

脑卒中动物模型的建立与比较

陈茉弦¹ 敖丽娟^{1,4} 李琦² 潘芳³

脑卒中动物模型早期多选择高等动物制备,特别是灵长目动物,其目的是更好地模拟人类卒中的发生,但是由于易得性较差,价格昂贵,于是利用小动物特别是啮齿类动物制备脑缺血动物模型逐渐受到重视。Mhair^[1]认为一个好的脑卒中的动物模型必须具备:①能够控制缺血的时间、部位、程度;②与脑缺血或出血相关的因素如血压、血气、体温、血糖等可被密切监视或控制;③避免其他疾病和脑血管解剖差异性影响。脑卒中动物模型根据病理性质可分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中两大类,以下就分别阐述各模型的特点。

1 脑缺血动物模型的制备

1.1 线栓法制备局灶性脑缺血模型

1986年,日本学者Koizumi J^[2]发明了线栓法制备局灶性脑缺血大鼠模型。在颈总动脉(common carotid artery, CCA)分叉部或颈外动脉(external carotid artery, ECA)残端插入栓线,栓线在外力的作用下相继经过下述血管结构:CCA分叉/ECA残端-颈内动脉(internal carotid artery, ICA)颈段-颈动脉管-ICA脑底段-大脑后动脉(posterior cerebral artery, PCA)起始端口-大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)起始端口-大脑前动脉(anterior cerebral artery, ACA)始段。特制的栓线头端略大,其直径能与ICA内径逐渐相适应。ICA直径在走行过程中逐渐变细,而栓线直径没有变,栓线在插入过程中与ICA结合趋于紧密,因此能逐渐减少、闭塞ICA血流。在MCA从ICA脑底段发出的起始端口,栓线的侧壁能进一步阻断进入MCA的血流,从而引起MCA供血区的缺血、梗死^[3]。目前该动物模型被公认为局灶性脑缺血标准模型,在国内外得到广泛运用。

线栓法制备的局灶性脑缺血大鼠模型的优点为:①缺血部位恒定,可进行再灌注,模拟了人类永久性、短暂性局灶性脑缺血的不同状态;②不需开颅,避免了其他开颅造模法引起的颅内环境改变或颅内感染;③能对缺血及再通时间进行准确控制,便于分析神经元的缺血敏感性和耐受性,评价再灌注作用以及治疗时间的选择^[4];④手术难度相对较小,大鼠死亡率和术后并发症发生低。缺点:①动物体重要求严

格,一般为280—350g;②结扎枕动脉、甲状腺上动脉、咽舌动脉、上颌外动脉和翼腭动脉有一定的难度;③该模型其实质也是栓塞卒中,与人类卒中存在一定的差异。

1.2 开颅电凝法

Tamura等^[5]选择颞下部开颅,分离并电凝横过嗅束外缘或内缘处的MCA造成脑梗死,是目前公认的标准MCA闭塞模型,以大脑皮质、尾状核缺血最明显。Bederson^[6]等电凝并切断MCA起始部至大脑下静脉之间或者嗅束内侧2mm至大脑下静脉之间的一段MCA后,梗死发生率可达到100%。近年来,这一模型也被广泛运用并不断改进^[7]。例如,降低动脉血压以减少伴行血管远端分支对梗死区的血供,增大了梗死面积;电凝近段MCA同时合并短时间阻塞双侧CCA,但研究表明永久性结扎比合并双侧CCA阻塞更适合于评估药物疗效的研究^[8]。

该模型的优点为:①手术在直视下操作,梗死成功率高,在一定程度上模拟了人类永久性脑梗死;②实验条件较恒定,缺血效果可靠,手术中出血量少。其缺点是:①需要开颅,创伤性大;②不可避免的引起脑积液漏,损伤脑组织,感染几率大;③闭塞血管后无法进行再灌注损伤研究。

