

缺血性脑损伤模型的研究

李梅芳 李智杰

【中图分类号】 R743 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2015)06-0385-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2015.06.021

缺血性脑损伤容易造成海马损伤,海马与人类记忆缺失上关系密切,损伤能够引起学习和记忆功能衰退,而海马解剖位置和纤维联系的特点,提示它在脑功能中起着关键作用。因此,在研究脑的学习和记忆的功能上海马是一个重点,加上它具有片层结构,结构相对较简单,是一个很适用的研究重点^[1],进行其研究的关键是制作其相关研究的动物模型。目前关于学习记忆研究的海马缺血性损伤的模型建立方式主要有以下几种:

1 全脑缺血再灌注损伤动物模型

1.1 双侧颈总动脉结扎法

一种慢性脑缺血动物模型,可参照 de la Torre^[2]的方法对大鼠的双侧颈总动脉进行永久性结扎(bilateral carotid artery ligation,BCAL)^[3]。亦可参照 Ohta 等制作慢性脑灌注不足的动物模型^[4]。将大鼠麻醉后仰卧固定,颈前部去毛消毒后沿颈正中切开,分离出双侧颈总动脉,双重丝线结扎。缺血组大鼠缺血半球皮质、内囊区、海马区白质均出现较大软化灶,伴胶质细胞和小血管增生^[5]。Tsuchiya 等报道大鼠双侧颈总动脉结扎后有 15 个脑区的局部脑血流量降低 25%~87%^[6]。双侧颈总动脉结扎后反映大鼠学习能力的跳台试验和反映空间记忆能力的水迷宫试验的各项指标均有显著下降,并随时间的推移大鼠的学习记忆能力有进一步的降低^[7]。

1.2 双侧颈总动脉阻断并循环降压法

采用夹闭家兔双侧颈总动脉合并股动脉(兔子、猫、狗等体型较大的实验动物)或眼眶后静脉丛^[8](小鼠)快速放血,造成急性脑缺血模型。脑电图、生化指标和形态学检测显示,这种模型脑缺血效果明显。但是,该模型不易进行再灌注观察。有作者采用双侧颈总动脉阻断合并控制性药物(硝普钠等)降压法^[9],制各急性脑缺血模型。缺血一定时间后恢复血液灌注,用于脑缺血再灌注损伤观察。但由于全身低血压造成心、肾和其他重要器官的损害,导致模型复杂化。

1.3 体循环控制性降压复合颅内注液增压法

李成辉等通过给狗快速滴注 0.02% 硝普钠溶液,使其平均动脉压(MAP)于 2~3 min 内降至 6.65 kPa,之后向小脑延髓池快速注入脑脊液近似溶液,使颅内压(ICP)于 5 s 内

升高至 13.3 kPa^[10]。这样由于降低 MAP 而使脑灌注压下降,同时升高颅内压使脑灌注阻力增大,导致脑血流阻断,造成脑缺血。维持 MAP 及 ICP 于上述水平一定时间后颅内减压使 ICP 降至正常水平,即可恢复血液灌注。经组织学、生理学、生物化学及放射性同位素等多项技术检测,证明应用体循环降压结合颅内增压技术制造的脑缺血再灌注损伤模型,具有缺血效果可靠、并发症少等优点,用作脑复苏的实验研究。但该模型不适用于大鼠等小动物,并且也具有因全身性低血压导致其它脏器损伤,而使模型复杂化的缺点。

1.4 四动脉结扎法

Pulsinelli^[11]和 De Ryck^[12]等 1979 年首先报道了采用电凝固 Wistar 大鼠双侧椎动脉合并结扎双侧颈总动脉,一定时间后再解除两侧颈总动脉结扎进行再灌注,从而造成严重大脑缺血再灌注损伤这种具有高度重复性的全脑缺血造模方法。Furrow^[13]又用 SD 大鼠复制此模型并加以改进。优点:简便易行,可控制夹闭 CCA 时间,进行再灌注实验是研究脑缺血再灌注损伤比较常用的动物模型;缺点:操作困难,尤其是动物的椎动脉与脊髓动脉间交通支差异很大,并且动物不同种属和不同个体之间差异较大,模型的成功率较低,稳定性亦较差。

