

引文格式:

徐帆, 邓霞, 许文, 等. 大脑中动脉光化学栓塞模型的改良及免疫表型分析 [J]. 集成技术, 2023, 12(2): 10-19.

Xu F, Deng X, Xu W, et al. The optimization of photothrombotic cerebral artery occlusion model and the poststroke immune phenotypic analysis [J]. Journal of Integration Technology, 2023, 12(2): 10-19.

大脑中动脉光化学栓塞模型的改良及免疫表型分析

徐帆^{1,2} 邓霞¹ 许文¹ 余泓达³ 高亮^{1*}

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

²(中国科学院大学 北京 100049)

³(中山大学附属第三医院神经科 广州 510630)

摘要 光照缺血模型是常用的脑卒中永久性缺血模型, 其原理是: 光敏染料在光照射下被激活并产生活性氧自由基, 生成的活性氧自由基会引起血管内皮损伤, 导致血小板的黏附和聚集, 并形成血栓。由于光照缺血模型产生的缺血半影带较小, 同临床病理差异较大, 限制了对于缺血半影带的研究, 因此, 该研究基于光化学法构建了一种改良的中动脉近端栓塞模型。具体地, 向小鼠体内注射光敏染料孟加拉红后, 用激光照射中动脉近端 3 min, 以诱导血管栓塞, 并通过氯化三苯基四氮唑染色、免疫荧光以及流式细胞术对模型进行评估。氯化三苯基四氮唑染色和免疫荧光结果显示, 与传统的光照缺血模型相比, 该模型能在纹状区和皮质区产生较大且稳定的梗死区域 (9%~15%), 且能通过流式细胞术分离出梗死组织中的驻留小胶质细胞、浸润髓系细胞和淋巴细胞。上述实验结果表明, 改良的中动脉近端光化学栓塞模型能够应用于缺血性脑卒中损伤后病理和免疫反应机制的研究。

关键词 缺血性脑卒中; 脑缺血模型; 大脑中动脉阻塞; 光照缺血; TTC 染色

中图分类号 R 74 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20220606001

The Optimization of Photothrombotic Cerebral Artery Occlusion Model and the Poststroke Immune Phenotypic Analysis

XU Fan^{1,2} DENG Xia¹ XU Wen¹ SHE Hongda³ GAO Liang^{1*}

¹(Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

³(Department of Neurology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

*Corresponding Author: liang.gao@siat.ac.cn

Abstract Photothrombotic ischemia is a common experimental ischemic stroke model. In response to light

收稿日期: 2022-06-06 修回日期: 2022-11-01

基金项目: 深圳市科技计划项目 (GJHZ20200731095205016)

作者简介: 徐帆, 硕士研究生, 研究方向为神经免疫; 邓霞, 研究实习员一级, 研究方向为神经免疫; 许文, 博士, 研究方向为神经免疫; 余泓达, 博士研究生, 研究方向为神经免疫; 高亮 (通讯作者), 硕士研究生导师, 研究方向为神经免疫, E-mail: liang.gao@siat.ac.cn.

stimulation, activated photosensitive dyes produce reactive oxygen species, which in turn induces damage to the vascular endothelial cells, causing platelet adhesion, aggregation and thrombosis. Since the conventional photothrombotic ischemia model produces only a tiny ischemic penumbra which can't properly represent the clinical pathology, a modified proximal middle cerebral artery occlusion model was established in this study. The mouse proximal middle artery was irradiated by laser for 3 minutes to induce thrombosis following injection with the light-sensitive dye Rose Bengal and subsequently evaluated by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining, immunofluorescence, and flow cytometry. The results showed that this model produced a stable infarct area of 9% to 15% in the striatal and cortical regions, which is larger than the conventional photothrombotic ischemia. Resident microglia, infiltrating myeloid cells, and lymphocytes in the infarcted tissue were identified by flow cytometry. It is suggested that the modified proximal middle artery occlusion model can be applied to study the pathological and immune mechanisms after ischemic stroke injury.

