

改良血栓栓塞法建立家兔脑血栓模型的实验研究^{*}

尧雪洲¹, 李国晖², 杨 燕², 许 轲³ (1. 云南中医学院机能实验室, 昆明 650500; 2. 云南中医学院第一附属医院放射科, 昆明 650021; 3. 云南艺术学院图书馆, 昆明 650500)

【摘要】 目的 采用改良的血栓栓塞法建立家兔脑血栓模型, 并引入 CT 技术等对模型进行观察与评价。**方法** 将 12 只家兔随机分为伪手术组和建模组两组, 导管自家兔颈外动脉逆行至颈内动脉, 伪手术组注入生理盐水, 建模组借助导丝注入经过体外处理的线状长血栓; 术前与术后行 CAT 检查对照, 并于术后各时间点观察行为障碍评分及头颅 NCCT 测量 CT 值进行对照。**结果** 建模组手术前后相比较, 术后 4 h CTA 显示建模组 6 例均成功置入自颈内动脉中段至大脑中动脉的血栓子; 术后对动物进行行为学评分及颅脑 NCCT 检查, 两组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 该模型简便易行, 血栓位置稳定, 血栓成分与临床类似, 对动物损伤相对较小, 重复性好, 是一种较为理想的医学实验动物脑血栓模型。

【关键词】 脑血栓模型; 血栓栓塞法; 实验动物模型

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 17. 009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)17-2505-03

Experiment research of improved thromboembolism method for establishing rabbit cerebral thrombosis model^{*} YAO Xue-zhou¹, LI Guo-hui², YANG Yan², XU Ren³ (1. Functional Laboratory, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650500, China; 2. Department of Radiology, First Affiliated Hospital, Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650021, China; 3. Library, Yunnan Art University, Kunming, Yunnan 650500, China)

【Abstract】 Objective To establish the rabbit cerebral thrombosis model by the improved thromboembolism method, and to introduce the CT technology for observing and evaluating this model. **Methods** 12 rabbits were randomly divided into the sham operation group and the model group. The catheter was retrogradely inserted from the external carotid artery to internal carotid artery. The sham operation group was injected by normal saline; the model group was injected by linear long thrombosis with the help of guiding wire. The CTA contrastive examinations was performed before and after operation; the scores of behavior disorder were observed at various time points after operation and the cranial NCCT measurements were contrasted. **Results** In the comparison between before and after operation in the model group, CTA at postoperative 4 h displayed that 6 cases were succeeded in placing the thrombosis from the middle section of internal carotid artery to middle cerebral artery; the behavior score and craniocerebral NCCT examination were performed after operation, the differences between the two groups were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The model is simple, easy to operate, has the stable thrombosis location, the thrombus constituents are similar to clinic, the animal injury is relatively small, the repeatability is good, which is an ideal cerebral thrombosis model of medical experimental animal.

【Key words】 cerebral thrombosis model; thromboembolism method; experimental animal model

建立一种栓塞位置比较稳定、能模拟人类脑血栓的动物模型, 对脑血栓类疾病、溶栓治疗、出血相关因素及超过溶栓时间窗治疗的研究具有重要价值。本实验研究及借鉴了目前流行的制作方法, 并对建模方法及模型的评价指标进行了改进, 得到了一个易于观察评价, 栓塞部位及梗死范围稳定的家兔脑血栓模型, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般材料 家兔 12 只, 雌雄不限, 体质量 (2.0 ± 0.3) kg, 由昆明医科大学实验动物中心提供, 实验动物使用许可证号: SYXK(滇)K2011-0011。术前 10 h 禁食, 5 h 禁饮。编号后随机抽号分为 2 组, 即伪手术组(1 组)与建模组(2 组)。

1.2 仪器与试剂 GE Light Speed 128 层螺旋 CT, 西门子公司生产; 高温消毒锅, 型号 LDZX-50KBS, 上海申安公司生产; 一次性麻醉导管, 贵州天地药业有限公司生产; 静脉留置针, 型

号 32A, 德国贝朗公司生产; 恒温箱; 金属银导丝; 麻醉喉镜, 儿童型; 一次性气管插管, 3.5 号; 乌拉坦, 百塞勤化学技术(上海)有限公司生产(批号 20120308); 造影剂碘海醇注射液(欧乃派克 350 mg/L), 美国 GE 公司生产; 注射用青霉素钠, 中诺药业有限公司生产; 凝血酶 Thrombin, 品牌 sigma。

