

· 实验研究 ·

改良可逆性局灶性脑缺血模型建立

吉训明, 凌 锋, 赵喜庆, 宣 芸, 王育琴, 凌小兰, 常红军, 张志平

【摘要】 目的 改良大鼠可逆性大脑中动脉缺血模型的栓子制作方法, 增加模型稳定性和成功率, 提高脑缺血实验研究结果的可靠性。方法 体重 280 ~ 320g Wistar 雄性大鼠 60 只, 随机分成改良组 and 对照组, 每组 30 只。对照组用尼龙线一端加热法制作传统栓子, 改良组用尼龙线一端沾 silicone 胶法制作改良栓子。两组模型除栓子制作方法不同外, 其他手术步骤完全相同。采用 Zea Longa 5 分制法进行模型的神经功能评分, 采用 TTC 染色法测量并计算梗死灶的大小。比较两组模型制作成功率、成功模型中神经功能评分 3、4 级大鼠所占百分数, 以及两组大鼠脑梗死体积的变异系数。结果 改良组大鼠模型成功率高于对照组(93% 比 60%, $\chi^2 = 9.32, P = 0.002$)。改良组模型中神经功能评分 3、4 级大鼠所占比例明显高于对照组(96.4% 比 61.1%, $\chi^2 = 9.51, P = 0.002$)。改良组与对照组大鼠脑梗死体积分别为 $(4.145 0 \pm 0.501 9) \text{ cm}^3$ 和 $(3.843 5 \pm 0.816 4) \text{ cm}^3$, 前者脑梗死体积变异系数明显小于后者(12.01% 比 21.24%)。结论 改良法建立的大鼠可逆性局灶性脑缺血模型成功率高, 模型稳定, 降低了脑缺血模型制作成本, 提高了实验研究结果的可靠性。

【关键词】 脑; 缺血; 可逆; 模型

Establishment of modified reversible regional cerebral ischemic models JI Xun-ming, LING Feng, ZHAO Xi-qing, XUAN Yun, WANG Yue-qin, LING Xiao-lan, CHANG Hong-jun, ZHANG Zhi-pine. Department of Neurosurgery, Xuanwu Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China

【Abstract】 **Objective** Modifying the method of establishing reversible middle cerebral ischemic models in rats for improvement of the stability and rate of success, so as to raise the reliability of cerebral ischemic study. **Methods** Sixty male Wistar rats were randomly divided into two groups, modified and control groups, 30 rats in each group. The method of silicone-tipping on one end of the nylon suture was used to modify the establishment of embolus, and tip-heating method was used to establish the traditional embolus with all the other steps of the procedure just the same. The Zea Longa 5 scoring scale was used to estimate the neurological deficiency while TTC staining method was used to measure and calculate the volume of cerebral infarction. The percentage of successful models with 3-4 grade scorings and the coefficient of the variations of cerebral infarct volume were used to estimate the stability of the models. **Results** The rate of success of establishment models in the modification group was significantly higher in comparing with the traditional group(93% vs 60%, $\chi^2 = 9.32, P = 0.002$). The percentage of model establishment with 3-4 grade neurological scores in modification group was higher than that in the traditional group(96.4% vs 61.1%, $\chi^2 = 9.51, P = 0.002$). The cerebral infarct volume in modification group and traditional group were $(4.145 0 \pm 0.501 9) \text{ cm}^3$ and $(3.843 5 \pm 0.816 4) \text{ cm}^3$, and the coefficients of variation were 12.01% and 21.24% respectively, which indicated that the stability of models was significantly higher in modification group than in the traditional one. **Conclusions** The rates of success and stability of the models for reversible focal cerebral ischemia made by the modification method were significantly improved, with decreasing the cost of model creation and increasing the accuracy of study of ischemic cerebral vascular disease. (J Intervent Radiol, 2005, 14:178-181)

【Key words】 Cerebral; Ischemia; Reversible; Model

基金项目: 国家博士后基金资助项目(2001-5)和北京市科技新星资助项目(2003B36)

作者单位: 100053 北京 首都医科大学宣武医院神经外科(吉训明、凌锋、赵喜庆、宣芸) 临床药理研究室(王育琴、凌小兰、常红军、张志平) 万方数据

通讯作者: 凌 峰

线栓大鼠大脑中动脉缺血模型具备制作方法简便, 不改变大鼠颅内压和缺血时间可控等优点, 适合于脑梗死缺血半暗区病理生理研究、影像学研究、缺血/再灌注损伤机制和脑保护药物研究。国外文献报道, 线栓大鼠局灶性脑缺血模型手术成功率为

30% ~ 70% ,神经功能评分和脑梗死体积变异较大^[1]。本研究目的是改良可逆性线栓大鼠大脑中动脉缺血模型 ,提高模型制作成功率和脑梗死体积稳定性 ,增加实验数据的可靠性。

材料与方法

一、手术器械
手术器械包括德国 Carl Zeiss 显微镜 1 台 ,双极电凝 1 把 ,显微镊 2 把、显微剪刀 1 把 ,血管阻断夹 2 只 ,市售 0.26 mm 直径尼龙线 1 卷 ,细砂纸 1 张 ,市售 silicone 胶 ,油性记号笔一支 ,手术刀 1 把 ,止血钳 2 把 ,直尺 1 把 ,10% 水合氯醛(首都医科大学宣武医院制剂室)100 ml ,四氮唑红(TTC ,北京生化制药厂)100 mg 和体温表一支。

二、实验动物
SPF 级 Wistar 雄性大鼠 60 只 ,体重 280 ~ 300 go。由首都医科大学实验动物中心提供。

三、实验分组
将 60 只大鼠随机分成实验组和对照组 ,每组 30 只。实验组采用改良法制作栓子 ;对照组采用传统法制作栓子。两组模型除栓子制作方法不同外 ,其他手术步骤与文献报道完全相同^[1]。

