

·基础研究·

最佳线栓头端直径建立对小鼠脑缺血再灌注模型成功率的影响*

张文芳¹ 王东^{1,2} 崔景晶^{1,3,4}

摘要

目的:改良的Zea-Longa线栓法建立小鼠(25—30g)脑缺血再灌注模型,以确定最佳线栓头端直径。

方法:将140只健康雄性C57BL/6J、体重25—30g小鼠,随机分为假手术组和模型组,模型组再根据线栓头端直径大小分为0.24mm组,0.25mm组,0.26mm组,0.27mm组,0.28mm组及0.29mm组,每组各20只小鼠。采用头端直径不同大小的线栓制作右侧大脑中动脉阻塞再灌注模型。缺血1h后,进行脑多普勒血流检测、核磁共振血管成像及T2加权成像(T2WI),恢复血流灌注24h后进行神经行为学评分及TTC染色,明确最佳线栓头端直径建立脑缺血再灌注模型。

结果:与假手术组相比,体重25—30g小鼠,线栓头端直径在0.25mm—0.28mm之间都可以形成梗死灶。与其他组相比,线栓头端直径为0.26mm,Longa评分在1—3分最多、梗死面积最大(0.26mm vs 0.24mm、0.25mm、0.28mm、0.29mm P<0.0001);线栓头端直径小于0.24mm或大于0.29mm,都不能形成梗死。多普勒血流仪检测、核磁共振血管成像及T2加权成像(T2WI)显示,与假手术组相比,0.26mm组线栓头端能够完全堵塞大脑中动脉血流,损伤侧血运与对侧相比,血运降至0,成功建立脑梗死模型。

结论:小鼠局灶性脑缺血再灌注模型的成功率与线栓头端直径大小密切相关,体重为25—30g小鼠用直径为0.26mm的线栓成功率最高。

关键词 线栓法;线栓头端直径;脑梗死;大脑中动脉阻塞;磁共振血管成像;T2加权成像;

中图分类号:R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-04-0386-06

The best tip diameter of the suture established the middle cerebral artery occlusion mouse model/
ZHANG Wenfang, WANG Dong, CUI Jingjing//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(4):
386—391

Abstract

Objective: To determine the optimal tip diameter of the suture, we established the model of cerebral ischemia reperfusion in mice (25—30g) by the improved zea-longa method.

Method: One hundred and forty healthy male mice(C57BL/6J, 25—30g) were randomly divided into the sham operation group and the experimental group. According to the tip diameter of the suture, the mice in the experimental group were divided into the 0.24mm group, 0.25mm group, 0.26mm group, 0.27mm group, 0.28mm group and 0.29mm group; and each group has 20 mice respectively. The model of right middle cerebral artery occlusion(MCAO) and reperfusion was made by using a different tip diameter of the suture. Transcranial Doppler(TCD),magnetic resonance angiography (MRA) and T2 weighted imaging (T2WI) were performed for each mouse 1h after ischemia. Neurobehavioral score and TTC staining were measured 24h after the reperfusion.

Result: The area of infarct was formed between 0.25mm and 0.28mm in diameter at the end of the round

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.04.004

*基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2014HM026);国家青年科学基金项目(81701301);山东省高校科研基金项目(J14LL01)

1 滨州医学院临床医学院,山东省烟台市,264000; 2 滨州医学院烟台附属医院; 3 滨州医学院附属医院; 4 通讯作者

作者简介:张文芳,女,硕士研究生; 收稿日期:2018-11-04

bolt. Compared with other groups, the 0.26 mm group had the most mice with a Longa score between 1—3, and the biggest infarction area (0.26 mm vs. 0.24 mm, 0.25 mm, 0.28 mm, 0.29 mm ($P<0.0001$)); In the groups using a tip diameter of the suture less than 0.24mm or more than 0.29mm, the infarction area was not formed. DCT, MRA and T2WI results showed that, rather than the sham operation group, the middle cerebral artery blood flow could be completely blocked, and the blood flow was reduced to 0 compared with the ipsilateral area with the tip of the 0.26mm; that is, the cerebral infarction model was successfully established.

