

## •实验研究 Experiment research•

## 一种新型的适用于延迟溶栓治疗的大鼠脑血栓模型的制作

尤小芳, 李明华, 赵俊功, 李永东, 程英升

【摘要】 目的 通过对血栓大小的改良,建立适用于延迟溶栓治疗的大鼠脑血栓模型。方法 将 10 个长度 0.8 ~ 1.0 mm、宽度 0.35 mm 的白色血栓经颈内动脉分别注入栓塞脑动脉,形成局灶性脑血栓模型。接受脑血管栓塞的 138 只 SD 雄性大鼠被随机分为两大组,分别为单纯缺血组( $n = 68$ )和延迟溶栓治疗组( $n = 70$ )。单纯缺血组不接受任何治疗;延迟溶栓治疗组分别在血栓注入 3、6 和 9 h 后,将 10 mg/kg 的 rt-PA 自股静脉缓慢注入。使用 MRI 评价梗死灶的位置、大小、栓塞后不同时间的相对脑血流量。末次 MRI 检查结束后,大鼠脑组织用 4%甲醛固定,作病理检查。结果 共有 131 只大鼠在血栓注入后脑内形成明确梗死灶,模型成功率为 95%,脑梗死仅位于同侧大脑半球占 84.7%(111/131),局限于左侧顶叶皮质或(和)左侧基底节的占 79.4%(104/131),局灶性脑梗死体积占同侧大脑半球( $23.12 \pm 6.04$ )%;对侧大脑半球也同时出现梗死灶占 14.5%(19/131)。发生局灶性出血 11 只,大面积出血 1 只,出血率为 9.2%(12/131),均发生在延迟溶栓组。单纯缺血组大鼠,在血栓注入后 3、6 和 9 h 的 rCBV 分别为 ( $34.13 \pm 17.55$ )%、( $40.67 \pm 25.91$ )%和( $40.72 \pm 26.51$ )%,各组之间 rCBV 均无显著差异(分别为 3 h 和 6 h,  $Z = -0.958$ ,  $P = 0.338$ , 3 h 比 9 h,  $Z = -1.147$ ,  $P = 0.251$ )。延迟溶栓后成活率高(24 h 死亡 13 只;48 h 死亡 1 只,溶栓后 8 d 和 12 d 各死亡 1 只)。结论 改良后的大鼠脑血栓模型是可靠的、可重复性的、类似于人类大脑中动脉分支栓塞的脑血栓模型,适用于研究延迟溶栓治疗的大鼠脑血栓模型。

【关键词】脑缺血;血栓栓塞性卒中;大鼠

中图分类号:R735.3 文献标识码:A 文章编号:1008-794X(2007)-05-0330-04

A modified thromboembolic stroke model of rat suitable for the delayed thrombolytic therapy YOU Xiao-fang, LI Ming-hua, ZHAO Jun-gong, LI Yong-dong, CHENG Ying-sheng. Department of Radiology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

【Abstract】 Objective To develop a modified focal thromboembolic stroke model of rat suitable for the delayed thrombolytic therapy. Methods Ten fibrin-rich autologous blood clots (0.8 – 1.0 mm in length, 0.35 mm in width) were injected into the internal carotid artery to establish a focal thromboembolic stroke model. 138 embolized rats were divided randomly into ischemic group ( $n = 68$ ) and delayed thrombolytic therapeutic group ( $n = 70$ ). At 3 h, 6 h and 9 h after embolization, the rats in delayed thrombolytic therapeutic group were treated with 10 mg/kg recombinant tissue plasminogen activator respectively, while no treatment was performed on ischemic group. Lesion size, location, relative cerebral blood flow volume at different time, and intracranial hemorrhage after treatment were evaluated by MRI. After the last MRI examination, the rats were decapitated and their brain tissue were fixed with formalin for further pathology study. Results Embolization with a pre-formed clot resulted in a focal infarction in the territory supplied by the MCA branch or anterior choroid artery, including 79.4% (104/131) of infarction located in ipsilateral parietal cortex or/and audoputamen, with infarction volume of ( $23.12 \pm 6.04$ )% in embolized hemisphere. At 3 h, 6 h, and 9 h after embolization, the relative cerebral blood flow volumes were ( $36.86 \pm 16.02$ )%, ( $40.67 \pm 25.91$ )% and ( $44.72 \pm 26.51$ )% respectively, with no statistical difference between them (3 h vs 6 h,  $Z = -0.958$ ,  $P = 0.338$ , 3 h vs 9 h,  $Z = -1.147$ ,  $P = 0.251$ ). Hemorrhage was observed in 12 rats, all of that were in delayed thrombolytic therapeutic