1.3 光化学法

光化学法的基本原理是光敏剂在特定强度光源的照射下发生光化学反应,在大脑的照射局部产生脑水肿和血小板微血栓,形成局灶性脑梗死。光化学法对实验动物创伤小,模型稳定性好且易于复制等优点得到了比较广泛的应用。自1982年Coyle^[9]及1985年Waston^[10]等相继成功建立大鼠光化学法脑缺血模型以来,此模型已经发展为4型^[11-13]:Ⅰ型即大脑皮质终末动脉阻塞模型;Ⅱ型即环形照射模型;Ⅲ型即大脑中动脉阻塞模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO);Ⅳ型即颈总动脉阻塞模型。不同的模型都对临床有不同的研究价值,如Ⅰ型可用于脑梗死后微血管损伤及血脑屏障改变后的病理生理、生化及用于对抗血小板药物防治作用的研究;Ⅱ型通过对此模型的研究可以对半暗带的病理生理、病理、神经生化等进行研究,以及评价各种脑保护防治措施的效果;Ⅲ型可用于研究血栓形成过程中释放的血管源性

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.08.023

1 昆明医学院第二附属医院康复医学科,昆明市人民西路191号,650000; 2 香港大学医学部精神科; 3 山东大学医学心理学研究所;

4 通讯作者

作者简介:陈茉弦,女,硕士; 收稿日期:2010-07-07

物质对脑梗死的作用,也可以用于抑制血小板集聚及神经保护药物的研究。还可用于缺血再灌注损伤的研究以及各种脑保护药物防治效果的评价;Ⅳ型可用于多发性脑梗死及抗血小板集聚药物的研究,但不利于长期脑缺血模型的研究。目前应用于临床药物研究的主要是Ⅰ型和Ⅲ型。

光化学法脑缺血模型的优点有:①动物模型的成功率高,在严格控制实验条件的情况下基本可达100%,其中Ⅳ型的死亡率较高;②无需开颅,损伤相对较小且死亡率较其他模型低;③因损伤的程度与光照的强度成正比,可通过控制实验参数任意改变梗死灶的大小、位置和严重程度,且梗死灶的重复性和稳定性较好;④通过对实验模型的选择,可用于对缺血再灌注损伤、抗血小板药物及缺血半暗带等的研究;⑤四种模型从不同方面模拟了人类的脑卒中,需根据实验目的进行选择。此法适于研究抗血小板、抗血栓形成药物和血管内皮细胞保护剂的疗效。这种模型无须开颅,动物存活时间长适于慢性脑缺血研究而且皮质梗死部位可任意选择,为皮质功能定位研究提供了条件。其缺点是:它与人类常见的脑栓塞存在差异,而且是终末动脉永久性闭塞,妨碍扩血管药的治疗观察。

1.4 微栓子栓塞法

微栓子栓塞法通常需要在影像学的辅助下将微栓子送达需要阻断的血管,主要是从颈内动脉系统引入栓子以达到阻断大脑中动脉血流的目的。不同性质的栓子对脑血流量造成的影响也不同,可分为3类^[14]:①永久性栓塞栓子,如硅胶柱可稳定地阻塞血管^[15];②不稳定再灌注栓子,是指可自溶或者被吸收的栓子,如自体血凝块^[16];③稳定再灌注栓子,指带软线的栓子,可人为精确控制缺血再灌注时间^[17]。需根据不同的实验目的选择不同栓子。例如自体血凝块栓塞法。血凝块栓塞由于适用于纤维蛋白原激活系统血栓效应的研究,可用于评价溶栓剂和抗栓药与神经保护药联合应用的安全性及效果^[18]。

此类模型的优点是:①非侵入,易操作;②可根据实验目的选择不同类型的栓子,选择多样。③与临床栓塞性卒中接近。缺点:①栓子的制作复杂,不同形态大小的栓子对栓塞效果影响差异大;②缺少对血凝块分布的控制,容易出现异位栓塞。

1.5 去除大鼠脑左侧皮质血管建立脑缺血模型

司银楚等^[19]采用雄性Wistar大鼠麻醉后,剪开大鼠头部皮肤,暴露颅骨应用牙科钻分别在左侧颅骨钻6个孔,用眼科剪翻开左侧颅骨,暴露左侧脑硬脑膜,用虹膜剪轻轻剪开硬脑膜,露出软脑膜,使用沾了生理盐水的棉签轻轻擦拭(在解剖显微镜下),至镜下见不到血管为止,缝合皮肤。

