Research of local cerebral hypo-perfusion model established by improved intraluminal thread technique in rats

HU Ling, GAO Pei-yi

(*Neuroimaging Center, the Affiliated Beijing Tiantan Hospital of Capital University of Medical Science, Beijing* 100050, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To establish a stable and reliable model of local cerebral blood hypo-perfusion in rats, and to evaluate it by CT perfusion and histopathological study. **Methods** Twenty-seven male Wistar rats were divided into three groups, nine rats in each group (the control group, hypo-perfusion group and infarction group). A nylon thread was inserted into the right middle cerebral artery (MCA), and the same time the region cerebral blood flow (rCBF) was examined by the laser Doppler blood perfusion monitor. About 6 hours after operation, all the rats were examined by CT perfusion, and 3 of each group were performed by TTC stain and histopathological study. **Results** The rCBF of both infarct group and hypo-perfusion group were reduced on CT perfusion, and rCBF of the infarct group was even lower than that of hypo-perfusion group. In histopathological results, the brain in hypo-perfusion group showed astrocytic swelling. Most of the neuronal was normal, but in the brain of infarct group, severe neuronal degeneration and necrosis could be found. **Conclusion** Based on the thread method, using laser Doppler blood perfusion monitor to monitor the blood flow during operation, we can establish stable and reliable model of local cerebral blood hypo-perfusion in rats.

[**Key words**] Blood perfusion; CT perfusion imaging; Thread technique; Animals, laboratory

改良线栓法制备大鼠脑局部低灌注模型的研究

胡　凌，高培毅

（北京市天坛医院神经影像中心，北京　100050）

[**摘　要**] **目的**　建立稳定的可重复的大鼠脑局部低灌注模型，并通过 CT 灌注等方法验证其可靠性。**方法**　27 只实验用 Wistar 雄性大鼠随机分为三组（假手术对照组、低灌注 6 h 组和脑梗死 6 h 组）。模型的制备采用改良的大脑中动脉线栓法，在术中应用激光多普勒血流仪实时监测局部大脑中动脉区脑血流量，术后利用 CT 灌注成像对血流状况进行观察，并与病理检查、TTC 染色等对照。**结果**　梗死组 CT 灌注参数 rCBF 较低灌注组明显下降，病理检查呈典型脑梗死改变；低灌注组仅见脑缺血病变。**结论**　在线栓法制备脑缺血模型的基础上，应用激光多普勒血流仪实时监测术中血流状态，可以有效建立不同程度的大鼠脑局部血流低灌注模型。

[**关键词**]　血流灌注；CT 灌注成像；线栓法；动物，实验

[**中图分类号**]　R814.42；Q95-33　[**文献标识码**]　A　　[**文章编号**]　1003-3289(2004)08-1182-04

人类脑血管病的发病率日益增加，其中缺血性脑血管病占 80%以上[1]。有学者发现在脑梗死发生之前，大脑局部往往存在较长时间的血流灌注异常状态，高培毅等[2]称之为脑梗死前期。由于神经细胞在完全切断血流后，数分钟即发生不可逆改变，因此研究的重点应该集中在脑梗死前期。本研究采用改良的线栓法建立大鼠脑局部低灌注的动物模型，并应用 CT 灌注、病理学检查等方法评价动物模型的效果。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组　实验用 Wistar 雄性大鼠由首都医科大学实验动物中心提供，体重 250～300 g，共 27 只，随机分为三组，每组 9 只。三组分别为对照组（只进行颈部血管分离及右侧颅骨去骨板）、低灌注 6 h 组和脑梗死 6 h 组。

1.2　建立脑局部低灌注动物模型　栓线的制备：采用日本株式会社生产的“贵花田”牌鱼线，直径 0.185 mm，剪成约 5.0 cm 长的线段，一端稍近火加热，使头端微成光滑球形，待尼龙线恢复室温，在显微镜下筛选出前端光滑钝圆、直径在 0.20～0.30 者，用深色标记笔把尼龙线前端涂黑约 2.0 cm，以便手术过程中观察线头所在位置和方向。在肝素中浸泡，晾干后紫外线消毒备用。

