

## ·实验研究 Experimental research·

## DSA 引导下食蟹猴大脑中动脉栓塞模型的建立与评价

叶娟, 尚海龙, 沈海林, 杜红娣, 沈萍, 朱枫, 邱志富, 曹莹,  
赵芳红, 王莺

**【摘要】目的** 建立并评价 DSA 引导下食蟹猴大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。**方法** 纳入 15 只成年雄性食蟹猴。DSA 引导下经股动脉切开通过导管向大脑中动脉(MCA)注入猴自体静脉血栓凝块构建 MCAO 模型。术后分别行颅脑 MRI 和头颈部 CTA+CT 灌注(CTP)检查,以明确 MCA 梗塞后影像学变化。术后 7 d 连续观察实验猴行为表现,于术后第 8 天处死,取脑组织行三苯基四唑氯染色。**结果** 15 只实验猴中 1 只术前头颈部 CTA 提示颅内血管畸形,未行手术。14 只接受手术的猴中 12 只经 DSA、头颈部 CTA+CTP 及颅脑 MRA 扫描证实 MCA 闭塞成功;1 只术中死亡;另 1 只栓塞后 DSA 及 CT、MRI 扫描均显示无明显缺血,麻醉复苏后无脑缺血行为表现。12 只实验猴术后均存活,神经功能评分提示有神经功能缺损,其缺损变化与影像学改变相符。**结论** DSA 引导下将自体静脉血栓引入 MCA 建立的食蟹猴 MCAO 模型具有手术创伤小、可重复性高、稳定性强的特点。

**【关键词】** 食蟹猴; DSA 导引; 大脑中动脉闭塞; 动物模型; 影像评价

中图分类号:R332 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2022)-04-0369-05

**Establishment of DSA-guided middle cerebral artery embolization mode in cynomolgus monkeys and its technical evaluation** YE Juan, SHANG Hailong, SHEN Hailin, DU Hongdi, SHEN Ping, ZHU Feng, QIU Zhifu, CAO Ying, ZHAO Fanghong, WANG Ying. Department of Medical Imaging, Suzhou Kowloon Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Suzhou, Jiangsu Province 215028, China

Corresponding author: WANG Ying, E-mail: Wangying1630901@163.com

**【Abstract】Objective** To establish an middle cerebral artery occlusion(MCAO) model under the guidance of digital subtraction angiography(DSA) in cynomolgus monkeys, and to evaluate its technical advantages. **Methods** A total of 15 adult male cynomolgus monkeys were included in this study. Under the guidance of DSA, the femoral artery incision with catheter insertion was performed, which was followed by catheterization of middle cerebral artery(MCA) and injection of autologous venous clot into MCA to establish MCAO model. After modeling, brain MRI scan, head and neck computed tomography angiography(CTA) and CT perfusion(CTP) scan were adopted to check the cerebral imaging changes after MCA was occluded. The postoperative behavior of the experimental cynomolgus monkeys was kept under continuous observation for consecutive 7 days. The experimental monkeys were sacrificed on the 8th day after operation, and the brain tissues of monkeys were taken for triphenyltetrazolium chloride(TTC) staining. **Results** Among the 15 experimental animals, one had intracranial vascular malformations, which was suggested by preoperative head and neck CTA and surgery was not adopted. Of the 14 experimental animals receiving surgery, successful MCA occlusion was achieved in 12, which was confirmed by DSA, head and neck CTA plus CTP, and cranial MRA scan. One animal died during operation; in another animal post-embolization DSA, CT and MRI showed no obvious signs of ischemia, and no abnormal behaviors due to cerebral ischemia were observed after anesthesia

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2022.04.010

作者单位: 215028 江苏 上海交通大学医学院苏州九龙医院医学影像科(叶娟、尚海龙、沈海林、杜红娣、沈萍、朱枫、赵芳红、王莺),放疗科(曹莹);上海浦灵生物科技有限公司(邱志富)

通信作者: 王莺 E-mail: Wangying1630901@163.com

resuscitation. Twelve experimental monkeys survived after surgery, and the evaluation score of neurological function suggested that there was neurological impairment, and the impairment changes were consistent with the imaging findings. **Conclusion** The technique used for establishing MCAO model in cynomolgus monkeys, i.e. DSA-guided injection of autologous venous clot into MCA, has the advantages of small surgical trauma, high repeatability, and strong stability of model. (J Intervent Radiol, 2022, 31: 369-373)

