

[文章编号] 1000-2200(2004)02-0101-03

# 小鼠全脑缺血再灌注损伤模型的研究

赵士弟, 杨卫东, 汪洪涛

[摘要] 目的: 探讨结扎双侧颈总动脉、颈部软组织加压人工通气等方法, 制作小白鼠脑缺血再灌注损伤动物模型的成功率和可靠性。方法: 结扎双侧颈总动脉, 并用粗棉线在颈部血管、神经和气管下方绕颈后结扎加压, 以脑电波变平作为全脑完全缺血的标志, 造成全脑缺血 30 min, 然后解除结扎、恢复血液灌流 60 min; 使用微通气量小动物呼吸机进行人工通气; 测大脑皮质乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸磷酸激酶(CPK)的活性; 观察大脑皮质和海马的形态学变化。结果: 缺血后数秒钟内脑电波变为一条直线, 缺血 30 min 和再灌 60 min 内未见恢复。LDH 和 CPK 活性, 缺血组和再灌组显著低于对照组( $P < 0.01$ ); 再灌组 CPK 活性明显低于缺血组( $P < 0.01$ )。病理检查: 缺血 30 min, 大脑皮质和海马锥体细胞固缩, 少数神经元变性, 轻度充血、水肿; 再灌 60 min, 上述损伤进一步加重。结论: 本文建立的改进模型方法简便易行, 缺血和再灌注损伤显著, 模型成功率高, 动物死亡率低。

[关键词] 脑缺血; 再灌注; 小鼠; 脑电描记术; 病理学

[中国图书资料分类号] R 743.31 [文献标识码] A

## Research on the creation of global cerebral ischemia-reperfusion injury model in mice

ZHAO Shi-di, YANG Wei-dong, WANG Hong-tao

(Department of Pathophysiology, Bengbu Medical College, Anhui 233003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the success rate and reliability of creating global cerebral ischemia-reperfusion injury model by obstructing the bilateral common carotid arteries and pressing the cervix and ventilating the mice in the artificial way and so on. **Methods:** Artificial respiration was performed using rodent micro-ventilator during the whole experiment course. ECG and EEG were detected carefully. EEG turning to a straight line was used as the criterion of full cerebral ischemia. Pathological examination was performed in the cerebral cortex and hippocampus. Lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase (CPK) were determined in the cerebral cortex. **Results:** EEG turned to a straight line after a few seconds of ischemia and didn't recover within 30 minutes of ischemic and 60 minutes of reperfusion. The LDH and CPK activity of ischemia and reperfusion group was significantly lower than that of control group ( $P < 0.01$ ). CPK activity of reperfusion group was significantly lower than that of ischemia group ( $P < 0.01$ ). Pathologic examination showed that after 30 minutes of ischemia, the cells of cerebral cortex and hippocampus pyramidal pyknosed, a small number of neurons degenerated and swelled. The above mentioned damage worsened after 60 minutes of reperfusion.

**Conclusions:** This improved operative method is simple and practical. The global cerebral ischemia-reperfusion injury is obvious in the model, with higher success rate and lower mortality.

[收稿日期] 2003-08-12

[基金项目] 蚌埠医学院教学研究资助项目(院教[1999]08号)

[作者单位] 蚌埠医学院病理生理学教研室, 安徽蚌埠 233003

[作者简介] 赵士弟(1976-), 男, 安徽颍上县人, 助教。

[Key words] cerebral ischemia; reperfusion; mice; electroencephalography; pathology

### [参考文献]

- [1] 许隆祺, 余森海, 许淑惠主编. 中国人体寄生虫分布与危害[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 244~250.
- [2] Verastegui M, Gilman RH, Gonzales A, et al. *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis[J]. *Vet Parasitol*, 2002, 108(1): 49~62.
- [3] 王俊霞, 彭郁葱, 姚玉霞, 等. 猪囊尾蚴特异性抗原编码 cDNA 的阶段特异性表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 14(2): 89~93.
- [4] Vibanco-Perez N, Jimenez L, Mendoza-Hernandez G, et al. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*[J]. *Parasitol Res*, 2002, 88(5): 398~404.
- [5] 赵旭东, 李莹, 王昊等. 抗猪囊尾蚴单抗、双特异单抗建株及检测血清循环抗原的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 14(3): 222~225.
- [6] 殷竹君, 刘静, 张耀娟. 应用尿素溶性抗原制备抗猪囊尾蚴单抗的研究[J]. 南京医科大学学报, 2000, 20(4): 255~257.