该模型具有以下优点:①适于做长期的皮质及皮质下结构的病理观察,同时该模型造成皮质缺血的部位、大小恒定;

②模型的重复性较好,手术相对简单。缺点:①打开蛛网膜下腔,可能导致脑脊液漏;②打开硬脑膜时可能损及硬脑膜窦,导致大量出血。

2 脑出血动物模型的制作

2.1 自体血注入法脑出血模型

脑内直接注入自体血是经典的脑出血模型,通常经股动脉采集自体血^[20],由于注入的血是非肝素化自体血,可观察到血液凝固过程中释放的血管活性物质对脑循环及脑组织的影响,与临床脑出血的过程较接近。采血后再利用立体定向仪将自体血准确注入大鼠相应的脑区,注血量的多少应根据动物脑体积的大小而定。Nath等^[21]采用的鼠脑注血量分别为25 μ l、50 μ l和100 μ l,分别相当于人脑20ml、40ml和80ml的出血量,这是造成临床上不同严重程度脑出血的出血量。

该模型优点:①操作简单,特别是采用立体定位仪,出血部位定位准确,可有效减少实验动物死亡率;②出血病理过程与人类脑出血更为接近,适合于脑实质出血的自然过程、病理形态学等特点的研究,还可更好地观察血液凝固过程中各种因子对脑组织代谢和血流影响,为临床治疗提供一定依据^[22]。缺点:穿刺针道可损伤脑实质,可能出现脑脊液漏。

2.2 自发性脑出血模型

高血压是脑卒中常见的脑血管病变的生理基础,因此可采用自发性高血压鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)作为模型动物,该鼠出生后数周开始自发性血压升高,峰值可达220mmHg,它们对脑血管闭塞较正常大鼠敏感很多,结扎SHR的大脑中动脉比正常血压大鼠产生更大的皮质梗死灶^[23-24]。在SHR基础上培育出的易卒中性高血压大鼠(stroke-prone strain of SHR, SHRSP),其血压更高,自发性脑出血或脑梗死发生率可达60%—80%,其卒中发生的部位主要在前内侧皮质、枕皮质和基底节^[25]。SHRSR是研究高血压动脉硬化性脑卒中较理想的动物模型^[26]。肾性高血压模型近年来也被广泛运用,实验通过双肾双夹法成功制备肾性高血压大鼠,待血压峰值稳定在195mmHg以上时,使之具备与临床脑卒中相似的脑血管基础病变^[27]。

该模型的优点是:将高血压、卒中有机结合起来,兼顾了脑卒中的病理生理基础。缺点:①SHR和SHRSP只代表遗传学上的一个小群体,与原发性高血压患者的性质有很大差异,且鼠源有限,饲养困难;②肾性高血压模型的脑卒中模型制作方法较复杂,造模时间长。

2.3 胶原酶注入法脑出血模型

胶原酶是一种金属蛋白酶,可以分解细胞间基质及血管基底膜上的胶原蛋白,主要分布人体的脑血管周围,存在于巨噬细胞和单核细胞内。病理情况下其可以从细胞中释放出来并被激活。Rosenberg等^[28]于1990年建立的胶原酶诱导

脑出血模型已被广泛采用。将SD大鼠麻醉局部消毒后固定于脑立体定位仪上,颅骨钻孔,定位右侧尾壳核,颅骨钻孔将微量注射器针头垂直插入脑组织右侧尾壳核内,用微量注射器缓注0.5μl胶原酶到尾壳核内^[29-30]。适用于研究血肿及脑水肿在脑出血中的作用及评价脑出血后神经功能的恢复状况和药物的治疗效果。

此模型特点是:①操作简单,重复性好;②与临床上脑出血的病理、生化及病理生理有许多相似性;③采用脑立体定位胶原酶注射方法诱导脑出血,血肿快速形成,形态一致,重复性好;④脑出血大小控制使大鼠神经体征表现轻,有利于行为学观测。缺点:①该模型存在出血部位的定位、出血量