**【Key words】** cynomolgus monkey; digital subtraction angiography; middle cerebral artery occlusion; animal model; imaging evaluation

缺血性脑血管疾病 (ischemic cerebrovascular disease, ICVD) 具有较高的致残、致死率, 已成为全球严重的公共卫生问题<sup>[1-5]</sup>, 探究其发病机制和治疗方案至关重要。大脑中动脉 (middle cerebral artery, MCA) 在颈内动脉分支中最粗大, 是颈内动脉入颅后的直接延续。MCA 横过前穿支在视交叉外下方向进入大脑外侧沟, 最终汇入 Willis 环。MCA 在 Willis 环上呈现近似垂直的走向, 是最易造成血栓栓塞而引起脑梗死的部位<sup>[6-7]</sup>。由于 MCA 解剖结构的特殊性, 大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型成为基础研究中模拟 ICVD 的常见模型, 是一种最接近人类缺血性脑卒中的技术<sup>[8]</sup>。目前国内外学者分别采用多种动物构建 MCAO 模型<sup>[9-12]</sup>, 但采用灵长类动物的报道较少见, 且研究难度大, 可重复性低。本研究拟在 DSA 导引下精准构建食蟹猴 MCAO 模型, 旨在为深入研究局部脑缺血的发病与治疗奠定动物实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

15 只 5~8 岁成年雄性食蟹猴 (经江苏省林业厅审批, 购于苏州西山中科实验动物公司), 体质量 4~8 kg。本研究已获得上海浦灵生物科技有限公司动物实验伦理委员会授权 (IACUC-2021003)。

### 1.2 药品与试剂

注射用戊巴比妥钠 (0.1g, 上海榕柏生物技术公司)、硫酸阿托品注射液 (5 mg, 天津金耀药业公司)、舒泰注射液 (1.5 mL, 法国 Virba 公司)、碘克沙醇注射液 (32 g, 通用电气医疗中国公司)、甘露醇注射液 (250 mL, 石家庄四药公司)、2,3,5-三苯基四唑氯溶液 (1 kg, 北京韵邦生物科技有限公司)。

### 1.3 仪器设备

AXIOM Artis FA 型 DSA 系统、MAGNETOM Skyra 3.0T 型 MRI 仪 (德国 Siemens 公司)、REF XD 2001CT 型高压注射器 (德国 Ulrich 公司)、Aquilion

ONE TSX-301A 型 640 多层螺旋 CT (日本 Toshiba 公司)、uMEC6 型心电图监护仪 (深圳迈瑞生物医疗电子公司)、RS\*A40G08SQ 型血管鞘组合、WH14112M 导管 (日本 Terumo 公司)。

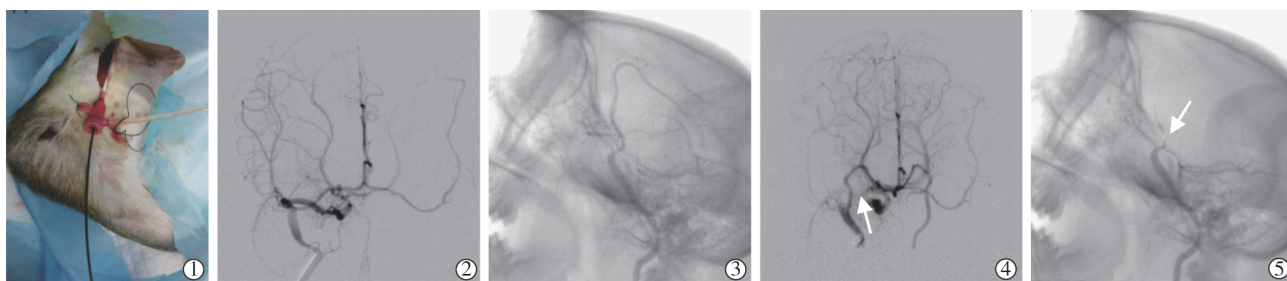
### 1.4 静脉血栓制备和模型建立

所有实验用猴分别于造模术前接受肢体神经功能检测, 排除肢体神经功能障碍, 完善头颈部 CTA+CT 灌注 (CTP) 及颅脑 MRI 扫描, 排除颅脑占位性病变及脑血管畸形。筛选可操作的实验动物及作为后续实验影像结果的对比参照。术前 24 h 抽取猴自体静脉血 1~2 mL, 迅速注入直径 0.5 mm 硅胶管中静置, 凝固后取出置入 0.9% 氯化钠溶液反复漂洗, 4℃ 冷藏备用。

