

选择运动功能缺损的脑梗死大鼠模型的制作

彭勃 库小维 饶立 李涛

【摘要】 目的 确立一种制作皮层梗死部位大小一致、梗死后症状大致一致的脑梗死大鼠模型方法。**方法** 利用光化学法结合大鼠皮层运动功能区图谱制作运动功能缺损的脑梗死大鼠模型;采用行为学及组织学评价;评估不同照射时间组运动神经功能的缺损程度。**结果** 利用运动皮层定位技术成功制作选择运动神经功能缺损的脑梗死大鼠模型,这个模型的梗死灶的部位、大小相近,面积不超过 4 mm×4 mm,而且有一侧前后肢运动功能缺失;发现照射 40 min 有血管再通现象,而照射 60 min 无血管再通现象,梗死灶的部位更恒定,大鼠运动功能缺损症状更明显。**结论** 采用光化学法结合大鼠皮层运动功能区图谱成功制作运动功能缺损的脑梗死大鼠模型。

【关键词】 光化学法 孟加拉红 行为学评价 组织学评价

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)01-0028-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.01.005

Establishment of a rat model of cerebral infarction with selected motor function deficits Peng Bo*, Ku Xiaowei, Rao Li, et al. * Department of Neurology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

【Abstract】 Objective To establish a method for creating a consistent rat model of cortical infarction in terms of the size of the infarcted area and the resulting symptoms. **Methods** We used the photodynamic method combined with a rat cortical motor functional area map to create a rat model of motor functional deficit due to cerebral infarction. Through behavioral and histological evaluations, we assessed the degree of motor nerve function impairment in different irradiation time groups. **Results** Using motor cortex localization techniques, we successfully created a rat model of cerebral infarction with selective motor nerve function deficits. The infarcted area in this model was similar in location and size, not exceeding 4 mm×4 mm, and resulted in impaired movement of the limbs on one side. We found that a 40-minute irradiation resulted in reperfusion of the blood vessels, whereas a 60-minute irradiation did not, leading to a more consistent infarcted area and more pronounced symptoms of motor functional deficit in the rats. **Conclusion** The rat model of cerebral infarction with motor function deficit was successfully made by photodynamic method combined with cortical motor functional area map.

【Key words】 Photodynamic method Rose Bengal Behavioral evaluation Histological evaluation

目前在脑梗死的相关研究中应用最广泛的是线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞模型^[1]。此制作大鼠肢体症状明显,但术后病死率高,无法进行长期观察,而且大鼠大脑中动脉闭塞模型的脑梗死部位及梗死面积大小无法人为控制,很难满足大样本试验中实验动物一致性等方面的要求。国外学者在观察血管中光敏剂的化学反应时发现,照射血管出现内皮损伤、血小板聚集等现象,未进行光照时光敏剂

不会对血管内皮造成损伤,也不会引起血小板聚集^[2];持续照射时照射血管区域内的光敏剂诱发释放反应,产生大量的自由基,加剧内皮细胞的损伤,促使血小板聚集进一步增加^[3]。这种循环性破坏最终导致特定光源照射区域的血栓生成。20 世纪 80 年代 Dietrich、Watson 两位科学家先后完成并确定了光化学法制作脑梗死大鼠模型的方法。本研究可以通过调节光源输出端的位置和面积大小来控制皮层病变位置和大小,而且可以通过改变光照强度、光照时间、荧光染色剂的水平来调整造模后大鼠神经功能缺损症状的轻重。光化学法术后大鼠的存活率增高及存活时间相应增长,更加适用于需要长时间

观察的实验^[4]。

神经调控是 1 个新兴的快速发展的多学科交叉领域,植入式皮层电刺激是通过神经调控治疗脑梗死的一种新方法,正处于技术突破和走向临床的重要时期^[5]。国外Ⅲ期临床试验的失败对我们提出挑战,本研究课题组在进行国家自然科学基金面上项目“植入式皮层电刺激模式对脑梗死后神经重建的影响”的研究中一直采用线栓法制作大脑中动脉闭塞大鼠模型,但其存在操作复杂、动物死亡率高、术后存活时间短、术后神经功能缺损症状表现不一等不利方面,而更为严重的是线栓法造模会出现皮层及皮层下梗死两种类型^[6],其中皮层下梗死大鼠模型不出现感觉运动功能缺损症状。因为导致这种皮层下梗死的原因目前尚不清楚,所以在实验操作过程中无法避免皮层下梗死的发生。我们亟需一种操作简单、大鼠皮层梗死位置及梗死面积相对固定、感觉运动功能障碍类化的脑梗死大鼠造模方法。光化学造模法正好弥补了这些缺点。随着大鼠运动皮层定位研究的发展,给我们带来了新的启发。结合大鼠运动皮层的精确定位,本研究可以通过光化学法精确控制皮层照射区域大小,制作课题组所需的梗死部位大小一致、症状大致一致的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)级成年雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠,体重 250 g 左右,饲养室通风良好,室内保持 23 ℃ 恒温,光照周期 12 h 开/12 h 关;所有大鼠饲养在干净的塑料笼具里,垫料、饮用水及食物均经过灭菌处理,自由进食、取水。