四、模型制作
(一)麻醉 所有大鼠术前在我院动物中心饲养 1 周以上。术前称重 ,按每公斤体重 10% 水合氯醛 3.5 ml 腹腔注射麻醉。为了排除麻醉因素对手术成功率的影响 ,将麻醉失败或出现喉头水肿导致呼吸困难的大鼠排除在外。

(二)栓子制作
1.改良栓子制作 :用细砂纸将直径 0.26 mm ,长 3 cm 尼龙丝线段一端磨钝 ,将头端约 1 mm 插入 silicone 胶中 ,轻轻提起形成一个直径在 0.30 ~ 0.35 mm 椭圆形小球 ,在 40W 白炽灯下烘干或自然晾干。选有效球用油性记号笔在距离 silicone 球顶端 1.8 mm 处做一记号 ,作为栓子插入颈内动脉的深度标记(1.6 ~ 1.8 mm)。

2.传统栓子制作方法
将长 3 cm ,直径 4-0(0.27 ~ 0.28 mm)尼龙线段一端加热呈圆球。用油性记号笔在距离圆球头端 1.8 mm 处作一记号备用。

(三)模型制作 两组模型除栓子制作方法不同外 ,手术步骤与文献报道完全相同^[1]。术中监测大鼠体温。血管阻断 3 h ,拔除栓子使血管再通。血管再通 24 h 进行神经功能评分并处死大鼠取脑组织。

(四)模型成功的标准 模型成功的标准是出现明确的右侧大脑中动脉缺血的神经功能症状。

五、神经功能评分
采用 Zea Longa 5 分制评分法 :不出现神经功能症状(0) ,出现右侧 Horner 征(1) ,拎起尾巴时 ,左前爪不能伸直(2) ,向左侧转圈(3) ,向左侧倾倒(4) ,死亡(5)。

六、脑梗死体积
用 TTC 染色法测定脑梗死体积。处死大鼠取出脑组织置于冰上。去除嗅脑和小脑 ,测量并记录大脑长度。在 1% 冰磷酸缓冲液中 ,将大脑自头侧向足侧切成等厚 6 块脑组织片 ,放入 0.4% 的 TTC 5 ml 中 ,37℃ 水育 30 min。放入 10 ml 4% 的中性多聚甲醛中固定 24 h ,取出后用数码相机摄像。梗死脑组织为苍白色 ,正常脑组织为粉红色。用 IBA2000 图像分析系统测量和计算脑梗死体积。

七、模型成功率
计算实验组与对照组大鼠出现确切神经功能症状的百分数 ,比较两组模型成功率有无差异。

八、脑梗死模型稳定性
用神经功能评分为 3、4 级大鼠占成功模型总数的百分数和脑梗死体积的变异系数代表模型稳定性。

九、统计学处理
模型成功率和神经功能评分比较采用 χ^2 检验。脑梗死体积测量采用 $\bar{x} \pm s$,脑梗死体积稳定性(离散程度)采用变异系数表示。

结 果

一、模型成功率
两组大鼠模型成功率见表 1。结果显示实验组大鼠模型成功率高于对照组($\chi^2 = 9.32$, $P = 0.002$)。

表 1 两组模型成功率比较

分组	成功模型数	失败模型数	合计	成功率(%)
实验组	28	2 失败 1 死 1)	30	93.3
对照组	18	12 失败 9 死 3)	30	60.0

$\chi^2 = 9.32$, $P = 0.002$

二、神经功能评分
从表 2 可见 ,实验组 28 只成功模型中 22 只神经功能评分为 4 级 ,5 只为 3 级。神经功能评分为 3、4 级模型占 96.4%。对照组 18 只成功模型中 ,神经功能评分 2、3 级的模型均为 5 只 ,4 级的模型 6

只。神经功能评分为 3、4 级模型成功率为 61.1%。实验组模型神经功能评分较对照组高($\chi^2=9.51, P=0.002$)。

表 2 两组模型神经功能评分

神经功能评分	I	II	III	IV	总数
实验组	0	1	5	22	28
对照组	2	5	5	6	18

三、脑梗死体积

实验组和对照组大鼠脑梗死体积和变异系数度见表 3,提示实验组模型脑梗死体积较对照组稳定。

表 3 实验组与对照组脑梗死体积比较

分组	脑梗死体积($\bar{x} \pm s$)	变异系数(%)	总数
实验组	4.1450 \pm 0.5019	12.11	28
对照组	3.8435 \pm 0.8164	21.24	18

讨 论

脑缺血/再灌注损伤模型较多。国内外学者认为线栓大鼠大脑中动脉缺血模型与人脑缺血/再灌注病理生理改变最为接近,模型较稳定和可重复性高,为国内外广泛采用^[1-3]。但线栓可逆性大鼠大脑中动脉缺血模型仍存在一定缺陷,如由于部分 Wistar 大鼠颅底颈动脉孔直径变异(变细),导致线段无法插入颅内。或由于颈内动脉颅内段管径变异,线段头端不能到达颈内动脉分叉部或线段头端不能完全闭塞大脑中动脉,降低了脑梗死模型成功率。另外,传统线栓大鼠大脑中动脉缺血模型制作过程中所用栓子头端的圆球由加热冷却所致,硬而无弹性,表面粗糙,栓子插入时易造成颈内动脉和大脑前动脉刺激和内膜损伤,较易发生颈内动脉穿孔(蛛网膜下腔出血)和继发血栓形成。很大一部分大鼠由于颈内动脉痉挛,在拔除栓子的瞬间由于血管破裂导致蛛网膜下腔出血而死亡。

