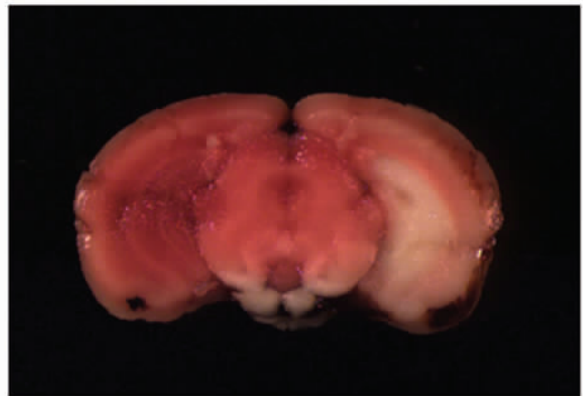


图 5 脑缺血脑组织的 TTC 染色

Fig. 5 Cerebral ischemia organization by TTC dyeing

2.6.2 行为评分 通过与正常小鼠(图 6)的比较,采用 longa 的 5 分评分标准,0 分为无症状;1 分为不能完全伸展对侧前爪(图 7);2 分为向对侧转圈;3 分为向对侧倾倒;4 分为不能自行

行走,意识丧失。剔除 0 分、4 分和术后死亡动物,满足 1、2、3 分的动物均为造模成功(表 5)。整个评分采用单盲法,即评分者不知道实验动物分组情况。

表 5 行为评分结果

Table 5 The behavior results

Numbers	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
model	3	3	3	3	death	3	0	1	2	1

2.6.3 生化指标 SOD 和 MDA 的检测 成功的 MCAO 模型会对实验动物造成严重的应激损伤,因此必定会引起其体内

SOD 和 MDA 含量的变化。通过对血清中 SOD 和 MDA 的检测,也可以有效判断模型是否成功(表 6)。

表 6 血清中 MDA 和 SOD 变化

Table 6 Changes in MDA and SOD

	normal	model
SOD(U/ML)	237.93± 24.29	166.04± 8.79*
MDA(nmol/ml)	5.06± 0.11	9.75± 1.08*

注:*与正常组相比 P<0.01 n=5

Note:*Compared with normal group P<0.01,n=5

3 讨论

上述采用昆明雄性小鼠,10%的水合氯醛麻醉的实验表明^[9],尼龙线栓的线径为 0.128 mm、线栓前端被硅橡胶包裹制作的小鼠 MCAO 模型效果较好。MCAO 模型目前有两种进线位置,一种是经典的 ECA 进线,一种是 CCA 进线^[10]。经实验发

现,小鼠 MCAO 模型进线的位置与经典的 ECA 进线相比,采用 CCA 途径进线,不仅操作简洁且更为安全。大鼠 MCAO 模型的进线深度已有成熟经验报道,关于小鼠的进线深度则仅仅有人指出应在 1 cm 左右^[10],由于进线太浅无法有效阻断 MCA,进线太深会刺破血管产生蛛网膜下腔出血,我们的实验发现,进线最适宜深度为 0.8 cm~0.9 cm 之间,同时线栓应具有

一定的弯曲,在进线时使线栓前端向上弯曲,便可以很容易插入颅内,可避免进入翼腭 A 动脉。栓塞两小时后再灌注所得到的梗死面积最为稳定,便于比较分析。在进行再灌注时需将小