所有实验猴术前 24 h 禁食, 8 h 禁水。采用舒泰+戊巴比妥钠+阿托品复合麻醉猴 (根据体质量确定具体用量), 仰卧位固定于介入手术台, 取一侧腹股沟区常规备皮、消毒、铺巾, 于腹股沟内侧行长约 7 cm 斜形切口, 钝性分离股动脉, 并于远端结扎股动脉, 近端 V 形切开放动脉后采用改良 Selinger 技术成功置入 4 F 动脉导管鞘, 0.035 英寸泥鳅导丝导引下将 4 F 多功能超滑导管插管至一侧颈内动脉颈段, 行正侧位 MCA 造影, 观察 MCA 血流及分支分布情况, 并为判断栓塞后血流状态作对照; 经导管向右 MCA 注入自体静脉血栓约 2 cm (确切长度视 MCA 显影所示血管管径大小而定), 再次行 MCA 造影, 显示一侧 MCA 及以后分支血管显影不良 (图 1); 证实手术成功后, 拔出插管并结扎近端股动脉, 逐层闭合皮下组织。术后根据实验设计决定是否进行溶栓治疗, 加强术后护理, 每天监测猴神经功能变化, 并做好记录分析。

### 1.5 术后影像学及血生化检查

术后 24 h、7 d 分别行头颈部 CTA+CTP 及颅脑 MRI 等影像学检查, 并监测血常规及凝血功能, 做好记录。由 2 名经验丰富的影像学医师分别分析所得到的影像, 如果诊断结果不一致, 则通过协商确定最终诊断结果。



①术中经股动脉置入动脉鞘管;②③MCA 造影显示 MCA 及远端分支显影良好;④⑤自体静脉血栓子注入后 MCA 及其远端分支血管均未见显影

图 1 DSA 引导下食蟹猴 MCAO 模型建立过程

## 1.6 术后神经功能评分

术后分别用摄像机连续 24 h 监测实验猴的行为表现,并由 2 名研究人员分别于术后 6、12、24、36 h 及 2~7 d 对猴 MCAO 标准化神经功能进行评分。该评分标准主要包含意识状态、感觉系统、运动系统及骨骼肌协调等 4 部分功能,评分范围为 0~100 分,分值越高,其神经功能缺损越严重<sup>[13]</sup>。

## 2 结果

15 只实验猴中 1 只因术前头颈部 CTA 提示颅内血管畸形未行手术。14 只接受手术的猴中 12 只经 DSA、头颈部 CTA+CTP 及颅脑 MRA 扫描证实 MCA 栓塞成功,1 只术中死亡(后解剖证实因颅内出血脑疝),另 1 只栓塞后 DSA 及 CT、MRI 扫描均未发现明显缺血,麻醉复苏后无脑缺血行为表现(该猴体质量约 12 kg,造影显示 MCA 内径粗,注入血栓栓子后栓子可能随血流出出现溶解破裂)。12 只实验猴建模成功,术后均出现不同程度肢体功能障碍。

12 只实验猴于术后 24 h、7 d 分别接受 CTA 联

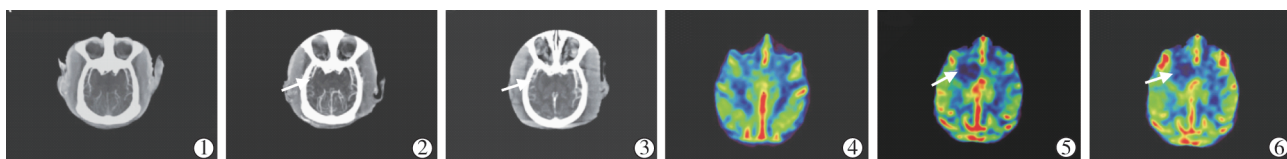
合 CTP 扫描,CTA 扫描均证实一侧 MCA 存在狭窄或闭塞(图 2①②③),CTP 扫描证实梗塞血管供血区脑组织出现缺血低灌注(图 2④⑤⑥),脑血容量(CBV)与健侧对比明显减少。

