

急性缺血性脑梗死动物模型研究进展

司马林源 李丹东 张 弩

摘 要 急性缺血性脑梗死(acute ischemic cerebral infarct)是指脑供血动脉狭窄或闭塞引起的缺血性脑卒中,占脑卒中的60%~80%,病情严重可致患者死亡,亦可发生在颈内动脉和椎动脉。为更好模拟人脑缺血梗死的发生及损伤机制,科研工作者们发明并改良了各种动物模型。本文就急性缺血性脑梗死动物模型研究进展进行综述。

关键词 脑梗死 实验动物 模型

中图分类号 R651

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.046

急性脑梗死是最常见的脑卒中类型,急性期的时间划分目前未形成统一意见,常指起病2周以内,患者年病死/致残率为33.4%~44.6%^[1],而随着社会的高速发展物质的极大化,以及中国老龄化社会的到来,发生脑梗死的危险因素和危险人群的增多,相信这一数据还会有所升高。我们也将面临严峻的医疗考验。建立稳定、接近疾病发生的生理病理过程及实验重复性好的动物模型对急性缺血性脑梗死的研究尤为重要。本文对急性缺血性脑梗死动物模型的选择动物、各模型的制作方法、模型之间的比较及展望进行综述。

一、选择实验动物

脑梗死动物模型多选择啮齿类动物,因其个体小易饲养,方便管理及生长周期短,主要优势是饲养成本很低,亦大量前人的实验研究积累了许多权威可借鉴的实验资料,对啮齿类动物的生理、药理、病理、行为学及遗传学等有较深入的认识。其中大鼠脑血管与人脑血管解剖结构相近且基因与人基因同源性较高,以及小脑容量很适合固定手术。兔的脑供血主要来源于颈内动脉,颅内血管间没有吻合网,其大脑中动脉主干梗死后,侧支循环对大脑中动脉供血区的代偿作用小,脑内血管间的端端吻合发达程度与人脑类似。猫犬类神经系统发达,猪、羊灰白质分布,以及形态学、神经系统发育的演变和人脑相似,并具有良好的手术耐受性,灵长类动物模型它们脑血管解剖生理学更符合人类的实际临床情况,同时可模拟的因素

包括年龄、高血压、糖尿病、高脂血症、吸烟、喝酒等。但因其伦理负担大、繁殖能力低、来源受限、成本高而受到限制。单从动物选择方面看,没有统一标准,也说明要模拟人脑和临床实际的复杂程度,科研工作者可根据自身实验要求选择相应的动物来完成模型的制造。

二、模型制作

脑梗死动物模型相关的文献研究有很多,其极大地促进了我们理解关于脑梗死的危险因素和病理生理学,但基本上是在已有的研究方式上进行改良,脑梗死模型主要分为3大类:①机械阻断法;②栓子栓塞法;③全脑梗死动物模型。其各自制作方法及特点如下。

1. 机械阻断法:包括开颅直视下血管血管夹夹闭、缝线结扎、套管结扎、电凝烧灼,开颅法因其对手术操作、器械要求和动物高感染率、致死率,不断有学者进行改进^[2,3]。不开颅血管内线栓梗死。实验动物涉及灵长类动物、猪、羊、狗、猫、兔子、啮齿类动物。20世纪90年代大脑中动脉线栓梗死模型在啮齿类动物身上被提出,该模型会产生脑缺血和再灌注位置主要包括额叶皮质和前额叶皮质的损伤^[4]。线栓材料从一开始的外科缝线慢慢演变到钓鱼线,再到有专门的生产商生产。线栓选用要求柔软但足以让它沿血管前进,从颈外动脉插入,大鼠模型线栓直径为17~20mm,插入深度约2cm,小鼠模型线栓直径为10~11mm,插入深度约1cm^[5,6]。此模型由于线栓可拔出,梗死相关区域血流可再通,便于研究缺血再灌注损伤。最常见的中动脉梗死持续时间为60、90、120min或永久闭塞,但至少需要60~90min老鼠才能获得较为稳定的梗死体积^[7]。该模型促进人们不断认识钙过量兴奋中毒、钙调节异常、血管新生、白质