手术过程：实验前大鼠禁食 12～24 h，自由饮水。实验室室温控制在 25～30℃。肛表测体温，术中还应根据肛温测定给予灯泡保暖，或用电风扇及冰块降温，以维持肛温在（37±

[**基金项目**] 国家自然科学基金资助项目（30370427）；北京市自然科学基金资助项目（7032009）。

[**作者简介**] 胡凌（1975－），女，山东茌平人，首都医科大学 2001 级博士研究生。E-mail：lingerhu@sohu.com

[**收稿日期**] 2004-05-19

0.5)℃。采用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,用量为4～6 ml/kg,待大鼠完全麻醉后,在显微镜下进行手术。

大鼠左侧卧位,常规消毒后,于右眼眶后至右耳中点纵向切开皮肤,分离皮下组织,充分暴露颞骨的颞鳞和蝶骨大翼,使用牙钻在颞骨钻孔直至硬脑膜,骨窗直径约3.0 mm,用眼科直镊小心撕开硬脑膜,暴露脑组织。将激光多普勒血流仪探头平稳置于暴露处脑组织,测量插线前的大脑中动脉分布区血流量。

大鼠仰卧固定于脑立体定位架上,行颈部正中切口,逐层钝性打开肌肉组织,分离右侧颈总动脉、颈内动脉及其颅外主要分支翼腭动脉、颈外动脉,用电凝器分别断掉颈外动脉的分支枕动脉、甲状腺上动脉。

在颈外动脉的近心端设置活结,结扎颈外动脉远心端,弯曲动脉夹夹闭颈内动脉和颈总动脉后,在颈外动脉两个结之间剪开动脉壁约1/2宽度,穿入备用的尼龙线,经颈外动脉、颈总动脉分叉处进入颈内动脉,剪断颈外动脉远心端,收紧近心端活结,松开动脉夹。

插入尼龙线的同时,应用激光多普勒探头在大鼠脑右后方检测大脑中动脉分布区的血流量,并计算术后脑血流量与术前脑血流量的百分比值。当血流量降低到原来的10%以下时,固定栓线深度,为脑梗死组;血流量降至原来的40%～50%时,为低灌注组。由于每只大鼠的血流量基础值不同,因此血流下降的百分比作为分组的依据,并记录每只大鼠术后血流下降的百分数(表1)。同时注意,当栓线进入约5 mm时,应该调整前进方向,以免误入翼腭动脉,造成模型失败。

1.3 CT灌注检查　模型制备完成后,依照组别到达设计实验时间后,取出栓线,将大鼠仰卧固定,剪开右后肢皮肤,暴露股静脉,静脉留置针穿刺成功后接高压注射器。CT机器为GE LightSpeed,120 kV,100 mA,FOV为9.6 cm×9.6 cm,造影剂为300 mgI/ml碘海醇,注射速度为0.5 ml/s,总量为2 ml。扫描时,选取尾状核层面,在注射对比剂的同时,连续获得大鼠脑冠状面图像40幅,层厚3 mm。脑灌注参数图均在个人电脑上用自制专用软件进行分析处理[3],可以获得脑血流量(rCBF)、脑血流容积(rCBV)、峰值时间(TTP)及平均通过时间(MTT)图像。脑局部血流动力学参数(rCBF、rCBV、MTT和TTP)测量方法为:采用人工手动方法确定感兴趣区(ROI)的大小,并放置在各参数图缺血区的皮层部位,取平均值;然后用镜像方法将ROI放置在对侧,取平均值。最后计算病侧/健侧×100%。

1.4 缺血区域面积的计算　选择rCBF参数图,用手动的办法勾勒血流异常区域和同侧大脑半球边缘,计算血流异常面积与同侧大脑半球面积的比值,分别测量3次,取其平均值。