Conclusion: The success rate of middle cerebral artery occlusion is firmly related to the tip diameter of the suture. The diameter of 0.26mm tip of the suture is the best choice for middle cerebral artery occlusion in mice with a body weight of 25—30g.

Author's address Department of Biomedical Research Center, Binzhou Medical University, Yantai City, Shandong Province, 264000

Key word Zea-Longa method; diameter of the suture; the middle cerebral artery occlusion; MRA; T2WI

急性缺血性脑梗死是一种常见的神经血管疾病。据Framingham流行病学研究表明,65%的脑卒中来源于大脑中动脉堵塞^[1-2]。建立大脑中动脉堵塞动物模型一直是脑缺血疾病机制研究最重要的研究方法之一。线栓法由于其创伤小、避免了开颅,缺血时间和再灌注时间易于控制,成本小等优点,被广泛应用于大脑中动脉栓塞^[3-5]。许多研究人员通过研究线栓的材质、插入深度及缺血再灌注时间来改良缺血再灌注模型。但是,由于受小鼠品系、性别、体重、年龄、材质、解剖结构及操作人员手法的差异性影响^[6-8],该模型的成功率及梗死面积的稳定性仍然很低。

目前现有文献对于线栓头端直径的研究较少,研究者大多根据经验选取线栓,造成了资源、时间浪费及后期实验数据的不稳定^[9-10]。本文系统研究体重25—30g雄性小鼠,运用线栓法建立局灶性脑缺血模型时选用不同线栓直径对造模成功率、Longa评分、脑梗死体积等的影响。线栓头端直径选用0.24—0.29mm,在保证其他可控变量(操作手法、熟练程度,实验动物品种、品系、性别、质量、年龄,线栓材质,缺血及再灌注时间、周围环境温度等)一致的前提下,得出最佳线栓头端直径,为脑卒中基础实验研究提供简单可靠、节约时间和资源的建模方法依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级成年健康雄性C57BL/6J,体重25—30g小鼠140只,8—10周,体重25—30g,购于济南朋悦实验动物中心。研究试验机构地点名称:滨州医学

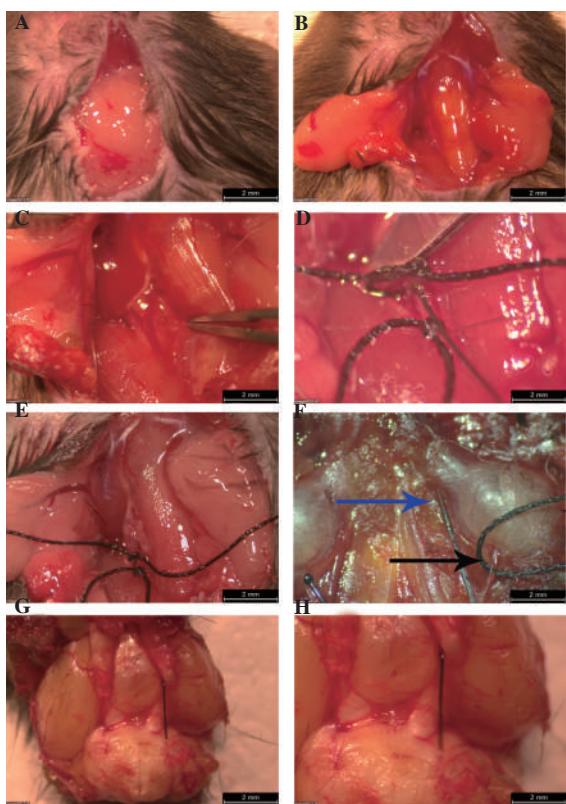
院医药研究中心。实验过程中动物的饲养及处置遵循国际实验动物伦理及滨州医学院实验动物伦理的相关规定。

