

论 著

经微导管大脑中动脉血栓栓塞制备猴局灶性脑缺血模型*

桂林医学院附属医院放射科

(广西 桂林 541001)

邓燕贤 周智鹏 邱维加
徐军红 张辉阳 廖国宇
曾阳东 成 戈

【摘要】目的 研究介入微导管插管法制备猴局灶性脑缺血模型技术以及影像学表现。**方法** 雄性广西猕猴10只,将1.7F微导管插管至大脑中动脉M1段注入自体血栓20cm(直径1mm),大脑中动脉正侧位造影确认栓塞成功,栓塞后2小时MRI扩散加权序列扫描再次确认脑梗死,并计算ADC值。栓塞后24小时, MRI扫描结束后处死动物取脑组织行HE染色观察病理改变。**结果** 动物大脑中动脉栓塞后收缩压较栓塞前升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。10只动物大脑中动脉共插管12次,其中两只动物颈内动脉迂曲插管不成功,将导管换至对侧大脑中动脉插管成功,动物插管成功率为100%(10/10),血管插管成功率为83.3%(10/12)。麻醉和手术期间动物死亡率为0,术后24小时以内死亡1只,死亡率10%(1/10)。栓塞后2小时以及24小时病灶ADC值降低,核心区ADC值降低较边缘区明显,差异有统计学意义($P<0.05$),对侧大脑正常区ADC值在栓塞前后差异无统计学意义($P>0.05$),栓塞后2小时病灶在DWI图像上信号升高,24小时明显升高。24小时后脑组织HE染色显示脑梗死灶边界清楚,梗死灶内脑组织液化、坏死,高倍镜下显示细胞坏死如筛网状,细胞核碎裂和溶解。**结论** 介入微导管超选择插管技术能制备稳定的猴局灶性脑缺血模型。

【关键词】 介入;微导管;脑缺血模型**【中图分类号】** R743.31**【文献标识码】** A**【基金项目】** 国家自然科学基金(编号:81160147)

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5131.2017.06.001

通讯作者:周智鹏

Application of Interventional Micro-catheter in Monkey Middle Cerebral Artery Embolism Model*

DENG Yan-xian, ZHOU Zhi-peng, QIU Wei-jia, et al., Department of Radiology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Province, China

[Abstract] Objective To study the application of interventional micro-catheter intubation for the preparation of monkey focal cerebral ischemia model. **Methods** Ten male Monkeys were anesthetized, the 1.7F micro-catheter were intubated into the middle cerebral artery. Twenty cm (1 mm diameter) autologous thrombus was injected into the middle cerebral artery (MCA). The embolization was confirmed by digital subtraction angiography (DSA). Diffusion Weighted sequence were performed to confirm the occurrence of cerebral infarction, and calculate the ADC value. The brain tissues were examined by routine HE staining after 24 hours of the embolization. **Results** After monkey MCA occlusion, the systolic blood was higher ($P<0.05$). 10 animals were intubated 12 times, the success rate of the intubation in monkey was 100% (10/10). The success rate of intubation in artery was 83.3% (10/12). The mortality rate during the anesthesia and surgery was 0%. One monkey died in 24 hours, the mortality rate in 24 hours was 10% (1/10). ADC values were significantly lower at 2 hours and 24 hours after embolization ($P<0.05$). ADC values in contralateral normal brain regions were not significantly different between before and after embolization ($P>0.05$). 24 hours after embolization, the signal intensity of the lesion was increased on the DWI imaging. The brain tissue HE staining showed infarct area of brain parenchyma clear boundary, the brain tissue in the infarct liquefaction, necrosis. High-power microscope showed infarction cell necrosis, such as mesh-like, nuclear fragmentation and dissolution. **Conclusion** The technique of micro-catheter super selective intubation can be used to prepare a stable monkey model of focal cerebral ischemia.

[Key words] Interventional Radiology; Micro-catheter; Cerebral Ischemia Model; Monkey

缺血性脑卒中严重威胁着人类的健康,具有高发生率、高死亡率、高致残率的特点,正逐步成为人类疾病死亡中的首要因素。由于神经细胞对缺血和缺氧耐受性差,脑缺血后的治疗一直是临床很棘手的问题,治疗的原则是尽早恢复血供,使脑组织得到糖和氧等营养物质,减少缺血再灌注损伤和凋亡的发生^[1]。脑缺血模型的建立有利于脑缺血疾病的研究和相关治疗药物的开发,本文选择广西猕猴作为实验对象,经微导管插管到大脑中动脉,注射猴自体血栓栓塞大脑中动脉分支制备脑缺血模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性广西猕猴10只(桂林永福动物实验养殖基地),体重6~8公斤,年龄4~8岁。术前24小时禁食,适量食水。复合麻醉剂(氯胺酮1ml+安定1ml+东莨菪碱1ml)肌肉注射,术前CT平扫,排除颅内病变。