检验传统模型是否成功的方法是使用 0.2% Evan 蓝血管内注射,模型成功的标准是颅内颈内动脉和大脑前动脉因栓子插入时损伤血管内膜导致血管染色,如未见内膜损伤则提示模型失败^[1],提示传统线栓法制作模型成功的标准是血管内皮的损伤。而血管内皮损伤会导致继发血栓形成或血管痉挛,加重病理生理改变。另外,加热所致的栓子头端的小球无法根据血管内径变异发生适形改变,易发生栓塞不到位(栓子过大)或血管闭塞不完全(栓子过小),降低了脑梗死模型稳定性。改良的线栓脑缺血

动物模型具有以下优点。

1.制作栓子所选用丝线直径(0.26 mm)较传统方法所选用栓子直径(0.27~0.28 mm)细,增加栓子柔软度,使得栓子易于通过颈动脉颅底孔,减少了颈动脉穿孔发生率。传统线栓动物模型遇到的主要问题是丝线无法通过颅底动脉孔,如用手勉强通过颅底孔,则极易引起颈动脉痉挛,影响结果的稳定性。直径细的栓子较柔软,不易发生颅内血管穿孔,提高了手术成功率。本研究结果显示,改良方法制作模型成功率为 96.1%,远远高于传统方法制作模型 61%成功率^[4,6]。

2.改良的栓子适应性更强,适合颅内血管变异,使得栓子插入血管深度更精确。栓子前端一薄层 silicone 干燥后具有弹性,在栓子头端插入颈内动脉 1.8 mm 后能既准确又完全堵住患侧大脑中动脉开口,无需因大鼠体重和栓子头端小球的直径不同而反复调节栓子插入深度,提高脑梗死模型稳定性。实验结果显示,改良法制作脑梗死模型神经功能评分为 3、4 级大鼠所占比例为 96.4%,远高于传统线栓法(61%)。另外,改良组模型脑梗死体积的变异系数也小于传统组,提示改良法脑梗死模型稳定,提高了实验结果的准确性^[7-9]。

3.改良的栓子头端更光滑,对血管内膜损伤小,不易诱发血管痉挛。改良栓子头端用细砂纸磨钝后,在头端蘸一层 silicone,由于 silicone 在干燥之前为液体,干燥之后在丝线头端形成一光滑柔软的小球,减轻了血管内膜损伤。传统的栓子头端经加热处理后,小球的头端受热不均匀,形成的小球表面不光滑,易损伤血管内皮或穿破血管^[10,11]。

4.改良的栓子制作更简单。将丝线一端磨钝,在头端轻轻蘸上一层 silicone 后加热烘干或自然风干即成。传统栓子制作时所选用的丝线直径需根据大鼠体重进行调整,尼龙线直径越粗,加热时形成的球越大,无法通过颅底孔,或堵不住大脑中动脉开口。尼龙线直径过细则无法完全堵塞大脑中动脉开口,造成模型制作失败或梗死体积不稳定。另外,丝线头端加热温度难以控制,加热过高时形成的球直径太大,加热不足使球表面粗糙。粗糙的栓子在血管再通时易刺激和损伤血管,造成血管痉挛和继发血栓形成。这也是传统线栓模型在拔除栓子血管再通时大鼠突然死亡的主要原因。

理想的脑缺血/再灌注损伤模型应具备制作简单、与人体接近、稳定和可重复性强等优点^[1,12]。本研究结果显示,改良线栓大鼠大脑中动脉缺血模型

无论模型成功率、脑梗死体积的稳定性、神经功能评分的稳定性均优于传统线栓模型,提高了研究结果的准确性。

[参 考 文 献]

- [1] Zea Longa E, Weinstein PR, Carison S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20 : 84-91.
- [2] Ding Y, Li J, Rafols JA, et al. Prereperfusion saline infusion into ischemic territory reduces inflammatory injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 2002, 33 : 2492-2498.
- [3] Macdonald RL, Stoodley M. Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurol Med Chir Tokyo*, 1998, 38 : 11.
- [4] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 1989, 20 : 1037-1043.
- [5] Kawamura S, Shirasawa M, Fukasawa H, et al. Attenuated neuropathology by nitvadipine after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 1991, 22 : 51-55.
- [6] Boland HG, Persson L, Hillered L, et al. Regional cerebral blood flow and histopathologic changes after middle cerebral artery occlusion

in rats. *Stroke*, 1989, 20 : 930-937.

- [7] Persson L, Hardemark HG, Bolander HG, et al. Neurologic and neuropathologic outcome after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 1989, 20 : 641-645.
- [8] Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10 : 290-293.
- [9] Del-Zoppo GJ, Wagner S, Tagaya M. Trends and future developments in the pharmacological treatment of acute ischaemic stroke. *Drugs*, 1997, 54 : 9-38.
- [10] Shuaib A, Yang Y, Siddiqui MM. Intraarterial urokinase produces significant attenuation of infarction volume in an embolic focal ischemia model. *Exp Neurol*, 1998, 154 : 330-335.
- [11] Yanamoto H, Nagata I, Hashimoto N, et al. Three-vessel occlusion using a micro-clip for the proximal left middle cerebral artery produces a reliable neocortical infarct in rats. *Brain Res Protoc*, 1998, 3 : 209-220.
- [12] Ding YC, Li J, Luan XD, et al. Neuroprotection of regional brain cooling and local saline infusion into ischemic territory in rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosurgery*, 2004, 54 : 956-965.

