

啮齿类脑卒中动物模型的建立

张昕¹, 秦冬冬², 尹勇³

【关键词】 脑卒中; 动物模型; 缺血性脑卒中; 出血性脑卒中

【中图分类号】 R49; R743.3 【DOI】 10.3870/zgkf.2018.02.019

脑卒中是指由于急性脑循环障碍所致的局限或全面性脑功能障碍综合征, 或称为急性脑血管事件。在脑卒中的患者中, 缺血性脑卒中最为常见, 约占总数的 88%, 出血性脑卒中占 9%, 蛛网膜下腔出血约占 3%^[1]。据 2010 年全球疾病负担研究结果显示, 脑卒中作为一个全球性的健康问题, 是影响伤残调整寿命年第 3 位的原因^[2], 而 2015 年美国心脏协会发布的数据显示, 脑卒中的致死率已上升至第 2 位^[3]。因脑卒中的高致死率和致残率, 近年脑卒中的病理生理机制及细胞、分子生物学的相关研究成为近年的研究热点。而啮齿类脑卒中动物模型因其相对廉价、生命力顽强、脑血管解剖结构和生理与人类相似等特点, 被广泛应用于脑卒中疾病相关的研究中。下面本文将分为缺血性脑卒中动物模型的建立、出血性脑卒中动物模型的建立、自发脑卒中动物模型三部分对啮齿类动物模型的制备方法进行综述。

1 缺血性脑卒中动物模型的建立

1.1 栓塞法 大脑中动脉线栓栓塞法 (middle cerebral artery occlusion, MCAo); 传统线栓法: 大鼠固定麻醉后, 常规备皮消毒, 取颈部正中切口, 分离颈总动脉 (common carotid artery, CCA)、颈外动脉 (external carotid artery, ECA)、颈内动脉 (internal carotid artery, ICA), 分离结扎并切断 ECA, 结扎翼腭动脉 (pterygopalatine artery, PPA), 夹闭 CCA 和 ICA, 将线栓由 ECA 残端插入, 经 ICA 进线约 18mm 插入 MCA 入口, 形成 MCA 栓塞模型。在传统线栓法的基础上, 经过不断改进, 形成改良方案: 从 CCA 插入线栓经 ICA 至 MCA 起始处, 改良方案无需结扎 PPA,

局部组织损伤小, 操作更为简单, 成功率更高^[4]。大脑中动脉及其分支, 是脑梗塞最常累及的颅内血管, 其发病率约占 70%^[5]。因此, 选择小鼠大脑中动脉进行栓塞, 能够更好地模拟人类缺血性脑卒中。大脑中动脉线栓法无需开颅, 减轻了对颅骨及颅内组织的损害, 线栓阻塞大脑中动脉使梗塞面积相对稳定, 可重复性高, 且可根据线栓存留的时间不同制作大脑缺血再灌注模型及永久性栓塞模型, 是目前应用最广泛的脑卒中模型的制作方法^[6], 被认为是缺血性脑卒中机制研究的金标准^[7]。但线栓栓塞法不足的是有致血管破裂导致脑出血形成的可能。

除选用上述使用线栓作为栓子外, 还有学者使用其他物质作为栓子进行栓塞, 例如: 舌下静脉注入铁粉模型、左心室注射液体石蜡模型、颈内动脉注入微小栓子等血管内注入外来栓子制备多发脑梗塞模型^[8], 以及冯光等^[8]将凝血酶注入血管内的方法来制作自体血栓体内急性栓塞性脑梗死模型等。

1.2 颈动脉结扎法 单侧颈总动脉结扎法^[9]: 该方法损伤小, 模型成功率高, 死亡率低, 被广泛应用于卒中模型的建立。

双侧颈总动脉结扎法: 分为两类: ①四血管闭塞法 (4-vessel occlusion model, 4vo 模型)^[10]: 该模型于 1979 年首次由 Pulsinelli WA 等提出, 方法是电凝阻断双侧椎动脉 24h 后夹闭双侧颈总动脉, 根据颈总动脉夹闭时间 (10min, 20min, 30min) 不同, 制造不同程度全脑缺血再灌注模型, 多用于脑缺血再灌注神经损害的研究, 但手术难度大, 并发症多, 造模成功率低。②二血管阻断法 (2-vessel occlusion model, 2vo 模型)^[11-13]: 该模型在 1972 年被 Eklöf 等^[11]提出, 方法是通过阻断双侧颈总动脉加动脉放血, 造成低血压而形成全脑缺血模型, 亦多用于脑缺血再灌注神经损害的研究。2vo 模型与 4vo 模型相比较, 其动物模型存活率更高, 但缺点是阻断双侧颈总动脉仅造成不完全性脑缺血, 需在此基础上形成低血压方可形成全脑缺血模型^[14]。上述两种双侧颈总动脉结扎法经过后来