12 只实验猴基线状态下 MRI 扫描显示双侧脑组织在弥散加权成像(DWI)、表观弥散系数(ADC)序列上信号一致,术后 24 h、7 d 再次分别行 MRI 扫描显示其中 DWI 序列均显示梗塞 MCA 供血区存在不规则异常高信号,对应部位 ADC 显示为低信号,见图 3。

12 只实验猴术后均存活,符合神经功能评分入选标准。其中 1 只猴接受包括意识状态、感觉系统、运动系统及骨骼肌协调等 4 部分神经功能评分,结果如图 4 所示,提示存在神经功能缺损,其神经功能缺损变化与影像学改变相符。

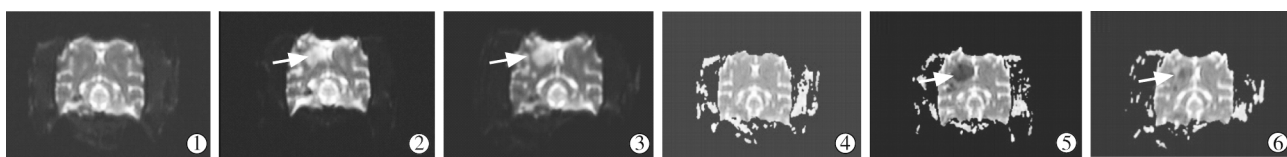
## 3 讨论

ICVD 临床发病率高,其病理生理机制目前尚未完全阐明,探究脑缺血发生发展过程对其防治尤为重要。如何建立标准化活体脑缺血动物模型用于临床前研究,目前仍然是医学难点之一。本研究于



①基线状态颅脑 CTA 示双侧 MCA 及远端分支血管显影良好;②③栓塞 24 h、7 d 颅脑 CTA 均示 MCA 及其远端分支血管均显影不良;④基线状态颅脑 CTP 示双侧脑组织血流灌注一致;⑤⑥栓塞 24 h、7 d 颅脑 CTP 均可见 MCA 供血区脑组织出现缺血低灌注

图 2 MCAO 食蟹猴模型 CTA+CTP 扫描结果



①④基线状态颅脑 MRI 的 DWI 和 ADC 序列示双侧脑组织信号一致;②③栓塞 24h、7 d DWI 序列示右 MCA 供血区出现不规则高信号;⑤⑥栓塞 24 h、7 d 对应部位 ADC 图均可见 MCA 供血区出现相应低信号

图 3 MCAO 食蟹猴模型 MRI 扫描结果



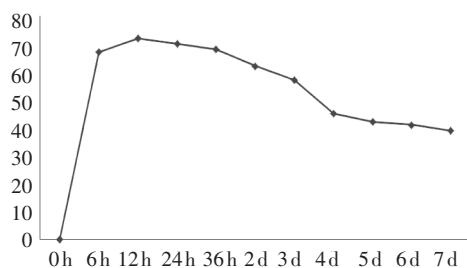


图4 术后神经功能评分

DSA 导引下构建食蟹猴特定部位脑梗死动物模型,旨在模拟临床 ICVD 发生发展过程,作为研究该类疾病的重要工具。

利用动物模型作为基础平台研究疾病的病因与发展是一种简单有效、方便可靠的技术手段<sup>[14-15]</sup>。在脑缺血动物模型中,目前的研究大多以啮齿类等小动物为主,但该类动物与人类大脑的脑血管解剖生理特点不同,仍然仅用于 ICVD 病理生理机制研究<sup>[16-19]</sup>。至于 ICVD 发病机制、防治手段、疗效评估及预后判断研究,尚未找到最为合适的动物模型。本研究选择与人体脑解剖结果最为相似的灵长类动物食蟹猴进行疾病模型的开发,旨在为该疾病的临床前研究提供稳定可靠的实验动物模型。食蟹猴作为非人灵长类动物,在生理活动和中枢神经系统发育等多方面与人类高相似<sup>[20]</sup>,其机体机能、对药物反应、代谢调控等方面均优于其他哺乳类动物<sup>[21]</sup>。因此,食蟹猴有望成为建立脑缺血动物模型的最佳选择。但食蟹猴模型仍存在一定不足,其实验经费高、动物来源不易、饲养困难,获得性和经济性均不高。本研究于 DSA 导引下成功构建食蟹猴 MACO 模型,后期将进一步开发用于再灌注治疗等相关研究。本研究对实验动物血管条件及神经系统反应要求均比较高,仍有很多技术上的难题有待进一步攻关。简言之,就本研究结果看,食蟹猴在实验动物模型开发方面相较于兔、鼠等小型动物有着更大的操作空间和更为直观的实验结果。