1.2 自体血栓制备 取自身静脉血5ml,肝素抗凝,高速离心取上层血清加入血浆凝固酶,注入内径为1mm的硬膜外麻醉管(河南新乡市驼人医疗器械公司),制成自体血栓。

1.3 大脑中动脉插管 心电、呼吸和血压监护下，微量泵静脉注射异丙酚维持动物麻醉状态。在GE Innova 3100血管造影机上，猴右侧腹股沟区常规备皮、消毒、铺巾，切开皮肤，暴露股动脉，股动脉穿刺置入4F导管鞘，经导管鞘引入4F多功能导管，超选择至颈内动脉起始部，行脑血管正侧位造影，对比剂总量2.5ml，速度1ml/s。经4F导管引入1.7F微导管，在0.014inch神经微导丝引导下插管至大脑中动脉M1段，行大脑中动脉正侧位造影，总量1.8ml，速度0.6ml/s(所有导丝、导管均为美国强生Cordis公司产品)。

1.4 大脑中动脉部分栓塞 自微导管注入制备好的血栓20cm，再次行大脑中动脉正侧位造影确认栓塞成功。

1.5 MRI 西门子公司Verio 3.0T MRI，栓塞后2小时MRI和DWI序列轴位扫描扫描确认栓塞表现，并根据DWI(b=0, b=1000)计算ADC值，MRI扫描参数见表1。

1.6 病理检查 栓塞后24小时，MRI扫描结束后处死动物取脑组织行常规HE染色观察病理改变。

1.7 统计学方法 所有数据利用SPSS 18软件包对数据进行统计学分析。两两比较的数据符合方差齐性检验，均采用t检验，三组比较采用 χ^2 检验。P<0.05为差异有统计学差异，P>0.05为差异无统计学意义。

2.1 栓塞前、后生理指标监测 栓塞前后监测血压、心率、体温和动脉血气分析。栓塞后动物的收缩压较栓塞前高，差别有统计学意义(P<0.05)，见表2。

2.2 大脑中动脉栓塞 栓塞前、后DSA显示大脑中动脉部分分支栓塞，栓塞后大脑中动脉血流减慢，对比剂反流至眼动脉致其显影，见图1-4。

2.3 大脑中动脉插管成功率和手术死亡率 10只动物大脑中动脉共插管12次，其中两只动物颈内动脉迂曲插管不成功，将导管换至对侧大脑中动脉插管成功，动物插管成功率为100%(10/10)，血管插管成功率为83.3%(10/12)。麻醉和手术期间动物死亡率为0，术后24小时以内死亡一只，死亡率10%(1/10)。

2.4 栓塞前后ADC值变化 栓塞后2小时以及24小时病灶ADC值明显降低，核心区ADC值降低较边缘区更加明显，差异有统计学意义(P<0.05)，对侧大脑正常区ADC值在栓塞前后差异无统计学意义(P>0.05)，栓塞后2小时病灶在DWI图像上信号升高，24小时明显升高，见表3，图5-10。

2.5 24小时后脑组织病理改变 见图11-13。

3.1 猴脑缺血模型的制备 常见的大脑中动脉缺血模型建立方法有：动脉结扎、静脉损伤、经颈动脉异物栓塞以及血栓栓塞等^[2-6]。但是大多数的研究都是采用啮齿类动物模型，和人体之间存在着较大的差异，而且啮齿类动物个体较小，生存能力和人不同，因此，虽然很多治疗药物和方法在基于啮齿类动物的脑缺血实验中有效，但是很难进一步在临床应用。本研究采用和人类亲缘关系较近的猕猴作为实验动物，由于猴的体重和脑体积都较大，通过不同栓塞部位和剂量的控制，可以成功复制脑缺血模型。我们的课题小组从2007年以来，陆续报道了猴脑缺血模型的制备及相关研究^[7-10]，本研究的报道是在综合以往猴脑缺血模型制备经验上的进一步改进和深化研究。

3.2 插管技术、成功率和动物死亡率分析 股动脉穿刺置入导管鞘是介入手术的第一步，也是大脑中动脉插管手术成功必要前提。人的股动脉穿刺并发症发生率约为2%~10%^[11-12]。猴的股动脉比较细小，猴腹股沟区皮肤与人相比，相对坚韧而厚，猴股动脉在体表往往不易触及，以前的研究中，首次穿刺的失败率较高，并且一旦穿刺失败损伤了血