基金项目: 国家自然科学基金 (81460352); 云南省自然科学基金应用基础研究重点项目 (2014FA047)

收稿日期: 2016-11-01

作者单位: 1. 沈阳市第六人民医院, 沈阳 110000; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650000; 3. 昆明医科大学第四附属医院, 昆明 650000

作者简介: 张昕 (1988-), 女, 住院医师, 主要从事卒中后抑郁发病机制-基于临床病人和猕猴的比较研究。

通讯作者: 尹勇, yyinpmr@126.com

学者的不断改进,实验动脉造模死亡率有所下降,制造模型为全脑缺血模型,多用于全脑缺血再灌注的研究。双侧颈总动脉结扎法形成的脑卒中模型的病理特点类似于人类心脏骤停或心肌梗塞后形成脑卒中的病理特点。

1.3 开颅手术模型 开颅手术模型需切除部分颅骨,分离硬脑膜,暴露大脑中动脉进行手术。闭塞大脑中动脉的手术方式大致分为三类:①开颅大脑中动脉阻断模型^[15-17]:分离腮腺、颞肌,离断颞弓,切除大脑中动脉上方的颅骨,进行永久性离断、结扎或电凝大脑中动脉、光化学栓塞、三氯化铁化学诱导中动脉栓塞、局部内皮素注射诱导栓塞等,建立缺血性脑卒中模型;②开颅三血管阻断模型(3-vessel occlusion model,3vo模型)^[18]:在上述开颅永久性阻断一侧大脑中动脉的基础上临时阻断双侧颈总动脉,以减少侧枝循环的影响,和加强缺血性损伤。③颅骨钻孔去皮层血管缺血手术模型^[19]:麻醉后,剪开颅顶皮肤,暴露颅骨。在颅骨正中线左侧用牙科钻分别钻6个孔,用眼科剪沿着6个孔翻开颅骨,暴露硬脑膜;用虹膜剪剪开硬脑膜,暴露软脑膜,在解剖显微镜下用沾生理盐水的棉签轻轻擦拭软脑膜上的血管,直到镜下看不到血管为止,形成缺血性脑卒中模型。上述模型的特点是开颅可在直视下操作,成功率较高,但需要开颅,创伤性较大,破坏血脑屏障,引起脑脊液漏,感染几率增大,成功率与手术技术相关^[20]。

1.4 光化学栓塞模型 光化学栓塞法原理是基于血管内光氧化导致血栓形成,使荧光照射区域局灶血管内皮过氧化损伤、血栓形成及脑皮质缺血性损害。具体方法是通过给动物循环系统内或小鼠腹腔内注射一种光敏染料,例如玫瑰红或赤藓红,然后使用特定波长的光束透过颅骨照射选定的区域,激活光敏染料,此过程产生的氧自由基,导致照射区域内软脑膜及脑实质血管内皮损伤,血小板活化聚集,形成光化学栓塞模型^[16,21]。光化学栓塞法的优点是通过三维立体定位、调整照射光束的波长、照射的时间可制作出病变部位、范围、程度均一的局灶性缺血性卒中动物模型,可在指定的皮质区发生梗塞,而限于大脑中动脉供血区,无需开颅,操作简单,避免手术对实验动物脑组织、血管的机械性损伤,且对动物全身影响小,有较高的可重复性和较低的死亡率^[21-23]。但该模型由于血栓阻塞发生于终末动脉,更近似人类的微血管病变,而不能说明人类其他缺血性脑卒中的发生机制^[23]。

1.5 直流电刺激颈总动脉法^[24] 除上述开颅中动脉电凝法,于2015年由马寅仲等^[24]提出一种新颖电凝方法,该方法使用直流电刺激颈总动脉制造血栓,通过

血流引导碎栓堵塞中动脉,制造脑栓塞模型。具体方法是:将大鼠麻醉固定,纵向剪开颈部皮肤,分离颈外动脉、颈总动脉与颈内动脉,夹闭颈外动脉,剥离动脉鞘及神经,将颈总动脉放入血管电击夹沟槽内进行电击,可见电击血管内形成血栓,夹闭颈总动脉远心端,用软质镊子夹闭形成血栓的血管处,使血栓与血管壁分离,开放颈总动脉处动脉夹,可见血栓随血液流动进入颈内动脉后立即夹闭颈总动脉近心端10~15min,到时间后打开全部动脉夹,形成栓塞模型。造模成功率为87.2%。该模型改进了以往需开颅进行电凝的手术方式,无需开颅减少了手术对脑组织的损伤,更为接近心源性栓塞的病理过程,造模成功率较高、梗死面积稳定,造模后能够表现出相应的神经与运动功能障碍。