1.5 三血管阻断法

Kamegama 等通过电灼断基底动脉、同时夹闭两侧颈总动脉的方法复制全脑缺血模型,由于该方法不仅阻断了脑供血主血管,而且也阻断了从脊前动脉来的侧支血管,与前述四血管阻断模型比较,脑缺血成功率高且无需再筛选是其主要优点。田鹤邨等在此基础上又加以改进,不用显微镜而在自视下进行手术,用特制的动脉夹夹闭基底动脉而不用电灼断的方法;缺血一定时间后去除夹闭进行彻底再灌注,也避免了灼断基底动脉导致的动脉损伤、出血之弊,造成的缺血和再灌注效果迅速、稳定性好;使用过程中全身动脉血压一自稳定在生理范围内,从而避免了由全身动脉压降低引起再灌注时脑血流灌注压不足,是其又一个比较突出的优点^[14]。

1.6 六动脉阻断法

在四血管阻断法造模的基础上加以改进,将传统的双侧颈总动脉阻断改为双侧颈内动脉和颈外动脉阻断再加双侧椎动脉阻断。该方法由于颈动脉阻断的部位是在颈动脉窦的远心端,使颈动脉窦区能维持一定的压力。这就避免了传统的四血管法阻断双侧颈总动脉,因双侧颈动脉窦区压力同

时骤降,导致全身血压反射性升高,引起脑侧支循环开放增加和脑血流增加,进而使脑缺血程度减轻等弊端。但该方法手术过程比较复杂、难度较大。

1.7 颈动脉分流法

采用结扎左侧颈总动脉、同时从右侧颈总动脉远心端放血,使大脑两侧颈总动脉来的血供停止,制造全脑缺血模型。此时虽然两侧椎动脉的血流仍能通过基底动脉流向大脑 Willis 环,但由于从右侧颈总动脉远心端进行放血,引起该侧颈总动脉、颈内动脉和后交通动脉压力显著降低。因而,当基底动脉的血流进入后交通动脉后,并不向前灌注大脑,而是逆行经颈内动脉的颈总动脉流出,导致大脑缺血。从颈总动脉放出的血液又经同侧股静脉输入体内。整个过程中可有效地控制血液流量和速度。该模型的优点在于不影响基底动脉和椎动脉的血流量,脑干缺血不明显,对呼吸、循环等基本生命活动的影响较小。再灌注时停止右颈总动脉放血,使右颈总动脉、颈内动脉和后交通动脉的低压消失,由基底动脉来的血流能够进入 Willis 环;同时解除左侧颈总动脉结扎,恢复其血液灌注。这样大脑便有了足够的血液灌注,即再灌注充分是其又一特点。但对于这种造模方法所导致的脑缺血范围尚有争议。有研究显示,这种缺血主要是右侧大脑中动脉供应的脑区缺血。造成这一差异的原因可能与放血速度、颈内动脉压力降低程度不同等有关。

1.8 颈动脉负压分流法

实验大鼠以戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔麻醉。从左股静脉注入肝素(180 U)后缓慢注入生理盐水,夹闭两侧颈总动脉,从右颈外动脉持续抽吸颈总动脉内血液(0.3 ml/min),此为脑缺血开始;同时自左股静脉持续回输血液,全脑缺血 20 min 后停止抽血,向颈动脉内注入 1 mL 生理盐水,结扎颈外动脉,松开两侧颈总动脉,此为再灌注开始^[15]。

2 局灶性脑缺血再灌注损伤造模方法

建立大脑局灶性缺血与再灌注损伤动物模型,是研究缺血性脑卒中的病理生理机制及其防治的重要手段之一。大脑中动脉(MCA)是人类脑梗塞的血管病变多发部位。由于大鼠脑血管解剖接近人类,血管性损伤恒定,重复性好等优点。因而,大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型是比较公认的研究脑缺血损伤的标准动物模型。对于局灶性脑缺血模型的制备,目前比较常用的有开颅法、插线法、光化学诱导法和栓塞法等造成大鼠 MCA 血流阻断与再通,从而导致其相应灌注区域局灶性脑缺血再灌注损伤。