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470506),上海市科委重点资助项目(034119851)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院放射科

通讯作者:赵俊功

group. 13 rats died within 24 hours and 3 died within 12 days after delayed thrombolytic therapy. **Conclusion**

The modified rat thromboembolic brain model is reliable and repeatable closely mimicking that of the human middle cerebral arterial branch thrombosis, suitable for investigating the delayed thrombolytic therapy in rats.(J Intervent Radiol, 2007, 16: 330-333)

**【Key Words】** Cerebral ischemia;Thromboembolic stroke;Rat

急性脑缺血严格的溶栓时间窗,使只有少数患者能在溶栓时间窗内接受溶栓治疗。延长溶栓时间窗,让更多的脑缺血患者从溶栓治疗中受益,是当前国内外学者积极探索的问题。目前,受制于延长时间窗研究的关键之一是适用于延迟溶栓治疗的脑栓塞动物模型非常有限。通常的脑栓塞模型,主要栓塞大脑中动脉的起始部,形成了整个大脑中动脉分布区梗死<sup>[1]</sup>。对大脑中动脉主干栓塞引起的“恶性脑梗死”进行溶栓治疗,尤其是延迟溶栓治疗时,极易引起梗死区出血和大面积水肿,引起脑疝,死亡率高,无法进行准确的疗效评估。

如果使用较小栓子栓塞大脑中动脉分支,形成类同人类豆纹动脉分支以远栓塞引起的局灶性梗死,延迟溶栓所致水肿区域较局限,死亡亦将减少。但栓子缩小后,在栓子注入过程中能否引起既定位置 and 有效面积的梗死,是否因栓子太小发生自溶而再通等问题仍待研究。本研究旨在对脑血栓模型进行改进,并对栓子改进后栓塞的区域、体积大小、栓塞后不同时间脑血流变化、延迟溶栓后脑出血情况和大鼠存活情况进行评估。现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 复旦大学上海医学院动物实验部提供健康成年 SD 雄性大鼠 138 只,体重 350 ~ 400 g。本课题实验方案得到上海交通大学附属第六人民医院实验动物伦理委员会批准 [许可证号:SYXK(沪)2006-0010]

1.1.2 血栓准备 新鲜配置的 PBS 溶液、凝血酶/PBS 溶液 (1 mg/ml) 1 ml, 20% 人体白蛋白 5 ml 备用,保存于冰箱。将盛有 0.15 ml 凝血酶/PBS 溶液与从同系大鼠的股动脉抽取动脉血 0.6 ml 混合后,注入 1.8 F 微导管(Boston Scientific, USA)。在室温下保存 40 min,使用生理盐水将丝线样血栓从微导管冲洗出来。在显微镜下切成长度为 0.8 ~ 1.0 mm 的栓子,PBS 溶液洗涤 2 遍(将血细胞洗涤下来),再将 10 个长度为 0.8 ~ 1.0 mm,宽度 0.35 mm 的栓子放入人体白蛋白/PBS(2 滴/5 ml)备用。

### 1.2 方法

1.1.2 颈总动脉的准备 大鼠经 10% 氯氨酮(1 ml/100 g 体重)腹腔麻醉后,仰卧固定于手术台上,沿颈前部正中切口逐层分离并暴露颈外动脉及其分支(枕动脉及甲状腺上动脉)。用电凝器分别夹闭枕动脉及甲状腺上动脉并离断,夹闭翼腭动脉。结扎颈外动脉的远侧段,并于结扎处剪断,在其近侧设置活结。

1.2.2 栓塞大脑中动脉 用小止血夹暂时夹闭颈总动脉血流,将盛有血栓的 1 ml 注射器通过 24 G 静脉留置针鞘管连接至颈外动脉。然后,栓子经颈外动脉被逆向缓慢注入颈内动脉,持续约 1 min。当注入最后 1 个栓子后,先去除颈总动脉夹子恢复血流,约 2 min 后,再拔除 24 G 静脉留置针鞘管并结扎颈外动脉。