3 讨 论

表1 MRI扫描参数

MR sequence	TR(ms)	TE(ms)	FOV(mm)	Matrix(mm)	Average	SL(mm)
DWI EPI	7300	100	171 × 210	156 × 192	4	4
T2WI TSE	6000	96	160 × 200	512 × 640	2	4

*TR: repetition time; TE: echo time; SL: slice thickness

2 结 果

表2 生理指标监测

	SBP*	DBP	HR	T	PH	PO ₂	PCO ₂
栓塞前	76.8 ± 9.9	38.0 ± 4.1	102.0 ± 11.1	36.9 ± 0.7	7.33 ± 0.03	436.8 ± 46.1	54.2 ± 12.9
栓塞后	95.3 ± 8.0	59.3 ± 3.9	108.5 ± 13.5	36.5 ± 0.3	7.31 ± 0.02	356.0 ± 59.4	57.7 ± 5.7
T值	-2.903	3.987	-0.743	0.936	0.802	2.148	-0.492
P值	0.027	0.196	0.486	0.386	0.453	0.075	0.640

注：*差异有统计学意义的数据。SBP: 收缩血压 (mmHg)；DBP: 舒张血压 (mmHg)；HR: 心率 (次/分)；T: 体温 (摄氏度)；PH: 动脉血PH值；PO₂: 动脉血氧分压 (mmHg)；PCO₂: 动脉血二氧化碳分压 (mmHg)

表3 栓塞前后ADC值 ($\times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{s}$) 变化

	栓塞前	栓塞后2h	栓塞后24h	F	P
病灶中心区	6.53 ± 0.21	4.37 ± 0.57	3.03 ± 0.49	15.058	0.000
病灶边缘区	6.82 ± 0.25	5.20 ± 0.84	4.28 ± 0.71	8.965	0.028
对侧大脑	6.33 ± 0.31	6.47 ± 0.28	6.43 ± 0.35	-1.068	0.749

管,再次穿刺成功率几乎为零。为了保证插管成功率,本研究采用了切开分离股动脉周围组织,暴露股动脉,直视下穿刺股动脉的技术,股动脉穿刺成功率达到100%。猴的颈内动脉迂曲,尤其是颈内动脉颅骨段,迂曲程度远远超过人的颈内动脉,插管过程中将4F导管尽量插到颈内动脉的远端,为微导管提供更好的支

撑。采用1.7F微导管,采用合适的导丝、导管技术,均能插管至大脑中动脉M1段,插管过程中动作尽量轻柔,减少对血管的刺激和损伤,本研究两支血管插管不成功的原因都是颈内动脉和大脑中动脉起始段血管痉挛,导致导丝和导管无法进入,为避免人为损伤影响实验结果,重新进行对侧大脑中动脉插管成功。由于我

们小组不断改进麻醉和插管技术,本研究动物麻醉和手术死亡率为零,有1例在术后24小时死亡,分析其主要原因是栓塞范围过大所致。栓塞后动物收缩压明显增高,和文献的报道一致,舒张压、二氧化碳分压有所升高,氧分压下降,但是差异无统计学意义,可能和本组实验动物数量较少有关。

3.3 脑缺血范围和梗死体积的影像学监测 术后监测采用MRI扩散加权成像(Diffusion Weighted Imaging, DWI)监测,同时测量表观弥散系数(Apparent