(收稿日期 2004-10-25)

· 消息 ·

举办国际会议和学习班通知

复旦大学附属中山医院放射科乘百年校庆大喜之际,将于 2005 年 6-7 月间相继举办系列学术活动,以示纪念,繁荣学术,促进交流,共谋发展,携同提高。学术活动分别为(1)2005 年上海首届肝癌综合介入诊疗国际会议(6 月 25-26 日为期 2 天)(2)国家级继续医学教育项目——介入放射学学习班(6 月 27 日—7 月 2 日为期 6 天,可获 I 类学分 14 分)(3)国家级继续医学教育项目——医学影像新技术的应用及其进展学习班(7 月 3-10 日为期 8 天,可获 I 类学分 18 分)。本次系列学术活动在以往举办多届学术活动和学习班的基础上,着眼于临床影像诊断与介入技术实用性和科学性的讨论与介绍。既强调新技术、新知识和新概念的传播,又注重临床实践经验总结和深化,尽量把临床实际工作和科研成果有机地结合起来,在提高诊断和操作水平的同时,增强一定的科研意识和科研能力。届时还将安排读片讨论和介入操作示范,并由专家教授进行讲解及商讨,从而强化学习内容,验证学习成果。

欲参加学习活动者,请与中山医院放射科李轶晨、吴东联系,并可获取相关资料信息等(如具体授课内容、报名费用和须知等)。

联系电话 021-64041990×2459(李轶晨)

021-64041990×2792(吴东)

E-mail :wudong@zshospital.net

中山医院网站 :www.zshospital.com

地址 :上海市医学院路 136 号,复旦大学附属中山医院。

邮政编码 200032

作者：[吉训明](#)，[凌锋](#)，[赵喜庆](#)，[宣芸](#)，[王育琴](#)，[凌小兰](#)，[常红军](#)，[张志平](#)，[JI Xun-ming](#)，[LING Feng](#)，[ZHAO Xi-qing](#)，[XUAN Yun](#)，[WANG Yue-qin](#)，[LING Xiao-lan](#)，[CHANG Hong-jun](#)，[ZHANG Zhi-pine](#)

作者单位：[吉训明,凌锋,赵喜庆,宣芸,JI Xun-ming,LING Feng,ZHAO Xi-qing,XUAN Yun\(100053 北京首都医科大学宣武医院神经外科\)](#)，[王育琴,凌小兰,常红军,张志平,WANG Yue-qin,LING Xiao-lan,CHANG Hong-jun,ZHANG Zhi-pine\(100053 北京首都医科大学宣武医院临床药理研究室\)](#)

刊名：[介入放射学杂志](#) **ISTIC PKU**

英文刊名：[JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY](#)

年，卷(期)：2005，14(2)

被引用次数：4次

参考文献(12条)

- 1.Zea Longa E.Weinstein PR,Carison S [Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats](#) 1989
- 2.Ding Y.Li J.Rafols JA [Prereperfusion saline infusion into ischemic territory reduces inflammatory injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats](#) 2002
- 3.Macdonald RL,Stoodley M [Pathophysiology of cerebral ischemia](#) 1998
- 4.Nagasawa H.Kogure K [Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion](#) 1989
- 5.Kawamura S.Shirasawa M.Fukasawa H [Attenuated neuropathology by nitvadipine after middle cerebral artery occlusion in rats](#) 1991
- 6.Boland HG.Persson L.Hillered L [Regional cerebral blood flow and histopathologic changes after middle cerebral artery occlusion in rats](#) 1989
- 7.Persson L.Hardemark HG.Bolander HG [Neurologic and neuropathologic outcome after middle cerebral artery occlusion in rats](#) 1989
- 8.Swanson RA.Morton MT.Tsao-Wu G [A semiautomated method for measuring brain infarct volume](#) 1990
- 9.Del-Zoppo GJ.Wagner S.Tagaya M [Trends and future developments in the pharmacological treatment of acute ischaemic stroke](#) 1997
- 10.Shuaib A.Yang Y.Siddiqui MM [Intraarterial urokinase produces significant attenuation of infarction volume in an embolic focal ischemia model](#) 1998
- 11.Yanamoto H.Nagata I.Hashimoto N [Three-vessel occlusion using a micro-clip for the proximal left middle cerebral artery produces a reliable neocortical infarct in rats](#) 1998
- 12.Ding YC.Li J.Luan XD [Neuroprotection of regional brain cooling and local saline infusion into ischemic territory in rats with transient middle cerebral artery occlusion](#) 2004

相似文献(10条)

1. 期刊论文 [周爱民](#),[李清君](#),[陈晓玲](#),[李文斌](#) [脑预缺血引起大鼠海马细胞膜腺苷受体数量和 亲和力升高及其对神经元的保护作用](#) -[生理学报](#)2001, 53(4)
采用放射性配基结合法,测定大鼠全脑缺血后海马细胞膜腺苷(adenosine, ADO)受体数量及亲和力的变化,以探讨其与脑缺血耐受形成之间的关系。发现缺血6min即可导致海马组织明显的神经元延迟性死亡(delayed neuron death, DND),缺血3min不足以引起海马组织明显的DND;而经过3min预缺血处理,可明显减轻间隔1d后6min缺血引起的海马DND(P<0.01)。与此相对应,缺血3min再灌1和3d时,ADO受体数量及亲和力明显高于sham组(P<0.05),而缺血6min再灌1和3d时,ADO受体数量明显低于sham组(P<0.05),但亲和力高于sham组(P<0.05)。与单纯6min缺血再灌4h、1和3d时相比,3min预缺血+6min缺血(间隔1d)再灌后,ADO受体数量及亲和力均显著升高(P<0.05)。这些结果表明,脑预缺血处理可使大鼠海马细胞膜ADO受体数量增多,亲和力增强,并能对抗损伤性缺血引起的ADO受体数量减少,提示腺苷受体数量及亲和力的变化在脑缺血耐受形成过程中发挥了重要的作用。

2. 期刊论文 [薛辛东, 芦惠, XUE Xindong, LU Hui 新生儿缺氧缺血性脑病的诊治要点 -临床误诊误治2000, 13\(5\)](#)

编者按健康的儿童是人类的未来。儿童健康保健的首要措施,是防治儿童期疾病,降低婴幼儿死亡率和发病率。据北京市1998年死因构成统计,损伤与中毒、严重肿瘤、先天异常、呼吸系统疾病和神经系统疾病构成了儿童期前5位死因。面向新世纪,我国儿科学还面临着许多问题和挑战。