1.3 方法

1.3.1 建模手术 兔耳缘静脉缓慢注射乌拉坦 1 mg/kg (25%, 4 mL/kg) 麻醉。麻醉后将家兔呈头部过仰卧位固定在兔手术台上, 在麻醉喉镜辅助下气管插管。手术部位备皮, 消毒铺巾后取颈前正中切口, 于下颌角内侧舌骨水平分离出右颈总动脉(CCA), 切断该侧舌骨肌, 于颈动脉膨大处分离颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA), 结扎 ECA 各分支; CCA 近心端及 ICA 远心端用动脉夹阻流, 自颈 ECA 逆行插管至 CCA 内。取血 1 mL, 将血液加入抗凝剂适量后放入恒温箱内老化 10 min,

^{*} 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2012Y065)。

作者简介: 尧雪洲, 女, 硕士, 实验师, 主要从事机能实验科学、神经生理学研究。

制成约长 10.0 mm、直径 0.2 mm 的自体血栓;丝线牵拉 ECA 向下以减小 ECA 与 ICA 的夹角(形成钝角),小心地插入套管大约 35 mm(从颈总动脉分叉处计算),此时套管头端距离大脑中动脉(MCA)起始处 2~3 mm,尽量接近 MCA 起始。建模组借助金属银导丝注入自体血栓,伪手术组注入生理盐水。术毕逐层缝合,肌注青霉素(40 万单位/只)。

1.3.2 CTA 造影 术后 4 h 对建模组与伪手术组所有家兔行头颈部血管 CT 血管造影(CTA),并进行对比。成像方案为家兔麻醉仰卧位,碘海醇注射液(欧乃派克 350 mg/L),耳缘静脉直接注入,剂量 12~16 mL(约 4.9~6.6 mL/Kg),灌注后 70 s 的延时扫描(DCT),CT 全脑灌注成像(PWCT)作为 CTA 源图重建 CTA,判断颅内大血管阻断或狭窄及分支缺损情况。

1.3.3 行为障碍评分 参考 Langa 和 Bederson 的方法,改良后的评分标准为:满分为 12 分,分数越高,动物的行为障碍越严重。于术前及术后 8、12 h 对动物进行评分。计分规则如下:(1)家兔至地面,观察其行走情况。行为完全正常者,记 0 分;无神经损伤症状 0 分;向手术对侧倾斜者记 1 分;向对侧倾倒 2 分;损伤严重,已无法自主活动者记 3 分;昏迷、意识丧失 4 分。(2)将动物置于平地面上,分别推双肩向对侧移动;观察两侧抵抗力有无差异;检查阻力;观察两前肢的肌张力。如双侧阻力对等且有力,计为 0 分;如向手术对侧推动时阻力下降者,根据下降程度不同分为轻、中、重 3 度,分别计为 1、2、3 分;昏迷、意识丧失 4 分。(3)提家兔后肢离开地面约 1 尺,将动物两前肢置一金属网上,观察两前肢屈曲情况:如双前肢对称伸向地面,计为 0 分。对侧有前肢内收或肩内旋者,记 1 分;不能完全伸展对侧前爪 2 分;既有腕、肘的屈曲又有肩内旋不能完全伸展对侧前爪者计 3 分,昏迷 4 分。

1.3.4 头颅 NCCT 术前及术后 12 h 所有家兔(仰卧位)采用颅脑常规非强化 CT(NCCT, Noncontrast CT)。扫描方案为:电流 100~400 mV,自颅底区向上扫描至颅顶,层厚 1.25 mm,电压 100 kV,扫描时间 3.34 s。3 名放射科高年资医师,按照 Alberta Stroke Program Early CT Score (ASPECTS)标准,进行大脑中动脉供血区分析。ASPECTS 分区的每个区域分别按照影像学表现分为正常区、脑质密度降低区和水肿区。分别测量建模组梗死灶及伪手术组相对应区 CT 值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.00 生物统计学软件。两实验组术前颅脑 NCCT 值,采用独立样本 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$;两实验组术后 8、12 h 生物学行为评分数据及术前与术后 12 h NCCT 测量的 CT 值均采用了多组重复测量资料的方

差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 建模前、后家兔头颈部 CTA 结果

2.1.1 术前 CTA 对家兔头颈部血管的观察 主动脉弓造影显示家兔的弓上血管呈 2 分支结构,左右侧颈总动脉与锁骨下动脉起始部共干。术前家兔 CTA 结果表明,家兔的头颈血管结构比较稳定,本次实验中未见明显变异结构,与人类头颈部血管结构具有较好相似性和可比性。见图 1。