将实验动物随机分成7组,每组20只。假手术组(20只,死亡0只),模型组6组,线栓头端直径0.24mm(20只,死亡0只),线栓头端直径0.25mm(20只,死亡0只),线栓头端直径0.26mm(20只,死亡1只),线栓头端直径0.27mm(20只,死亡3只),线栓头端直径0.28mm(20只,死亡5只),线栓头端直径0.29mm(20只,死亡2只)。

1.2 动物模型的制备

取黑色6—0号单纤丝尼龙线,将头端用蚊香烫成球形,在需要的长度处标记(12mm),将此线浸泡消毒,用前在肝素生理盐水中浸泡。呼吸机麻醉(美国MATRX动物麻醉机)通过面罩,使用异氟烷和氧气混合气体,输出压力不超过0.4MPA,氧气流量300ml/min,诱导麻醉异氟烷的吸入浓度为3%,手术中根据小鼠的呼吸调节麻醉浓度并保持在0.5%—1%之间。小鼠仰卧位固定于手术台上,并保持呼吸道通畅。用酒精消毒颈部,颈部正中切口,钝性分离下颌下腺。显微镜下找到颈总动脉(图1A-B),用显微镊钝性分离颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉(图1C)。用丝线结扎颈内动脉的远心端,近心端打一松结,使用微血管夹夹闭颈总动脉的近心端。用显微手术剪在两结扎线之间剪开一小口,将已准备好的线栓插入颈总动脉处,将松结扎紧,松开微血管夹,轻轻上提颈外动脉,使线栓缓缓沿着颈内动脉方向插入至大脑中动脉分叉处。线栓进入深度0.9cm

图1 MACO模型制备过程



黑色箭头指翼颤动脉

左右,直至感到前方稍有阻力,停止插入线栓。造模后的小鼠放在恒温孵育装置中,确保小鼠肛内温度为 $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$,在缺血1h,再灌注24h处理小鼠(图1)。

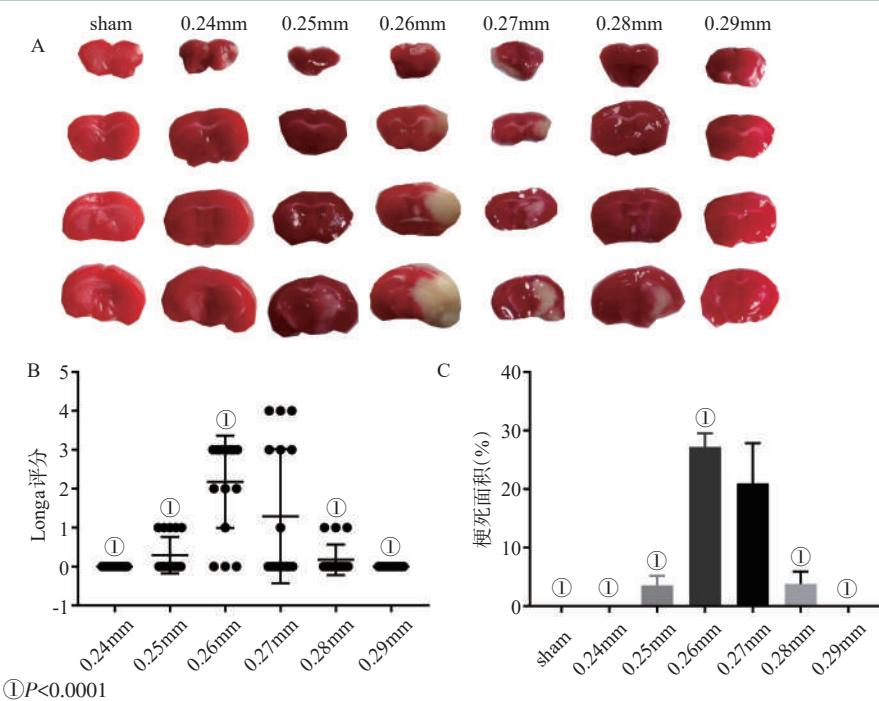
1.3 神经行为学评分

缺血1h再灌注24h后,通过改良Longa等^[6]的评分准则进行评分:0分:无神经缺损症状;1分:提尾时左前肢不能内收、完全伸直;2分:行走时向左侧倾倒;3分:向左侧旋转;4分:无自发活动或意识障碍评分在1—3分为造模成功的标准。模型制备完成后,动物虽有缺血症状,但怀疑或者疑似蛛网膜下腔出血者(小鼠在地上翻滚)不纳入模型组。神经症状评分采取单盲法,即观察者不知实验分组。

