

· 论 著 ·

缺血性卒中无复流动物模型建立
和多维度评价方案[☆]杨馨漩* 田昊* 赵家慧* 郑丽娜* 刘丽萍*[⊗]

【摘要】目的 建立脑无复流模型并对灌注减低进行多维度评价。**方法** 利用激光散斑对比成像和双光子活体成像,比较 C57BL/6($n=16$)和 BALB/c 小鼠($n=37$)短暂性大脑中动脉闭塞,以及 BALB/c 小鼠缺血 1h 或 1.5h 灌注改变情况。结合激光散斑对比成像、低倍率和较高放大倍率的灌注脑片图像,以及双光子显微镜监测红细胞流速和流量对短暂性大脑中动脉闭塞后脑灌注下降进行活体动态以及全脑切片和微血管的评估。用微管相关蛋白 2 染色和行为学评分评估梗死面积和行为学缺损。**结果** 在 C57BL/6 小鼠中,大脑中动脉区域大多数毛细血管在缺血期间仍然流动,而在 BALB/c 小鼠中,大多数毛细血管被阻断。此外, BALB/c 小鼠缺血 1.5 h 后,24 h 后再通时的皮质灌注减少至基线 76.1%(与 BALB/c sham 组 89.0% 相比减少, $P=0.046$),而缺血 1 h 减少至 79.9%,与 BALB/c sham 组无明显差异($P=0.299$)。切片全脑灌注评估 BALB/c 小鼠短暂性大脑中动脉闭塞 1.5 h 导致全脑灌注减少至 75.1%(与 BALB/c sham 组 100% 相比降低, $P<0.001$),双光子活体成像评估大脑中动脉流域皮质表面毛细血管血流在再通 24h,红细胞流速降至基线水平的 50.3%(与 BALB/c sham 组 110.7% 相比降低, $P=0.010$),红细胞流量降至基线水平的 38.9%(与 BALB/c sham 组 119.2% 相比降低, $P=0.010$);高倍率切片成像评估毛细血管有灌注长度为 $241\mu\text{m} \pm 33\mu\text{m}$ (与 BALB/c sham 组 $997\mu\text{m} \pm 103\mu\text{m}$ 相比减少, $P=0.001$),有灌注的毛细血管占据的总体积分数为 0.0128 ± 0.0018 (与 BALB/c sham 组 0.0539 ± 0.0055 相比减少, $P<0.001$)。微管相关蛋白 2 染色提示 BALB/c 小鼠短暂性大脑中动脉闭塞 1.5 h 导致梗死面积占全脑面积约 36%,行为学评分提示行为学缺损,评分升高至 9 分。**结论** BALB/c 小鼠短暂性缺血 1.5 h 导致明显的脑灌注下降以及毛细血管无复流,适合建立无复流模型。激光散斑对比成像、低倍率和较高放大倍率的灌注脑片图像,以及双光子显微镜活体成像的结合,可以对灌注变化进行多维度评价。

【关键词】 脑缺血 无复流现象 无复流模型建立 脑血流灌注 无复流多维度评价

【中图分类号】 R743

【文献标识码】 A

Establishment of an animal model of no-reflow ischemic stroke and the multidimensional evaluation system.
YANG Xinxuan, TIAN Hao, ZHAO Jiahui, ZHENG Lina, LIU Liping. Beijing Tiantan Hospital, Beijing 100050, China. Tel: 010-59978585.

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to explore a suitable method to model no-reflow phenomenon following ischemic stroke and to evaluate perfusion decrease from multiple perspectives. **Methods** Laser scatter contrast imaging and two-photon live imaging were used to compare transient middle cerebral artery occlusion in C57BL/6 and BALB/c mice and perfusion alterations in BALB/c mice with 1 or 1.5 h of ischemia. Several imaging techniques including laser scatter contrast imaging, low and higher magnification images of perfused brain slices and two-photon microscopy to monitor erythrocyte flow rate and flux were used to assess *in vivo* dynamics as well as whole brain sections and microvasculature for decreased cerebral perfusion after transient middle cerebral artery occlusion. Infarct size

doi:10.3969/j.issn.1002-0152.2024.01.001

[☆] 国家自然科学基金(编号:82071301,81820108012)

^{*} 首都医科大学附属北京天坛医院 神经病学中心(北京 100050)

[⊗] 通信作者(E-mail:lipingsister@gmail.com)

and behavioral deficits were assessed with microtubule-associated protein 2 staining and behavioral scoring. **Results** In C57BL/6 mice, most capillaries in the middle cerebral artery region remained flowing during ischemia, whereas most capillaries were blocked in BALB/c mice. In addition, cortical perfusion at 24 h of recanalization was significantly reduced to 76.1% of baseline following 1.5 h of ischemia in BALB/c mice ($P=0.046$ compared with the sham group), whereas for it was reduced to 79.9% following 1h of ischemia which was not significantly different from the sham group ($P=0.299$). Transient middle cerebral artery occlusion in BALB/c mice for 1.5 h resulted in a reduction in whole-brain perfusion to 75.1% ($P<0.001$ compared with the sham group), and erythrocyte flow rate assessed by two-photon live-imaging of erythrocyte flow on the cortical surface of the middle cerebral artery basin was reduced to 50.3% of baseline levels at 24 h of recanalization ($P=0.010$ compared with the sham group), and erythrocyte flux decreased to 38.9% of baseline levels ($P=0.010$ compared with the sham group); high-magnification imaging of sections assessed an approximately 76% reduction in the length of capillaries with perfusion ($P=0.0001$ compared with the sham group), and a reduction in the fraction of the total volume occupied by perfused capillaries by an approximately 76% reduction ($P<0.001$ compared with the sham-operated group). Microtubule-associated protein 2 staining suggested that transient middle cerebral artery occlusion for 1.5 h in BALB/c mice resulted in infarcts that accounted for approximately 36% of the total cerebral area and behavioral scores elevated to 9, suggesting behavioral deficits. **Conclusion** Transient ischemia in BALB/c mice for 1.5 h resulted in a significant decrease in cerebral perfusion as well as capillary no-reflow and thus can model the no-reflow phenomenon following ischemic stroke. The combination of laser scatter contrast imaging, low magnification and higher magnification images of perfused brain slices, and two-photon microscopy live imaging allows for a multifaceted assessment of perfusion changes.