2.1 开颅法

多数研究选择颞下部开颅,通过电凝或丝线结扎横过嗅束外缘或内缘处的 MCA,造成脑梗塞。Kader 等对电凝闭塞 MCA 方法加以改进,闭塞 MCA 所有可见分支,梗塞效果更好。开颅法 MCAO 模型缺血效果可靠,是迄今应用最广泛的经典局灶性脑缺血模型。但开颅创伤大,脑脊液外漏,易感染,改变了脑微环境,手术难度较大和 MCA 闭塞后无

法观察再灌注损伤效应。虽然有作者通过用微型动脉夹夹闭或通过穿线抬起 MCA 造成短暂脑缺血,然后使血流再通制作再灌注模型,但也只限于短时间 MCAO 后再灌注损伤的研究,技术上尚待进一步改进。

2.2 微栓子栓塞阻断法

自颈外动脉(ECA)向颈总动脉(CCA)逆行插管并注入大鼠自体血凝块碎片与生理盐水配制的混悬液,可造成颈内动脉(ICA)系统,主要是 MCA 供血区的缺血性损害,梗死灶位于同侧大脑皮质、基底节及海马等部位。有人报道,也可利用硅酮微球、碳粒微球或 CCA 自发性脱落的血栓栓子栓塞一侧 MCA。这种栓塞性脑梗死模型很接近人类自然栓塞现象,成功率高,手术创伤较小^[16]。但也存在诸如不能预见缺血部位和范围、不能控制再通、对侧亦可能受累以及可能导致外源物质引起的炎症反应等缺点^[17-18]。故此法仅限于一些特殊研究的应用,如溶栓治疗及血小板微血栓形成后的脑病理改变及功能变化研究等^[19]。

2.3 插线法

Kuizumi 于 1986 年首次报道了尼龙线插线法制作的可逆性 MCAO 模型,解决了局灶性脑缺血再灌注损伤研究的难题。若手术选择颈部旁侧手术入路,可使手术视野暴露更好,便于血管分离,并且较颈部正中切口对气管刺激小,无需再行气管造瘘,使手术相对较简单。病理检查结果显示,造模动物均存在缺血侧尾壳核及背外侧皮层梗塞,病变一致、稳定性好,缺血效果可靠。尤其适用于基底节缺血再灌注的病理生理机制的研究和药物治疗效果与机制的观察。此外,无需开颅、创伤小,栓线闭塞 MCA 后不引起血压、血气和体温的异常变化,不影响缺血后脑水肿和颅内压病理变化的自然过程等优点,均优于开颅闭塞 MCA 法建立的局灶性脑缺血模型^[20]。

Zea Longa 线栓法^[21]:该模型的制备方法是将动物麻醉后颈后正中切开,电烧双侧椎动脉局阻断后循环;前正中切开,暴露左侧 CCA、ICA 和 ECA,以微血管夹将 CCA 夹闭,将单股尼龙线(4-0)插入 ICA 远端,大脑中动脉起始部阻断血流/平均进线长度为(2±0.2)cm。

2.4 栓塞法

这种造模方法是将栓塞剂(如碎血凝块、碳素颗粒、花生四烯酸盐等)注入血管,制成脑栓塞模型。将无菌干燥的血凝块研碎,制成栓子混悬液。从颈外动脉注入栓子后,结扎颈外动脉并放开总动脉,栓子冲入颈内动脉并进入 MCA。该模型不需开颅,制作简单,缺血效果可靠。且与临床栓塞性卒中病理过程最为相似,比较适用于溶栓治疗的观察研究,尤其选用人血凝块作为栓塞剂更具有实用意义。其缺点是由于栓子的随机性较大,无法精确预测梗塞的部位和范围大小。也有研究人员应用气囊栓塞法,但仅能用于大动物如狒狒、家兔等。