1.2.3 栓塞位置、面积的评价和栓塞后脑血流的测定 大鼠分别在血栓注入后 3、6、9、24 h 和 7、14 d 接受 MRI 检查。MRI 采用 GE Signa 1.5 T 超导成像仪,3 英寸环形表面线圈或自制的大鼠脑专用线圈(上海晨光医疗科技公司)置于自制固定板上。大鼠仰卧(3 英寸环形表面线圈)或俯卧(大鼠脑专用线圈),头置于线圈中央,自主呼吸。先行矢状位定位扫描,然后分别行 T1WI、T2WI、DWI (Diffusion Weighted Imaging)、PWI(Perfusion Weighted Imaging)及增强后的 T1WI。扫描层厚 2 mm,间距 0.1 mm。其中,T1WI:TR/TE = 400/11 ms,FOV 8 × 6,NEX = 2,矩阵 320 × 256;T2WI:TR/TE = 3500/108 ms,FOV 8 × 6,矩阵 256 × 160,NEX = 2;DWI:TR/TE = 8000/97.8 ms,FOV 5 × 5,矩阵 64 × 64,在相互垂直的 X、Y、Z 轴 3 个方向施加弥散梯度,取 b = 0 s/mm<sup>2</sup> 及 1 000 s/mm<sup>2</sup>,斜坡采集技术(Ramp Sampling);PWI:TR/TE = 1 000/34.7 ms,FOV 5 × 5,矩阵 64 × 64,斜坡采集,每次扫描 5 层,连续扫描 50 次。在第 4 次扫描末,从股静脉留置针(静脉留置针 22 G)团注 Gd-DTPA(0.2 ml/100 g 体重),在 3 s 内注完。

根据血栓注入后 24 h T2WI 的高信号区域确定梗死位置、梗死灶大小,由每个层面对侧半球减

去缺血半球的正常组织累加算出。利用 FUNCTOOL 软件定量测定脑梗死区域相对脑血流量(relative cerebral blood volume,rCBV,患侧与健侧相比)。

1.2.4 动物分组 在血栓注入后 3 h,将动物随机分为单纯缺血组( $n=68$ )和延迟溶栓治疗组( $n=70$ )。单纯缺血组不接受任何治疗,只在不同时间点接受 MRI 检查;延迟溶栓治疗组分别在血栓注入 3、6 和 9 h 后,将 10 mg/kg rt-PA 自股静脉缓慢注入,15 min 内注射完。

1.2.5 梗死灶溶栓后出血的评估 末次 MRI 检查结束后,在麻醉状态下,将大鼠断头取脑,与 MRI 成像层面对应的层面,切成 2 mm 薄片,置于 4%甲醛固定,作 H-E 染色。光镜下,根据神经元和星形胶质细胞的受累范围确定梗死灶位置。光镜下,散在红细胞位于血管外,为少量渗血;少量红细胞积聚于血管外,为局灶性出血;大量红细胞积聚于血管外,为大面积出血。

1.3 统计学分析

所有结果都采用均数  $\pm$  标准差表示,使用 SPSS 软件中 Wilcoxon Singed Ranks Test 方法对数据进行统计学处理, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