3. 期刊论文 [高永翔, 张发荣, 孙鸿辉, 雷鸣, 曹万慧 脑脉通注射液对缺血中风模型大鼠脑组织肿瘤坏死因子和降钙素](#)

[基因相关肽的影响 -成都中医药大学学报2001, 24\(1\)](#)

目的:研究中药脑脉通注射液对缺血中风模型大鼠的早期治疗机理。方法:塑造大鼠缺血中风模型,采用RIA法检测,观察中药脑脉通注射液对缺血中风模型各组大鼠脑组织TNF- α 、CGRP含量的影响。结果:具有补肾益气、活血开窍功效的脑脉通注射液能拮抗TNF- α 对缺血中风模型大鼠神经细胞的免疫病理损害,与模型组相比,有极显著差异($P<0.01$);脑脉通注射液能提高缺血中风模型大鼠脑组织CGRP含量,改善脑血管舒缩失衡状态,与模型组相比,有极显著性差异($P<0.01$)。脑脉通注射液的以上作用存在量效关系。其作用亦优于阳性对照药丹参注射液($P<0.05$)。结论:脑脉通注射液的以上作用最终体现于它能促进缺血中风模型大鼠脑组织细胞损伤的修复和避免更广泛的损害。

4. 期刊论文 [邓敏, 车小群 牛磺酸对孕鼠子宫胎盘缺血引起胎鼠脑组织损伤的保护机制的研究 -现代妇产科进展](#)

2006, 15(2)

目前,对新生儿缺氧性脑病的研究已经取得了很大的进展,出生前,胎儿在宫内发育过程中因宫内缺血而引起脑组织损伤的发生机制及防治方法,成为人们关注的热点。牛磺酸(taurine, Tau)是一种含硫氨基酸的衍生物,自然状态下广泛分布于动物体内,以脑、心脏、视网膜含量最高。研究表明, Tau对神经组织缺血、缺氧及缺血再灌注损伤有明显的防治作用[1]。我们以孕鼠为研究对象,制作孕鼠的子宫胎盘缺血模型,以胎鼠脑组织一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)量的表达为指标,探讨牛磺酸对孕鼠子宫胎盘缺血引起胎鼠脑组织损伤的保护机制。

5. 学位论文 [江君 低氧预适应减轻脑中动脉阻塞致小鼠缺血性脑损伤及其机制探讨 2009](#)

氧的利用和调节是高等生物生存的基本条件,而低氧性损伤和适应参与了许多病理生理过程及一些疾病的发生,如窒息、高原反应、缺血、脑中风、心肌梗死,以及癌细胞耐药和转移等。缺血/低氧预适应(Ischemic/hypoxic preconditioning, I/HPC)最初于1986年由美国学者Murry在心脏组织中发现,随后人们又在脑、肺、肝和肾等组织器官中观察到了类似现象。HPC是一种内源性保护机制,即亚致死性缺血/低氧预刺激可诱发组织器官对继发严重缺血/低氧所致损伤产生耐受。脑I/HPC引起的保护机制为临床寻找防治缺血/低氧性脑损伤的策略提供了新思路,但目前关于其发生发展的细胞分子机制尚不清楚。利用已建立小鼠整体I/HPC模型,我们曾发现,随着低氧暴露次数的增加,小鼠低氧耐受时间明显延长,并且蛋白激酶C(PKC)家族的10个亚型中,经典型PKC(cPKC) β II和 γ ,以及新异型PKC(nPKC) ϵ 膜转位水平(激活程度)在脑组织内明显增高,提示它们可能参与了小鼠脑I/HPC的发生发展过程。然而,这种I/HPC是否能够减轻小鼠脑缺血性损伤,以及cPKC β II、 γ 和nPKC ϵ 在其中的作用还不清楚。据此,本研究拟利用小鼠I/HPC和左大脑中动脉阻塞(MCAO)所致脑局灶缺血模型,通过观察缺血后脑梗死面积、水肿率、神经行为学改变和神经细胞丢失等,来探讨I/HPC对MCAO诱发脑缺血性损伤的影响;同时,应用cPKC γ 抑制剂(Gö6983)和PKC非亚型特异性激动剂(PMA),探讨cPKC γ 膜转位(激活)和蛋白表达量变化在I/HPC保护缺血性脑组织中的作用。所获研究结果将进一步丰富人们对脑I/HPC信号转导机制的认识。

实验在室温20-22℃下进行,选用成年雄性BALB/c小鼠(12-14w, 18-22g),动物实验方法按照美国国立卫生研究院(NIH)制定的《实验动物饲养和使用》指南(NIH Publication No. 80-23)进行。实验动物随机分为假手术(S)、缺血(I)、I/HPC+I、I/HPC+Gö6983+I,以及PMA+I等5组。小鼠在I/HPC(低氧暴露4次)处理后1小时,再进行MCAO缺血模型的制备,术后6小时对小鼠的神经行为学改变进行评分和TTC染色,以及脑梗死面积、梗死区密度值和水肿率的分析。然后,收集缺血核心区(Ic)、半影区(P)和缺血对侧皮质(C)组织,进行胞浆、膜相关及胞膜蛋白组分的提取。应用蛋白印迹(Western blot)方法,观察I/HPC对小鼠脑缺血核心区、半影区及缺血对侧皮质组织内cPKC γ 膜转位水平及蛋白表达量变化的影响。同时,应用尼氏(Nissl)染色,观察I/HPC对小鼠脑缺血半影区神经细胞丢失的影响,并分别进行侧脑室和腹腔注射Gö6983和PMA,观察cPKC γ 膜转位水平对I/HPC保护作用的影响。实验数据使用单一因素方差分析(Oneway ANOVA)和Bonferroni检验进行统计学处理,并以均数士标准误(X \pm S.E.)表示,其中 $P<0.05$ 为差异显著。实验结果如下:

