·新技术新方法·

一种新型脑缺血小鼠模型的制作方法

李欢欢 葛红飞 张超 邹永杰 钟俊 方煊宇 胡荣

【摘要】 **研究背景** 在线拴法、光化学法诱导血栓形成、凝血块栓塞法等常用局灶性脑缺血模型的基础上，推广一种新型局灶性脑缺血动物模型。**方法** 通过永久性阻断小鼠大脑中动脉远端制备大脑中动脉远端闭塞模型，激光散斑血流成像仪实时监测脑血流量，2,3,5-氯化三苯基四氮唑（TTC）染色和HE染色检测缺血灶，Clark评分评价神经功能。**结果** 激光散斑血流成像仪监测显示，电凝灼烧离断大脑中动脉后，脑血流量明显降低。TTC染色显示，缺血区仅局限于大脑皮质。HE染色显示，缺血区神经细胞大部分死亡，缺血区周围可见明显的细胞密集，考虑是炎性细胞和各种神经细胞。模型制备后1、3、7和14 d，小鼠平均体重分别为22、20.70、19.50和20.10 g；Clark评分中身体对称性评分分别为0.75、0.75、0.50和0.50分，步态评分均为0分，攀爬评分均为0分，转圈实验评分为0.50、0.75、0.50和0.25分，前肢对称性评分均为0.25分，强迫转圈评分均为0分，胡须反应性评分为1、1、1和0.50分。**结论** 经优化的新型大脑中动脉远端闭塞小鼠模型可以模拟局灶性脑缺血且神经功能缺损较轻微，可以作为一种实验模型用以研究神经损伤后血管病理生理改变和修复过程以及神经损伤后修复过程中参与的神经细胞及其作用机制。

【关键词】 脑缺血； 大脑中动脉； 疾病模型，动物

A new model of cerebral ischemia in mice

LI Huan-huan, GE Hong-fei, ZHANG Chao, ZOU Yong-jie, ZHONG Jun, FANG Xuan-yu, HU Rong
Department of Neurosurgery, the First Hospital Affiliated to Army Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China
Corresponding author: HU Rong (Email: huchrong@aliyun.com)

【**Abstract**】 **Background** Based on the commonly used local cerebral ischemia models, such as clot embolization, photochemically induced thrombosis and sludged blood embolization, a new model of local cerebral ischemia in mice was popularized. **Methods** The model of distal middle cerebral artery occlusion (dMCAO) was prepared by permanently blocking the distal middle cerebral artery (MCA) of mice. Cerebral blood flow (CBF) was monitored by real - time laser speckle contrast imaging system. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and HE staining were used to detect ischemic infarcts. Clark classification was used to evaluate neurological function. **Results** Laser speckle contrast imaging system showed CBF decreased significantly after ablation of MCA by electrocoagulation. TTC staining showed that the ischemic region was only located in cerebral cortex, and no obvious damage was found in subependymal basal ganglia and hippocampus. HE staining showed that most nerve cells died in the ischemic region, and there was obvious cell density around the ischemic region, which was considered to be inflammatory cells and various nerve cells. One, 3, 7 and 14 d after model preparation, the mice weighed 22, 20.70, 19.50 and 20.10 g, respectively. Body symmetry scores in Clark classification were 0.75, 0.75, 0.50 and 0.50, respectively; gait scores were 0, climbing scores were 0, turning test scores were 0.50, 0.75, 0.50 and 0.25, forearm symmetry scores were 0.25, forced turning scores were 0, beard reactivity scores were 1, 1, 1 and 0.50 respectively. **Conclusions** The improved new model of dMCAO can simulate local cerebral ischemia with minor neurological defect, and can be used as an experimental model to study the pathophysiological changes and repair process of the vessels after nerve injury as well as the nerve cells involved in the repair process after nerve injury.

【**Key words**】 Brain ischemia; Middle cerebral artery; Disease models, animal
This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81371340).