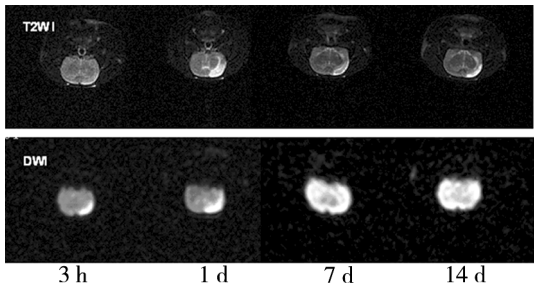
2.1 梗死灶的分布及大小

138 只大鼠血栓性脑缺血模型的脑梗死灶分布见表 1。

表 1 脑梗死灶的分布

| 位置                 | 鼠数 |
|--------------------|----|
| 左侧顶叶皮质             | 54 |
| 左侧顶叶皮质 + 左侧基底节     | 44 |
| 左侧基底节              | 6  |
| 左侧下丘脑              | 6  |
| 左侧额叶皮质             | 1  |
| 左侧基底节 + 左侧下丘脑      | 1  |
| 左侧下丘脑 + 右侧顶叶皮质     | 1  |
| 双侧顶叶皮质             | 11 |
| 双侧顶叶皮质下            | 3  |
| 双侧顶叶皮质 + 左侧基底节     | 2  |
| 左侧顶叶皮质、基底节 + 右侧皮质下 | 1  |
| 左侧顶叶皮质、基底节 + 右侧额叶  | 1  |
| 阴性                 | 7  |

共有 131 只大鼠在血栓注入后脑内发现明确梗死灶,模型成功率为 95.0%(131/138),脑梗死仅位于同侧大脑半球的占 84.7%(111/131),局限于左侧顶叶皮质或左侧基底节占 79.4%(104/131)(图 1,2),对侧大脑半球也出现梗死灶占 14.5%(19/131)。



血栓注入后不同时间示左侧顶叶局灶性梗死灶。在栓塞后 3 h, T2WI 呈等信号,但从栓塞后 1 ~ 14 d, T2WI 呈高信号;但 DWI 在栓塞后 3 d 就呈高信号,但从栓塞后 7 ~ 14 d 呈等信号。病灶的体积以栓塞后 1 d T2WI 最大

图 1 栓塞后不同时间 MRI 表现



栓塞后 14 d, H-E 染色, 示左顶叶的脑梗死, 软化灶形成

图 2 脑梗死大鼠组织病理

111 只梗死灶位于一侧大脑半球大鼠, 脑梗死体积占同侧大脑半球的( $23.12 \pm 6.04$ )%。

2.2 梗死区域的出血情况

13 只大鼠出现少量渗血, 其中发生于单纯缺血组 2 只; 发生局灶性出血 11 只, 大面积出血 1 只, 出血率为 9.2%(12/131), 均发生在延迟溶栓组。

2.3 脑梗死区血流变化

单纯缺血组大鼠在血栓注入后 3、6、9 h 的 rCBV 分别为( $36.86 \pm 17.55$ )%、( $40.67 \pm 25.91$ )%、( $44.72 \pm 26.51$ )%。各组之间差异无统计学意义(3 h 比 6 h,  $Z=-0.958$ ,  $P=0.338$ , 3 h 比 9 h,  $Z=-1.147$ ,  $P=0.251$ )。

2.4 大鼠的存活情况

在延迟溶栓后 24 h, 有 13 只大鼠死亡(其中, 死于大面积水肿 6 只、不明原因 5 只、股静脉置管松脱大出血死亡 1 只、溶栓后癫痫大发作后死亡 1 只), 延迟溶栓后 24 h 死亡率为 19%(13/70); 48 h 死亡 1 只(不明原因), 溶栓后 8 d 与 12 d 各死亡 1 只(麻醉意外)。

3 讨论



### 3.1 改良后血栓模型的特点

栓子长度影响着栓子栓塞的位置,当栓子长度在 25 mm 时,95% 栓塞在 MCA 的起始部,较小的栓子只有 25% 栓塞在 MCA 的起始部。而栓子数目影响模型的可重复性,当 6 ~ 8 个 1.5 mm 大小栓子被注入颈内动脉后,梗死区 CBF 存在着较大差异;10 个 1.5 mm 大小的栓子形成覆盖整个 MCA 区域可重复性梗死<sup>[1]</sup>。我们在保持 10 个栓子即保持可重复的情况下,将栓子长度缩小至 0.8 ~ 1.0 mm。当栓子缩小后,栓子主要进入颈内动脉终末支——大脑中动脉,并进入其远端分支,引起顶叶皮质栓塞梗死。这种单纯顶叶皮质的局灶性梗死在本实验中占 41%(54/131)。有 34%(44/131)大鼠同时出现左侧顶叶皮质和左侧基底节梗死。我们认为这是因为栓子进入大脑中动脉引起其血流阻断后,多余栓子则随血流冲击进入同侧脉络膜前动脉而引起基底节梗死。虽然基底节也出现梗死,但仍呈局灶性分布。