1. 随着低氧暴露次数的增加,小鼠对低氧的耐受时间逐渐延长与低氧暴露1次(H1, 17.8 \pm 0.6min)相比,重复低氧暴露2次(H2, 25.4 \pm 0.8min)、3次(H3, 30.8 \pm 0.9min)和4次(H4, 35.6 \pm 1.3min)小鼠的低氧耐受时间明显增加($p<0.05$, $n=50$),提示本实验成功地制备了小鼠I/HPC模型。以下I/HPC小鼠特指低氧暴露4次组小鼠。

2. 小鼠MCAO可诱发皮层、海马和丘脑等3种脑缺血模式经TTC染色证实, MCAO可诱发明显的小鼠局灶性脑缺血,其手术成功率约为79%。我们还发现MCAO可诱发皮层、海马和丘脑等3种典型缺血模式,其中皮层缺血约占40.3%,海马缺血约占39.0%,丘脑缺血约占7.3%,联合缺血(同时包括皮层和海马缺血)约占13.4%。其中小鼠MCAO缺血模型可诱发海马和丘脑缺血为本实验室首次报道。

3. I/HPC明显缓解MCAO所致神经行为学改变缺血后6小时进行小鼠神经行为学评估。在单项神经行为学指标中发现,皮层和海马局灶性缺血损伤都可导致明显的神经行为改变,如运动减少、姿势侧倾、拖地步态、转圈、低反应性、前肢屈曲、前肢肌力下降和运动失调等,而I/HPC可明显缓解这些神经行为学改变;在神经行为学综合评价中, I/HPC同样明显改善小鼠皮层或海马缺血后神经行为学的综合评分($p<0.05$, $n=20$)。

4. I/HPC明显降低小鼠脑梗死面积、水肿率和梗死区密度值TTC染色证实, MCAO可诱发明显的小鼠局灶性脑缺血。在皮层缺血模式中,梗死体积约占全脑35%,脑水肿率约为5%;与单纯缺血组相比, I/HPC明显降低MCAO所致局灶性脑缺血梗死体积($p<0.05$, $n=12$),脑水肿率($p<0.05$, $n=12$)和梗死区密度值($p<0.05$, $n=12$)。在海马缺血模式中, I/HPC明显降低缺血梗死区密度值($p<0.05$, $n=12$),但是未明显降低脑梗死体积和水肿率。

5. I/HPC明显缓解缺血半影区神经细胞的丢失缺血半影区神经细胞丢失在不同时间点(缺血后0, 6, 12和24小时)通过Nissl1染色进行研究。结果显示在缺血后6小时,部分神经细胞呈现出坏死形态学改变如核固缩,核碎裂等,而在缺血后12和24小时,几乎所有的神经细胞都呈现明显坏死形态学改变。我们采用缺血后6小时作为实验观察点,发现I/HPC明显缓解脑缺血所致神经细胞的丢失($p<0.05$, $n=6$)。

6. I/HPC对缺血组织内cPKC γ 膜转位和蛋白表达量的影响在I/HPC对缺血小鼠脑内cPKC γ 膜转位水平影响的研究中发现,在缺血后6小时, cPKC γ 膜转位水平在缺血核心区和半影区都明显下降,而I/HPC可明显缓解这种MCAO所致cPKC γ 膜转位水平的降低($p<0.05$, $n=6$)。在缺血24小时后,同样, cPKC γ 膜转位水平在缺血核心区和半影区也都明显下降,然而I/HPC却不能缓解cPKC γ 膜转位的下降。本结果表明, I/HPC可能通过增高cPKC γ 膜转位水平减轻脑缺血损伤。

本研究还显示,缺血损伤明显降低缺血核心区及半影区cPKC γ 的蛋白表达水平($p<0.05$, $n=6$),但无论在缺血后6小时还是24小时, I/HPC都不能缓解这种MCAO所致cPKC γ 蛋白表达量的降低($p>0.05$, $n=6$)。

7. cPKC γ 抑制剂和PKCs激动剂对I/HPC脑保护作用的影响侧脑室注射cPKC γ 抑制剂Gö6983(6nmol/L)可明显抑制缺血核心区、半影区和对侧皮层组织内cPKC γ 的膜转位水平。与I/HPC+I组相比, Gö6983明显增高脑梗死梗死体积($p<0.05$, $n=6$)、梗死区密度值($p<0.05$, $n=6$)和水肿率($p<0.05$, $n=6$)。而注射Gö6983溶剂DMSO(0.1%)并没有明显影响脑梗死梗死体积,梗死区密度值和水肿率。结果提示cPKC γ 膜转位的抑制减弱了I/HPC对缺血脑组织的保护作用。

此外,腹腔注射PKC非亚型特异性激动剂PMA(0.15mg/kg)明显增高缺血核心区、半影区和对侧皮层组织内cPKC γ 的膜转位水平。与单纯缺血组相比, PMA明显减小梗死区密度值($p<0.05$, $n=6$)和水肿率($p<0.05$, $n=6$),但对梗死体积影响不大。结果提示PKC非亚型特异性激活可部分模拟I/HPC的脑保护作用。

综上所述,本研究发现MCAO可诱发小鼠皮层、海马和丘脑等3种典型缺血模式; I/HPC明显减轻MCAO所致脑缺血性损伤,即减小脑梗死面积,降低脑水肿率和梗死区密度值,以及缓解缺血半影区神经细胞的丢失和缺血所致神经行为学的改变;在此基础上,我们进一步发现I/HPC可缓解缺血所致cPKC γ 膜转位水平的下降,同时,应用cPKC γ 抑制剂Gö6983和PKC激动剂PMA发现, 特异性抑制cPKC γ 激活或PKC非亚型特异性激活可分别减弱或部分模拟I/HPC的神经保护作用。本研究所获成果不仅丰富了人们对脑I/HPC信号转导机制的认识,而且为我们后续分离、鉴定与I/HPC神经保护作用相关的已知或未知信号蛋白奠定了基础。同时,也为临床上开发抗缺血/低氧性脑损伤药物提供一定的实验依据。