1.5 病理学检查　每组取3只大鼠CT检查后经左心室用肝素化生理盐水灌注5 min,然后用4%多聚甲醛(0.1 MPBS,pH 7.3稀释)溶液灌注约30 min,直至体内血液完全冲出.。将大鼠断头迅速取脑,先于大脑中动脉低灌流区取3～5块体积约1 mm^3脑组织于3%戊二醛中固定,逐级脱水、包埋、切片,铅铀染色及透射电镜观察。再将剩余脑组织置于4%多聚甲醛溶液固定至少24 h。冠状面切开病变脑组织,形成厚约2 mm的组织块,经脱水、浸蜡、包埋、切片、摊片、烤片及脱蜡后行常规HE染色。

每组2只大鼠进行红四氮唑(TTC)染色,大鼠取脑后,置入液氮中冻硬,以尾状核为中心3 mm层厚冠状面切成4片,放入2%TTC溶液中37℃水浴30 min。

1.6 统计学分析　实验数据均以"均数±标准差"的形式表示,多组均数比较采用SPSS for windows 8.0方差分析,$P<0.05$表示有显著性差异。

2 结果

2.1 CT灌注结果　CT灌注图可以清楚显示不同组的血流状态,与术中激光多普勒血流仪检测结果一致。脑梗死和脑低灌注组大鼠右侧大脑中动脉供血区rCBF图与左侧相比可见明显的色阶变化,对照组鼠脑两侧血流灌注对称(图1)。各组rCBF平均值及术后CBF下降百分数见表1,术中及CT灌注值各组均数均有显著性差异。

2.2 缺血面积测量　根据前述缺血面积测量方法,应用rCBF参数图,低灌注6 h组缺血区域与同侧半球面积的比值为0.26±0.17,脑梗死组为0.63±0.28,两组均数通过t检

表1　各组术中及CT灌注脑血流量数值表(%)

检查方法	对照组	梗死组	低灌注组
超声测量	100.04±8.67	7.25±0.55	46.81±8.49
CT灌注	99.54±2.58	11.58±2.46	57.96±9.54

图1　脑梗死组(A)和脑低灌注组(B)大鼠,右侧大脑中动脉供血区rCBF图与左侧相比可见明显的色阶变化,且脑梗死组病变范围较低灌注组大。对照组(C)鼠脑两侧血流灌注对称

图 2 HE 染色，脑梗死组(A)示组织明显水肿，呈空泡样，神经元固缩深染呈三角形。脑低灌注组(B)组织略疏松，神经元形态未见明显异常。对照组(C)显示正常脑组织

图 3 梗死组(A)右侧大脑半球梗死区域颜色苍白，未见着色；低灌注 6 h 组(B)和对照组(C)脑组织对称红染

验有显著性差异，低灌注组脑缺血面积小于脑梗死组。

2.3 病理学改变 电镜和光镜 HE 染色均可以观察到缺血早期脑组织的病理变化，其中电镜尤为敏感。在低灌注 6 h 组，电镜可见神经元基本正常和仅有轻微可逆性损伤，如神经元胞浆内的粗面内质网扩张，线粒体轻微肿胀，线粒体嵴减少，核膜凹陷，细胞核电子密度增高等。本组标本明显改变为星形细胞极度肿胀，胞浆内可见变性的细胞器，挤压毛细血管使管腔狭窄甚至闭塞，血管内可见淤积的红细胞。光镜 HE 染色仅见组织疏松，血管周围间隙增宽，基质内可见空泡样改变，神经元形态基本正常，偶见固缩神经元。星形细胞肿胀，胞浆淡染。梗死 6 h 组光镜和电镜均表现典型脑梗死改变：脑梗死区可见大量固缩坏死的神经元，脑组织液化，疏松淡染，甚至部分区域仅见红染的坏死组织而无明显细胞结构；电镜下细胞破裂，小胶质细胞吞噬破坏的组织碎片，小血管壁结构崩解。对照组未见明显病理改变(图 2)。