脑缺血再灌注损伤的发生机制,正在进行广泛、深入的研究。一个较好的动物模型,直接关系到实验研究的意义和价值,因此建立或改进动物模型是脑缺血再灌注损伤研究中的一项重要工作。我们以往对叶春玲等的小鼠全脑缺血再灌注损伤模型进行过改进<sup>[1,2]</sup>,取得了一定的成效。现本室使用自行改进的微通气量小动物呼吸机,脑电波描记监视脑缺血程度,对本模型进一步改进,以进一步减少动物死亡率,提高模型的稳定性与成功率。

## 1 材料与方法

1.1 动物 昆明种小鼠,雌雄兼用,体重22~28 g,由蚌埠医学院实验动物科供给。

1.2 仪器 微通气量小动物呼吸机,上海嘉定曹三五金厂生产的SDF-1型小动物呼吸机加以改进;三道生理记录仪,SJY-3000B型,购自开封科教仪器厂。

1.3 药品、试剂 乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸磷酸激酶(CPK)药盒,购自南京建成生物制品所。

1.4 预备手术 小白鼠,20%乌拉坦,按1.0 g/kg体重,腹腔内注射麻醉。沿颅顶中线切开皮肤暴露颅骨,于颅顶左侧冠状缝和矢状缝旁各1 mm处钻洞,穿透颅骨达硬膜外,安装不锈钢电极,与脑电图负极相连,将参比电极插入同侧耳后皮下,备记录脑电图使用。将动物仰卧固定,作颈部正中切口,分离气管并作气管内插管。分离两侧颈总动脉,穿线备用。在两侧颈总动脉、颈外静脉、气管、迷走、交感神经下方穿线,环绕过颈后,打活结备用。插管接小动物呼吸机,进行人工通气(室内空气,通气量2 ml/100 g体重,频率70~80次/分),使用心电图标准II导联记录心电图。

1.5 动物分组 随机分成对照组、缺血组、再灌注组。对照组:分离两侧颈总动脉,置线备用,并另穿线绕颈后一周,但均不结扎,观察90 min。缺血组:结扎双侧颈总动脉,同时将绕颈后的备线扎紧给颈部软组织逐渐加压,观察脑电波完全变平后,持续观察30 min。再灌注组:在脑缺血30 min后,松开两侧颈总动脉的结扎线,同时解除颈部软组织的结扎线,继续观察60 min。

1.6 LDH和CPK活性测定 按药盒说明书进行。

1.7 病理组织学检查 各组动物于观察结束后,开颅取脑,浸泡于10%的福尔马林溶液中固定,石蜡包埋,苏木精-伊红染色,光镜下观察大脑皮质和海马的组织学变化。

1.8 统计学方法 采用方差分析和 $q$ 检验及秩和

检验。

## 2 结果

2.1 脑电图变化 对照组脑电波的波形和幅度,在观察的90 min内未见明显变化;缺血组动物在结扎双侧颈总动脉和颈部加压后,脑电波在数秒钟内变为一条直线,并在以后持续缺血的30 min内不变;再灌注组动物在全脑缺血后脑电波变平,再灌60 min后未见恢复。

2.2 心电图变化 对照组和缺血组动物心电图未见明显变化,再灌注组动物有少数心电图的幅度降低。

2.3 瞳孔变化 对照组瞳孔颜色鲜红;缺血组动物在缺血前瞳孔颜色鲜红,缺血后转为苍白;再灌注组在缺血30 min内瞳孔颜色苍白,再灌后即刻变为鲜红色,持续60 min不变。