【Keywords】 Cerebral ischemia No-reflow phenomenon No-reflow modelling Cerebral perfusion No-reflow multidimensional evaluation

血管再通是急性缺血性脑卒中治疗的一个重要手段^[1-2]。然而,约有一半的患者无法通过血管再通治疗获得良好神经功能预后^[3],称为无效再通。约有 1/4 的患者不能成功再灌注^[4]。除责任血管再闭塞外,微血管循环障碍导致的无复流而不能获得再灌注是主要的病理变化^[5]。无复流机制尚不清楚,还需进一步的研究。既往研究中建立和评估脑无复流模型的方法各不相同^[6-8],所用小鼠品系及造模方式和缺血时间各有不同,没有公认的方法。本研究目的是为了建立合适的脑无复流模型并对灌注减低进行多维度评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 C57BL/6 及 BALB/c 小鼠(体重 25 ~ 30g, 8 ~ 12 周龄)购买于斯贝福实验动物科技有限公司(北京,中国)。实验动物饲养于北京市神经外科研究所动物实验室,饲养环境温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,光照/黑暗周期为 12 h,小鼠可自由饮水和采食。实验流程和动物福利保护严格按照实验动物

福利伦理法律法规执行。本实验由北京市神经外科研究所实验动物福利伦理委员会批准,批准伦理号为 202002005 和 202201003。

共用雄性 C57BL/6 小鼠 16 只,5 只用于活体双光子监测(其中 2 只颅骨窗质量差,成像差),5 只用于 C57BL/6 sham 组激光散斑血流监测,6 只用于 C57BL/6 MCAO 组激光散斑血流监测(其中 1 只死亡)。BALB/c 小鼠 37 只,8 只用于活体双光子监测(其中 3 只颅骨窗质量差成像差或死亡),5 只用于 BALB/c sham 组激光散斑血流监测,6 只用于 BALB/c tMCAO 1 h 组激光散斑血流监测(其中 1 只死亡),7 只用于 BALB/c tMCAO 1.5 h 组激光散斑血流监测(其中 2 只死亡),处死后用于评估全脑灌注改变及免疫荧光染色评估微血管灌注改变;5 只用于 BALB/c sham 组行为学评估,6 只用于 BALB/c tMCAO 1.5 h 组行为学评估(其中 1 只死亡),处死后用于免疫荧光染色评估脑梗死面积。

1.2 方法

1.2.1 小鼠短暂性大脑中动脉闭塞(transient middle

cerebral artery occlusion, tMCAO)模型的制作 4%~5%异氟烷诱导小鼠进行深度麻醉,1%~2%异氟烷维持麻醉。参照既往研究^[9],结扎和切断颈外动脉远端,并从颈外动脉残端将6-0硅胶涂层线栓(602256PK5Re, Doccol)插入颈内动脉。线栓进一步推进到有轻微阻力,从颈外动脉起始处进入颈内动脉约8~9 mm,即为大脑中动脉起始处。1 h或1.5 h后,通过抽出线栓使大脑中动脉再通。假手术组(sham组)进行除了插入线栓以外的操作。在手术和麻醉恢复期间,将小鼠放在加热垫上,保持(37.0±0.5)°C。

1.2.2 激光散斑对比成像动态评估小鼠脑皮质血流变化 参考既往研究^[10]使用激光散斑血流成像仪(RFLSI III, 深圳瑞沃德生命科技有限公司)测量激光散斑对比成像图。在缺血前、缺血期间以及再通后2 h和24 h,对皮质灌注进行监测。感兴趣区选在双侧大脑中动脉流域内。此外,计算梗死同侧/对侧脑血流的相对比例。

1.2.3 组织准备 建模后24 h,在处死前10 min通过尾静脉注射100 μL 70 kD的罗丹明B异硫氰酸酯(RITC)-葡聚糖(R9379, sigma, 5% W/V)。小鼠脑用4%多聚甲醛固定过夜,然后用含有30%蔗糖的4%多聚甲醛溶液固定48 h。使用冰冻切片机收集50 μm或30 μm厚的连续冠状切片。

1.2.4 免疫荧光染色 免疫荧光染色用漂片,血管基底膜用抗胶原IV抗体(1:250, Abcam, ab19808)标记,用兔源抗MAP₂抗体(1:200, cst, 8707S)染色来评估梗死区。将切片在含有5%山羊血清(Solarbio, SL038)和0.3% Triton X-100的0.1 mol/L PBS中在室温下封闭1 h。然后一抗4 °C下孵育过夜,用PBS/Triton X-100洗涤后,将切片与二抗在室温下孵育1 h。二抗是山羊抗兔Alexa Fluor 488(1:500; Thermo Fisher Scientific, A-11008)。用PBS/Triton X-100清洗后,用抗荧光衰减封片剂(Solarbio, S2100)封片。通过激光共聚焦显微镜(LSM 710; Zeiss, 德国)获得用于血管分析的Z-堆图。MAP₂染色的图像用Vectra Polaris (PerkinElmer, Spokane,

WA, United States)进行扫描。

1.2.5 梗死面积的量化 从前囟层面开始每隔7张脑片选取一张30 μm厚切片用于评估梗死面积,使用ImageJ(1.53t版,美国NIH)计算MAP₂阴性和全脑的面积。用梗死面积÷全脑面积,得到梗死面积与全脑的占比。

1.2.6 颅窗手术 用颅骨钻在运动感觉皮质上方做一个直径3 mm颅骨窗(右侧,距Bregma点-3.0 mm,外侧3.5~4.0 mm)。其余暴露颅骨表面用牙科水泥封闭,并用牙科水泥将定制头件固定在颅骨上。

1.2.7 双光子成像观察大脑中动脉血流及测量微血管流速变化 在双光子成像前一天制作颅内窗。在缺血前、缺血期间以及再通后2 h和24 h,使用配备有MaiTai双光子激光器和20倍水浸物镜的双光子显微镜(LSM 880, Axio Examiner; 蔡司)进行成像。显微镜由ZEN 2011软件(黑色版,蔡司,德国)控制,在测量过程中,小鼠固定在定制金属板上,并如造模所述保持麻醉状态。在成像前10 min,从尾静脉注射100 μL RITC-葡聚糖,并用800 nm激光激发,以观察血管。血管的Z-堆记录为512×512像素,帧扫描时间943.72 ms,覆盖约425 μm×425 μm×120 μm的体积。此外,每个Z-堆记录10帧。红细胞的流速和流量通过线扫描获得^[11],2000循环,帧扫描时间为1.84 ms。