2.4 TTC 染色 对照组和低灌注 6h 组脑组织对称红染，梗死组右侧大脑半球梗死区域颜色苍白，未见着色(图 3)。

3 讨论

1986 年，Koizumi 等[4]首次报道了不用开颅的线栓法制作可逆性大脑中脉闭塞(middle cerebral artery occlusion，MCAO)模型，开创了 MCAO 模型的新途径，后经许多学者[5-7]的改进，使之成为 MCAO 模型的经典方法。该方法可以有效地阻断大鼠 MCA 供血区的脑血流，并可模拟血管再通后的再灌注情况，且不需要复杂的手术操作过程，创伤小，脑缺血损伤程度稳定，术后动物存活期较长，已被广泛接受和应用。但由于线栓法是在非直视的情况下进行的，插线的粗细、进行的距离，以及因不同品系、匹次和体重的动物而引起的变化以及插入线栓后血流下降的程度无法准确控制。

脑梗死的过程是一个渐进的复杂变化的过程。近来的研究证明，在脑梗死之前，大脑局部往往存在较长时间的血流灌注异常状态。由于神经细胞在完全切断血流后数分钟即发生不可逆改变，因此研究的重点应该集中在脑梗死前期。而如何复制脑血流量下降的状态，即制作脑局部血流量低灌注状态的动物模型，成为了新的挑战。

本组主要的改良在于对缺血区域脑组织开颅直接进行脑血流量的观察。虽然颞骨开骨窗在一定程度上增加了手术的难度，但可以直接准确控制血流量下降的程度，以复制出各种不同程度脑血流低灌注模型，稳定性及可重复性得到保证，而非以往仅凭术者的手感和经验。本组中，通过术中激光多普勒血流仪监测，根据血流量下降的程度不同，成功建立了低灌注组和脑梗死组，两组 CT 灌注值、梗死面积、TTC 染色和病理结果均不相同，证明术中观察血流量是有效的方法，并且有良好的组内重复性和模型的稳定性。

本组在手术操作上也做了一些改进。传统的方法需要结扎翼腭动脉，认为这样可以阻断颅外的侧支循环，有利于实现脑梗死。有研究者[8]由 ECA 残端进线时，用微动脉夹暂时夹闭翼腭动脉 (pterygopalatine artery, PPA)，进线成功后取下，保持 PPA 的开放，认为可以保持血管壁光滑，避免结扎

PPA 引起涡流而形成血栓的可能，从而减少 ICA 内血栓形成的机会，栓线拔出后可较快恢复灌注，并证明在梗死面积和神经功能缺损的体征方面均无明显差异。本组结果同样表明，不结扎 PPA 并不影响缺血效果。由于翼腭动脉位置较深，分离结扎困难，易出血，操作时，只需进行适度暴露。如果不慎误入 PPA，则线栓不能前进。这时退出栓线，调整好插线的方向向上内侧或用镊子辅助，可避免栓线进入 PPA。

CT 灌注成像是通过观察静脉内团注对比剂后脑组织密度时间变化，根据不同的数学模型计算得到局部脑血容积（rCBV）、局部脑血流量（rCBF）、平均通过时间（MTT）及最大峰值时间（TTP）。根据中心容积定理，其关系为：rCBV＝rCBF×MTT[3,9]。CT 灌注成像在极早期就可以灵敏地显示脑血流异常区域，并可半定量测出以上四个指标和缺血面积，其结果和术中激光多普勒血流仪监测结构一致。在本组中，结合常规病理、TTC 染色，CT 灌注成像可有效评价脑局部低灌注模型。

总之，在线栓法制备脑缺血模型的基础上，通过笔者的改良，应用激光多普勒血流仪实时监测术中的血流状态，可以有效地建立不同程度的大鼠脑局部血流低灌注模型，其可操作性、可重复性及稳定性都符合脑梗死前期实验的要求。

［参考文献］

［1］ Mayer TE, Hamann GF, Baranczyk J, et al. Dynamic CT perfusion imaging of acute stroke[J]. AJNR, 2000,21(8): 1441-1449.