和血肿大小控制、胶原酶停留时间等对手术影响较大的因素,故稳定性较差;②出血以弥漫性出血为主,并非真正意义上的血肿,且出血灶中常混有正常脑组织与临床自发性脑出血的发病不同。

综上,无论是脑缺血动物模型还是脑出血动物模型,各模型都具有各自不同的特点。可以根据不同研究目的选择适合的模型。在此,我们归纳总结了各模型优缺点(表1)。但是还有许多脑卒中的动物模型由于模型本身的特点目前已较少运用或还处于研究阶段而没有包括在本综述内,如注入栓塞剂法、气囊闭塞法、硅酮球栓塞法、新生大鼠缺血模型等。

表1 脑卒中动物模型的优缺点比较

模型	优点	缺点
线栓法脑缺血模型	缺血部位恒定;不需开颅,避免了颅内环境的改变和感染;能准确控制缺血和再通的时间;并发症少,死亡率低。	对实验动物体重有要求;手术操作有一定难度;与人类脑卒中存在一定差异。
开颅电凝法脑缺血模型	实验条件较恒定;缺血效果可靠;手术中出血量少。	需开颅,创伤性大;可引起脑积液漏,损伤脑组织,感染几率高;闭塞血管后无法进行再灌注性研究。
光化学法脑缺血模型	造模成功率高;无需开颅,死亡率低;可通过控制实验参数,任意改变梗死灶的大小、位置、程度;适用于慢性脑缺血研究。	与人类脑卒中存在差异;属于终末动脉永久性闭塞,妨碍扩血管药的治疗观察。
微栓子栓塞法脑缺血模型	非侵入,易操作;栓子的选择多样性;与临床的栓塞性卒中中相似。	栓子的制作复杂;缺少对血凝块分布的控制;缺乏梗死位置、大小的一致性。
去除大鼠脑左侧皮层血管法脑缺血模型	模型重复性好;手术操作相对简单;适用于做长期皮质及皮质下结构的病例观察。	手术创伤性大;可能损伤脑脊液或/和硬脑膜窦,导致大出血。
自体血注入法脑出血模型	操作简单,死亡率低;定位准确,出血量可控制;与人类脑出血病理过程相似。	穿刺针道损可损伤脑实质,可能出现脑脊液漏;
自发性脑出血模型	将高血压与脑卒中中较好的结合;适用于高血压导致的脑出血病理生理机制的研究。	SHR高血压大鼠只代表遗传学上的一个小群体;与原发性高血压患者的性质有很大差异;鼠源有限,饲养困难。
胶原酶注入法脑出血模型	操作简单;与临床上脑出血的病理、生化及病理生理有许多相似性;采用脑立体定位胶原酶注射方法诱导脑出血,血肿快速形成,形态一致,重复性好。	手术的影响因素较多,稳定性较差;出血以弥漫性出血为主,非真正血肿。

3 小结

随着人们对脑卒中的不断研究探索,建立标准化脑卒中动物模型已逐渐成为共识,即尽可能按照国际通用标准建立规范化的动物模型操作,使动物实验中的各处理因素和影响因素统一化,减少对实验结果的影响,尽可能地提高与人类脑卒中发病过程的一致性,但这将是一个长期的探索过程。

参考文献

[1] Mhairi Macrae I. New models of focal cerebral ischaemia[J]. Br J Clin Pharmacol, 1992, 34(4): 302—308.
[2] Koizumi J, Min Z, Imanaka T, et al. Temperature-dependent