传统脑缺血模型的构建原理及方法主要分为永久性或短暂性血管闭塞。具体制备方法主要有开颅物理闭塞法、电凝法、光化学法、线栓法、血栓栓塞法等。其中,永久性脑缺血模型在缺血后组织损伤、新生血管生成等方面的应用较为广泛,是目前国内外脑缺血模型的主流方法。短暂性脑缺血模型主要适用于脑组织缺血-再灌注损伤的研究。以往的脑缺血动物模型在不同研究中均表现为创伤大、动物死亡率高,栓子的体积、走行路径和最后滞留位置的不确定性,以及无法有效评价模型动物中、

远期神经功能等不足。因此,亟需探索和开发高生存率、可重复性的先进建模和模型效果评价方式。目前 DSA 技术在临床上应用已相对成熟,常作为血管疾病诊断的“金标准”,也广泛应用于血管疾病治疗。本研究在 DSA 导引下成功地将食蟹猴自体静脉血栓精准定位于 MCA,动物创伤小、造模成功率高、MCA 供血区产生病灶可通过影像学进行量化记录,且有助于后期关于疗效及预后判断的研究。

由于缺血责任血管不同、侧支循环存在及脑组织自身代偿功能不同,引起脑梗死发病时间及严重程度均不同,利用影像学工具评估量化急性缺血性脑卒中发病严重程度、进行疗效判断及预后评估显得尤为重要。目前临床上一般通过采用 3 h 内 CT 排除脑出血、指导脑梗死治疗,缺乏更为敏感精准的方式对急性脑卒中进行更为精准有效的筛查及评分<sup>[22-24]</sup>。MRI 的 DWI 序列已广泛应用于急性期缺血性脑卒中诊治,是早期诊断脑梗死最敏感和精准的影像学检查方法之一<sup>[25-26]</sup>。全脑 CTP 能够准确判断缺血发生后不同时期供血区脑组织的灌注情况并进行定量分析,结合动态 CTA 显示病变区的血流情况,可为临床诊治提供更准确的影像学依据<sup>[27-28]</sup>。其中,CTA 主要是利用对比剂对梗死部位的外形轮廓进行强化,并结合三维重建技术清晰显影血管;CTP 通过获取清晰的脑组织图像,明确缺血范围及部位,同时定量评估脑组织异常灌注情况<sup>[29-30]</sup>。本研究在 DSA 导引下成功构建食蟹猴 MCAO 模型,并在模型建立后不同时期对模型行 CTA-CTP 及 MRI 检查,以 DSA 结果为参照,对上述影像学工具在模型进程中的诊断价值进行了综合评估。

综上,本研究通过 DSA 导引成功建立了食蟹猴 MACO 模型,梗塞效果统一,结果稳定可控,操作可重复性高,可作为一种行之有效的脑缺血动物模型制作方法。此模型的成功研制奠定了临床前研究工作的基础。但神经影像如何更精准地量化评估脑卒中发病时间、确定可挽救脑组织、筛选治疗潜在获益人群,尚有待技术开发和进一步探究。

#### [参考文献]

- [1] Thomas H, Diamond J, Vieco A, et al. Global atlas of cardiovascular disease 2000-2016: the path to prevention and control[J]. Glob Heart, 2018, 13: 143-163.
- [2] Lewington S, Whitlock G, Clarke R, et al. Blood cholesterol