1.2.8 全脑灌注分析 从前囟对应脑平面开始,每7片脑切片选取一片30 μm厚代表脑片,一共6片脑片,封片后用Vectra Polaris (PerkinElmer, 华盛顿州斯波坎,美国)仪器进行成像,使用Image J(1.53t, 美国国立卫生研究院)软件测量每个半脑切片的平均RITC-葡聚糖信号强度,并对其进行伪彩色化。该信号可评估脑组织灌注。此外,计算梗死同侧/对侧RITC-葡聚糖信号强度的比。

1.2.9 行为学评估 行为学评估在再通后24 h进行,使用改良神经功能评分(modified neurological function score, mNSS)。mNSS的评分标准为0~18分(分数越高代表损伤越严重):0分,正常;1~6分,轻度损伤;7~12分,中度损伤;13~18分,严重

损伤^[12-14]。

1.3 统计学方法 统计分析及作图采用 GraphPad Prism(9.4.0 版)。数据使用 D'Agostino & Pearson 检验进行正态性测试,用 $\bar{x} \pm s$ 描述数据。正态分布数据用 *t* 检验比较,同一批小鼠多时间点血流数据比较用两因素重复测量方差分析。非正态分布数据用 Mann-Whitney 检验分析。检测水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 脑无复流模型的建立

2.1.1 C57BL/6 sham 组和 C57BL/6 tMCAO 1 h 组 多时间点皮质灌注对比 激光散斑血流监测显示,脑血流数据采用两因素重复测量方差分析,发现组间 ($F=40.452, P<0.001$)、时间 ($F=73.712$, 校正 $P<0.001$)、时间与组间 ($F=22.798$, 校正 $P<0.001$) 存在交互效应,故进行成对比较。分析发现大脑中动脉阻塞时, C57BL/6 tMCAO 1 h 组皮质灌注减少 70.3%, 而 C57BL/6 sham 组减少 11.3%。再通后 2

h, C57BL/6 tMCAO 1 h 组与 C57BL/6 sham 组间的差异有统计学意义 ($P<0.001$)。当再通后 24 h 时, 两组无统计学差异 ($P>0.999$)。见图 1 和表 1。

2.1.2 C57BL/6 与 BALB/c 小鼠双光子活体成像 多时间点血流对比 见图 2。活体双光子显微镜观察中, C57BL/6 小鼠在大脑中动脉闭塞时, 大脑中动脉主干远端的血流在缺血期间方向逆转(图 2C 大白箭头指示), 并且大脑中动脉流域内几乎所有毛细血管血流仍然流动。大脑中动脉阻塞期间 BALB/c 小鼠大脑中动脉远端主干的血流几乎停滞。BALB/c 小鼠大脑中动脉区域内大多数毛细血管是阻塞状态, 一些毛细血管在再通后 2 h 和 24 h 后仍然阻塞。

2.1.3 BALB/c sham 组、BALB/c tMCAO 1 h 组和 BALB/c tMCAO 1.5 h 组 多时间点皮质灌注对比 激光散斑血流仪监测 BALB/c 小鼠缺血再通期间血流情况, 脑血流数据采用两因素重复测量方差分析, 发现组间 ($F=57.601, P<0.001$)、时间 ($F=96.178$, 校正 $P<0.001$)、时间与组间 ($F=15.960$, 校正 $P<0.001$) 存在交互效应, 故进行成对比较。分析结果显示大脑中动脉阻塞时, BALB/c tMCAO 1 h 组与 BALB/c tMCAO 1.5 h 组皮质脑血流量下降无统计学差异 ($P>0.999$)。在再通后 2 h, BALB/c tMCAO 1 h 组 ($P<0.001$) 和 BALB/c tMCAO 1.5 h 组 ($P<0.001$) 与 BALB/c sham 组的差异有统计学意义。再通后 24h, BALB/c tMCAO 1 h 组与 BALB/c sham 组无明显差异 ($P=0.299$), 而 BALB/c tMCAO 1.5 h 组与 BALB/c sham 组间的差异有统计学意义 ($P=0.046$)。见表 1、图 3。

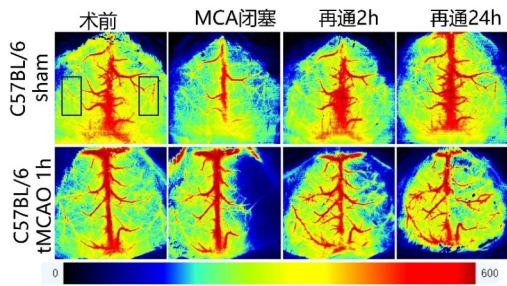


Fig.1 Scattered representative images of C57BL/6 mice sham group and tMCAO 1 h group at multiple time points showing cortical perfusion

图1 C57BL/6 小鼠 sham 组和 tMCAO 1 h 组多时间点的散斑代表图,显示皮质灌注情况

Tab.1 Changes in cerebral blood flow in mice assessed by laser scatter contrast imaging ($\bar{x} \pm s, n=5$)
表 1 激光散斑血流仪评估小鼠脑血流变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	术前	MCA 闭塞中	再通 2h	再通 24h
C57BL/6 sham	100.0%±0.0%	88.7%±9.8%	95.8%±11.4%	99.4%±8.5%
C57BL/6 tMCAO 1 h	100.0%±0.0%	29.7%±4.7% ¹⁾	51.5%±12.9% ¹⁾	96.3%±16.8% ¹⁾
BALB/c sham	100.0%±0.0%	88.9%±9.8%	91.3%±2.5%	89.0%±5.3%
BALB/c tMCAO 1 h	100.0%±0.0%	30.1%±5.0% ²⁾	63.3%±18.4% ²⁾	79.9%±5.8%
BALB/c tMCAO 1.5 h	100.0%±0.0%	32.3%±9.2% ²⁾	64.9%±8.7% ²⁾	76.1%±9.8% ²⁾³⁾

1)与 C57BL/6 sham 组比较,采用两因素重复测量方差分析, $P<0.05$; 2)与 BALB/c sham 组比较,采用两因素重复测量方差分析, $P<0.05$; 3)与 C57BL/6 tMCAO 1 h 组比较,采用两因素重复测量方差分析, $P<0.05$ 。