2.5 Endothelin-1 诱导的大鼠局灶性脑缺血再灌注模型 Sharkey 等建立了 ET-1 诱导的大鼠局灶性脑缺血再灌注模

型^[22],国内外已有人采用该法进行了缺血性脑损伤的研究^[23]。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(3.5 ml/kg)麻醉,俯卧位固定于脑立体定位仪上,以热垫维持肛温 37.0~38.0℃,沿正中线切开头皮暴露颅骨,参照大鼠脑立体定位图谱以前囟为标志,头端 0.9 mm,右侧开 5.2 mm,颅骨下 8.7 mm 处植入一导管,5 min 后将稀释的不同浓度 ET-1(4.0 μL)以 1.0 μL/min 速度注入到 MCA 附近;同时行尾动脉插管术监测给 ET-1 前、后大鼠尾动脉血压变化。与普遍应用的插线法相比,本模型仅涉及简单的立体定位和开颅术,不会造成脑内较大动脉的损伤,减少了颅内出血的危险;再灌注的发生是一个渐进过程,避免了人为再灌注引起的 CBF 急剧增加,较符合人类脑卒中溶栓后 CBF 逐渐恢复的情况;开颅范围小(直径 0.65 mm),不会造成脑内环境的较大变化;产生与插线法类似的较稳定的梗死范围且具有良好的重现性。此外,本模型的最大优点是可以对清醒动物进行缺血性脑损伤的研究,因此本模型对脑缺血再灌注机制的研究及脑保护新药疗效的评估而言是一种较理想的局灶性脑缺血再灌注模型。

3 离体组织培养脑缺血再灌注损伤造模方法

海马脑片抽氧缺糖模型:脑片的制作方法为取出生 6~9 d SD 大鼠,剥离出海马,切成 400 μm 厚制成脑片培养液,放入插入微孔滤膜,再置入培养箱中,2 周后加入碘化丙啶(Propidium iodide, PI),再孵育 1 h,选取完好无 PI 特异荧光着色的脑片。海马脑片缺氧缺糖模型的制作方法有多种,目前运用较多的有浸没法、充 N₂ 法和三气缺氧培养箱法。浸没法:将脑片换入内、外各含有 1.2 mL 无糖平衡盐溶液的微孔滤膜上,再放入培养箱中分别培养 30、45 min、1、1.5 h。充 N₂ 法:先将脑片用 HEPES 液冲洗,再放入含有 1.2 mL HEPES 缓冲液的微孔滤膜内,然后放入密闭容器中,分别持续充入 5% CO₂、95% N₂ 的混合气体 30、45 min、1、1.5 h。三气缺氧培养箱法:将脑片放入只有外侧含有 1.2 mL 无糖平衡盐溶液的微孔滤膜上,再放入 5% CO₂、1% O₂、94% N₂ 的三气缺氧培养箱内分别缺血缺氧培养 30、45 min、1、1.5 h。目前普遍认为三气缺氧培养箱法来的缺氧缺糖模型最稳定,但有实验证实将浸没法结合充 N₂ 法制作的模型与三气缺氧培养箱法在缺氧 1 h 的结果相似^[24],且更方便实用。有实验证实离体海马脑片缺氧缺糖培养模拟“脑缺血”,可以重现在体动物实验时海马各区对缺血敏感性不同的特点^[25],这种方法正在逐步取代动物体内缺血模型。朱洁等在此基础上发明了改良的新生大鼠海马脑片缺氧缺糖巧匠制备方法,使得该方法应用更加经济广泛^[26]。还有人认为从成年小鼠海马脑片培养细胞损伤的评价将会成为研究神经保护作用的一个潜在模型系统^[27]。