2 出血性脑卒中动物模型的建立

2.1 开颅出血性脑卒中模型建立 开颅出血性脑卒中模型是通过直接行手术局部开颅、解剖定位颅骨钻孔、立体定位等技术打开颅骨,选择不同物质注入到脑内特定区域制作开颅出血性脑卒中模型。根据注入脑内物质不同分为下面3类方法:①自体血注入法^[25-26]:抽取自体动脉(尾动脉、股动脉、心室腔等)或静脉血,开颅后向颅内注射血液(注射部位多选用尾状核进行注射)形成脑出血模型^[27]。为减少蛛网膜下腔积血和针道返流,有学者将该方法进一步改进,如低压注射法、二次注射法、三次注射法、微量泵控制注射法及自体凝固血注射法等,经上述改进,模型的稳定性、重复性均有所改善。该方法的优点是对脑内血肿位置和体积能够控制,重复性好,但对动物的损伤较大。②胶原酶注入法^[25,28]:该方法是向特定区域脑组织内注射可破坏血管壁的药物(如胶原酶、胶原酶+肝素、胶原酶+自体血等)造成局部血管壁破裂导致脑出血。该模型的出血量取决于胶原酶的用量,所产生的出血面积、形态、部位重复性较好,但该方法诱导脑出血以渗血为主,与临床所见脑血管破裂出血有一定差距。③植入惰性物质建立脑出血模^[25-26]:通过向脑内植入惰性物质如微气囊、石蜡油等,产生类似血肿的占位效应。该模型的优点是可为人为控制气囊内的气体量,能产生一致、可重复的脑损害,避免了自体血注入法中血液进入蛛网膜下腔或破入脑室以及血肿形态不一的缺陷,并可以逐渐放气,有利于了解占位物质逐渐清除后的效应,但外来异物不能模拟出血后脑组织病理损害及细胞毒性。目前已较少应用。

2.2 非开颅出血性脑卒中模型建立 张昊^[28]根据血管内穿刺法制备大鼠蛛网膜下腔出血模型的方法^[29]

提出穿刺颈动脉制备脑出血模型的理论,该方法通过颈外动脉刺入导丝,应用头皮导联脑电图及局部脑血流量监测进行穿刺定位,因大鼠蛛网膜下腔出血模型制备目前已成熟,运用该方法制备脑出血模型理论上有一定可行性,但该方法尚未应用于实践中。张昊^[28]认为选择动脉穿刺符合脑出血模型动脉出血的要求,避免穿刺过深损伤脑组织,省去各种方式的采血过程,减少了对大鼠的损害。但本人认为,该方法应用于实验有一定困难,因行颅外部监测进行定位准确性差,且出血量无法控制,有待进一步研究。

3 自发脑卒中动物模型

改变大鼠基因获得的易卒中型自发性高血压大鼠(stroke-prone spontaneously hypertensive rats, SHR-SP)和易卒中肾血管性高血压大鼠(stroke-prone renovascular hypertensive rats, RHRSP)^[30]随着生长时间的延长,可产生自发卒中大鼠模型。但因 SHRSP 大鼠的遗传局限性、易变种、断种和饲养困难的特点在实验中的应用受到限制,而 RHRSP 大鼠无遗传局限性、无需特殊喂养、动物廉价易得、造模技术简单^[31],而被广泛应用于动物实验中。RHRSP 大鼠自发卒中率可达 56.4%,其中脑出血 19.4%,脑梗塞 41.9%,蛛网膜下腔出血 3.2%,混合性中风 35.5%^[30]。为进一步增加 RHRSP 大鼠的自发卒中率,施晓耕等^[32]将 RHRSP 给予大鼠寒冷刺激诱发大鼠发生脑卒中,该方法诱发的脑卒中类型以脑出血为主,发病过程更符合人类高血压动脉硬化基础上脑卒中发病的自然状况,但该模型有卒中类型不能确定、造模成功率低、造模周期较长等缺点。为改进上述不足,有学者在制备 RHRSP 大鼠后^[30],联合上述各种制备缺血性或出血性脑卒中的方法,制备 RHRSP 缺血性或出血性卒中动物模型,以更好地模拟人类高血压动脉硬化脑卒中模型。