Keywords ischemic stroke; ischemia model; middle cerebral artery occlusion; photothrombotic ischemia; TTC staining

Funding This work is supported by Shenzhen Science and Technology Program (GJHZ20200731095205016)

Ethical Statement The study was approved by the Institutional Review Board of the Animal Care and Use Committees at the Shenzhen Institute of Advanced Technology (SIAT), Chinese Academy of Sciences (CAS) (ID number: SIAT-IACUC-200316-NS-GL-A1111), and written informed consent was obtained from each participant

1 引言

脑卒中是全球最主要的致死致残原因之一, 全球每年约有 650 万人死于脑卒中, 仅中国每年脑卒中新发病例就达 200 万^[1-2]。脑卒中主要包括出血性脑卒中和缺血性脑卒中, 其中, 缺血性脑卒中约占所有脑卒中病例的 71%^[3]。在世界范围内, 1990—2019 年, 缺血性脑卒中病例增加了 87.55%, 死亡病例增加了 60.68%^[4]。为研究缺血性脑卒中的致病机理, 进而开发有效的临床治疗手段, 目前已基于小动物建立了一系列不同的脑缺血模型, 其中最常用的两类模型为大脑中动脉阻塞 (Middle Cerebral Artery occlusion, MCAo) 模型和光照缺血模型 (Photothrombotic ischemia model, PT)。

MCAo 模型通过物理或化学方法栓塞大脑中

动脉, 阻断脑组织血供, 栓塞方法主要包括线栓法^[5]、电凝法^[6]、内皮素-1 法^[7]等。其中, 电凝法是缺血性脑卒中研究常用的永久梗死模型造模方法, 通过移除小鼠 MCA 上方颅骨并利用电极电凝暴露出 MCA 远端部位, 从而将缺血部位限制在受中动脉远端分支供血的脑区。因此, 该方法所构建的脑缺血模型也称作大脑中动脉远端阻塞模型 (distal Middle Cerebral Artery occlusion, dMCAo)。然而, 该方法需要对小鼠进行颅骨移除和电凝手术, 手术过程中易造成皮层损伤及颅压改变^[8]。为减少对小鼠的创伤, 后续有一系列研究对 dMCAo 模型进行了改进, 如氯化铁法, 利用颅钻将颅骨磨薄, 然后在 MCA 上方覆盖浸泡过饱和氯化铁溶液的滤纸, 诱导中动脉中血栓的形成^[9]; 还有研究向小鼠体内注射一种磁性纳米颗粒, 同时在 MCA 上方施加磁场, 从而吸引

循环中的磁性纳米颗粒定向堵塞 MCA，随后撤去磁场，即可实现靶血管的再灌注^[10]。

PT 是另一种常见的脑缺血模型^[11]，首先，向小鼠体内注射光敏染料(如孟加拉红)，在激光或冷光源的照射下，光敏染料能够被激活并产生活性氧自由基(Reactive Oxygen Species, ROS)，生成的 ROS 会导致血管内皮细胞细胞膜的过氧化，引起血管内皮损伤^[12]，然后激活血小板，并导致血小板的黏附和聚集，因此，该模型可在光照射位点形成血栓，从而实现特定区域的脑缺血^[13]。PT 操作简单，可重复性高，可根据研究需求控制梗死发生的部位，造成的创面较小，能够显著提高小鼠的术后存活率。然而，由于模型限制，PT 诱导的脑梗死体积较小，缺血半影带区域极其微小，同时由于光斑的透射深度有限，该模型仅能对浅层血管进行堵塞，适用于皮层梗死及梗死后炎症反应的研究^[14]。有研究将光化学缺血与 dMCAo 结合，通过直射 MCA 远心端，诱导远端中动脉堵塞，避免了电凝法开颅所导致的较大创伤^[15]。