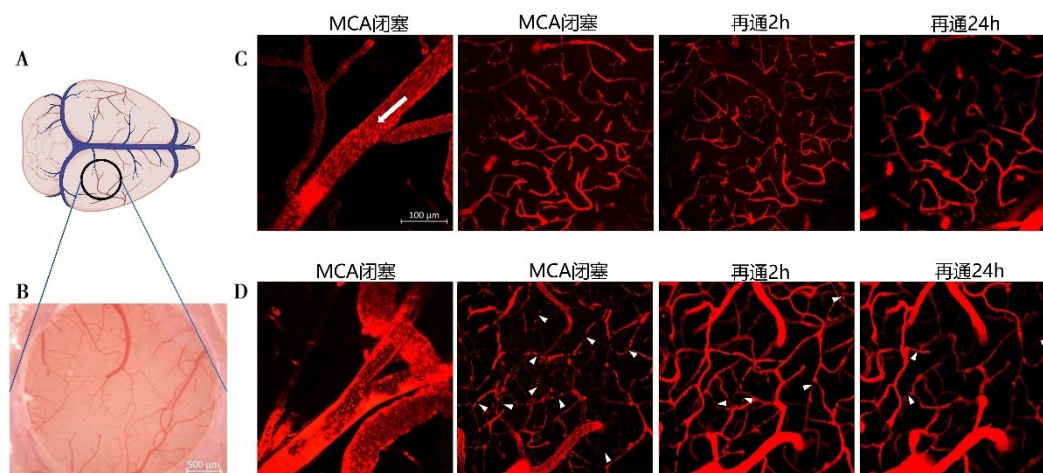


Fig.2 Comparison of two-photon *in vivo* imaging of blood flow at multiple time points in C57BL/6 and BALB/c mice

图2 C57BL/6与BALB/c小鼠双光子活体成像多时间点血流对比 A, 颅窗位置示意图, 黑色圆圈示意颅窗位置, 覆盖了右侧感觉运动皮质。B, 颅窗的显微镜图, 标尺为500 μm 。C、D, 双光子活体成像代表图。C和D分别展示了C57BL/6和BALB/c小鼠大脑中动脉阻塞时大脑中动脉远端分支及大脑中动脉流域毛细血管的双光子活体图像, 及再通2h和24h大脑中动脉流域毛细血管的双光子活体图像。白色大箭头表示大脑中动脉血流反向, 白色小箭头示意毛细血管阻塞部位, 标尺为100 μm 。

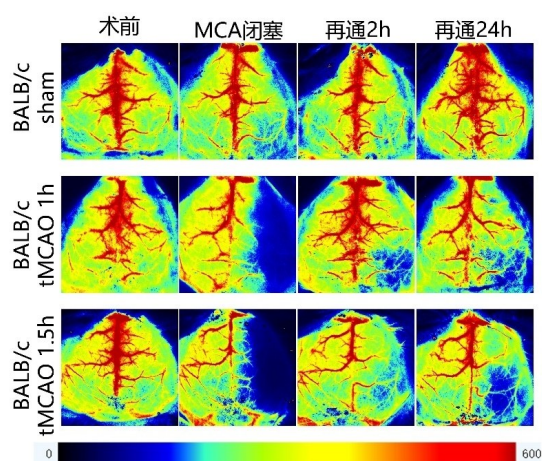


Fig.3 Scattered representative images of the BALB/c sham group, tMCAO 1 h and tMCAO 1.5 h groups at multiple time points showing cortical perfusion

图3 BALB/c sham组、tMCAO 1h和tMCAO 1.5h组多时间点的散斑代表图, 显示皮质灌注情况

2.1.4 C57BL/6 tMCAO 1 h组和BALB/c tMCAO 1.5 h组多时间点皮质灌注对比 表1可见C57BL/6 tMCAO 1 h组与BALB/c tMCAO 1.5 h组脑血流量对比, 脑血流实验数据采用两因素重复测量方差分析, 发现组间 ($F=138.900$, $P<0.001$)、时间 ($F=88.026$, 校正 $P<0.001$)、时间与组间 ($F=49.680$, 校正 $P<0.001$) 存在交互效应, 故进行成对比较。结果

显示大脑中动脉阻塞时, C57BL/6 tMCAO 1 h组与BALB/c tMCAO 1.5 h组皮质血流下降无统计学差异 ($P>0.999$); 再通2h后, 两组血流比较仍无统计学差异 ($P=0.129$)。而再通24h时, 两组间的差异有统计学意义 ($P=0.008$)。BALB/c tMCAO 1.5 h组较C57BL/6 tMCAO 1 h组在大脑中动脉再通24h后皮质脑血流量多降低20.2%。

2.2 BALB/c小鼠短暂性大脑中动脉闭塞1.5h导致脑无复流的多维度评价

2.2.1 全脑切片灌注评估 再通24h后, 用全脑切片梗死侧/对侧罗丹明B异硫氰酸酯-葡聚糖平均荧光强度表示脑灌注, 结果显示与BALB/c sham组相比, BALB/c tMCAO 1.5 h组再通后出现无复流。BALB/c tMCAO 1.5 h组脑灌注量减少至75.1%, 而BALB/c sham组脑灌注量为100%, 两组间差异有统计学意义 ($t=9.221$, $P<0.001$, 图4A、B)。

2.2.2 激光散斑血流监测 激光散斑血流监测脑血流数据采用两因素重复测量方差分析, 发现组间 ($F=102.52$, $P<0.001$)、时间 ($F=50.081$, 校正 $P<0.001$)、时间与组间 ($F=28.862$, 校正 $P<0.001$) 存在交互效应, 故进行成对比较。分析结果显示再通2h后, BALB/c tMCAO 1.5 h组皮质血流与BALB/c sham组