基金项目:浙江省科技厅公益技术研究社会发展项目(2015C33144)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院神经外科

通讯作者:张弩,主任医师,电子信箱:zhangnu65@163.com

重构、炎性反应等缺血性损伤的机制,恢复治疗和神经保护。随着梗死时间的延长,动物死亡率也逐渐升高,可能与大脑皮质和纹状体的梗死有关^[8]。其缺点也很明确不能复制脑卒中患者的血流动力学特征,此外还有相关术后并发症如蛛网膜下腔出血、病变体积的变化、下丘脑损伤。但由于线栓模型动物消除了颅骨切除术相关问题其低死亡率以及模型成功率高逐渐成熟并推广,并随着材料的不断发展而发展^[9]。

2. 栓子栓塞法:文献报道大部分脑梗死患者是因为血栓掉落梗死大脑相应的供血血管发病的。所以研究血栓梗死动物模型意义重大。该方法使用的栓子包括异种异体血栓、同种异体血栓、自体血栓、胶原蛋白、黏性硅酮、聚乙氧基硅氧烷、异源动脉粥样斑块,实验常用的动物有啮齿类动物、兔子、犬类动物、灵长类动物。栓子直接注射到颈总动脉或颈内动脉。当栓子($<50\mu\text{m}$)可引起较小面积的梗死,类似于脑小血管多发梗死病灶^[10]。所以栓子大小、数量、分布可能会决定脑梗死的体积,该模型更多依赖栓子材料的选择,可用于小面积梗死相关神经保护与治疗。大部分微栓子栓塞造模与血栓栓塞法造模制作方法类似,在大鼠身上血栓法使用 EP-50 管(外径 0.96mm,内径 0.58mm)吸满无菌生理盐水,然后吸取已制好的血栓长约 25mm,从颈外动脉插入然后再进入颈内动脉约 2~3mm,缓慢注入血栓。有文献报道模型成功后同侧的大脑中动脉供血区域脑血流量会减少 43%,进一步核磁共振成像显示梗死时间 24~48h 的老鼠脑组织的自溶速率和时间类似于临床患者的情况^[11]。光化学诱导动物模型,该方法通过血管内注射光感染料 Rose Bengal 后透过颅骨光照目标血管,其形成机制可能是光照的目标血管臭氧形成,血管内皮损伤,血小板聚集,栓子形成引起微血管梗死辐射区次级缺血^[12-14]。该模型优点是动物有长期的感觉运动缺陷便于长期观察且有较长的生存期。模型的光照过程是非侵入性的,半透明的头骨透过的光照量是足够的。该模型可用于梗死后行为学的研究和了解大脑皮质某些特定解剖功能区域。且适合研究影响血小板的治疗药物和内皮损伤相关反应。但由于光照涉及大量血管无法集中于单个血管,而临床患者多为单一终末端动脉被阻塞。另外光照直接对脑实质细胞的损伤不能被忽视。Kurz 1990 年首次报道了氯化铁可诱发血栓形成。一种新的动物脑梗死模型被发明,该模型需开颅直视下将浸泡过氯化铁的滤纸片覆盖在目标血管上约 30min 左右,现有的报