1.4 脑缺血面积的计算

分别在大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)缺血1h再灌注24h后,断头取脑,自额叶前极起切出5片冠状切片,每片1mm。将切好的脑片放入预先配置好的0.25%的2,3,5-氯化三苯基氯化四唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染液中, 37°C 水浴30min。4%的多聚甲醛固定10min。将固定好的脑片按照切片顺序依次排列,并进行拍照。用Image J计算每片脑组织面积及缺血侧脑组织面积(图2)。脑梗死体积百分比

图2 脑梗死面积



=[总梗死体积 - (梗死侧半球体积 - 梗死对侧半球体积)]/梗死对侧半球体积×100%,其中“梗死侧半球体积 - 梗死对侧半球体积”是为了校正脑水肿对梗死体积大小的影响。

1.5 脑血流监测

小鼠俯卧,头部备皮,剪开额顶部皮肤1cm,暴露颅骨前囟及右侧半颅骨,将激光多普勒探头固定于颅骨右侧大脑中动脉部位(定位以前囟为起点向右2mm,向后6mm),当大脑中动脉血流下降80%及以上,表明造模成功。

1.6 磁共振成像及血管成像

应用7.0T(BioSpec imaging spectrometer, 94/30USR; Bruker Biospin)核磁共振成像仪MR进行磁共振血管成像(magnetic resonance imaging, MRA)、T2加权(T2-weighted MRI scans, T2WI)扫描,质子共振频率为200 MHz,最大梯度强度为100mT/m,重复时间TR=2500ms,恢复时间TE=55ms,图像数据矩阵128×128,扫描厚度0.5mm,视场范围包括大脑、小脑及其左右对应的部位。

1.7 统计学分析

采用GraphPad Prism7.03(San Diego, CA, USA)统计软件进行统计学分析,所得数据以均数±标准差表示,各组数值均经正态性及方差齐性检验,采用单因素方差分析Tukey统计学分析方法。P<0.05认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组之间造模成功率统计

见表1。

2.2 各组小鼠造模后Longa评分结果

假手术组、0.24mm组和0.29mm组Longa评分分0分,说明假手术组无神经功能损害,三组之间评

分并无差异性。0.26mm组和0.27mm组Longa评分明显优于其他组。0.26mm组与假手术组、0.24mm组、0.25mm组、0.28mm组及0.29mm组评分差值有显著差异性,差异有显著性意义(P<0.0001)。尽管0.27mm组Longa评分很高,但与其他各组之间相比无显著差异(P>0.05)。

2.3 脑梗死面积所占的百分比

缺血1h再灌24h后,将各组小鼠取材进行TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)染色,用Image J计算脑梗死面积。0.26mm组梗死面积最大,标准差最小,且与假手术组、0.24mm组、0.25mm组、0.28mm组及0.29mm组间比较有显著性差异(P<0.0001)。0.27mm组梗死面积比假手术组、0.24mm组、0.25mm组、0.28mm组及0.29mm组大,但与各组之间的差异并无显著性意义(P>0.05)。

2.4 脑血流量检测

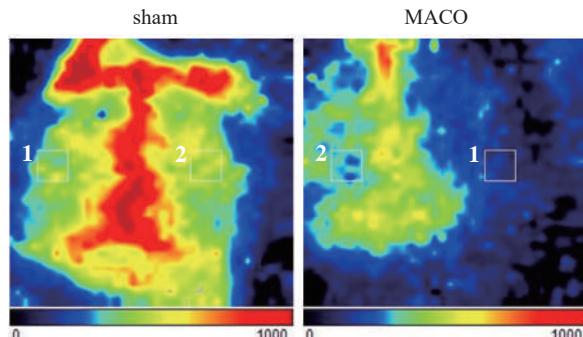
多普勒频谱信号的强度从弱到强颜色变化为蓝色—黄色—红色,血管内含有大量红细胞,红细胞多地方,血流信号强呈现红色,红细胞少的地方血流信号弱呈现蓝色。