［2］ Gao PY, Liang CY, Lin Y, et al. CT perfusion imaging on the disturbance of regional cerebral microcirculation in a pre-infarction period: an experimental study[J]. Chin J Radiol, 2003, 37(8): 887-891.
高培毅，梁晨阳，林燕，等. 脑梗死前期脑局部微循环障碍动态 CT 灌注成像的实验研究[J]. 中华放射学杂志，2003，37(8)：887-891.

［3］ Gao PY, Lin Y. Personal computer aided mapping and measurement of cerebral perfusion with dynamic CT[J]. Chin J Radiol, 2002, 36(1):7-10.
高培毅，林燕. 微机辅助 CT 脑灌注成像以及定量测量[J]. 中华放射学杂志，2002，36(1)：7-10.

［4］ Koizumi J, Yoshid Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema, a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. Jpn J Stroke, 1986,8(11): 1-8.

［5］ Longa E, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

［6］ Kuge Y, Minematsu K, Yamagachi T, et al. Nylon monofilament for intralaminal middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Stroke, 1995, 26(9): 1655.

［7］ Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, et al. Comparative histopathologic consequence of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats[J]. Stroke, 1993, 24(2): 286-293.

［8］ Zhou J, Gao PY. The quality control of dynamic CT perfusion imaging used in the clinical study[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2003,19(11):1576-1578.
周剑，高培毅. 动态 CT 灌注成像临床应用中的质量控制[J]. 中国医学影像技术，2003，19(11)：1576-1578.

［9］ Klotz E, Konig M. Perfusion measurement of the brain: using dynamic CT for the quantitative assessment of cerebral ischemia in acute stroke[J]. Eur J Radiology, 1999,30(1): 170-184.

携手共建 CT 博物馆

——山东泰山医学院致医学影像界同仁

自 1895 年伟大的德国科学家伦琴发现 X 线，医学影像学走过了百余年的历史，这是一部不断更新的科学发展史。21 世纪是医学影像学的世纪，技术设备不断地推陈出新，目前大部分早期二手设备已进入淘汰期，有的用户已将其作为废品处理，少数早期 X 线机产品已不复存在，记录人类医学影像科学的结晶和产品正在逐渐消失当中。为尊重科学、尊重历史、尊重前人、教育和敬示后人，为拯救人类影像科学的结晶和产品，为把学校建设成一所具有影像医学特色的多科性大学，山东泰山医学院校领导决定：筹建一个 CT 博物馆（即影像医学博物馆）。

我院名誉院长，中国工程院刘玉清院士先生获悉建馆消息后致信说："这不仅反映医学成像技术的发展和历程，而且对推动泰山医学院乃至我国的医学影像学、技术学和医学工程专业的发展将会起到积极的作用，同时对科学普及和提高全国人民的科技素质有着重要意义。"

博物馆是人类文化和文明的结晶，一个博物馆就是一部直观的活生生的历史和教科书，是人类进行教学活动的课堂。泰山医学院筹建 CT 博物馆得到了各医学影像学界领导和专家的肯定和支持，我们衷心感谢各专家和同仁对泰山医学院 CT 博物馆筹建工作的大力支持和帮助，真诚欢迎大家继续为泰山医学院正在筹建中的 CT 博物馆献计献策。我们对提供设备的单位将发给捐赠证书以做纪念，并在博物馆中撰文宣传、介绍医院情况以扩大知名度，对医疗单位的发展将起到积极的推动作用。

欲索要泰山医学院 CT 博物馆设备陈列目录，请与泰山医学院 CT 博物馆筹建组联系。

地址：泰安市迎胜东路 2 号 泰山医学院放射学院；邮编：271000。

联系人：刘林祥：（0538）6222136，E-mail：lxliu@tsmc.edu.cn；陈鹤声：（0538）6225027，13805489721，E-mail：chenhesheng2003@sohu.com；冯圣平：(0538)6222138，6222665，E-mail：shpfeng@tsmc.edu.cn。