2.4 CPK活性和LDH含量 再灌注组和缺血组均较对照组明显降低( $P < 0.01$ )。再灌注组与缺血组比较CPK明显降低( $P < 0.01$ )。而LDH含量再灌注组与缺血组差异无显著性( $P > 0.05$ )(见表1)。

表1 小鼠全脑缺血再灌注损伤时脑组织LDH和CPK的活力( $\bar{x} \pm s$ )

分组	$n$	LDH (u/g 蛋白质)	CPK (u/ml)
对照组	5	354.87 ± 47.43	1 419.30 ± 96.06
缺血组	5	140.76 ± 22.95 **	1 153.60 ± 146.36 **
再灌注组	5	127.34 ± 23.54 **	509.96 ± 42.61 $\Delta\Delta$
$F$	—	73.41	101.02
$P$	—	< 0.01	< 0.01
$MS_{组内}$	—	1 110.146	1 0821.50

$q$  检验:与对照组比较 \*\*  $P < 0.01$ ;与缺血组比较  $\Delta\Delta P < 0.01$

2.5 病理学变化 对照组在观察的90 min内,大脑皮层和海马的组织学未见明显变化。缺血组小鼠在缺血30 min时,大脑皮质锥体细胞固缩,少量神经元变性,有轻度充血、水肿;海马锥体细胞固缩,颗粒细胞轻度变性,有轻度充血、水肿。缺血60 min和90 min时上述变化加重。再灌注组动物在缺血30 min再灌30 min后的大脑皮层和海马的组织学变化与缺血30 min时的差别不大,缺血30 min再灌60 min时,大脑皮层和海马的锥体细胞固缩,神经元水肿,有轻度充血、水肿。缺血60 min再灌60 min时,大脑皮质锥体细胞显著固缩,海马颗粒细胞严重变性,两者充血、水肿严重;缺血60 min再灌90 min、120 min时,大脑皮层和海马的组织学变化进一步加重。

2.6 动物生存时间 模型改进后,动物生存时间明

显长于改进前,死亡率降低( $P < 0.01$ ) (见表 2)。

表 2 模型改进前后的不同时间死亡动物数比较

分组	n	不同时间(min)死亡动物数				$u_c$	P
		0~	10~	30~	60~		
模型改进前	43	14	2	27	0		
模型改进后	49	2	2	8	37	6.84	< 0.01
合计	92	16	4	35	37		

### 3 讨论

随着脑缺血疾病的发病率升高和溶栓、搭桥技术的临床应用,愈来愈多的学者试图通过脑缺血再灌注损伤的动物模型来研究缺血再灌注损伤发生的规律和机制。使用小鼠复制全脑缺血再灌注损伤模型方法较多,目前实验室通常采用的方法是单纯阻断双侧颈总动脉,但动物存活时间差别较大,其原因可能与动物个体脑血管侧循环是否容易形成或脑干对缺氧的耐受性不一致有关。研究证明,单纯结扎双侧颈总动脉只有 14% 左右的动物脑电波完全抑制,说明大部分动物脑缺血不完全。为加重脑缺血程度,我们曾对上述模型进行改进<sup>[3]</sup>,即在结扎双侧颈总动脉的基础上,同时将颈部软组织结扎加压,以脑电波变平为标志,基本上所有动物均能达到完全脑缺血。脑细胞内酶的释放明显增多,原因是再灌时体内自由基产生增多和细胞内钙超载及血液流变学的改变而使细胞膜受损,胞质里的物质释放使脑细胞的物质含量改变。但病理组织学改变较轻微,动物存活时间短,死亡率高,这些结果与国内外其他学者报道相一致<sup>[4~6]</sup>。这主要由于脑血流严