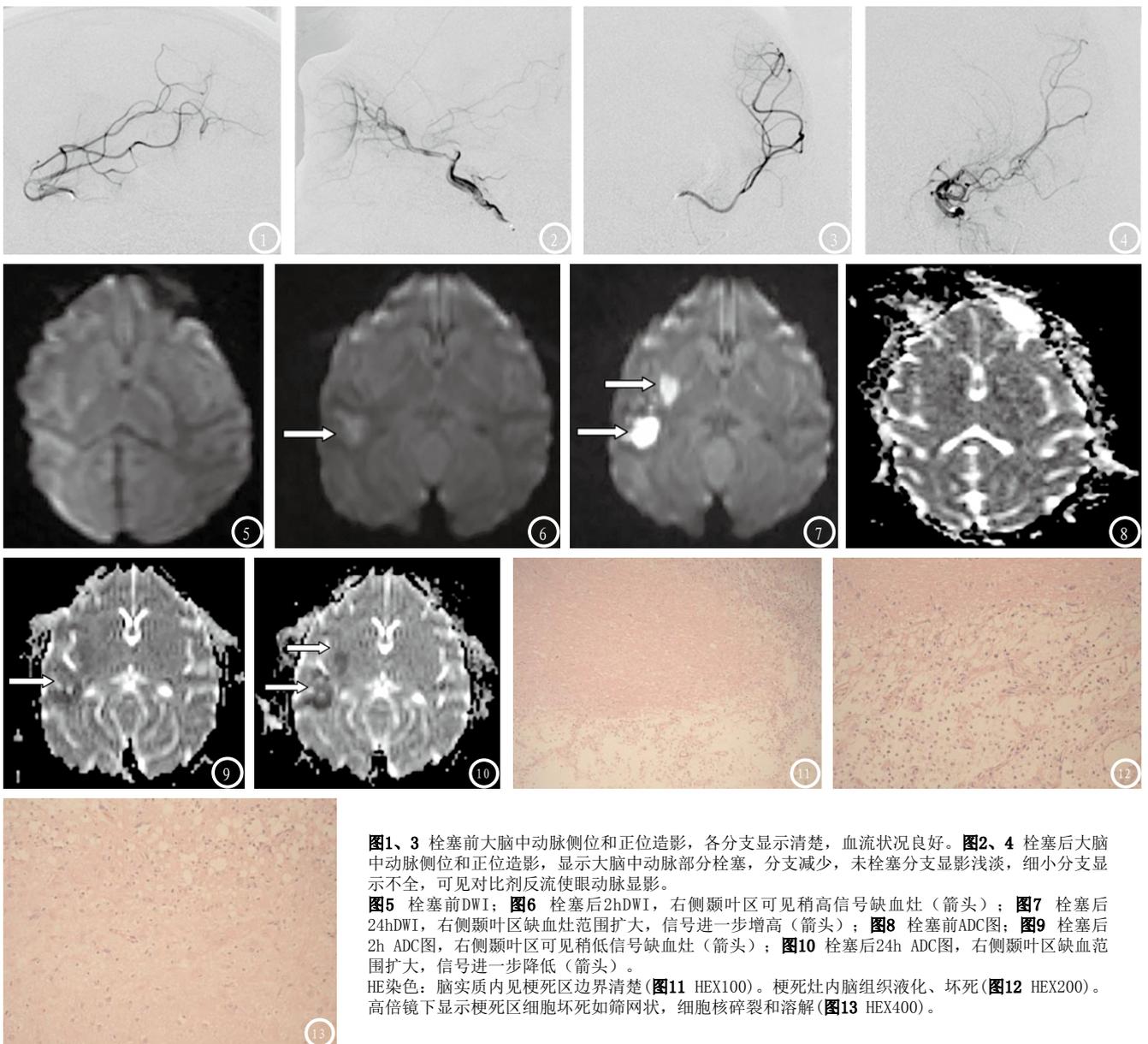


图1、3 栓塞前大脑中动脉侧位和正位造影,各分支显示清楚,血流状况良好。图2、4 栓塞后大脑中动脉侧位和正位造影,显示大脑中动脉部分栓塞,分支减少,未栓塞分支显影浅淡,细小分支显示不全,可见对比剂反流使眼动脉显影。

图5 栓塞前DWI;图6 栓塞后2hDWI,右侧颞叶区可见稍高信号缺血灶(箭头);图7 栓塞后24hDWI,右侧颞叶区缺血灶范围扩大,信号进一步增高(箭头);图8 栓塞前ADC图;图9 栓塞后2h ADC图,右侧颞叶区可见稍低信号缺血灶(箭头);图10 栓塞后24h ADC图,右侧颞叶区缺血灶范围扩大,信号进一步降低(箭头)。

HE染色:脑实质内见梗死区边界清楚(图11 HEX100)。梗死灶内脑组织液化、坏死(图12 HEX200)。高倍镜下显示梗死区细胞坏死如筛网状,细胞核碎裂和溶解(图13 HEX400)。