参 考 文 献

1 韩太真,吴馥梅主编.学习与记忆的神经生物学.北京:中国协和

- 医科大学联合出版社, 1998. 61, 162-163, 169-170, 230, 279, 287.
- De la Torre JC, Fortin T, Park GA, et al. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats. *Brain Res*, 1992, 582(2):186-195.
- 谢元云, 袁群芳, 姚志彬. 慢性脑缺血对青年和老年大鼠海马 NOS 阳性神经元的影响. *神经解剖学杂志*, 1999, 15(2):161-164.
- Ni J, Ohta H, Matsumoto K, et al. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res*, 1994, 653(1-2): 231-236.
- 李露斯, 刘之荣, 肖桃元. 大鼠慢性脑血流灌注不足脑的病理组织学和超微结构变化. *第三军医大学学报*, 1999, 21(11):805-508.
- Tsuchiya M, Sako K, Yura S, et al. Local cerebral glucose utilisation following acute and chronic bilateral carotid artery ligation in Wistar rats: relation to changes in local cerebral blood flow. *Exp Brain Res*, 1993, 95(1):1-7.
- 林 琅, 陈文军, 梅元武. 慢性低灌注状态对大鼠脑部能量代谢及学习记忆功能的影响. *卒中与神经疾病*, 2004, 11(1): 22-25.
- 吕 青, 曲 玲, 王 芳, 等. 蝙蝠葛酚性碱对小鼠脑缺血-再灌注脑组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响. *中草药*, 2004, 35(2): 185-187.
- 郝宪恩, 王鑫国, 李 楠, 等. 姜黄素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用. *中药药理与临床*, 2004, 20(1): 7-9.
- 朱 谦, 李成辉, 贾乃光. 硝普钠在冠状动脉搭桥手术中对脑血流速度的影响. *临床麻醉学杂志*, 2004, 20(4): 212-215.
- Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1979, 10(3): 267-272.
- De Ryck M, Van Reempts J, Borgers M, et al. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. *Stroke*, 1989, 20(10):1383-1390.
- Furlow TW Jr. Cerebral ischemia produced by four-vessel occlusion in the rat: a quantitative evaluation of cerebral blood flow. *Stroke*, 1982, 13(6):852-855.
- 田鹤卿, 陈前芬, 张成英, 等. 氯胺酮对大鼠全脑缺血再灌注损伤的影响及其机理探讨. *蚌埠医学院学报*, 1994, 19(2): 83-86.
- 邢雪松, 曹德寿, 刘晓湘. CGRP 和 NGF 对全脑缺血再灌注大鼠脑组织 PKC 表达的调节作用. *解剖科学进展*, 2004, 10(1): 50-53.
- 李 胜, 雷征霖. 大鼠大脑中动脉区局灶性脑缺血模型. *国外医学·脑血管疾病分册*, 1998, 6(1): 3-6.
- Burggraf D, Martens HK, Liebetrau M, et al. A new approach to reduce the number of animals used in experimental focal cerebral ischemia models. *Neurosci Lett*, 2005, 386(2):88-93.
- Wang LC, Futrell N, Wang DZ, et al. A reproducible model of middle cerebral infarcts, compatible with long-term survival, in aged rats. *Stroke*, 1995, 26(11): 2087-2090.
- Nagakura A, Miyake-Takagi K, et al. Impairment of adenylyl cyclase and of spatial memory function after microsphere embolism in rats. *J Neurosci Res*, 2002, 68(3):363-372.
- Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? *Stroke*, 1993, 24(2):294-297.

21 Pereira BM, Weinstein PR, Zea-Longa E, et al. Effect of blood flow rate and donor vessel diameter on the patency of carotid venous bypass grafts in dogs. Surg Neurol, 1989, 31(3):195-199.

22 Sharkey J, Ritchie IM, Kelly PA. Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1993, 13(5):865-871.

23 梅和珊, 苏素文, 王永利, 等. Endothelin-1 诱导的大鼠局灶性脑缺血再灌注模型. 中国药理学通报, 2004, 20(1): 114-117.

24 王玉兰, 徐铁军, 张凤真, 等. Endothelin-1 诱导的大鼠局灶性脑缺血再灌注模型. 中国药理学通报, 2004, 20(1): 114-117.