---

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2018.12.008
基金项目：国家自然科学基金资助项目（项目编号：81371340）
作者单位：400038 重庆，陆军军医大学第一附属医院神经外科
通讯作者：胡荣（Email：huchrong@aliyun.com）

目前,我国脑血管病发病率和病死率均有逐渐升高趋势,脑血管病分为缺血性卒中和出血性卒中两种类型,尤以缺血性卒中发病率更高[1],因此,选择适宜的动物模型对脑血管病的诊断与治疗研究具有重要意义[2]。目前,脑缺血模型包括全脑缺血模型和局灶性脑缺血模型,常用的局灶性脑缺血模型制备方法有线拴法、光化学法诱导血栓形成、凝血块栓塞法等[3],但存在模型不稳定、操作复杂、不符合临床实际栓塞情况等缺点[4]。本文在上述方法基础上提出一种优化的脑缺血动物模型——小鼠大脑中动脉远端闭塞模型(dMCAO)[5]。

大脑中动脉远端闭塞模型是常见的小鼠局部脑缺血模型,需开颅显露大脑中动脉(MCA)末端,并于大脑中动脉更远端结扎,颧弓损伤轻微,对小鼠的干扰降低,从而促进恢复[6-7]。该模型最早于1981年由Tamura等[8]制备,作为大鼠局灶性脑缺血模型,而后应用于小鼠[6]。大脑中动脉远端闭塞模型是在线拴法和可逆性阻断双侧颈总动脉(CCA)等方法的基础上加以改进,后两种方法导致的脑组织损害覆盖小鼠大脑半球,对梗死灶周围功能区的研究有限,且模型稳定性较差、死亡率较高,而大脑中动脉远端闭塞模型则可以改善上述局限性[5-6]。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物　成年雄性C57小鼠共12只,周龄7~8周,体重20~23 g,置于可控、无病原体条件下,温度18~22℃,湿度50%~60%,12 h昼-12 h夜循环照明环境,可自由获取颗粒状食物和水。动物实验方案经陆军军医大学第一附属医院动物护理和使用委员会批准(许可证号:IACUC2012-0012),动物应用规程经陆军军医大学动物护理和使用委员会批准,动物实验程序严格按照《动物实验管理条例》执行。

2. 药品与仪器　(1)药品与试剂:质量分数为5%的水合氯醛溶液和质量分数为4%的多聚甲醛溶液购自成都市科隆化学品有限公司,质量分数为10%的2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液和质量分数为10%的甲醛溶液购自南京建成生物科技有限公司,医用碘伏购自山东利尔康医疗科技股份有限公司,质量分数为3%的过氧化氢(H_2O_2)溶液购自江西德成制药有限公司,生理盐水购自西南药业股份有限公司,磷酸盐缓冲液(PBS)购自武汉博士德生物工程有限公司,体积分数为75%、80%、95%的乙醇溶液和二甲苯购自四川绿森林化工有限公司,石蜡购自江苏聚冠新材料科技有限公司。(2)仪器与设备:OPMI pico桌面型手术显微镜购自德国Zeiss公司,单极微手术电凝器购自武汉春光医疗美容仪器有限公司,DZKW恒温水浴锅购自北京市永光明医疗仪器有限公司,CM1860UV型冰冻式切片机购自德国Leica公司,RFLSI Pro型激光散斑血流成像仪购自RWD生命科学有限公司,VS120型数字切片显微镜购自日本Olympus公司。

二、实验方法

1. 动物模型制备　小鼠于无菌条件下称重后以5%水合氯醛腹腔注射麻醉,剃毛,侧位固定于手术显微镜下;轻轻将耳朵拉向尾部并固定,以确保手术过程中耳朵不影响操作;常规消毒,以眼科剪在眼眶与耳道之间的皮肤剪出一1 cm大小的纵切口;剥离肌肉显露颅骨,并于颅骨表面找到大脑中动脉;以50 ml注射器针头在大脑中动脉挑开一直径为2~3 mm的孔,采用单极或双极电凝灼烧、离断血管;于手术显微镜下寻找并确认血管断端并逐层缝合,将小鼠置于37 ℃恒温箱苏醒,视为模型制备成功(图1)。