图3中所示,与假手术组相比,模型组(0.26mm)缺血侧血流明显降低,由黄色变为蓝色,血流量下降大于等于80%,说明模型组0.26mm的线栓成功阻断了大脑中动脉的血流,脑缺血模型成功建立。

2.5 MRA和T2WI磁共振成像

与假手术组相比,模型组(0.26mm)显示,颈内动脉内插入线栓,线栓头端直径0.26mm完全堵塞了大脑中动脉,使大脑中动脉的分支显示不清;而模

图3 脑血流量检测



“1”:红细胞数目少,血流速度小;“2”:红细胞数目多,血流速度大。

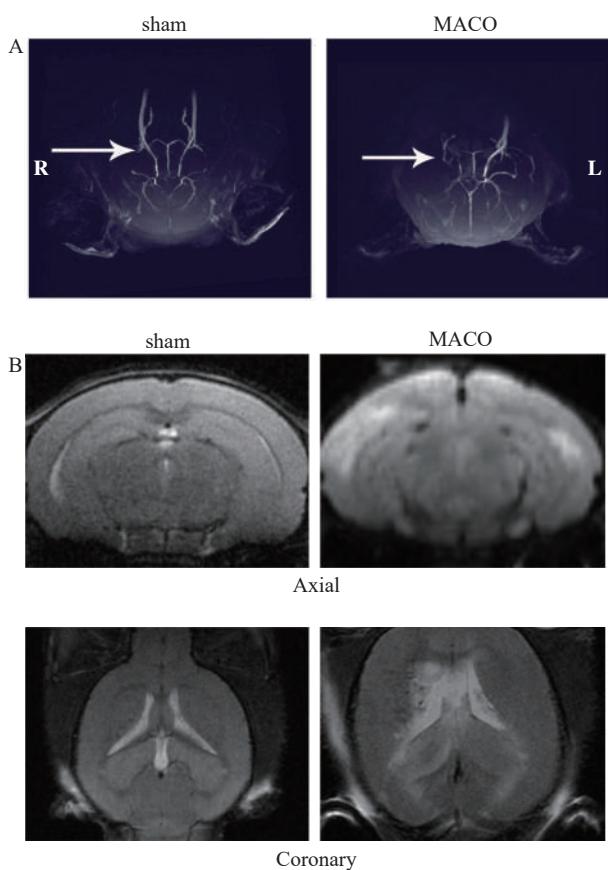
表1 各组之间造模成功率统计

组别	插入受阻 (例)	疑似出血 (例)	死亡 (例)	梗死面积 百分比(%)	成功率 (%)
假手术组	未插线栓	0	0	0	0
0.24mm组	0	0	0	0	0
0.25mm组	0	0	0	3.54±0.06	5/20
0.26mm组	0	1	1	27.72±0.08	18/20
0.27mm组	1	2	3	20.97±0.27	15/20
0.28mm组	6	3	5	3.8±0.08	6/20
0.29mm组	8	0	2	0	0

型组缺血对侧颈内动脉、大脑中动脉及其分支显示清晰。说明线栓头端直径为0.26mm完全能够堵塞大脑中动脉,脑缺血模型成功建立。

图4中小鼠磁共振成像显示:假手术组脑组织双侧对称,密度均匀,无结构改变;而模型组在缺血1h再灌24h后,右侧大脑顶叶、颞叶和外侧尾壳核出现高信号强度区,提示存在脑缺血损伤区,脑缺血再灌注模型成功建立。