改良后梗死体积占同侧大脑半球体积( $23.12 \pm 6.04\%$ ),小于常规血栓法的梗死灶[( $42 \pm 19\%$ )]。延迟溶栓治疗后,发生大面积水肿和大量出血分别为 9% 和 9.2%,低于 Dijkhuizen 等<sup>[2]</sup>的报道(6 h 后延迟溶栓出血率为 100%)。因此,改进后脑血栓模型,79.4%(104/131)的梗死灶位于左侧顶叶皮质或(和)左侧基底节,呈局灶性分布;延迟溶栓治疗后,发生大面积水肿、大量出血而致大鼠死亡的概率大为降低。

### 3.2 提高模型的可重复性

本实验中尚有 7 只大鼠在 MRI 检查未发现异常信号灶,光镜下未见明显梗死灶。我们分析可能是翼腭动脉电凝夹闭不牢而重新开放,致使栓子主要进入翼腭动脉,因为翼腭动脉的管径接近颈内动脉颅内段直径。充分夹闭翼腭动脉,有助于提高模型成功率。

值得注意的是,尚有少数实验大鼠栓子并未到达预定位置(10.6%)或漂流至对侧(14.4%)引起异位栓塞。这主要是栓子缩小后,栓子从颈内动脉起就被血流带向远端,在距离大脑中动脉起始部长约 20 mm 的路程,可能存在 0.8 ~ 1.0 mm 栓子进入其他动脉引起异位栓塞,尤其当大脑中动脉血流被先行栓子暂时阻断后,后续栓子或多余栓子即随血流进入其他动脉的可能性大大增加。当下丘脑动脉被栓塞而引起下丘脑梗死,将引起脑缺血大鼠的体温

增高,使神经保护药物 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 失效<sup>[3]</sup>,异位栓塞的存在,使单纯依靠神经功能障碍判定模型成功与否变得不准确。使用 MRI 可以及时准确地发现异位栓塞,对于发现下丘脑梗死的大鼠,可以及时从实验中排出。

当然,使用类似 PE-50 的细导管,将其头端放置在大脑中动脉开口,可以避免异位栓塞。但是在微导管放置于大脑中动脉开口的过程中,41% 大鼠发生了同侧大脑半球脑出血<sup>[4]</sup>,这无疑增加了后续治疗尤其是溶栓治疗的风险。减少栓子数量或暂时减少同侧颈总动脉再通的血流量,将会降低异位栓塞,但尚待以后实验进一步研究。

### 3.3 脑梗死区血流变化

在脑血栓模型中,血栓是否发生自溶而再通是一个重要问题,它关系到不同治疗方案间疗效评价。Kilic 等<sup>[5]</sup>在注入 10 个 1.5 mm 或 4 个 4 mm 栓子连续监测 2 h 后,未发现栓子自溶而再通现象。但当栓子体积缩小后,尤其是栓塞后期,可能会发生栓子自溶而再通。本研究结果表明,栓塞后 3、6、9 h 的 rCBV 保持恒定降低。说明栓子体积缩小后,未发生栓子自溶而血流再通,是一个稳定的脑血栓模型。

### [参考文献]

- [1] Krueger K, Busch E. Protocol of a thromboembolic stroke model in the rat review of the experimental procedure and comparison of models[J]. *Inv Radiol*, 2002, 37: 600 - 608.
- [2] Dijkhuizen RM, Asah M, Wu O, et al. Rapid breakdown of microvascular barriers and subsequent hemorrhagic transformation after delayed recombinant tissue plasminogen activator treatment in a rat embolic stroke model[J]. *Stroke*, 2002, 33: 2100 - 2104.
- [3] Gerriets T, Stolz E, Walberer M, et al. Neuroprotective effects of MK-801 in different rat models for permanent middle cerebral artery occlusion: adverse effects of hypothalamic damage and strategies for its avoidance[J]. *Stroke*, 2003, 34: 2234 - 2239.
- [4] Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, et al. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17: 123 - 135.
- [5] Kilic E, Hermann DM, Hosmann KA. A producible model of thromboembolic stroke in mice[J]. *Neuroreport*, 1998, 9: 2967 - 2970.

(收稿日期:2007-03-06)