2. 观察指标　(1)脑血流量(CBF):模型制备过程中,采用激光散斑血流成像仪实时监测小鼠脑血流量(图2)。(2)TTC染色和HE染色检测缺血灶:模型制备后1 d,处死小鼠,断头切取脑组织,分别行TTC染色和HE染色。①TTC染色,取小鼠全脑组织置于培养皿中,-20 ℃冷冻40 min,制备均匀冠状切片5片,置于6孔板中,加入适量TTC溶液,于37 ℃避光孵育20 min(期间不停摇晃),吸出染液,清水冲洗1次,再加入4%多聚甲醛溶液,于4 ℃固定24 h,观察大体标本。②HE染色,取小鼠全脑组织,以10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,作层厚5 μm的均匀冠状切片,脱蜡水化,苏木素染色5~20 min,自来水冲洗,分化液分化30 s,自来水浸泡15 min或温水(约50 ℃)浸泡5 min,伊红染色数秒至2分钟,自来水冲洗、浸泡1~2 min,脱水,透明,封片,数字切片显微镜观察。(3)神经功能:分别于模型制备后1、3、7和14 d采用Clark评分评价小鼠神经功能。Clark评分包括身体对称性、步态、攀爬、转圈实验、前肢对称性、强迫转圈和胡须反应性共7项内容,每项分为0~4分[9]。身体对称性评分0分,正常,提尾悬空后双侧前肢伸直、对称;1分,轻微不对称,左侧前肢

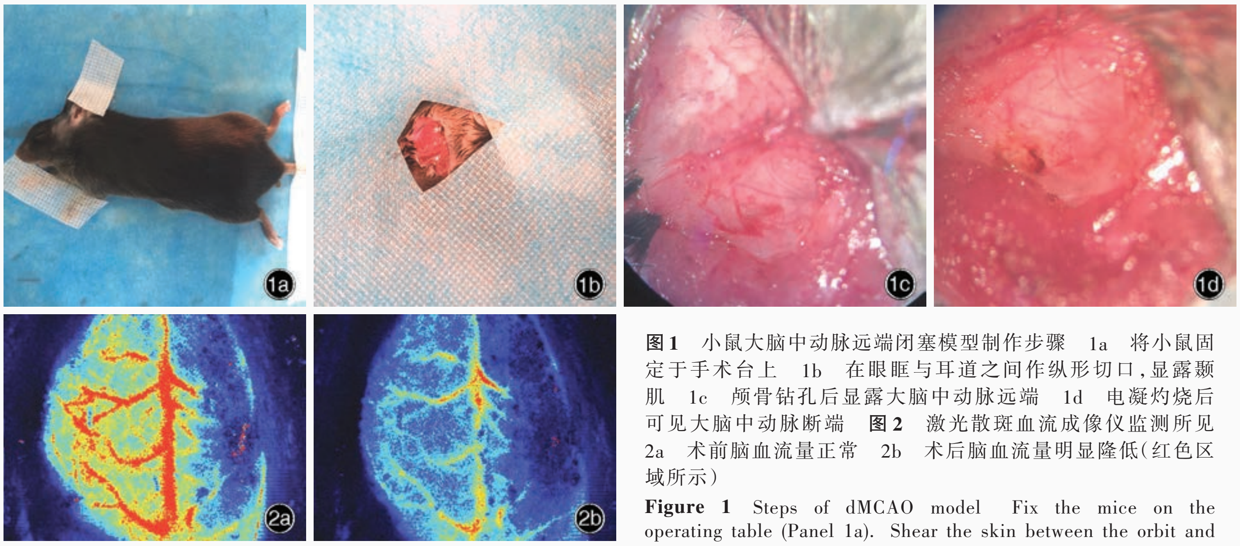

图1 小鼠大脑中动脉远端闭塞模型制作步骤 1a 将小鼠固定于手术台上 1b 在眼眶与耳道之间作纵形切口，显露颞肌 1c 颅骨钻孔后显露大脑中动脉远端 1d 电凝灼烧后可见大脑中动脉断端 **图2** 激光散斑血流成像仪监测所见 2a 术前脑血流量正常 2b 术后脑血流量明显降低（红色区域所示）