1.2 选择运动神经功能缺损的脑梗死大鼠模型的建立

用 10%水合氯醛(0.4 mL/100 g)进行大鼠腹

腔麻醉,麻醉后捏大鼠尾部,无肢体活动即表示麻醉成功;俯卧位固定在脑立体定位仪上;电动备皮刀去毛,范围为大鼠颈部至鼻尖部以及两眼眶之间;消毒后头皮取一长约 2.5 cm 纵行切口,确定中线及前囟;用显微剪刀剪颞肌与颅骨的连接处,牙科钻磨平颞上嵴,便于塞入止血棉减少头皮出血及固定锡纸(图 1);研磨颅骨,研磨面积为中线旁 1~5 mm,前囟前 4 mm 至前囟后 2 mm 的长方形区域,研磨过程中滴生理盐水到颅骨表面,避免研磨发热损伤脑组织;研磨到硬脑膜后用显微镊掀开硬脑膜,暴露照射区脑组织(图 2);按照课题组电极置入要求,需制作影响大鼠一侧前后肢运动功能,并且在 4 mm×4 mm 电极置入区内包含部分正常大脑皮层;按照大鼠皮层运动功能区图谱(图 3),剪取所需形状的锡纸覆盖在脑表面;然后将大鼠仰卧位放置于手术台上,左侧腹股沟区备皮,沿腹股沟方向切开皮肤,暴露股静脉,用 1 mL 注射器缓慢推注孟加拉红(Rose Bengal)(0.02 g/mL、0.1 mL/100 g),推注时间>2 min,避免引起大鼠血压急速降低,注射过程中观察大鼠呼吸及心率情况,注射完成后可观察到大鼠四肢及大鼠口唇部皮肤呈淡粉红色;注射完成后继续用脑立体定位仪固定大鼠,使用光导纤维冷光源 LG-100 加装滤光片(图 4)照射目标区域;并按照照射时间不同分为 60 min 组、40 min 组;照射期间注意观察头皮切口部位及静脉注射区域出血情况;照射期间用加热垫保持大鼠体温在 37 ℃;手术完成后将大鼠置于室温维持在 23 ℃ 恒温黑暗环境中,光照周期 12 h 关/12 h 开;对照组完成颅骨研磨及孟加拉红注射,但是不进行光源照射(表 1)。

表 1 分组条件及动物数量

组别	n	光源照射时间(min)
实验组 1	5	60
实验组 2	5	40
对照组	5	未进行光源照射



图 1 手术过程

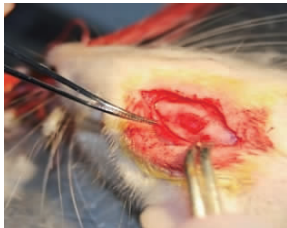


图 2 手术过程

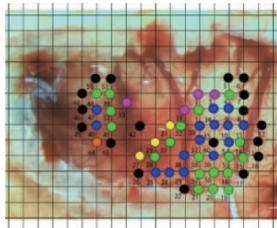


图 3 手术过程

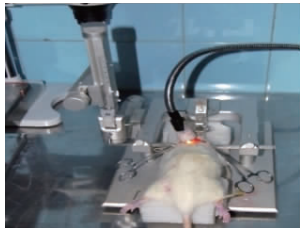


图 4 手术过程

1.3 行为学评价

对于植入式电极对脑梗死大鼠神经重建的影响,主要通过患侧肢体运动情况来体现,所以在术后第1、3、5、7、14 d进行大鼠的行为学评价(横木行走、足失误测试)。

1.3.1 横木行走测试

该试验(图5)主要对大鼠后肢运动过程中协调和整合能力进行评估。在进行光化学法前所有大鼠均接受1周预训练,2次/d,每只实验大鼠都需要可以成功走过横木;术后按如下评分标准进行评分,每只大鼠横木行走测试3次,观察大鼠照射区对侧后肢的运动,并取3次成绩的平均值。