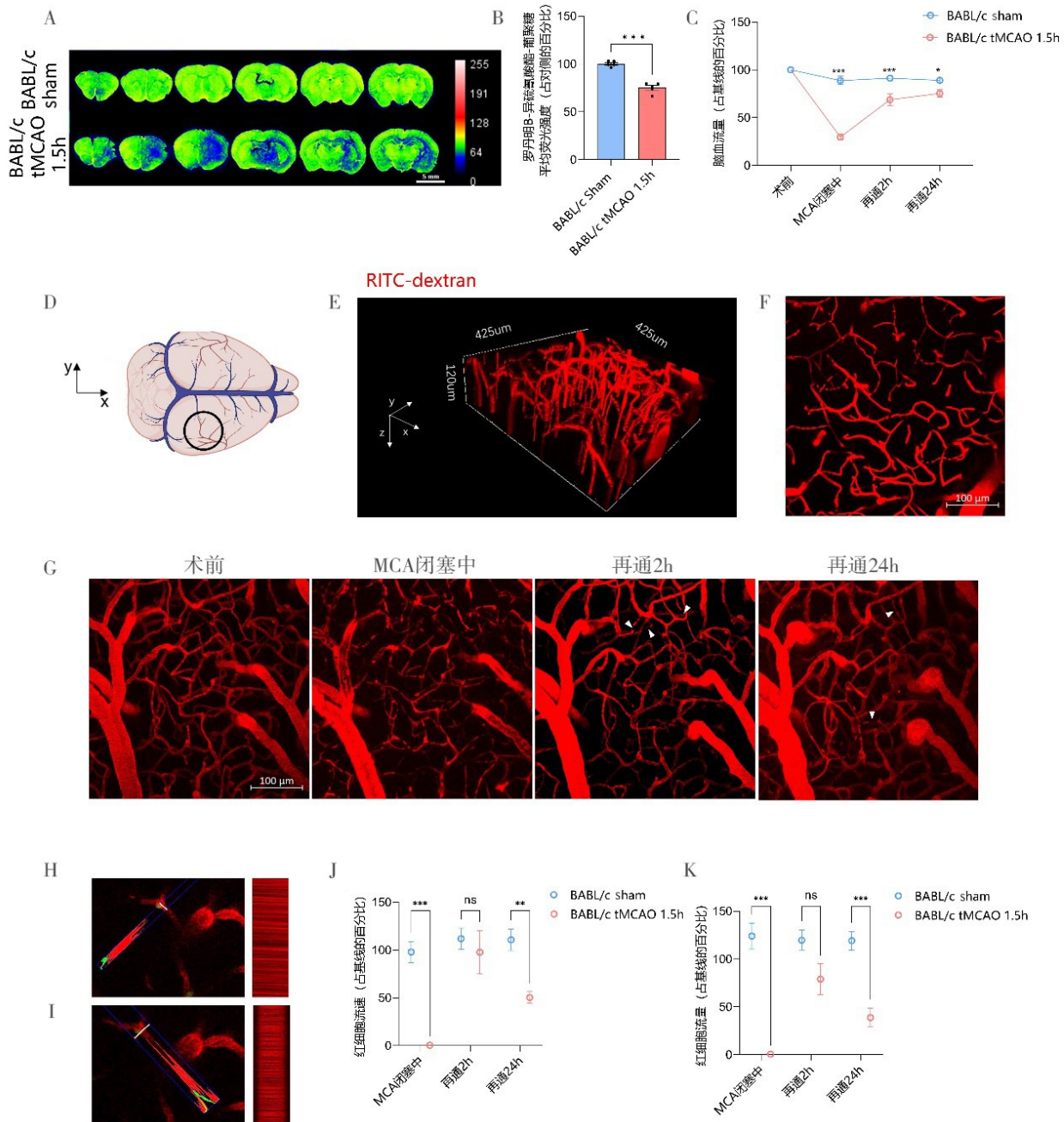


Fig.4 Decreased cerebral blood flow due to transient middle cerebral artery occlusion in BALB/c mice for 1.5 h

图4 BALB/c 小鼠短暂性大脑中动脉闭塞1.5 h导致脑血流量下降 A, 活体灌注罗丹明B异硫氰酸酯-葡聚糖后全脑切片示意图(伪彩), 切片时间点为再通24 h。B, 定量A图中假手术组及tMCAO 1.5 h组再灌24 h的切片罗丹明B异硫氰酸酯-葡聚糖的平均荧光强度, 计算为梗死/对侧平均荧光强度比值, 显示全脑灌注情况。每组数量 $n=5$, 数据用平均值 $\pm$ 标准差表示, *** $P<0.001$, 双侧 t 检验。C, 激光散斑血流监测定量BALB/c小鼠假手术组和tMCAO 1.5 h组感兴趣区(图1A中的方框所示大脑中动脉流域)多时间点的脑血流量灌注值, 计算为与基线的比值。每组数量 $n=5$, 数据用平均值 $\pm$ 标准差表示。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 两因素重复测量方差分析。D, 双光子图方位的示意图显示颅骨窗的位置。E, 双光子拍摄血管的Z-堆3D重建图($425\mu\text{m} \times 425\mu\text{m} \times 120\mu\text{m}$), 血流用静脉注射的罗丹明B异硫氰酸酯-葡聚糖标记(红色)。F, E图中Z-堆血管图的Z轴最大密度投影(比例尺 $100\mu\text{m}$)。G, 缺血前基线、大脑中动脉闭塞术中、大脑中动脉再通2 h和大脑中动脉再通24 h血管图的Z轴最大密度投影, 白色小箭头示意阻塞部位(比例尺 $100\mu\text{m}$)。H、I, 双光子线性扫描代表图。(H为沿着毛细血管长轴扫描, I为垂直于毛细血管长轴扫描)。J、K, 定量大脑中动脉闭塞术中、大脑中动脉再通2 h和大脑中动脉再通24 h红细胞流速(J)和流量(K)与缺血前基线的比值(占基线水平的百分比)。每组数量 $n=5$, 数据用平均值 $\pm$ 标准差表示。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 两因素重复测量方差分析。

的差异有统计学意义($P<0.001$,图3C)。在再通后24 h时,两组间差异仍有统计学意义($P=0.026$,图4C)。

2.2.3 双光子显微镜获得的毛细血管Z-堆视频和红细胞流速流量 双光子成像位置及方位见图4D~F,颅骨窗位置位于右侧感觉运动皮质区,成像范围 $425\ \mu\text{m} \times 425\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$ 。双光子成像显示再通2 h后,仍有部分毛细血管血流阻滞(图4G小白箭头);红细胞流速数据采用两因素重复测量方差分析,发现组间($F=28.221$, $P<0.001$)、时间($F=10.685$,校正 $P<0.001$)、时间与组间($F=5.973$,校正 $P=0.010$)存在交互效应,故进行成对比较。红细胞流量数据采用两因素重复测量方差分析,发现组间($F=79.743$, $P<0.001$)、时间($F=5.501$,校正 $P=0.010$)、时间与组间($F=6.883$,校正 $P=0.040$)存在交互效应,故进行成对比较。分析发现 BALB/c tMCAO

1.5 h组红细胞流速恢复到基线水平的97.7%,而 BALB/c sham组为基线水平的111.9%,两组无统计学差异(图4J, $P>0.999$)。tMCAO 1.5 h组红细胞流量恢复到基线水平的79.0%,BALB/c sham组为基线水平的119.6%,两组无统计学差异(图4K, $P=0.050$)。当再通后24 h时,仍有部分毛细血管血流阻滞(图4G小白箭头),tMCAO 1.5 h组红细胞流速降至基线水平的50.3%,BALB/c sham组为基线水平的110.7%,两组间差异有统计学意义(图4J, $P=0.010$)。而tMCAO 1.5 h组红细胞流量降至基线水平的38.9%,BALB/c sham为基线水平的119.2%,两组间差异有统计学意义(图4K, $P<0.001$)。