Figure 1 Steps of dMCAO model Fix the mice on the operating table (Panel 1a). Shear the skin between the orbit and ear canal to expose the temporalis muscle (Panel 1b). Exposure of distal MCA after drilling (Panel 1c). The broken end of MCA could be seen after electrocoagulation (Panel 1d). **Figure 2** Laser speckle contrast imaging system findings Preoperative CBF was normal (Panel 2a). Postoperative CBF was significantly reduced (red areas indicate, Panel 2b).

不能完全伸展；2分，中度不对称，身体呈屈曲状，有向左侧倾斜、旋转的趋势；3分，明显不对称，行走时向左侧倾倒；4分，极度不对称，不能行走，全身痉挛、昏睡、意识丧失。步态评分0分，正常；1分，步态僵硬、不灵活；2分，跛行；3分，颤抖，行走不稳并跌倒；4分，无法行走。攀爬（45°粗糙表面）评分0分，正常；1分，爬行困难，左侧肢体无力；2分，抓握斜面，不下滑也不攀爬；3分，顺斜面下滑，抓握不能阻止下滑；4分，即刻下滑，无抓握能力。转圈实验评分0分，无转圈或随机向两侧转弯；1分，转弯有偏向一侧倾向；2分，仅向一侧转弯，但不连续；3分，仅向一侧连续转弯；4分，转圈、摇摆或不运动。前肢对称性评分0分，正常，双侧前肢运动频率相同；1分，轻微不对称，表现为左侧肢体运动次数较右侧减少1～2次；2分，明显不对称，左侧肢体运动次数较右侧少≥3次；3分，非常不对称，左侧肢体完全不动，右侧肢体有活动；4分，肢体不运动，双侧前肢均不运动。强迫转圈评分0分，不转圈或随机向两侧转圈；1分，有偏向一侧转圈的倾向；2分，向一侧转圈；3分，缓慢向一侧转圈；4分，无前进动作。胡须反应性评分0分，反应对称，双侧转头均>30°，且无明显角度差异；1分，轻微不对称，左侧转头>30°，但与右侧的差值>10°；2分，明显不对称，左侧转头≤30°；3分，左侧无反应，右侧反应降低，左侧有转头动作，但轻微（<10°）且缓慢；4分，双侧本体觉消失，左侧无反应。

结　果

激光散斑血流成像仪监测显示，电凝灼烧、离断大脑中动脉后，脑血流量明显降低，形成局部脑组织缺血（图2）。

TTC染色显示，缺血区仅位于大脑皮质，室管膜下基底节区和海马区无明显损害（图3）。HE染色可见缺血区神经细胞大部分死亡，缺血区周围明显细胞密集，考虑是炎性细胞和各种神经细胞（图4）。

模型制备后1、3、7和14 d，小鼠平均体重分别为22、20.70、19.50和20.10 g；Clark评分中身体对称性评分分别为0.75、0.75、0.50和0.50分，步态评分均为0分，攀爬评分均为0分，转圈实验评分为0.50、0.75、0.50和0.25分，前肢对称性评分均为0.25分，强迫转圈评分均为0分，胡须反应性评分为1、1、1和0.50分，表明模型制备后小鼠神经功能缺损较轻微，可以作为一种实验模型用以研究神经损伤后血管病理生理改变和修复过程以及神经损伤后修复过程中参与的神经细胞及其作用机制。