2.1.2 建模手术后 4 h CTA 结果 血栓栓塞组 6 例均显示颈内动脉明显狭窄,颈内动脉内至大脑中动脉内有血栓形成。该结果提示,术后 4 h,经过手术植入的血栓子稳定,未溶解,未见出血等其他并发症。见图 2。

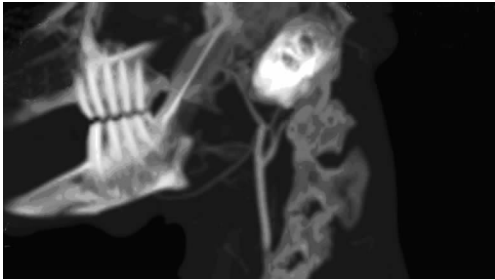


图 1 CTA 术前显示家兔头颈部血管



图 2 CTA 显示建模后家兔血栓栓塞

2.2 行为学障碍评分结果

2.2.1 术前,实验动物行为障碍评分两组均为 0 分,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 术后 8、12 h 两组家兔行为学评分

实验动物分组	动物编号	术后 8 h	术后 12 h	实验动物分组	动物编号	术后 8 h	术后 12 h
1 组(伪手术组)	1.1	2.00	1.00	2 组(建模组)	2.1	8.00	5.00
1 组(伪手术组)	1.2	2.00	0.00	2 组(建模组)	2.2	9.00	6.00
1 组(伪手术组)	1.3	1.00	0.00	2 组(建模组)	2.3	9.00	6.00
1 组(伪手术组)	1.4	3.00	2.00	2 组(建模组)	2.4	10.00	6.00
1 组(伪手术组)	1.5	1.00	1.00	2 组(建模组)	2.5	7.00	4.00
1 组(伪手术组)	1.6	1.00	0.00	2 组(建模组)	2.6	8.00	5.00
$\bar{x}$		1.67	0.67	$\bar{x}$		8.50	5.33
<i>s</i>		0.82	0.82	<i>s</i>		1.05	0.82

2.2.2 术后 8、12 h,家兔苏醒后均表现出不同程度行为障碍。Mauchly 的球形度检验,不拒绝球形假设($P=0.687$);不同时间行为学评分差异有统计学意义($P=0.00$);动物分组处理因素与时间的交互作用有统计学意义($P=0.00$);动物分组处理

差异有统计学意义($P=0.00$)。该结果提示,在不同处理组间,不同观察点观察,实验动物的行为学表现差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.3 术前及术后 12 h NCCT 头颅平片的变化

2.3.1 术前颅脑 NCCT,两组 12 只家兔双侧 CT 图像脑组织均匀对称,术前 CT 值均值约为(27.76±5.07),两组家兔脑 CT 值差异无统计学意义($P=0.863$)。见表 2。

2.3.2 术后 12 h 颅脑 NCCT,建模组家兔术后 12 h CT 平扫可发现以下 3 个征象:(1)脑动脉高密度征;(2)局部脑肿胀;(3)脑实质密度降低。同时本组 4 例 CT 图有低密度改变或灰白界限不清,轻度脑沟展平等表现。建模组患侧脑 CT 值明显

下降提示脑缺血,而伪手术组从 CT 值观察亦略有上升,见表 2,考虑由于手术等所致脑供血不足或轻度脑水肿所致。建模手术前与建模手术后 12 h,CT 结果显示,家兔建模组球脑密度下降,对比伪手术组时间,差异有统计学意义($P=0.00$);分组与时间的交互作用差异有统计学意义($P=0.00$)。分组处理间差异有统计学意义($P=0.02$)。

表 2 术前及术后 12 h 测量家兔脑组织 CT 值

实验动物分组	动物编号	术前	术后 12 h	实验动物分组	动物编号	术前	术后 12 h
1 组(伪手术组)	1.1	23.56	28.03	2 组(建模组)	2.1	27.03	11.24
1 组(伪手术组)	1.2	27.08	32.87	2 组(建模组)	2.2	21.17	13.46
1 组(伪手术组)	1.3	36.17	35.56	2 组(建模组)	2.3	37.26	20.87
1 组(伪手术组)	1.4	26.67	27.34	2 组(建模组)	2.4	28.34	12.65
1 组(伪手术组)	1.5	21.96	25.12	2 组(建模组)	2.5	23.94	16.59
1 组(伪手术组)	1.6	29.51	27.48	2 组(建模组)	2.6	30.48	17.05
$\bar{x}$		27.49	29.57	$\bar{x}$		28.04	15.31
s		5.03	4.27	s		5.59	3.54