6. 期刊论文 [荣丽华, 林永泉, RONG Lihua, LIN Yongquan 脑循环功能治疗仪治疗后循环缺血患者的疗效观察 -中国](#)

[现代医生2008, 46\(5\)](#)

目的 观察脑循环功能治疗仪对治疗后循环缺血的临床疗效。方法 将后循环缺血患者80例随机分为两组:对照组40例,给予营养神经,促进改善血液循

环药物及对症处理;治疗组40例,除上述处理外,予物理治疗即脑循环功能治疗仪治疗.治疗20d后观察效果.结果 脑循环功能治疗仪治疗后循环缺血,总有效率达95%,治愈率、平均治愈天数:治疗组分别为75.0%、(8.97±3.34)d;对照组分别为52.5%、(13.28±3.18)d,两组比较均有统计学意义(P<0.05).结论 脑循环功能治疗仪治疗后循环缺血效果显著,对脑功能恢复有明显促进作用.

7. 期刊论文 [张沁园, 寇全春](#) [脑通滴鼻液治疗缺血中风临床研究](#) -[山东中医药大学学报](#)2006, 30 (1)

近年来,我们采用自制之脑通滴鼻液治疗痰瘀互结型缺血中风,临床取得满意疗效,为分析该方的具体作用机制,进行了相关指标的临床观察研究,现报告如下.

8. 会议论文 [王秀云, 李积胜, 刘公望, 郭义, 潘荣菁, 张果忠, 李桂兰, 韩煜, 王强](#) [井穴放血法对急性脑缺血大鼠缺血区](#)

[脑组织凋亡相关蛋白的影响](#) 2003

[目的]观察井穴放血法对急性缺血性脑损伤的脑保护作用.[方法]将实验大鼠分为假手术组、脑缺血组和脑缺血+井穴放血治疗组,一侧大脑中动脉阻塞急性缺血性脑损伤模型(MCAO),治疗组在脑缺血后即刻给予井穴放血治疗,出血量为每穴1滴.分别于缺血后的1,3,6,24h处死,进行免疫组织化学染色,检测缺血区皮层脑组织c-fos蛋白(FOS)及HSP70蛋白免疫阳性细胞,以观察井穴放血法对急性缺血性脑损伤后早期抑制凋亡基因表达的影响.[结果]c-fos蛋白和HSP70蛋白在缺血区皮层脑组织表达增加,缺血后1h HSP70无表达,FOS表达增加,在随后观察的3,6,24h时程内HSP70和FOS均有随缺血时间延长表达增多的趋势.井穴放血治疗组在以上各时程c-fos及HSP70免疫阳性细胞数均高于同时段的缺血病模组,有统计学意义.[结论]急性脑缺血后应用井穴放血干预治疗可明显增强缺血区脑组织对抗神经细胞凋亡的即刻早期基因c-fos蛋白和抗应激HSP70蛋白的表达,从而提高了缺血后神经细胞对缺血、缺氧的耐受和适应能力,提高了缺血后神经元的可塑性,进而可影响晚期目的基因的表达,抵抗细胞凋亡的发展,增强脑修复能力.表明井穴放血法对中风初期有一定的脑保护作用.

9. 期刊论文 [王晓斌, 况铎, 刘跃, WANG Xiao-bin, KUANG Xian, LIU Yue](#) [快速预缺血处理对兔脑再缺血的保护作用](#) -

[中国现代医学杂志](#)2005, 15 (11)

目的探讨预缺血后短暂灌注(快速预缺血)对兔脑再缺血的影响.方法股动脉放血至平均动脉压35~40mmHg时,阻断双侧颈总动脉诱导脑缺血.20只兔随机分为对照组:脑缺血10min;实验组:脑缺血3min灌注30min后、脑再缺血10min,观察两组脑再缺血3、10d海马CA1区正常神经元密度.结果实验组脑缺血3d后海马CA1区正常神经元密度明显高于对照组,实验组脑缺血10d后海马CA1区正常神经元密度与对照组无明显差异.结论快速预缺血对兔脑再缺血具有保护作用,但仅出现在再灌注3d后而非10d后.

10. 学位论文 [张慧慧](#) [清脑滴丸对缺血海马、皮层MARCKS磷酸化及其基因表达动态变化的影响](#) 2006

脑血管病是中老年人的常见病、多发病,其发病率高、致残率高、死亡率高,脑血管病在大多数国家死因顺位居前三位,幸存者75%以上留有不同程度的后遗症,当前对脑血管的预防、治疗效果虽有一定的提高,但无突破性进展,一个重要原因是对其发病机理认识不清.近20年来,人们从分子生物学、病理学、生理学、生物化学、药理学等角度对于脑缺血的发病机制、病理过程进行研究,认为脑缺血损害涉及到自由基损伤、能量耗竭、钙超载等问题,与兴奋性氨基酸、一氧化氮、内皮素等关系密切.随着研究的不断深入,发现许多分子介导、参与了脑缺血损害过程,其中对细胞跨膜信息传递的研究认识到不仅在神经系统乃至整个生命活动中都起着极为基本和重要的作用.许多疾病的发生和发展与细胞信号转导异常都有直接或间接的关系。