讨　论

本研究激光散斑血流成像仪监测、TTC染色和HE染色、Clark评分均表明，经过优化的局灶性脑缺血动物模型[10]，其成功率和稳定性均有一定提高，

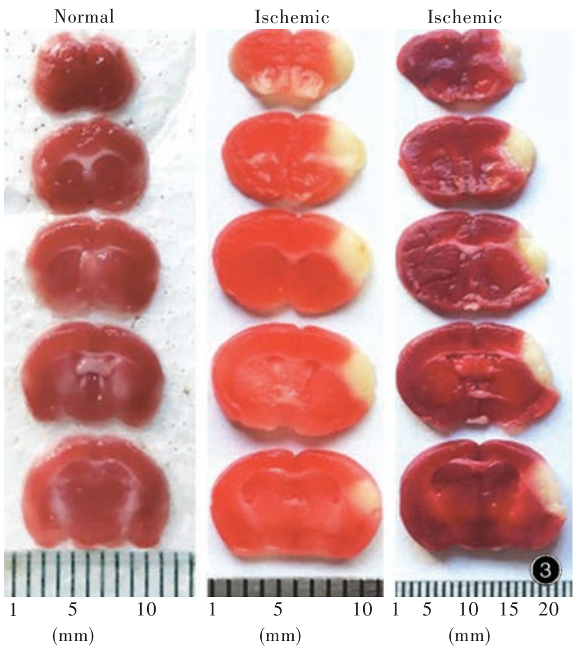

图 3　大体标本TTC染色观察显示，缺血区仅局限于大脑皮质

Figure 3　TTC staining of gross specimen showed that the ischemic infarct was limited to cerebral cortex.

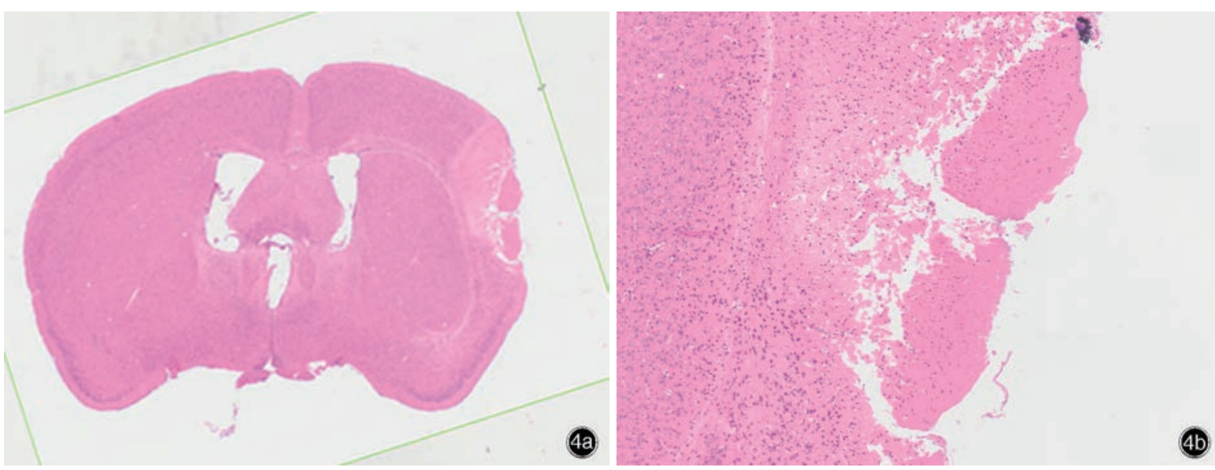

图 4　模型制备后1 d HE染色所见　4a　脑组织切片局部区域呈淡染　4b　数字切片显微镜观察显示，缺血区神经细胞大部分死亡　低倍放大

Figure 4　HE staining findings 1 d after model preparation　Brain issue slice showed local region was lightly stained (Panel 4a). Digital slide microscopy findings showed most of neural cells died in the ischemic infarct (Panel 4b).　Low power magnified