2.2.4 高放大倍数的免疫荧光染色切片灌注评估 更高放大倍率的切片免疫荧光染色显示,毛细血管大量阻塞(图5C)。50 μm 厚的共聚焦显微镜成像Z-堆图($212.45\ \mu\text{m} \times 212.45\ \mu\text{m}$)显示,每个图像区

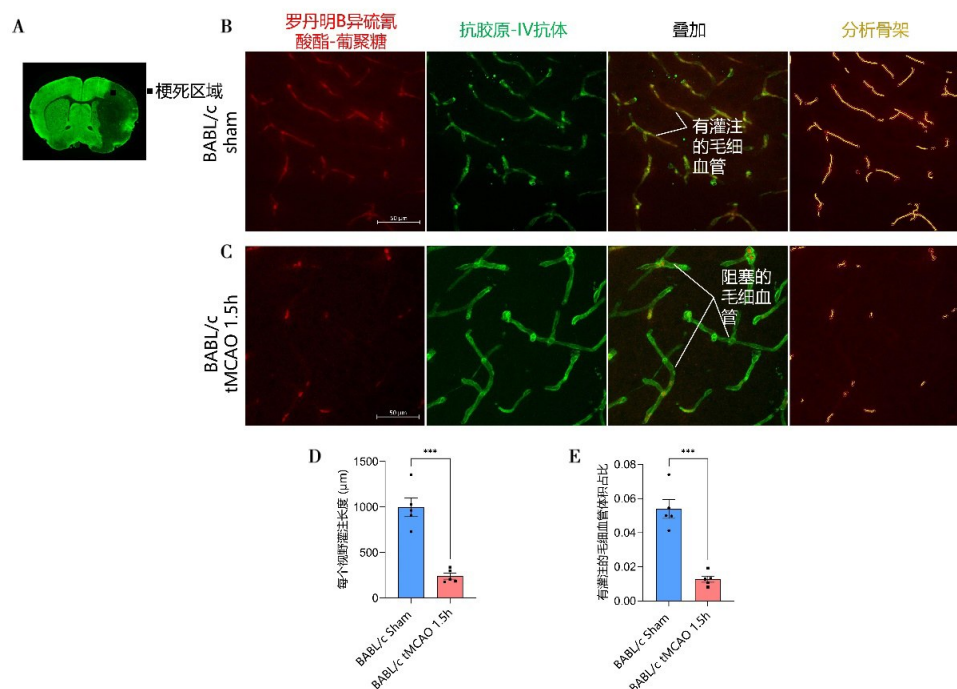


Fig.5 Transient middle cerebral artery occlusion in BALB/c mice for 1.5 h results in no cerebral microvascular re-flow

图5 BALB/c小鼠短暂性大脑中动脉闭塞1.5 h导致脑微血管无复流 A, MAP₂染色显示梗死区域(MAP₂阴性区域),示意共聚焦成像所选感兴趣区位置。B、C, A中位置梗死区毛细血管代表图。B为假手术组,C为tMCAO 1.5 h组,切片时间点为再通24 h。图示分别为罗丹明B异硫氰酸酯-葡聚糖(红色)标记的有灌注的血管、抗胶原-IV抗体(绿色)标记所有的血管、罗丹明B异硫氰酸酯-葡聚糖和抗胶原-IV抗体的叠加,以及有灌注的血管的分析骨架(黄色)。比例尺50 μm 。D、E,假手术组、tMCAO 1.5 h组再通24 h的切片总的有灌注的毛细血管长度(D)和有灌注毛细血管体积占比(E)的比较。切片为共聚焦拍摄的50 μm 厚的Z-堆。每组小鼠数 $n=5$,假手术组Z-堆图数量为19,tMCAO 1.5 h组Z-堆图数量为27。数据用平均值 $\pm$ 标准差表示,*** $P<0.01$,双侧 t 检验。

域内 BALB/c tMCAO 1.5 h 组总的有灌注的毛细血管长度减少了约 76% (BALB/c sham 组 $997 \mu\text{m} \pm 103 \mu\text{m}$, BALB/c tMCAO 1.5 h 组 $241 \mu\text{m} \pm 33 \mu\text{m}$, $t=7.016$, $P<0.001$), 有灌注的毛细血管占据的总体积分数也减少了约 76% (BALB/c sham 组 0.0539 ± 0.0055 , BALB/c tMCAO 1.5 h 组 0.0128 ± 0.0018 , $t=7.122$, $P<0.001$, 图 5D 和 E)。

2.2.5 梗死面积和行为学评估 用微管蛋白 2 染色来评估缺血再通 24 h 后的梗死面积, 结果显示 BALB/c tMCAO 1.5 h 组再通 24 h 时梗死面积占全脑面积约 36% (图 6A、B), 用 mNSS 评分评估血再通 24 h 后的行为学评分, 结果显示 BALB/c tMCAO 1.5 h 组再通 24 h 时表现为中度行为学缺损, 评分平均为 9 分 (图 6C)。

3 讨论

本研究发现 BALB/c tMCAO 1.5 h 与既往研究中常用的 C57BL/6 tMCAO 1 h 相比更适合用于无复流模型的建立, 它所造成的脑灌注量下降更为明

显, 无论皮质还是全脑灌注量均明显下降。结合切片全脑灌注评估、激光散斑血流监测活体评估皮质脑血流量、双光子活体成像评估大脑中动脉流域皮质表面毛细血管血流, 以及高倍率切片成像评估毛细血管灌注对 BALB/c 小鼠短暂性大脑中动脉闭塞 1.5 h 导致的脑灌注下降以及毛细血管无复流进行多维度评估。本研究的数据提供了建立和评估脑无复流模型的合适条件, 为后续脑无复流的动物研究提供了参考。