3 讨 论

在目前各类脑血栓模型的众多建模方法中,血栓栓塞法是其中公认最适合溶栓治疗研究需要的。大鼠是目前国际上制作各种脑梗死模型中最常用的动物^[1]。但大鼠是无脑回动物,其脑组织和血管解剖以及脑白质和灰质的比例等与人类差别较大;鼠的脑体积较小,对建立模型的技术及评价的设备条件要求高。另外,很多临床中应用的诊断和治疗方法也难以在鼠模型上验证。因此脑组织较大灵长类、猪、犬等动物模型也越来越多地被应用到脑梗死实验研究中。灵长类动物无疑是研究人类脑血管疾病的最佳选择,但伦理学和经济学上的问题都限制了该类动物的广泛应用^[2]。国内有学者报道用幼猪、犬等制作脑血管模型并用于溶栓研究。但猪 ICA 入颅前在颅底破裂孔近端形成由小血管组成的网状结构,与人类解剖结构差异较大^[3]。故本次实验中采用家兔作为实验动物,家兔性格温顺,有相对较大的靶器官,其脑体积和血管直径变异较小,在一定范围内与体质量没有相关性,稳定性较好;能采用在人体普遍适用的方法及设备进行检查评估。

过去血栓模型主要采用 2 种类型的血栓,即悬浮血栓(微血栓)和经过精细切割的血栓。由于选用悬浮血栓(微血栓)容易诱发 DIC 且栓塞部位不稳定,而精细切割血栓对实验条件及设备要求较高^[4]。故本次实验中将血栓子改良为线状血栓,0.2 mm×10.0 mm,容易制作,且比较容易控制栓塞部位。

过去对脑血栓动物模型的评价指标主要选择病理学指标及行为学评分,具有明显的局限性^[5-6]。本实验引入 CT 平扫及 CTA 技术进行模型的评价,虽然 CT 平扫不能准确判断半暗带和缺血核区,但对 12 h 后的脑缺血性疾病 CT 平扫结果提示患侧密度下降,脑组织肿胀。本实验中家兔大脑梗死灶均由 CTA 及 CT 平扫证实,行为学评分也比较稳定,表明此模型稳定、重复性好。

笔者认为本实验中建立的脑血栓家兔模型,主要存在 2 个问题。第一,采用乌拉坦做静脉全麻,时间较长且对脑组织的血氧流量等有明显影响^[7-8]。如果采用短效麻醉药复合剂静脉滴注,如芬太尼和瑞芬太尼复合静脉麻醉等,可以减少麻醉

的干扰。第二,普通 CT 平扫检测,难以进行 12 h 内的早期诊断。而 CT 灌注成像能够在脑血栓早期的 6 h 内进行有效的准确判断^[9-10]。故如果需要对脑血栓早期(12 h 内)进行建模研究,在选择观察评价指标时应该采用 CT 灌注代替 NCCT。

参考文献

[1] Kenneth MS, Marc F. Animal models of focal brain ischemia[J]. Exp Translat Stroke Med, 2009, 1(3): 1-7.

[2] 许晓泉. 介入栓塞技术建立犬腔隙性脑梗死动物模型的实验研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2012.

[3] He XH, Wu JY, Li CS, et al. Evaluation of respiratory dysfunction in a pig model of severe acute dichlorvos poisoning[J]. Chin Med J, 2012, 125(20): 3612-3618.

[4] Sharlene MD, Jennifer LR, Daniel DM, et al. Murine thrombosis models[J]. J Thromb Haemost, 2004, 92(3): 486-494.

[5] Zhang HA, Gao M, Chen B, et al. Evaluation of hippocampal injury and cognitive function induced by embolization in the rat brain[J]. Anat Rec (Hoboken), 2013, 296(8): 1207-1214.

[6] 王树, 张力. 脑缺血及脑缺血-再灌注损伤动物模型制备方法 & 评价[J]. 神经药理学报, 2011, 3(2): 31-40.

[7] 吕光耀, 蔡业峰, 王立新, 等. 缺血性卒中二级预防研究中动物模型的选择应用与思考[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(2): 177-179.

[8] 刘盼功, 杜洋, 赵晓峰, 等. 脑缺血动物模型动物选择研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 17(9): 2372-2373.

[9] 吴纪凯. 对急性脑梗死动物实验结果的分析[J]. 当代医药论丛, 2014, 20(5): 189-190.

[10] 刘亚敏, 吴宿慧, 李寒冰, 等. 大鼠脑缺血模型的研究进展[J]. 中国西部科技, 2013, 9(4): 66-73.