Diffusion Coefficient, ADC) 的值进行对比。DWI 是活体测量水分子运动的有效手段,水分子在活体内的扩散与组织的空间结构以及周围大分子物质的分布有关。急性缺血后,脑组织内的神经元细胞在缺血后数分钟开始,钠-钾离子泵失活,使得细胞外水分子向细胞内渗透,导致细胞内水分子增多,发生细胞毒性水肿;此时缺血区组织内水分子扩散受阻,导致DWI信号增高,ADC值下降^[13-15]。随着缺血时间延长,血管内皮细胞受损导致毛细血管通透性增加,缺血组织出现血管源性水肿,此时T2WI信号逐渐增高,因此DWI对脑梗死的检出早于常规MR序列。本研究结果显示,所有的动物在栓塞后2小时,均能在DWI图像上显示梗死灶,相应区域ADC值降低,栓塞后24小时,梗死灶进一步扩大,显示更清楚,2小时和24小时ADC值之间差异有统计学意义,表明脑缺血后缺血区脑组织水分子扩散进一步受限。DWI可以作为猴脑缺血模型监测的首选影像学检查。术后24小时病理染色进一步明确梗死灶的存在,可以观察和研究梗死区的病理改变,并且进一步验证DWI诊断的结果。

灵长类动物猴在直立行走、行为、运动、感觉以及脑血管的解剖结构和功能等方面与人类非常的相似,基于灵长类动物的药物实验研究有其他低等动物无法比拟的优势。利用介入插管的方法减少了手术损伤,猴自体血栓栓塞更接近临床血栓栓塞性脑梗

塞的发病原因,术后利用脑血管造影和核磁共振扫描监测脑梗死后的血流情况、梗死范围以及治疗后的转归,使得该动物模型非常接近于临床疾病的发生、发展和诊疗过程。本研究的结果将进一步完善猴脑缺血模型的药物治疗实验方法,为临床脑缺血治疗提供了更多的基础研究证据。

参考文献

- [1] O'Carroll CB, Rubin MN, Chong BW. What is the Role for Intra-Arterial Therapy in Acute Stroke Intervention[J]. *Neurohospitalist*, 2015, 5(3): 122-132.
- [2] 张世蕾,江基尧,邱永明.选择性超深低温对缺血猴脑神经元凋亡及PTEN表达的影响[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2010, 7(4): 173-175.
- [3] 刘博虎,尹芳,岑键昌,等.猴脑严重缺血后选择性脑深低温灌注对神经功能的影响[J]. *昆明医科大学学报*, 2015, 36(3): 18-22.
- [4] Barbay S, Plautz EJ, Zoubina E, et al. Effects of postinfarct myelin-associated glycoprotein antibody treatment on motor recovery and motor map plasticity in squirrel monkeys[J]. *Stroke*, 2015, 46(6): 1620-1625.
- [5] Zhao B, Shang G, Chen J, et al. A more consistent intraluminal rhesus monkey model of ischemic stroke[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(23): 2087-2094.
- [6] Sun ML, Li M, Huang Q, et al. Ischemia/reperfusion-induced upregulation of TIGAR in brain is mediated by SP1 and modulated by ROS and hormones involved in glucose metabolism[J]. *Neurochemistry international*, 2015, 80(1): 99-

109.

- [7] 周智鹏,邱维加,邓燕贤,等.猴局部脑缺血模型的建立及t-PA溶栓效果的评价[J]. *临床放射学杂志*, 2007, 26(5): 500-503.
- [8] 周智鹏,邓燕贤,邱维加,等.不同程度猴脑缺血模型的CT灌注和脑血管造影评价[J]. *临床放射学杂志*, 2008, 27(11): 1585-1588.
- [9] 周智鹏,邱维加,邓燕贤,等.ω-agatoxin-IVA对猴脑缺血模型的神经保护作用研究[J]. *介入放射学杂志*, 2012, 21(8): 660-663.
- [10] 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(7): 578-581.
- [11] 曹莉明,王杰,施海彬,等.股动脉穿刺定位方法的优化研究[J]. *介入放射学杂志*, 2013, 22(5): 409-412.
- [12] Schnyder G, Sawhney N, Whisenant B, et al. Common femoral artery anatomy is influenced by demographics and comorbidity: implications for cardiac and peripheral invasive studies[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2001, 53(3): 289-295.
- [13] 李超,李晓婷.核磁共振弥散成像在脑干梗死早期诊断中的意义[J]. *中国CT和MRI杂志*, 2014, 11(1): 39-41.
- [14] Simonsen CZ, Madsen MH, Schmitz ML, et al. Sensitivity of diffusion- and perfusion-weighted imaging for diagnosing acute ischemic stroke is 97.5%[J]. *Stroke*, 2015, 46(1): 98-101.
- [15] 卢晓冬,杨明,何业银,等.磁共振弥散成像对短暂性脑缺血发作的应用价值[J]. *中国CT和MRI杂志*, 2015, 13(10): 19-21.

(本文编辑:汪兵)

【收稿日期】2017-05-09