重而急剧地减少,侧支循环来不及建立,以致脑细胞缺血、缺氧,呼吸中枢严重抑制而死亡。本研究在结扎小鼠双侧颈总动脉及颈部软组织加压的同时使用小动物人工呼吸机,维持基础通气量,使动物能够耐受较长时间的脑缺血且存活时间延长,死亡率显著降低(见表 2)。EEG 显示脑功能严重抑制,脑细胞受损,细胞内酶释放增多,这些和以往工作一致<sup>[1,2]</sup>。但病理学检查表明,大脑皮层和海马损害明显加重,随着缺血与再灌注的时间延长损害进一步加重,从而证实改进后的小鼠全脑缺血再灌注损伤的动物模型具有准确、可靠、稳定,操作简单易行、重复性高、死亡率低等特点,在脑缺血再灌注损伤的研究中有广泛的应用价值。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 田鹤郁,陈前芬,储德开,等. 脑再灌诱发的脑水肿、细胞内酶释放、乳酸积聚、脂质过氧化与结构损伤[J]. 蚌埠医学院学报, 1994, 19(1): 6~9.
- [2] 杨卫东,吴嘉陵,储德开,等. 小白鼠全脑缺血一再灌注损伤模型探讨[J]. 蚌埠医学院学报, 1995, 20(5): 344~346.
- [3] 袁淑华. 盐酸小檗碱对小白鼠脑缺血作用的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 1988 22(1): 14~15.
- [4] 吴俊芳,史以菊,刘天培. 小檗碱对小鼠和大鼠脑缺血的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(2): 100~103.
- [5] Todd NV, Picozzi P, Crockard HA, et al. Recirculation after cerebral ischemia simultaneous measurement of cerebral blood flow, brain edema, cerebrovascular permeability and cortical EEG in the rat[J]. *Acta Neurol Scand*, 1986, 74(4): 269~278.
- [6] Johshita H, Asano T, Hanamura T, et al. Effect of indomethacin and a free radical scavenger on cerebral blood flow and edema after cerebral artery occlusion in cats[J]. *Stroke*, 1989, 20(6): 788~794.

## 常用药物标准名称摘编(九)

宜用	不宜用	宜用	不宜用	宜用	不宜用
碘仿	黄碘	氟桂利嗪	西比灵	二巯丁二钠	二巯琥钠
亚甲蓝	美蓝	碘解磷定	磷敌	复方炔诺酮	复方口服避孕药 I 号
利托君	羟苄羟麻黄碱	托吡卡胺	托品酰胺	复方氯化钠	林格注射液
羟苄唑	羟苄苯并咪唑	色甘酸钠	咽泰	二颈丙磺钠	二巯基丙磺酸钠
硫酸锌	锌矾	阿莫西林	新达贝宁	卡前列甲酯	卡孕栓
硫必利	泰必利	氯解磷定	氯化派姆	复方氟己定	复方洗必泰含漱液
碘海醇	碘苯六醇	麦角新碱	麦角新碱马来酸盐	依地酸钙钠	解铅乐
缩宫素	催产素	依沙吖啶	利凡诺	硫代硫酸钠	海波
克霉唑	三苯甲咪唑	毒扁豆碱	依色林	复方炔诺孕酮	复方 18 甲基炔诺酮
咪康唑	双氯苯咪唑	普罗碘铵	安妥碘	复方甲地孕酮	复方口服避孕药 II 号
氯己定	洗必泰	双氯芬酸	双氯灭痛	亚硝酸异戊酯	亚硝戊酯
乙酰唑胺	醋唑磺胺	泛昔洛韦	诺克	牛乳糖-棕榈酸	利声显
妥拉唑林	妥拉苏林	毛果芸香碱	匹鲁卡品	必需磷脂软胶囊	易善力
赖氨匹林	来比林	氯化氨基汞	白降汞	氨基酸型肠内营养剂	爱伦多

[ 摘自:《国家基本药物(西药)》(1999 年版)、《中国药典》(1995 年版)和药典委员会《药名词汇》 ]