该方法可以为小鼠大脑中动脉闭塞（MCAO）模型的制备提供相应参考[11-12]。

采用本研究方法制备的小鼠大脑中动脉远端闭塞模型成功率高、稳定性佳，且简便、快速，但应注意的是，选择动物时性别和年龄可能影响缺血区体积和实验结果，故建议选择与实验相匹配的动物性别和年龄进行研究[13-14]。手术过程中和恢复期间，应保持动物周围温度为37 ℃。该模型制备过程中最困难的部分是成功结扎大脑中动脉，术中可能出现大出血，可以尝试在灼烧血管前，先将电凝电极置于待灼烧部位再打开电极开关，待温度升高后开始灼烧，可以一定程度减少脑出血的概率[14-16]。该模型另一主要缺点是须行开颅手术，开颅手术可能将病原体引入大脑并引起免疫反应，属于不典型脑卒中；但也存在优势，大脑中动脉远端在小鼠颞骨部位清晰可见，这可以简化开颅手术部位的选择，易于定位并成功结扎大脑中动脉[17]。该模型优于线拴法制备的大脑中动脉闭塞模型，后者手术过程中无法直视血管，因此难以验证是否制备模型成功[10,18]。该模型的另一优点是，小鼠可以产生高度可重复性的大脑皮质损伤，且易产生行为异常[4,7-8]。

综上所述，小鼠大脑中动脉远端闭塞模型有较高的非特异性，在研究血管生成、修复机制的同时，更易追踪修复过程[2,12,14,18-24]。尽管小鼠大脑中动脉远端闭塞模型导致的病变在小鼠品系内一致，但在不同品系间有明显差异，尚待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Gan Y, Yang TT, Liu JX, Hu S, Qiao Y, Wang C, Yang YD, Chang YY, Lu ZX. Research progress on trends and influence factors for stroke at home and abroad[J]. Zhongguo Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2018, 19:24-30.[甘勇, 杨婷婷, 刘建新, 胡赛, 乔岩, 王超, 杨宇迪, 常园园, 卢祖洵. 国内外脑卒中流行趋势影响因素研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2018, 19:24-30.]

[2] Rehni AK, Liu A, Perez-Pinzon MA, Dave KR. Diabetic aggravation of stroke and animal models[J]. Exp Neurol, 2017, 292:63-79.

[3] Webb RL, Kaiser EE, Jurgielewicz BJ, Spellicy S, Scoville SL, Thompson TA, Swetenburg RL, Hess DC, West FD, Stice SL. Human neural stem cell extracellular vesicles improve recovery in a porcine model of ischemic stroke[J]. Stroke, 2018, 49:1248-1256.

[4] Liu CM, Liu S, Xie JL, Huang ZH. Comparison of animal models in cerebral ischemia-reperfusion experiment[J]. Gannan Yi Xue Yuan Xue Bao, 2018, 38:112-116.[刘超明, 刘松, 谢佳丽, 黄志华. 脑缺血再灌注实验中各类动物模型的比较[J]. 赣南医学院学报, 2018, 38:112-116.]

[5] Zou YJ, Cui GY, Feng H. Research progress on animal models of cerebral ischemia[J]. Guo Ji Shen Jing Bing Xue Shen Jing Wai Ke Xue Za Zhi, 2012, 39:423-426.[邹永杰, 崔高宇, 冯华. 脑缺血动物模型的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39:423-426.]

[6] Sun WH, Chen HS. Review and research progress on rodent models of cerebral ischemia[J]. Zhongguo Nao Xue Guan Bing Za Zhi, 2013, 10:432-435.[孙文昊, 陈会生. 啮齿类动物脑缺血模型的回顾与研究进展[J]. 中国脑血管病杂志, 2013, 10:432-435.]

[7] Liang Y, Zhou LF. Ischemic models of rodents[J]. Guo Wai Yi Xue Shen Jing Bing Xue Shen Jing Wai Ke Xue Fen Ce, 1995, 22:177-179.[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学分册, 1995, 22:177-179.]

[8] Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. 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, 1:53-60.