道认为此模型可重复且稳定,另外没有与手术相关的死亡,改良型钻孔氯化铁法报道其成功率、脑梗死体积、脑水肿程度优于经典线栓模型^[15,16]。

3. 全脑梗死动物模型:该模型制作方法包括:4-VO 模型,3-VO 模型,2-VO 模型,心室颤动法模型,颈部止血带法模型^[7-25]。其中 4-VO 模型,3-VO 模型,2-VO 模型是在同一种制作方法的基础上针对不同血管进行结扎操作,同时也使各个模型具有了不同的意义和研究价值。4-VO 模型被开发出来是为了研究可逆性双侧前脑和脑干缺血,该模型包括双侧椎动脉的永久闭塞和在手术第 1 天里第 2 天里实施两次双侧颈总动脉的短暂闭塞。该模型脑血流量的变化与神经损伤的位置和程度有关,但因模型制作的创口出血和创伤大小导致动物的高死亡率。3-VO 模型是闭塞基底动脉加临时双侧颈总动脉闭塞,该模型特点是脑组织供血量和神经细胞死亡量人为可控性高;可能是由于脑组织梗死面积可能是由脑供血血流量决定的,文献报道模型成功后实验动物脑供血至少减少 15%。2-VO 模型是在 4-VO 模型的基础上加上降低实验动物的基础血压(降低平均动脉压 50mmHg),该模型使前脑中易梗死的海马体的锥体神经元、尾状体、大脑皮质等梗死,其脑损伤模仿心脏停搏的幸存者。此模型制作成功后操作性更高,侵入性更低,后续康复实验的价值范围更大。心室颤动法模型用于研究心脏停搏后神经元死亡的机制和神经保护药物的疗效,模型制作通过实验动物颈静脉内注射 KCl,及时测量捕捉到平均动脉血压急剧下降,由于其实验过程复杂实验动物低生存率未被推广。颈部止血带法模型大鼠麻醉后高压袖带加压(600~700mmHg),使脑血供减少 1%,通过输液和抽血动脉血压保持在 60mmHg。但不知什么原因一直未被广泛应用。另外还有内皮素-1 灌注诱导血管收缩法、负电流电解损伤法及其他。

三、模型之间的比较

到目前为止,模型还在继续发展改进,几乎没有哪一种模型可以完全如意的模拟真实的自然脑梗死,但所有的动物模型对研究脑梗死的病理生理学机制都意义重大,然而它们又不能完全取代临床相关模型。且至今对于脑梗死动物模型没有明确的统一的标准,所有动物模型都存在这样或那样的问题;体温是被公认可影响脑损伤预后的一个重要因素之一^[26]。所以实验过程动物体温的控制也应考虑进去,另外动物基本上都是健康年轻统一性别的动物,

实验研究表明年轻雌性动物诱导缺血梗死后脑梗死面积比年轻雄性动物更小。此外一些基础疾病像高血压、糖尿病、高胆固醇血症、心房纤维性颤动等高危因素都对脑梗死的发生、发展及预后有着重要影响,所以没有把年龄、性别、基础疾病、并发症等有可能对实验结果产生重大影响的因素考虑进去的实

验也是不够严谨的;当然也有学者开始在患有某些疾病的老鼠身上研究缺血性脑梗死。有些实验设计都存在缺陷如没有使用随机性分组、缺乏随机对照等;还有一些统计学上的错误,所以现如今应该建立一个更为严格的脑梗死模型评价体系。各模型比较见表 1。

表 1 急性缺血性脑梗死动物模型

种类	方法	特点
局部缺血模型		
动脉夹夹闭	夹闭大脑中动脉近端	技术有效组织学结果一致
大脑中动脉结扎	结扎大脑中动脉	病变局限于皮质
电刀电凝法	电凝中断大脑中动脉血流	阻断位置精确
线栓栓塞	线栓插入大脑中动脉起始端	重复性好可恢复再灌注
血栓	血栓形成的凝块	血栓药物研究最好的模型
微栓子	大小不同的化合物和微颗粒	不同栓子引起不同程度的缺血
光照栓子	注射光敏染料	研究特定功能区域
氯化铁	氯化铁贴服	形成自体血栓
全脑缺血模型		
4 - VO	结扎椎动脉和颈总动脉	可逆性前脑和脑干缺血
3 - VO	阻塞颈动脉和基底动脉	脑血流量人为可控性
2 - VO	结扎双侧颈动脉	可逆性前脑缺血
心室颤动法	诱发心室颤动导致停搏	研究停搏引起的神经元损伤
颈部止血带法	袖套高压阻断双侧颈动脉	导致不同的缺血性结果