25 Strasser U, Fisher G. Quantitative measurement of neuronal de-

generation in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. J Neurosci Methods, 1995, 57(2): 177-186.

26 朱洁, 李光勤. 改良的新生大鼠海马脑片缺氧缺糖模型的制备方法. 重庆医科大学学报, 2008, 11(33): 1281-1283.

27 Tao Su, Beatrice Paradiso, Yue-sheng Long, et al. Evaluation of cell damage in organotypic hippocampal slice culture from adult mouse: A potential model system to study neuroprotection. Brain Research, 2011, 138: 68-76.

(2015-03-02 收稿 2015-03-20 修回)

神经痛性肌萎缩 1 例报道并文献复习

殷晓宇 王彦喆 姜美曦 马婧 李蕾 何志义

【中图分类号】 R746.4 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2015)06-0388-02
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2015.06.022

神经痛性肌萎缩是一种较为少见的综合症,特征性地表现为肩背部和/或上肢严重的疼痛以及随后出现的肩胛带和/或上肢肌肉无力、萎缩,由于没有被大家广泛认识,常被误诊。本研究报道 1 例神经痛性肌萎缩病例,结合文献以阐明其特征。

1 临床资料

患者,男,62 岁,因“右肩关节疼痛 2 个月余,右上肢上抬不能伴肌萎缩 1 个半月”入院。患者 2 个月前无明显诱因出现右肩关节持续性酸胀疼痛,1 个半月前出现右上肢上抬不能,需托肘才能握筷子,但手部力量可,能自行系纽扣。同时逐渐出现右上肢肌肉萎缩(图 1),伴肉跳。曾于外院按“肩周炎”治疗,未见好转,遂转入本院。否认高血压病、冠心病、糖尿病、肿瘤病史及家族史,吸烟 20 支/d×40 年,常年饮酒。体格检查:P74 次/min, P130/75 mmHg,神志清,精神可,颅神经检查未见异常,右上肢近端肌力 III 级,远端肌力 V⁻ 级,余肢体肌力 V 级。四肢肌张力正常,右冈上肌、冈下肌、三角肌、肱二头肌、大鱼际肌可见不同程度的肌肉萎缩。双上肢可见束颤。BCR, TCR(L: + +, R: +), PSR(L: + +, R: +), ASR(L: + +, R: +), Hoffmann 征(L: -, R: -), Babinski 征(L: -, R: -)。深浅感觉查体未见异常。指鼻试验右侧不能配合,左侧稳准。跟膝胫试验双侧稳准。心肺听诊未见异常。入院后检查血常规、大小便常规、血生化、风湿系列、肿瘤标志物等均未见明显异常。肌电图示右冈下肌、右三角肌、右小指展肌、右拇短展肌呈神经源性损害,右

肩胛上神经、右腋神经运动神经传导正常,诱发电位波幅降低;左侧未见异常。头 CT 未见异常。颈椎 MR 平扫+增强示颈椎退行性变, C3-4 椎体终板变性, C3-7 椎间盘突出,脊髓形态、信号未见异常。肺 CT 平扫示双肺结节,双肺及左侧胸膜陈旧病变。肝胆脾彩超示前列腺增大伴结石或钙化,余未见明显异常。根据患者临床表现、神经电生理检查,诊断为神经痛性肌萎缩。给予强的松 10 mg/次, 3 次/d,口服, 3 个月后随访,患者右肩关节疼痛减轻,右上肢肌力增加,肌肉萎缩未再进展。



图 1 右肱二头肌、冈上肌、冈下肌、三角肌可见不同程度的肌肉萎缩

2 讨论

神经痛性肌萎缩(neuralgic amyotrophy, NA)由 Parsonage 和 turner 于 1948 年报道,他们明确描述了 136 例军人患者的临床表现,故又称 Parsonage-Turner 综合征。本病是一种少见的临床综合征,可以散发,也可以表现为常染色体显性遗传。最新的研究表明 SEPT9 基因是部分遗传性 NA (HNA)家系中的致病基因。目前国内还没有 HNA 病例的