[9] He SS, Li R, Wu D, Wang ZH, Peng ZW, Wang HN, Tan QR. Protective effects of gastrodin on the hippocampal newborn neurons after cerebral ischemia-reperfusion[J]. Xian Dai Sheng Wu Yi Xue Jin Zhan, 2015, 15:6241-6244.[何珊珊, 李锐, 吴迪, 王中恒, 彭正午, 王化宁, 谭庆荣. 天麻素对脑缺血再灌注小鼠海马新生神经元的保护作用[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15:6241-6244.]

[10] Doyle KP, Buckwalter MS. A mouse model of permanent focal ischemia: distal middle cerebral artery occlusion[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1135:103-110.

[11] Jiang Z, Li C, Arrick DM, Yang S, Baluna AE, Sun H. Role of nitric oxide synthases in early blood-brain barrier disruption following transient focal cerebral ischemia[J]. PLoS One, 2014, 9:E93134.

[12] Hirt L, Fukuda AM, Ambadipudi K, Rashid F, Binder D, Verkman A, Ashwal S, Obenaus A, Badaut J. Improved long-term outcome after transient cerebral ischemia in aquaporin-4 knockout mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37:277-290.

[13] Panahpour H, Farhoudi M, Omidi Y, Mahmoudi J. An in vivo assessment of blood-brain barrier disruption in a rat model of ischemic stroke[J]. J Vis Exp, 2018, (133):E57156.

[14] Kanemitsu H, Nakagomi T, Tamura A, Tsuchiya T, Kono G, Sano K. Differences in the extent of primary ischemic damage between middle cerebral artery coagulation and intraluminal occlusion models[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22:1196-1204.

[15] Pontén U, Ratcheson RA, Salford LG, Siesjö BK. Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats[J]. J Neurochem, 1973, 21:1127-1138.

[16] Molcho L, Ben-Zur T, Barhum Y, Angel A, Glat M, Offen D. Combined gene therapy to reduce the neuronal damage in the mouse model of focal ischemic injury[J]. J Mol Neurosci, 2018, 66:180-187.

[17] Johnston KC, Brott TG; Stroke Progress Review Group. Looking back and going forward: introduction[J]. Stroke, 2013, 44(6 Suppl 1):110.

[18] Hou Q, Ling L, Wang F, Xing S, Pei Z, Zeng J. Endostatin expression in neurons during the early stage of cerebral ischemia is associated with neuronal apoptotic cell death in adult hypertensive rat model of stroke[J]. Brain Res, 2010, 1311:182-188.

[19] Zhang G, Chen L, Chen W, Li B, Yu Y, Lin F, Guo X, Wang H, Wu G, Gu B, Miao W, Kong J, Jin X, Yi G, You Y, Su X, Gu N. Neural stem cells alleviate inflammation via neutralization of IFN-γ negative effect in ischemic stroke model[J]. J Biomed Nanotechnol, 2018, 14:1178-1188.

[20] Hou B, Ma J, Guo X, Ju F, Gao J, Wang D, Liu J, Li X, Zhang S, Ren H. Exogenous neural stem cells transplantation as a potential therapy for photothrombotic ischemia stroke in Kunming mice model[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54:1254-1262.

[21] Kamp MA, Lieshout JH, Dibué-Adjei M, Weber JK, Schneider T, Restin T, Fischer I, Steiger HJ. A systematic and meta-analysis of mortality in experimental mouse models analyzing delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage[J]. Transl Stroke Res, 2017, 8:206-219.

[22] Burk J, Burggraf D, Vosko M, Dichgans M, Hamann GF. Protection of cerebral microvasculature after moderate hypothermia following experimental focal cerebral ischemia in mice[J]. Brain Res, 2008, 1226:248-255.

[23] Chen Y, Ito A, Takai K, Saito N. Blocking pterygopalatine arterial blood flow decreases infarct volume variability in a mouse model of intraluminal suture middle cerebral artery occlusion[J]. J Neurosci Methods, 2008, 174:18-24.

[24] Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM. TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17:483-490.

（收稿日期：2018-11-02）