既往研究中, 短暂性远端或近端大脑中动脉闭塞用于建立脑无复流模型。在短暂性远端大脑中动脉闭塞中, 用血栓阻塞大脑中动脉远端主干或外力阻断大脑中动脉^[8, 15], 然后静脉注射阿替普酶溶栓^[7]或松解外力实现再通。在短暂性近端大脑中动脉闭塞中, 用线栓阻塞大脑中动脉。近年, 急性缺血性卒中机械取栓术后出现无复流一直是热点话题, 而近端大脑中动脉闭塞更接近临床情况。因此, 我们选择了血管内线栓阻塞大脑中动脉来建立脑无复流模型。至于缺血时间, 既往研究中从 30 min 到 2 h 不等, 所用实验动物品种也多样, 包括 C57BL/6、BALB/c、CB-17、SV129 和瑞士白化病小鼠等^[6-7, 16-18]。在血管内线栓阻塞大脑中动脉模型中, 缺血少于 1 h 会导致梗死体积不稳定^[19]。同时, 无复流与较长的缺血时间有关^[20], 但较长的缺血时间会导致高死亡率。不同品系小鼠对缺血的敏感性也不同^[21-24]。既往研究最常用 C57BL/6 小鼠缺血 1 h^[6, 8, 10], 因此我们首先尝试了此条件。然而, 我们发现再通 24 h 时, 激光散斑血流监测显示 C57BL/6 sham 组和 C57BL/6 tMCAO 1 h 组之间大脑中动脉流域皮质脑血流量无显著差异 (图 1 和表 1)。

双光子成像进一步评估显示大脑中动脉阻塞期间, C57BL/6 小鼠大脑中动脉远端主干血流反向, 大脑中动脉区域内大多数毛细血管中仍有血液流动。上述结果表明, C57BL/6 不是评估脑无复流的理想品系。考虑到侧支循环差可能与无复流有关, 临床患者大多侧支代偿较差, 并且与 C57BL/6 相比, BALB/c 小鼠侧支代偿较差^[25], 可能更贴合临

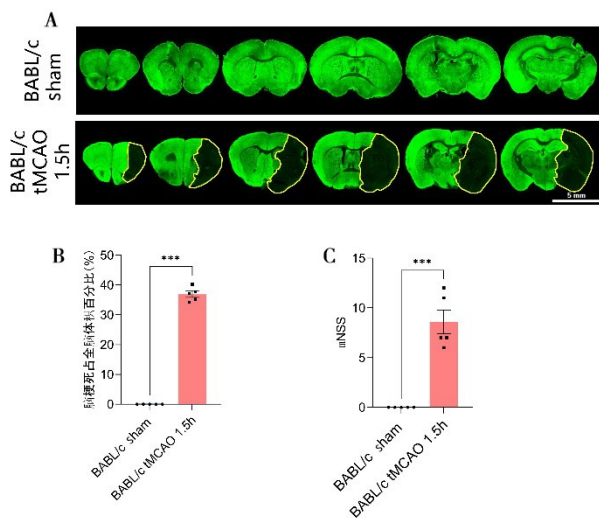


Fig.6 Transient middle cerebral artery occlusion in BALB/c mice for 1.5 h results in cerebral infarction and behavioural deficits

图 6 BALB/c 小鼠短暂性大脑中动脉闭塞 1.5 h 导致脑梗死及行为学缺损 A, MAP₂ 染色显示假手术组、tMCAO 1.5 h 组梗死区域的代表图 (MAP₂ 阴性区域, 黄线勾画)。B, 柱状图显示假手术组、tMCAO 1.5 h 组再通 24 h 时的梗死面积占比。每组数量 $n=5$, 数据用均值 $\pm$ 标准差表示, *** $P<0.001$, 双侧 t 检验。C, 柱状图显示假手术组、tMCAO 1.5 h 组再通 24 h 的 mNSS 评分。每组数量 $n=5$, 数据用平均值 $\pm$ 标准差表示, *** $P<0.001$, 双侧 t 检验。

床患者情况,因而我们转向 BALB/c 小鼠。双光子成像显示 BALB/c 小鼠大脑中动脉阻塞期间,大脑中动脉远端主干流动几乎停滞,同时大脑中动脉区域内大多数毛细血管也是阻滞状态,再通 2 h 和 24 h 时仍有部分毛细血管阻滞(图 2C、D)。所以 BALB/c 小鼠可能是更合适的选择。

关于缺血时间,2 h 缺血意味着极高的死亡率,因此我们将缺血 1 h 和 1.5 h 组与 BALB/c sham 组进行比较。结果显示,再通后 2 h 缺血 1 h 和 1.5 h 组均导致大脑中动脉流域皮质脑血流量降低。然而,到再通后 24 h 时,虽然 BALB/c tMCAO 1 h 组脑血流量较 BALB/c sham 组下降,但差异无统计学意义。而 BALB/c tMCAO 1.5 h 组的脑血流量与 BALB/c sham 组相比两组间的差异有统计学意义(图 2B)。同时与前期常用的 C57BL/6 tMCAO 1 h 相比, BALB/c tMCAO 1.5 h 在再通 24 h 时,皮质脑血流量下降 20.2%(表 1)。因此, BALB/c 小鼠大脑中动脉闭塞持续 1.5 h 可能更适用于评价脑无复流现象。这与前期研究一致,该研究表明,当近端大脑中动脉闭塞时间超过 1h,血管再通后存在毛细血管的持续阻塞^[17, 26]。

无复流的评估包括激光散斑血流监测、激光多普勒、相位分辨光学相干断层扫描、双光子活体成像评估毛细血管停滞和流动状态、低倍全脑切片量化组织灌注、高放大倍数的图像评估毛细血管阻滞和荧光图像量化红细胞阻塞^[7-8, 15-16, 27]。激光多普勒只能评估一个较小区域,激光散斑血流监测可以监测整个表面血流量,并计算感兴趣区的血流量。然而,检测范围仅限于表面,无法到达深层组织。相位分辨光学相干断层扫描可以测量深度为几百微米的皮质表面红细胞流速,双光子激光扫描显微镜的 Z-stacks + 时间序列可以获取 3D 血管网络图和血流视频。此外,线性扫描还可以获得所选血管的红细胞流速和流量。相位分辨光学相干断层扫描和双光子激光扫描显微镜的缺点是测量范围限制在小区域内。灌注后切片的低倍视图可以评估全脑灌注。我们使用同侧/对侧罗丹明 B 异硫氰酸

酯-葡聚糖平均荧光强度比值来评估梗死侧灌注减少的情况,类似于临床使用计算机断层扫描灌注或磁共振灌注的评估。切片的缺点在于它不是活体的评估。高放大倍数的图像可以观察到单根毛细血管阻滞,以及可以用荧光图像量化红细胞阻塞,反应微观情况下毛细血管的灌注情况。