鼠进行二次麻醉,此时的麻醉剂量应是第一次剂量的一半左右。拔线时不必全部拔出,只需拔出 0.6 cm 左右,不堵塞大脑中动脉即可。



图 6 正常小鼠

Fig. 6 The normal mice

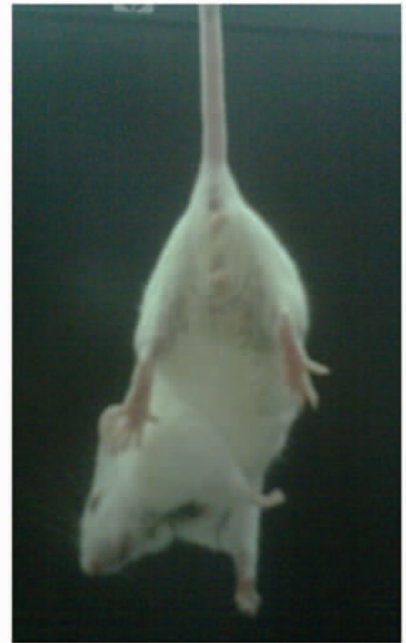


图 7 造模 1 分标准

Fig. 7 The model

大鼠 MCAO 造模中使用动脉夹便可以很好的解决止血。但是小鼠因血管太细,使用微型动脉夹也不能够有效的止血,且严重影响操作视野。经改进只需在 ICA、ECA 及 CCA 上分别挂线,其中结扎 ECA 和 CCA 的两条线,轻微系紧 ICA 线结即可,当线栓进入 ICA 后便轻轻解开 ICA 上的尼龙绳结,使得线栓可以顺利进入血管,阻断 MCA。通过以上的方法可以有效的解决小鼠 MCAO 造模中的止血问题。

TTC 染色、神经功能评分、SOD 和 MDA 的检测表明,经过条件优化后的模型,其成功率、稳定性都有一定的提高。该方法可为小鼠的 MCAO 模型构建提供相应的参考。

参考文献(References)

- [1] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemia brain edema. A new experimental model of cerebral embolism infarcts in the ischemia area [J]. Jpn J Stroke, 1986, (8): 1-8
- [2] Zea-Longa Z, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91
- [3] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood and histologic changes in a new rat model of cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 1989, 20: 1037
- [4] Tekeda T, Shima T, Okada Y, et al. Pathophysiological studies of cerebral ischemia produced by silicone cylinder embolization in rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1987, 7(Suppl 1): S566
- [5] 梁勇,周良辅.啮齿类动物的缺血模型 [J]. 国外医学神经病学神经外科分册, 1995, 22(4): 178
Liang Yong, Zhou Liang-fu. The rodents ischemia model [J]. Foreign medical sciences section on neurology and neurosurgery, 1995, 22(4): 178(In Chinese)

- [6] Huang Z, Huang PL, Panahian N, et al. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase [J]. Science, 1994; 265(5180): 1883-1885
- [7] 关云谦,孙明,徐超.大鼠颈内动脉线栓法制备局灶性脑缺血模型及影响因素 [J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2001, 9(3): 151-153
Guan Yun-qian, Sun Ming, Xu Chao. Rats internal carotid artery bolt thread for focal cerebral ischemia model and the influencing factors [J]. Foreign medical sciences (cerebrovascular diseases), 2001, 9 (3): 151-153(In Chinese)
- [8] 廖维靖,刘淑红,范明,等.线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良及讨论 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(6): 345-348
Liao Wei-jing, Liu Shu-hong, Fan Ming, et al. Modification of the preparation of models of focal ischemic brain injury with suture occlusion in rats [J]. Chinese journal of physical medicine and rehabilitation, 2002, 24(6): 345-348(In Chinese)
- [9] 张彦,朱艳菊,张芳,等.动物实验中常用麻醉药的选择与应用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(1): 164-165
Zhang Yan, Zhu Yan-ju, Zhang Fang, et al. The choice and application about commonly used drugs in animal experiments [J]. Journal of Liaoning university of traditional Chinese medicine, 2009, 11(1): 164-165(In Chinese)
- [10] 张成英,赵旭东.线栓法制作大鼠局灶性脑缺血模型插线部位的选择 [J]. 四川解剖学杂志, 2004, 12(2): 110-111
Zhang Cheng-ying, Zhao Xu-dong. Selection of inserted thread position for a rat's model of focal cerebral ischemia by nylon suture embolization [J]. Sichuan journal of anatomy, 2004, 12(2): 110-111(In Chinese)