1.3.2 足失误测试(Foot-fault test)

正常大鼠在平台上行走时前肢及后肢极少出现掉落在网格内的情况,但是脑梗死大鼠可出现行走过程中患肢掉落网格的情况;该测试(图6)通过记录掉落次数来系统分析大鼠运动功能;光化学法大鼠术前进行1周的预训练,术后记录大鼠照射对侧(左侧)前肢在平台上爬行2 min的失足次数和总步数,以失足数占该侧总行走次数的比例来统计,每次测试3次,取平均值。



图5 横木行走测试



图6 足失误测试

1.4 组织学比较

大鼠术后第14 d最后1次行为学评价完成后

照射损伤区域周围切厚2 mm的冠状位切片,用2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑进行染色,比较梗死灶大小,并进行苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-eosin staining, HE)染色。

1.5 统计学处理

采用Spss软件。计数资料以例数、频数(n)或百分比(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;连续正态分布变量以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

行为学评价:横木行走测试如图7,60 min组大鼠的横木行走测试得分在各个时间点上低于40 min组和对照组大鼠,而40 min组大鼠得分又低于对照组。经过60 min照射的大鼠在后肢运用上弱于40 min照射组,在试验中更便于观察;足失误实验如图8,虽然60 min组与40 min组大鼠前肢功能均弱于对照组,但60 min组前肢症状更明显,更利于实验过程的观察及比较。

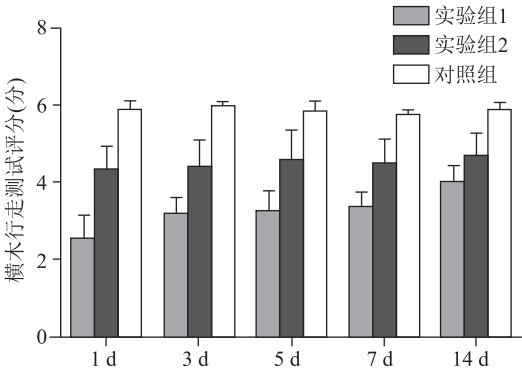


图7 横木行走测试

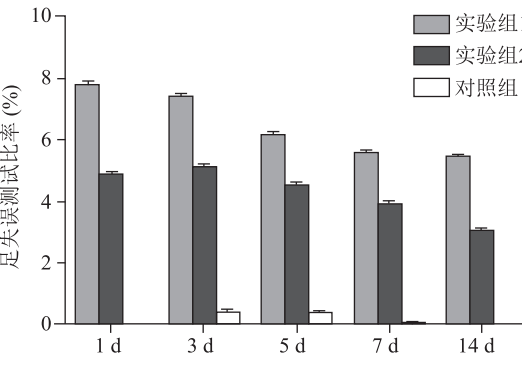


图8 足失误实验

2,3,5-氯化三苯基四氮唑及HE染色:根据大鼠2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色的表现(图9),可以观察到60 min组的梗死区域较40 min组更广

泛;进行 HE 染色后(图 10)同样得出 60 min 组造成的皮层梗死范围及损伤程度较 40 min 组明显;从组织学上来看,照射 60 min 组对皮层组织的破坏较 40 min 组更加严重。