我们结合激光散斑血流监测、灌注后切片的低倍视图、双光子显微镜获得的毛细血管 Z-堆视图和红细胞流速流量,以及高放大倍数切片免疫荧光染色图像来评估短暂性大脑中动脉缺血再通后脑灌注的变化。活体评估了表面皮质大脑中动脉流域脑灌注量及毛细血管血流情况,同时用脑切片评估了全脑灌注情况和微观毛细血管的阻塞,从多维度较全面地评估了 BALB/c 小鼠大脑中动脉缺血 1.5 h 后再通所致的毛细血管无复流和脑灌注下降,以支持此模型的可行性,并为脑无复流的动物研究评估提供了参考。

当然,我们研究也有一定局限性,只比较了常用的 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠,可能有其他更适合的小鼠品系或转基因鼠,将来可增加品系或设计转基因鼠进一步研究;另外 BALB/c 小鼠短暂性缺血 1.5 h 死亡率较高,使得实验成本稍有增加。

总的来说, BALB/c 小鼠与 C57BL/6 小鼠相比更适合用于无复流模型的建立。另外,在 BALB/c 小鼠中,与缺血 1 h 相比,短暂性缺血 1.5 h 所导致的脑灌注量下降更为明显,无论皮质还是全脑灌注量均有明显下降,更适合用于无复流模型的建立。我们建立和多维度评估脑无复流模型的合适方法,为后续脑无复流的动物研究提供了支持。

参 考 文 献

- [1] The Lancet. 21st century management and prevention of stroke[J]. Lancet, 2018, 392(10154): 1167-1167.
- [2] 邢莹, 朱良付, 李天晓, 等. 颅内大血管急性闭塞血栓病理学特征与病因相关性[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2022, 48(7): 385-391.
- [3] GOYAL M, MENON B K, VAN ZWAM W H, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-

- analysis of individual patient data from five randomised trials[J]. *Lancet*, 2016, 387(10029): 1723–1731.
- [4] KHATRI P, NEFF J, BRODERICK J P, et al. Revascularization end points in stroke interventional trials: recanalization versus reperfusion in IMS-I[J]. *Stroke*, 2005, 36(11): 2400–2403.
- [5] LINFANTE I, CIPOLLA M J. Improving Reperfusion Therapies in the Era of Mechanical Thrombectomy[J]. *Trans Stroke Res*, 2016, 7(4): 294–302.
- [6] GUO R B, DONG Y F, YIN Z, et al. Iptakalim improves cerebral microcirculation in mice after ischemic stroke by inhibiting pericyte contraction[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(6): 1349–1359.
- [7] EL AMKI M, GLÜCK C, BINDER N, et al. Neutrophils Obstructing Brain Capillaries Are a Major Cause of No-Reflow in Ischemic Stroke[J]. *Cell Rep*, 2020, 33(2): 108260.
- [8] ERDENER Ş E, TANG J, KILIÇ K, et al. Dynamic capillary stalls in reperfused ischemic penumbra contribute to injury: A hyperacute role for neutrophils in persistent traffic jams[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(2): 236–252.
- [9] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91.
- [10] ZHANG S, LIAO X J, WANG J, et al. Temporal alterations in pericytes at the acute phase of ischemia/reperfusion in the mouse brain[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(10): 2247–2252.
- [11] GRUTZENDLER J, NEDERGAARD M. Cellular Control of Brain Capillary Blood Flow: *In Vivo* Imaging Veritas [J]. *Trends Neurosciences*, 2019, 42(8): 528–536.
- [12] LI Y, CHOPP M, CHEN J, et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(9): 1311–1319.
- [13] CHEN J, SANBERG P R, LI Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(11): 2682–2688.
- [14] 刘可嘉, 王浩月, 李弘杰, 等. 大鼠皮层梗死后同侧丘脑胶质细胞活化和炎性介质动态变化 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2018, 44(9): 520–524.
- [15] KASAHARA Y, IHARA M, NAKAGOMI T, et al. A highly reproducible model of cerebral ischemia/reperfusion with extended survival in CB-17 mice[J]. *Neurosci Res*, 2013, 76(3): 163–168.
- [16] YEMISCI M, GURSOY-OZDEMIR Y, VURAL A, et al. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery[J]. *Nat Med*, 2009, 15(9): 1031–1037.
- [17] LEE J, GURSOY-OZDEMIR Y, FU B, et al. Optical coherence tomography imaging of capillary reperfusion after ischemic stroke[J]. *Appl Opt*, 2016, 55(33): 9526–9531.
- [18] TACHIBANA M, AGO T, WAKISAKA Y, et al. Early Reperfusion After Brain Ischemia Has Beneficial Effects Beyond Rescuing Neurons[J]. *Stroke*, 2017, 48(8): 2222–2230.
- [19] BELAYEV L, BUSTO R, ZHAO W, et al. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation[J]. *Brain Res*, 1999, 833(2): 181–190.
- [20] NG F C, CHURILLOV L, YASSI N, et al. Prevalence and Significance of Impaired Microvascular Tissue Reperfusion Despite Macrovascular Angiographic Reperfusion (No-Reflow)[J]. *Neurology*, 2022, 98(8): e790–e801.
- [21] BARONE F C, KNUDSEN D J, NELSON A H, et al. Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1993, 13(4): 683–692.
- [22] FUJII M, HARA H, MENG W, et al. Strain-related differences in susceptibility to transient forebrain ischemia in SV-129 and C57black/6 mice[J]. *Stroke*, 1997, 28(9): 1805–1810; discussion 1811.
- [23] MAEDA K, HATA R, HOSSMANN K A. Differences in the cerebrovascular anatomy of C57black/6 and SV129 mice[J]. *Neuroreport*, 1998, 9(7): 1317–1319.
- [24] MAJID A, HE Y Y, GIDDAY J M, et al. Differences in vulnerability to permanent focal cerebral ischemia among 3 common mouse strains[J]. *Stroke*, 2000, 31(11): 2707–2714.
- [25] ZHANG H, FABER J E. Transient versus Permanent MCA Occlusion in Mice Genetically Modified to Have Good versus Poor Collaterals[J]. *Med One*, 2019, 4: e190024.
- [26] DZIENNIS S, QIN J, SHI L, et al. Macro-to-micro cortical vascular imaging underlies regional differences in ischemic brain[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10051.
- [27] FREITAS F, ATTWELL D. Pericyte-mediated constriction of renal capillaries evokes no-reflow and kidney injury following ischaemia[J]. *Elife*, 2022, 11: e74211.

(收稿日期:2023-08-06 录用日期:2024-01-27)

(责任编辑:甘章平)