图4 小鼠磁共振成像



3 讨论

脑卒中是指急性脑循环障碍所致的部分或者全部脑功能缺损综合征^[5,11]。脑卒中是继心脏病、恶性肿瘤之后的第三大世界致死性疾病,具有发病率高、死亡率高和致残率高的特点,是中国成年人致残的主要原因^[3-4]。其中,缺血性脑卒中占70—80%,缺血性脑卒中是由多种原因的脑内血供障碍,导致脑组织缺血、缺氧,神经元凋亡^[12-13]、坏死,出现相应的

神经功能障碍^[5,8,14]。

脑缺血再灌注动物模型由于与人类脑卒中损伤类似,一直是研究脑血管疾病常用的疾病模型^[15-16]。但是由于受实验物种品种、品系、性别、年龄、体重、操作手法、外界环境、线栓大小及插入深度等多种因素的影响,脑缺血再灌注模型的成功率低^[4,17]。以前研究表明,大脑中动脉的直径和长度与大鼠的体重成正比。体重大于350g的大鼠,必须要有足够粗的线栓头端直径才能够阻塞大脑中动脉的血流;相反,体重小于240g的大鼠,由于线栓头端直径过大,使得线栓插入困难,脑缺血再灌注成功率低。大鼠体重在240—350g之间,线栓头端0.33—0.34mm,成模率高、脑梗死面积稳定、成本较低^[17]。然而,目前并没有对小鼠的脑缺血再灌注模型线栓头端直径进行研究。本研究选用了脑缺血研究中最常用的建模体重(25—30g)与线栓头端直径(0.24—0.29mm),得出最佳线栓头端直径。

脑梗死面积是评价脑梗死治疗效果的重要指标之一。一个理想的脑卒中模型应该是梗死部位和梗死面积较为统一,稳定性及重复性高^[18-19]。大多数研究者,梗死部位及面积并不一致,造成实验结果可信度降低^[19-22]。TTC染色及Longa评分结果表明,体重25—30g小鼠,用0.26mm线栓头端直径,脑梗死面积最大(27.72 ± 0.08)mm²,且重复性及成功率较高。0.27mm线栓头端直径与0.26mm线栓头端直径相比,虽然梗死面积较其他组高(20.97 ± 0.27)mm²,但是梗死面积不稳定,个体差异较大,加之线栓易造成出血,0.27mm的线栓并不作为首选。线栓头端直径小于0.25mm的线栓,虽然能够顺利插入,梗死面积很小甚至不能形成梗死灶。这说明头端直径小于0.25mm的线栓并没有堵塞或者完全堵塞大脑中动脉的血流。线栓头端直径大于0.28mm线栓插入受阻,尽管数据显示有线栓能插入脑内,但TTC染色显示并无梗死灶产生。说明线栓可能存在插入部位不正确,存在误入翼颤动脉或血管被插破的可能性。

脑缺血再灌注造成Na⁺/K⁺泵功能受损,细胞内Na⁺离子积聚,短时间内造成细胞水肿^[19,22]。核磁共振成像技术对于梗死区水分的变化非常敏感,可明确梗死灶^[12]。与假手术组相比,0.26mm组T2加权成像显示明显的高信号,表明细胞水肿明显,特别是

皮层部位(图4)水肿明显^[23]。MRA能够清晰显示Willis环,0.26mm组大脑中动脉的中央支(豆纹动脉)显示不清,脑多普勒血流仪显示其血流明显下降,提示头端为0.26mm的线栓造模成功。