plasmid integration into and excision from the chromosome of *Bacillus stearothermophilus*[J]. J Gen Microbiol, 1986, 132(7): 1951—1958.
[3] Braeuninger S, Kleinschnitz C. Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems [J]. Exp Transl Stroke Med, 2009, 1:8.
[4] 炎彬,邢东明,孙虹.卒中后抑郁小鼠模型的研制及其脑内神经核团相关递质的动态变化[R].国际神经精神药理学会(CINP)亚太地区大会,2004,278:46—47.
[5] 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.
- [6] 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.
- [7] Chauveau F, Moucharrafe S, Wiart M, et al. In vivo MRI assessment of permanent middle cerebral artery occlusion by electrocoagulation: pitfalls of procedure[J]. Exp Transl Stroke Med, 2010, 2(1):4.
- [8] Roof RL, Schielke GP, Ren X, et al. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats[J]. Stroke, 2001, 32(11):2648—2657.
- [9] Coyle P. Middle cerebral artery occlusion in the young rat[J]. Stroke, 1982, 13(6):855—859.
- [10] 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.
- [11] Futrell N. An improved photochemical model of embolic cerebral infarction in rats[J]. Stroke, 1991, 22(2):225—232.
- [12] De Ryck M, Van Reempts J, Borgers M, et al. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats[J]. Stroke, 1989, 20(10):1383—1390.
- [13] Chen F, Suzuki Y, Nagai N, et al. Rodent stroke induced by photochemical occlusion of proximal middle cerebral artery: evolution monitored with MR imaging and histopathology[J]. Eur J Radiol, 2007, 63(1):68—75.
- [14] 郑冲,吴刚.局灶性脑缺血动物模型制作方法的概述[J].中国卒中杂志,2008,3(8):603—607.
- [15] 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.
- [16] Rynkowski MA, Kim GH, Komotar RJ, et al. A mouse model of intracerebral hemorrhage using autologous blood infusion[J]. Nat Protoc, 2008, 3(1):122—128.
- [17] Purdy PD, Horowitz MB, Mathews D, et al. Calcium 45 autoradiography and dual-isotope single-photon emission CT in a canine model of cerebral ischemia and middle cerebral artery occlusion[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 1996, 17(6):1161—1170.
- [18] Susumu T, Yoshikawa T, Akiyoshi Y, et al. Effects of intra-arterial urokinase on a non-human primate thromboembolic stroke model[J]. Pharmacol Sci, 2006, 100(4):278—284.
- [19] 司银楚,朱培纯,吴海霞.去大脑皮层血管痴呆模型的建立及评价[J].中国中医基础医学杂志,2001,7(2):46—49.
- [20] Wan S, Zhan R, Zheng S, et al. Activation of c-Jun-N-terminal kinase in a rat model of intracerebral hemorrhage: the role of iron[J]. Neuroscience Research, 2009, 63(2):100—105.
- [21] Nath FP, Jenkins A, Mendelow AD, et al. Early hemodynamic changes in experimental intracerebral hemorrhage[J]. Neurosurg, 1986, 65(5):697—703.
- [22] 张祥建,刘春燕,祝春华,等.大鼠自体动脉血脑出血动物模型的建立[J].脑与神经疾病杂志,2003,11(6):341—344.
- [23] Wakisaka Y, Chu Y, Miller JD, et al. Critical role for copper/zinc-superoxide dismutase in preventing spontaneous intracerebral hemorrhage during acute and chronic hypertension in mice[J]. Stroke, 2010, 41(4):790—797.
- [24] Wakisaka Y, Chu Y, Miller JD, et al. Spontaneous intracerebral hemorrhage during acute and chronic hypertension in mice[J]. Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(1):56—69.
- [25] 刘建文.药理实验方法学——新技术与新方法[M].北京:化学工业出版社,2007.10.
- [26] McBride MW, Brosnan MJ, Mathers J, et al. Reduction of Gstm1 expression in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat contributes to increased oxidative stress[J]. Hypertension, 2005, 45(4):786—792.
- [27] Zeng J, Zhang Y, Mo J, et al. Two-kidney, two clip renovascular hypertensive rats can be used as stroke-prone rats[J]. Stroke, 1998, 29(8):1708—1713; discussion 1713—1714.
- [28] Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1990, 21(5):801—807.
- [29] Nguyen AP, Huynh HD, Sjøvold SB, et al. Progressive brain damage and alterations in dendritic arborization after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Curr Neurovasc Res, 2008, 5(3):171—177.
- [30] Warkentin LM, Auriat AM, Wolk S, et al. Failure of deferoxamine, an iron chelator, to improve outcome after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Brain Res, 2010, 1309:95—103.