缺血性脑血管病最核心的问题是神经细胞损害引起的神经功能障碍,因此,治疗缺血性脑血管病的最重要任务是保护和恢复神经细胞功能,神经保护药物可以增强神经细胞对缺血的耐受性并最终促进功能恢复,研制临床行之有效的神经保护药物仍是当今神经学科领域的重点.许多神经保护剂虽然在Ⅱ、Ⅲ期临床研究中看到希望,但因药效/毒性、副作用等原因使其进一步的研究受到限制.中药复方具有多组分、多环节、多靶点的治疗优势,有可能成为今后神经保护剂的突破点,将神经分子生物学等现代理念引入中医药的发展进程中,这样更有利于弄清疾病发生、发展以及中药治疗的分子机制。

本课题观察急性缺血后海马、皮层MARCKS磷酸化及其基因表达的动态变化,探讨这些变化与缺血损害的关系,从蛋白、基因水平探讨与证实中药对脑缺血损害的保护作用及可能的机制,并进一步探讨脑缺血损害毒损络络的理论观点.具体包括以下4部分内容及相关实验:1急性脑缺血大鼠神经功能缺损表现采用同种系体外微栓子注入法(改良Kaneko法)复制急性多发脑梗死大鼠模型,根据Bederson评分标准,对模型组大鼠进行神经系统症状观察,发现造模后大鼠有不同程度的神经功能缺损表现。

2急性缺血海马、皮层MARCKS磷酸化及其基因表达动态变化应用光学显微镜(HE染色)和透射电子显微镜观察急性脑缺血大鼠脑组织形态学改变,发现造模后大鼠组织形态学发生了明显的缺血损害,脑缺血易损区海马、皮层急性缺血损害的发生、发展基本同步;应用免疫组织化学方法和westernblot法检测急性缺血后各时点大鼠海马、皮层MARCKS、p-MARCKS蛋白表达变化,在海马和皮层神经细胞胞浆、胞膜中均观察MARCKS、p-MARCKS的表达,MARCKS、p-MARCKS蛋白在患侧海马、皮层的表达均为过高表达,缺血24h均变化最显著(P均<0.05);应用半定量PCR法检测缺血各时点患侧海马、皮层MARCKSmRNA表达水平,发现MARCKSmRNA在海马、皮层缺血后各时点均为过高表达,1h开始升高,7d最高,呈动态变化,缺血6h、72h、7dMARCKSmRNA表达与正常组和假手术组相比均(P<0.01)。

3清脑滴丸对神经功能缺损改善及对神经细胞保护作用选取缺血后24h这一急性缺血海马、皮层MARCKS、p-MARCKS蛋白变化最显著时点,应用清脑滴丸对急性多发脑梗死大鼠进行预防给药,所有大鼠均在造模后24h时点统一处死.造模后观察到给药组和模型组均有不同程度的神经功能缺损表现,中药组大鼠较模型组的神经功能缺损稍轻;应用光学显微镜(HE染色)和透射电子显微镜观察各组大鼠脑组织形态学改变,发现中药组神经细胞受损程度轻于模型组。

4清脑滴丸对急性缺血海马、皮层MARCKS磷酸化及其基因表达变化的调节作用应用免疫组织化学方法和westernblot法检测清脑滴丸对急性多发脑梗死大鼠进行预防给药后MARCKS、p-MARCKS蛋白表达变化,MARCKS、p-MARCKS蛋白在患侧海马、皮层模型组、给药组的表达均为过高表达,模型组表达量均最高(P均<0.01),海马区中药组同西药组无明显差异(P>0.05),皮层区中药组同西药组有明显差异(P<0.01);应用半定量PCR法检测各组大鼠患侧海马、皮层MARCKSmRNA表达水平,发现MARCKSmRNA在海马、皮层模型组、给药组的表达均为过高表达,模型组表达最高(P均<0.01),海马区中药组同西药组无明显差异(P>0.05),皮层区中药组同西药组有明显差异(P<0.01)。

通过对以上实验结果分析整理,得出如下结论:1急性脑缺血后,模型组大鼠神经功能和组织形态学均发生明显改变,缺血易损区的MARCKS、p-MARCKS蛋白和基因表达均明显增高,呈动态变化,即缺血损害最严重恰是MARCKS磷酸化表达最高峰,表明MARCKS磷酸化与急性脑缺血后神经细胞损害的发生和程度密切相关,信号转导异常可能是缺血损害的重要机制;

2清脑滴丸可以改善急性脑缺血大鼠神经功能缺损,减轻急性脑缺血时脑组织缺血易缺区的组织形态学的改变,干预急性脑缺血损害时PKC-MARCKS信号转导系统,调节MARCKS蛋白和基因的过高表达,从而减缓神经细胞死亡的过程,减轻急性脑缺血损害;

3解毒通络、宣脑开窍法可能通过干预PKC-MARCKS信号转导系统起到神经保护作用,MARCKS信号转导通路的调节可以为中药治疗急性脑缺血提供新的思路和切入点;

4急性脑缺血缺氧状态下海马皮层MARCKS磷酸化过高表达与缺血损害的关系可以为毒损络学说找到新的理论支持。

[引证文献\(4条\)](#)

1. [吴培要, 王静, 谢丽芬, 张贵林, 任光友](#) [线栓大鼠大脑中动脉缺血模型制作方法的改进](#) [期刊论文] -[贵阳医学院学报](#) 2009 (1)

2. [朱弘, 吉训明, 李淑婷, 罗玉敏](#) [尼莫地平联合环磷酸胺对缺血-再灌注大鼠的脑保护作用](#) [期刊论文] -[中国脑血管病杂志](#) 2008 (10)

3. 李榕. 罗春霞. 迟路湘. [重组人生长激素对局灶性脑缺血大鼠神经功能恢复的影响](#) [期刊论文] - [中国临床药理学与治疗学](#) 2007 (11)
4. 肖莹. 刘树民. [线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型的研究进展](#) [期刊论文] - [中国康复理论与实践](#) 2006 (11)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200502021.aspx

授权使用: qkxb11(qkxb11), 授权号: 0ee15ae5-5815-423a-9269-9e2f00c0c6a7

下载时间: 2010年11月15日