4 小结

上述各种啮齿类脑卒中动物模型为脑卒中的病理生理机制的研究提供了一种途径,通过对脑卒中病理生理及损伤机制的研究,可针对性研发相应的预防脑卒中发生及脑卒中后神经保护治疗的方法。但啮齿类动物与人类存在种族差异性,实验动物多为健康青壮年动物,而脑卒中患者多为中老年人,且脑卒中患者常合并较多疾病如高血压、糖尿病、高血脂、心脏病等,以及拥有不良生活习惯和口服多种药物史,在实验中应综合考虑上述差异性,使通过动物模型获得的实验数据结果同样适用于人类脑卒中患者。有望能在以后的

脑卒中动物模型中建立不同性别、年龄、合并多种共病的标准化脑卒中物模型,统一动物实验中的处理因素和影响因素,以减少对实验结果的影响,并通过对实验设计的不断改进和创新,更好地模拟人类脑卒中的发病过程,以充分研究和认识脑卒中的病理生理机制,从而服务于临床疾病的治疗。

【参考文献】

- [1] Casals JB, Pieri NC, Feitosa ML, et al. The use of animal models for stroke research: a review[J]. Comparative medicine. 2011,61(4):305-313.
- [2] Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease[J]. The New England journal of medicine. 2013,369(5):448-457.
- [3] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation. 2015,131(4):e29-322.
- [4] 翟小虎. 线栓法制备大鼠脑缺血模型的研究进展与思路[J]. 实验动物科学. 2015, 32(5):55-58.
- [5] Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke[J]. Stroke. 1988,19(9):1083-1092.
- [6] Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, et al. Different strokes for different folks; the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia[J]. Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2010,30(8):1412-1431.
- [7] Herson PS, Traystman RJ. Animal models of stroke: translational potential at present and in 2050[J]. Future neurology. 2014,9(5):541-551.
- [8] 李冬梅, 王戈. 多发性脑梗塞动物模型的研究及分析[J]. 内蒙古中医药. 2014, 29(10):57-58.
- [9] 钱海兵. 一种脑卒中后抑郁症模型的建立[J]. 时珍国医国药. 2011,22(03):746-747.
- [10] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke. 1979,10(3):267-272.
- [11] Eklof B, Siesjo BK. The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain[J]. Acta physiologica Scandinavica. 1972,86(2):155-165.
- [12] Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, et al. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model[J]. Acta Neurol Scand. 1984,69(6):385-401.
- [13] 刘抒雯, 刘敬霞, 李娟, 等. 缺血性脑卒中动物模型的研究概述[J]. 中国老年学杂志. 2015, 13(7):3756-3758.
- [14] 林竹贞, 皮荣标. 啮齿类脑缺血动物模型的研究进展[J]. 中国神经精神疾病杂志. 2007,33(09):574-576.
- [15] 徐秋琴, 俞月萍, 魏尔清. 大鼠局灶性脑缺血模型的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志. 2004,9(6):80-83.
- [16] Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research[J]. Drug