四、展 望

现有的动物模型还有许多值得改正或改进的地方,学者们也在不断完善动物模型,临床上患者长期卧床合并肺部感染较为常见,一些带有基础疾病的动物模型逐渐被研究,如脑梗死合并肺部感染动物模型^[27]。同时随着一些临床辅助检查技术和计算机软件的发展,相应也推动了动物实验的进展,一些后处理工具允许同时访问多个变量,如 PET/MRI 混合扫描仪强大的计算能力前所未有的展示出脑缺血后组织和神经元细胞之间错综复杂的动态的变化,科技技术很大程度上推进科学实验研究的发展。科学实验不断发展过程中的需求和未知也触发了科学技术的创造,如材料学与影像技术的进步,动物实验研究不能单单局限在动物本身,实验本身就是一项系统工程,我们应该开阔视野,发散思维。在过去,有许多动物实验的研究几乎都是专门分析梗死体积作为缺血性脑损伤的重要指标,但事实上梗死体积不能可靠的反应功能障碍,因为神经功能可能受非梗死脑组织的影响,另外治疗后功能恢复忽视了大脑可塑性的潜力,未来的实验当中应该纳入功能方面的疾病研究。有些实验对疾病动物模型有效,而应用临床则无效,

怎么把基础实验与临床连起来,分析其影响因素,有学者也做了相关研究分析,每一种动物模型的制作以及相关实验展开其最终目的都是服务临床,对现有的疾病提提供新的治疗思路、研发新的治疗药物,而从动物实验运用到临床还有很长的距离。

综上所述,脑梗死动物的选择各有优缺点,造模方法各有各的特点,但尚无一种动物模型可以真正意义上的完全模拟人脑梗死发生、发展及其损伤机制,只有科研工作者不断探索,积极创新,努力寻找到一种更加完美的模拟人脑梗死机制的动物模型,并转化于临床,最终造福临床患者。

参考文献

- 1 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48 (4): 246 - 257
- 2 Anna M, Lidia GB, Verónica B, *et al.* A new method for focal transient cerebral ischaemia by distal compression of the middle cerebral artery [J]. *Neuropathol App Neurobiol*, 2012, 38: 617 - 627
- 3 Alexey S, Elena M, Michael Gal, *et al.* Characteristics of cerebral ischemia in major rat stroke models of middle cerebral artery ligation through craniectomy[J]. *Int J Stroke*, 2012, 9: 1747 - 1749
- 4 Lubjuhn J, Gastens A, von Wilpert G, *et al.* Functional testing in a mouse stroke model induced by occlusion of the distal middle cerebral