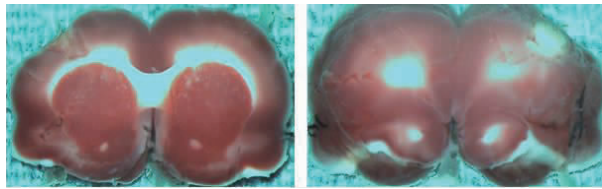


图 9 大鼠脑组织 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色

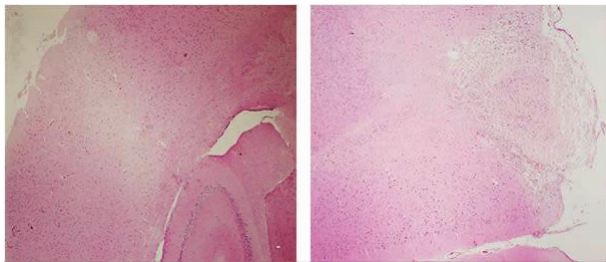


图 10 大鼠脑组织 HE 染色

3 讨论

目前制作脑梗死动物实验模型的方法包括开颅法、线栓法、光化学法等。本研究需要制作有一侧前后肢运动功能缺损症状的大鼠模型,并且在 $4\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ 大小电极置入区内包含部分正常大脑皮层,而且术后大鼠需要进行长达 6 周的慢性实验。本研究确定了光化学法制作脑梗死大鼠模型。本研究通过调节光源输出端的面积大小来调节大鼠皮层梗死区域面积,按照大鼠运动皮层图谱能精确照射前后肢的运动区域来达到有一侧前后肢运动功能缺损的要求,而且光化学法对大鼠手术创伤小,造模后动物死亡率低于其它造模方法,感觉运动功能缺损症状保持时间较其它方法长^[7],适用于慢性实验。光化学法造模中大鼠脑皮层上可迅速出现不含有缺血半暗带的梗死区域,而且梗死区域对于神经保护剂的作用不敏感^[8]。

本研究通过精确定位后的选择性区域照射,完成了梗死面积、梗死后症状一致性的大鼠模型制作,但预实验通过显微镜观察大鼠皮层血管栓塞情况时发现在光源照射 40 min 后血管存在再通的现象;将照射时间延长至 60 min 后未观察到血管再通。光化学法制作的动物模型只会引起轻至中度的感觉运动功能障碍,对于这种程度的功能障碍行为学评价

中肢体不对称试验、足失误试验等都较敏感^[9]。所以,本研究采用这些行为学测试方法来评价 60 min、40 min 照射组大鼠的运动功能损伤程度,并与对照组大鼠进行了行为学上的对比,而且在行为学评价完成后也进行了 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色及 HE 染色的比较,这样就能直观地了解有无行为学及组织学上的差异。

利用光化学法结合同一规格大鼠的运动皮层定位技术本研究成功制作了选择运动神经功能缺损的脑梗死大鼠模型,这个模型的梗死灶的部位、大小相近,面积不超过 $4\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ 大小,而且有一侧前后肢运动功能缺失;发现照射 40 min 有血管再通现象,而照射 60 min 无血管再通现象,梗死灶的部位更恒定,大鼠运动功能缺损症状更明显。

参 考 文 献

- [1] Nedelmann M, Wilhelm-Schwenkmezger T, Alessandri B, et al. Cerebral embolic ischemia in rats: correlation of stroke severity and functional deficit as important outcome parameter [J]. Brain Res, 2007, 1130(1): 188-196.
- [2] Dietrich WD, Busto R, Watson BD, et al. Photochemically induced cerebral infarction [J]. Acta Neuropathol, 1987, 72(4): 326-334.
- [3] Schmidt A, Hoppen M, Strecker JK, et al. Photochemically induced ischemic stroke in rats [J]. Exp Transl Stroke Med, 2012, 4(1): 13.
- [4] Macrae IM. Preclinical stroke research—advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia [J]. Br J Pharmacol, 2011, 164(4): 1062-1078.
- [5] Harvey RL, Winstein CJ, Everest Trial Group. Design for the everest randomized trial of cortical stimulation and rehabilitation for arm function following stroke [J]. Neurorehabil Neural Repair, 2009, 23(1): 32-44.
- [6] Wegener S, Weber R, Ramos-Cabrer P, et al. Subcortical lesions after transient thread occlusion in the rat: T₂-weighted magnetic resonance imaging findings without corresponding sensorimotor deficits [J]. J Magn Reson Imaging, 2005, 21(4): 340-346.
- [7] Minnerup J, Seeger FH, Kuhnert K, et al. Intracarotid administration of human bone marrow mononuclear cells in rat photothrombotic ischemia [J]. Exp Transl Stroke Med, 2010, 2: 3.
- [8] Diederich K, Quennet V, Bauer H, et al. Successful regeneration after experimental stroke by granulocyte-colony stimulating factor is not further enhanced by constraint-induced movement therapy either in concurrent or in sequential combination therapy [J]. Stroke, 2012, 43(1): 185-192.
- [9] Schroeter M, Jander S, Stoll G. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses [J]. J Neurosci Methods, 2002, 117(1): 43-49.

(2023-06-05 收稿)