- design, development and therapy. 2015,9:3445-3454.
- [17] 顾国军, 孙学军, 李润平, 等. HBO 治疗内皮素-1 诱导的大鼠局灶性脑缺血模型的研究[C]. 中华医学会第十五次全国高压氧医学学术会议, 2006.
- [18] Yanamoto H, Nagata I, Niitsu Y, et al. Evaluation of MCAO stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique [J]. *Experimental neurology*. 2003,182(2):261-724.
- [19] 徐向青, 唐启盛, 侯秀娟, 等. 卒中后抑郁大鼠受体后信号转导的变化及中药的干预作用[J]. *中国中医基础医学杂志*. 2005,11(5):345-347.
- [20] 陈莱弦. 脑卒中动物模型的建立与比较[J]. *中国康复医学杂志*. 2011,26(8):779-782.
- [21] 马凌云. 光化学栓塞法建立缺血性脑卒中动物模型[J]. *中国组织工程研究*. 2015,19(49):7951-7957.
- [22] Dietrich WD, Ginsberg MD, Busto R, et al. Photochemically induced cortical infarction in the rat. 1. Time course of hemodynamic consequences[J]. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1986,6(2):184-194.
- [23] 李红戈, 张茂悦, 董莹莹, 等. 光化学诱导大鼠脑皮质梗塞模型的研究[J]. *卒中与神经疾病*. 1996,3(3):126-128.
- [24] 马寅仲. 血管内成栓脑梗死模型的制备及评价[J]. *中国药理学通报*. 2015,31(11):1620-1623.
- [25] 李红玲. 脑出血实验动物模型[J]. *神经损伤与功能重建*. 2006,4(1):238-239.
- [26] 段晓春. 脑出血动物模型研究进展[J]. *中华神经创伤外科电子杂志*. 2015,1(2):36-39.
- [27] 张化彪. 脑出血模型[J]. *国外医学(脑血管疾病分册)*. 2002,6(10):469-472.
- [28] 张昊. 大鼠脑出血模型[J]. *中国医药指南*. 2012,10(34):89.
- [29] 金清东. EEG 和 rCBF 监测在大鼠非开颅 SAH 模型中的应用[J]. *第三军医大学学报*. 2007,29(13):1282-1284.
- [30] 曾进胜, 黄如训. 易卒中肾血管性高血压大鼠模型及其应用[J]. *中山医科大学学报*. 1996,17(4):241-244.
- [31] 黄如训, 曾进胜, 苏镇培, 等. 易卒中型高血压大鼠模型的研制和应用[J]. *医学研究通讯*. 2005,8(34):24-25.
- [32] 施晓耕. 人工寒潮诱发肾血管性高血压大鼠脑卒中[J]. *实用预防医学*. 2007,14(4):976-978.

针灸配合康复训练治疗中枢性面瘫的研究进展

寿崧^{1,2}, 徐平¹, 虎力¹, 温佩彤¹, 张伟波¹, 高原¹, 王静¹

【关键词】 中枢性面瘫; 针灸; 康复训练

【中图分类号】 R49;R745.1 【DOI】 10.3870/zgkf.2018.02.020

中枢性面瘫(Central Facial Paralysis)是指各种原因导致大脑皮质运动区、内囊皮质脑干束等面神经核以上神经通路受损,并累及支配面神经的中枢部位,从而引起的面肌功能性瘫痪,为上运动神经元损伤病变。本病常继发于脑卒中、颅脑损伤及颅内肿瘤术等疾病后,临床表现为病灶对侧下部面部表情肌群瘫痪,表现为鼻唇沟变浅、口角歪斜,多数患者伴有刷牙漱口时患侧漏水,进食时患侧口腔存食、口角流涎等。该病轻者可自行恢复,但较重面瘫可导致构音障碍、吞咽困难、误吸、肺炎、抑郁等多种并发症,影响预后,增加患者病死率。由于卒中时肢体偏瘫往往重于面瘫,故中枢性面瘫的治疗在临床中往往被忽略,针对中枢性面瘫的治疗方法也比较少^[1-2]。另有研究表明,约 1/3

的卒中后面瘫患者半年后有明显的面瘫后遗症^[3-4]。目前临床上多给予营养神经、能量支持等对症治疗,疗效欠佳。针灸及康复训练针对该病有多种治疗手段,如针刺、电针、特种针法、特定穴刺法、温针灸、针药结合法、康复手法、康复手法配合相关仪器、针灸与康复结合疗法以及其他技术辅助康复疗法等等,临床效果较显著,因此研究针灸配合康复训练治疗中枢性面瘫或许是一个新的研究方向。本文将就这些方法进行综述及评估,并提出建议,以期能更好地服务于临床。

1 针灸疗法

针刺能诱导额叶和枕叶脑组织的血流量和血流容积的增加,在中枢性面瘫损伤早期修复中有重要作用。针刺不同穴位可以通过对脑部病灶血液动力学的改善,从而加速中枢性面瘫的康复^[5]。

许多学者在常规中西医治疗方案基础上,加用针刺面瘫对侧合谷穴^[6-10]。对该法用 House-Brackmann 量表、评价面神经麻痹程度分级量表和多伦多面神经分级系统量表及面部残疾指数问卷量表进行评估疗效时,针刺合谷组优于对照组,进一步研究表明不

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373755);国家自然科学基金青年科学基金项目(81403470);上海市科学技术委员会科研计划中医引导类项目(17401932200);上海市第一人民医院院级课题(11B10)

收稿日期:2016-12-01

作者单位:1. 上海中医药大学针灸推拿学院,上海 201203;2. 上海交通大学附属第一人民医院针灸科,上海 200080

作者简介:寿崧(1984-),女,主治医师,讲师,在读博士研究生,主要从事针灸与神经退行性疾病的临床和基础研究。

通讯作者:徐平, xp99@163.com