- artery[J]. *Neurosci Methods*,2009, 184: 95 – 103
- 5 Guzel A, Rolz R, Nikkhah G, *et al.* A microsurgical procedure for middle cerebral artery occlusion by intraluminal monofilament insertion technique in the rat;a special emphasis on the methodology[J]. *Exp Transl Stroke Med*,2014, 6: 6
- 6 Rupadevi M, Parasuraman S, Rav eendran R. Protocol for middle cerebral artery occlusion by an intraluminal suture method[J]. *Pharmacol Pharmacother*, 2011, 2: 36 – 39
- 7 Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose[J]. *NeuroRx*,2005, 2: 396 – 409
- 8 Hata R, Maeda K, Hermann D, *et al.* Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. *Cereb Blood Flow Metab*,2000, 20: 937 – 946
- 9 Sun WH, Chen HS. A new middle cerebral artery occlusion model for intra – arterial drug infusion in rats[J]. *Neurosci Lett*,2015, 607: 102 – 107
- 10 Gerriets T, Li F, Silva MD, *et al.* The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Neurosci Methods*,2003, 122: 201 – 211
- 11 Ding G, Jiang Q, Li L, *et al.* MRI of combination treatment of embolic stroke in rat with rtPA and atorvastatin[J]. *Neurol Sci* 2006, 246: 139 – 147
- 12 Watson BD, Dietrich WD, Busto R, *et al.* Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis[J]. *Ann Neurol*,1985, 17:497 – 504
- 13 管兴志,匡培根. 光化学法诱导的脑梗死动物模型[J]. *国外医学·脑血管疾病分册*, 2000,1085:278 – 280
- 14 杨峰,赵雅宁,李建民. 光化学法诱导建立大鼠局灶性脑梗死模型的效果评价[J]. *河北联合大学:医学版*,2012; 14 (3) : 301 – 302
- 15 Hulya K,Sefik EE,*et al.* Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl₃ application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies[J]. *J Cerebral Blood Flow Metab*,2011,31: 1452 – 1460
- 16 包玉龙.线栓法与改良三氯化铁法致大鼠脑中动脉闭塞模型的对比研究[J]. *动物医学进展*,2014,35(5) :68 – 71
- 17 Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. *Stroke*,1979,10: 267 – 272
- 18 Li H, Klein G, Sun P, *et al.* Buchan. CoQ10 fails to protect brain against focal and global ischemia in rats[J]. *Brain Res*,2000,877:7 – 11
- 19 严智文,董河,冯伟,等. 改良血管阻塞方法建立大鼠全脑缺血模型[J]. *中国医学创新*,2013, 10(1) :1 – 3
- 20 Kameyama M, Suzuki J, Shirane R, *et al.* A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat – three vessel occlusion model[J]. *Stroke*, 1985, 16: 489 – 493
- 21 张颖,高金环,韩松,等. 一种改良的三血管闭塞小鼠缺血性脑卒中模型的建立[J]. *基础医学与临床*,2017,1(37) :38 – 42
- 22 Eklof B, Siesjö BK. The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid – base parameters and substrate levels in the rat brain[J]. *Acta Physiol Scand*,1972, 86: 528 – 538
- 23 武钊,黄伟青,文锐玲,等. 改良二血管阻断加低血压法制作大鼠全脑缺血再灌注模型[J]. *中国现代药物应用*,2012, 6(19) : 4 – 5
- 24 Kofler J, Hattori K, Sawada M, *et al.* Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice[J]. *Neurosci Methods*,2004, 136: 33 – 44. 21
- 25 Siemkiewicz E, Hansen AJ. Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo – , normo – and hyperglycemic rats[J]. *Acta Neurol Scand*,1978, 58: 1 – 8
- 26 Barber PA, Hoyte L, Colbourne F, *et al.* Temperature-regulated model of focal ischemia in the mouse: a study with histopathological and behavioral outcomes[J]. *Stroke*, 2004, 35:1720 – 1725
- 27 黄亚平,胡克,雷琳,等. 脑梗死合并肺部感染临床动物模型的制作[J]. *中华医院感染学杂志*,2013, 6(23) :1256 – 1258
(收稿日期:2017 – 09 – 12)
(修回日期:2017 – 10 – 07)

(上接第 189 页)

- 15 Boink GJ, Duan L, Nearing BD, *et al.* HCN2/SkM1 gene transfer into canine left bundle branch in a stable stable, autonomically responsive biomass pacing at physiological heart rates[J]. *Am Coll Cardiol*, 2013, 61(11) : 1192 – 1201
- 16 Cingolani E, Yee K, Shehata M, *et al.* Biological pacemaker created by percutaneous gene delivery via venous catheters in a porcine model of complete heart block[J]. *Heart Rhythm*, 2012,9(8) : 1310 – 1318
- 17 Wang J, Bai Y, Li N, *et al.* Pitx2 – microRNA pathway that delimits sinoatrial node development and inhibits predisposition to atrial fibrillation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014,111(25) : 9181 – 9186
- 18 Franco D, Christoffels VM, Campione M. Homeobox transcription factor Pitx2: the rise of an asymmetry gene in cardiogenesis and arrhythmogenesis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24(1) : 23 – 31
- 19 Kapoor N, Liang W, Marban E, *et al.* Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18[J]. *Nat Biotechnol*,2013,31(1) : 54 – 62
- 20 Hu YF, Dawkins JF, Cho HC, *et al.* Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(245) : 245ra94
- 21 Plotnikov AN, Shlapakova I, Szabo MJ, *et al.* Xenografted adult human mesenchymal stem cells provided a platform for cured biological pacemaker function in canine heart[J]. *Circulation*, 2007, 116(7) : 706 – 713
- 22 Cho HC, Kashiwakura Y, Marbán E. Creation of a biological pacemaker by cell fusion[J]. *Circ Res*, 2007, 100(8) : 1112 – 1115
- 23 Chauveau S, Anyukhovsky EP, Ben – Ari M, *et al.* Induced pluripotent stem cell – derived cardiomyocytes provide in vivo biological pacemaker function[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2017, 10(5) : e004508
(收稿日期:2017 – 11 – 02)
(修回日期:2017 – 12 – 04)