综上所述,本研究表明对于体重25—30g的小鼠,使用线栓头端直径为0.26mm的线栓造模的成功率、重复性、稳定性高,死亡率及成本低,有利于推动脑卒中的基础研究。

参考文献

- [1] Hamilton NB, Kolodziejczyk K, Kougioumtzidou E, et al. Proton-gated Ca(2+)-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia[J]. Nature, 2016, 529(7587):523—7.
- [2] Deng Y, Wang ZV, Gordillo R, et al. An adipo-biliary-uridine axis that regulates energy homeostasis[J]. Science, 2017 Mar 17. doi: 10.1126/science.aaf5375.
- [3] Geng J, Zhang Y, Li S, et al. Metabolomic profiling reveals that reprogramming of cerebral glucose metabolism is involved in ischemic preconditioning-induced neuroprotection in a rodent model of ischemic stroke[J]. J Proteome Res, 2019, 18:57—68.
- [4] Laugesen E, Høyem P, Thrysoe S, et al. Negative carotid artery remodeling in early type 2 diabetes mellitus and increased carotid plaque vulnerability in obesity as assessed by magnetic resonance imaging[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(16):e008677
- [5] Sakai Y, Delman BN, Fifi JT, et al. Estimation of ischemic core volume using computed tomographic perfusion[J]. Stroke, 2018, 49(10):2345—52.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84—91.
- [7] Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M. Rat middle cerebral artery occlusion using an intraluminal thread technique[J]. Acta neurochirurgica, 1991, 109(3—4):126—132.
- [8] Zhang X-H, Dai J, Qiu Y-M, et al. Neuroprotective effect of baicalin on focal cerebral ischemia in rats[J]. Neural Regen Res, 2018, 13(12):2129.
- [9] Sieber MW, Guenther M, Kohl M, et al. Inter-age variability of bona fide unvaried transcripts Normalization of quantitative PCR data in ischemic stroke[J]. Neurobiol Aging, 2010, 31(4):654—64.
- [10] Yuan F, Tang Y, Lin X, et al. Optimizing suture middle cerebral artery occlusion model in C57BL/6 mice circumvents posterior communicating artery dysplasia[J]. J neu-rotrauma, 2012, 29(7):1499—505.
- [11] Billoir P, Barbay V, Joly LM, et al. Anti-Xa oral anticoagulant plasma concentration assay in real life: rivaroxaban and apixaban quantification in emergency with LMWH calibrator[J]. Ann Pharmacother, 2018 Oct 31.doi: 10.1177/1060028018811657. [Epub ahead of print].
- [12] Miao M, Cao L, Li R, et al. Protective effect of chlorogenic acid on the focal cerebral ischemia reperfusion rat model [J]. Saudi Pharm J, 2017, 25(4):556—63.
- [13] Thye M, Mirman D. Relative contributions of lesion location and lesion size to predictions of varied language deficits in post-stroke aphasia[J]. NeuroImage Clin, 2018, 20:1129—38.
- [14] Li HZ, Chen JF, Liu M, et al. Effect of hyperbaric oxygen on the permeability of the blood-brain barrier in rats with global cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108:1725—30.
- [15] Head GA, Lim K, Barzel B, et al. Central nervous system dysfunction in obesity-induced hypertension[J]. Curr Hypertens Reports, 2014, 16(9):466.
- [16] da Silva AA, Spradley FT, Granger JP, et al. Brain-mediated antidiabetic, anorexic, and cardiovascular actions of leptin require melanocortin-4 receptor signaling[J]. J neurophysiol, 2015, 113(7):2786—91.
- [17] Tang Q, Han R, Xiao H, et al. Role of suture diameter and vessel insertion position in the establishment of the middle cerebral artery occlusion rat model[J]. Exp and Ther Med, 2013, 5(6):1603—8.
- [18] Herb Brody, Michelle Grayson, Brian Owens, et al. Stroke [J]. Nature. 2014;510(7506):S1.
- [19] El-Ghanem M, Al-Mufti F, Thulasi V, et al. Expanding the treatment window for ischemic stroke through the application of novel system-based technology[J]. Neurosurg Focus, 2017, 42(4):E7.
- [20] Prpic V, Watson PM, Frampton IC, et al. Differential mechanisms and development of leptin resistance in A/J versus C57BL/6J mice during diet-induced obesity[J]. Endocrinology, 2003, 144(4):1155—63.
- [21] Satriotomo I, Bowen KK, Vemuganti R. JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia[J]. J Neurochem, 2006, 98(5):1353—68.
- [22] Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(7):1269—78.
- [23] Jin Y, Kim IY, Kim ID, et al. Biodegradable gelatin microspheres enhance the neuroprotective potency of osteopontin via quick and sustained release in the post-ischemic brain [J]. Acta Biomater, 2014, 10(7):3126—35.