- and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55000 vascular deaths[J]. *Lancet*, 2007, 370: 1829-1839.
- [3] 侯瑞丽, 牛文亮, 刘波, 等. 青年、老年脑梗死患者流行病学分布比较及影响因素分析[J]. *中国现代医生*, 2019, 57:9-13.
- [4] 姚东陂, 张锦丽, 王红欣. 脑梗死的治疗现状及研究进展[J]. *解放军医药杂志*, 2012, 24:55-59.
- [5] 荆芳华. 高尿酸血症与老年脑梗死相关性的临床分析[J]. *中华保健医学杂志*, 2015, 17:101-103.
- [6] 李强, 庄妍榕, 同伟杰, 等. 缺血性脑卒中的大脑中动脉阻塞模型构建研究进展[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2019, 27:249-254.
- [7] Tutino VM, Mandelbaum M, Takahashi A, et al. Hypertension and estrogen deficiency augment aneurysmal remodeling in the rabbit circle of willis in response to carotid ligation[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2015, 298: 1903-1910.
- [8] Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3445-3454.
- [9] Aspey BS, Taylor FL, Terruli M, et al. Temporary middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke and reperfusion[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2000, 26: 232-242.
- [10] 曹霞, 曹秉振, 郭述苏. 大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血模型的时间梗死体积相关研究[J]. *解放军医学杂志*, 2000, 25:123-124.
- [11] Cai H, Yao H, Ibayashi S, et al. Photothrombotic middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats: influence of substrain, gender, and distal middle cerebral artery patterns on infarct size[J]. *Stroke*, 1998, 29: 1982-1986.
- [12] 延根, 赵大威, 戴卓智, 等. 评估量化超急性期缺血性脑卒中发病时间窗的研究[J]. *磁共振成像*, 2014, 5:60-65.
- [13] Kito G, Nishimura A, Susumu T, et al. Experimental thrombo-embolic stroke in cynomolgus monkey[J]. *J Neurosci Methods*, 2001, 105: 45-53.
- [14] 秦智勇, 陈衍城, 张福林. 猪急性脑栓塞动物模型[J]. *上海医科大学学报*, 1998, 25:54-56.
- [15] 徐军红, 邓燕贤, 邱维加, 等. 介入法猴大脑中动脉栓塞模型的制作及评价[J]. *介入放射学杂志*, 2012, 21:578-581.
- [16] 戴丽军, 冯媛瑜, 梁成结, 等. 长爪沙鼠脑底血管红油铸型标本制作及其后交通支变异类型分析[J]. *解剖学研究*, 2013, 35: 186-188, 207.
- [17] 尤小芳, 李明华, 赵俊功, 等. 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[J]. *介入放射学杂志*, 2007, 16:330-333.
- [18] Hwang IK, Lim SS, Choi KH, et al. Neuroprotective effects of roasted licorice, not raw form, on neuronal injury in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27: 959-965.
- [19] 郑振峰, 杜小燕, 王迎, 等. 长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环变异缺失类型与脑缺血模型症状相关性分析[J]. *中国兽医学报*, 2011, 31:908-912.
- [20] 刘勇, 魏鑫甜, 陈伊. 局灶性脑缺血动物模型的制备探究[J]. *中国中医急症*, 2019, 28:177-180, 185.
- [21] 薛丽香, 张凤珠, 孙瑞娟, 等. 我国疾病动物模型的研究现状和展望[J]. *中国科学(生命科学)*, 2014, 44:851-860.
- [22] Jauch EC, Saver JL, Adams HP, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2013, 44: 870-947.
- [23] Bahn MM, Oser AB, Cross D3. CT and MRI of stroke[J]. *J Magn Reson Imaging*, 1996, 6: 833-845.
- [24] Liu HJ, Zhang Y, Yang JP. The CT, MRI performances and understanding in cerebral ischemia[J]. *Chin J Magnet Reson Imaging*, 2013, 4: 47-58.
- [25] Lutsep HL, Albers GW, Decrespigny A, et al. Clinical utility of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the assessment of ischemic stroke[J]. *Ann Neurol*, 1997, 41: 574-580.
- [26] Lovblad KO, Baird AE, Schlaug G, et al. Ischemic lesion volumes in acute stroke by diffusion-weighted magnetic resonance imaging correlate with clinical outcome[J]. *Ann Neurol*, 1997, 42: 164-170.
- [27] 王新正, 丁玲, 邱波, 等. 一站式全脑动态容积 CTA-CTP 成像在缺血性脑血管病诊断的应用及效果分析[J]. *现代医学影像学*, 2019, 28:1556-1558.
- [28] 施海彬, 刘圣, 季立标, 等. 犬急性脑栓塞模型的建立及 CT 灌注成像早期诊断的研究[J]. *介入放射学杂志*, 2005, 14:182-186.
- [29] 姚佳, 李锋坦. 低剂量“一站式”全脑灌注成像在缺血性脑卒中的应用[J]. *影像技术*, 2018, 30:43-45.
- [30] 沈立双, 向述天. 脑 CTP 联合多时相 CTA 在缺血性脑卒中患者中的临床应用价值[J]. *影像研究与医学应用*, 2018, 2:241-242.

(收稿日期:2021-09-12)

(本文编辑:边 佑)