本研究基于光化学法和中动脉阻塞模型，构建了一种改良的中动脉近端光化学栓塞模型(Photothrombotic proximal Cerebral Artery occlusion model, PT-pMCAo)。该模型具有稳定性高、创伤性小及梗死体积可控等优点，可更好地应用于缺血性脑卒中机制的研究。

2 材料和方法

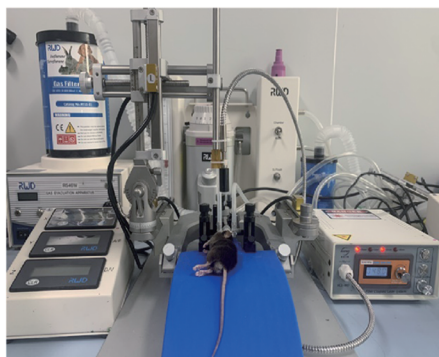
2.1 实验动物

本文动物实验方案经中国科学院深圳先进技术研究院动物伦理委员会审查通过(编号: SIAT-IACUC-200316-NS-GL-A1111)。实验所用小鼠为 12 周龄的 C57BL/6J 雄鼠(均购自浙江维通利华实验动物技术有限公司)。

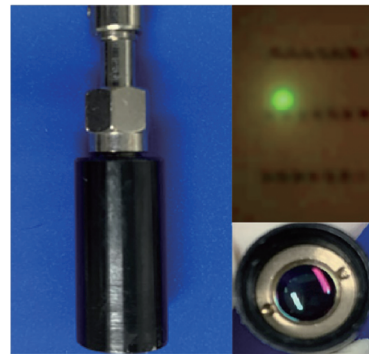
2.2 光化学诱导的小鼠脑卒中模型

2.2.1 激光栓塞诱导装置的搭建及其参数配置

本激光栓塞诱导装置主要由麻醉诱导系统、立体定位仪和激光器(北京宏蓝光电科技有限公司, #VCL-525nmM0-250mW)构成(图 1(a))。



(a) PT-pMCAo 激光装置实物



(b) 准直器及光斑实物图



(c) 激光器及主面板实物图

面板数值	输出功率
44	1 mW
46	12 mW
48	25 mW
50	36 mW

(d) 激光器面板数值及对应输出功率

图 1 激光栓塞诱导装置示意图

Fig. 1 Schematic of laser induced thrombosis device

将气麻机通过橡胶管与鼻杆相连, 固定至立体定位仪上, 并将光纤固定在操作臂上, 使准直器垂直于水平面, 准直器实物图如 1(b) 所示。转动准直器透镜, 将光斑直径调至 0.3 mm, 使 PT-pMCAo 造模时光斑仅汇聚于 MCA。转动激光器主面板上的旋钮, 对激光输出功率进行调节 (图 1(c)), 造模时常用的激光输出功率与主面板数值对应关系, 如图 1(d) 所示。

2.2.2 中动脉近端光化学栓塞模型

利用鼻杆将小鼠侧身固定于立体定位注射仪上, 使其左侧颞部朝上, 使用含有 2% 异氟烷的空气混合气对小鼠进行诱导麻醉。为小鼠涂抹眼膏并消毒备皮后, 沿小鼠外耳道向外眼角处剪开皮肤, 暴露出颞肌 (图 2(a) 和 2(b))。首先, 用

精细剪剪断颞肌与顶骨连接处粘连的肌肉组织, 并用精细镊对颞肌进行钝性分离, 暴露颞骨。如图 2(d) 所示, 可透过颞骨观察到靠近眼眶后静脉丛的 MCA “Y” 字分支结构, 沿着 MCA 主干向上, 将靠近颞弓处的 MCA 近心端部位作为激光照射位点, 并用记号笔在颞骨上进行标记, 激光照射位点下方所对应的 MCA 部位如图 2(e) 和 2(f) 所示。其次, 打开激光器, 将光斑对准标记的血管照射位点, 并调节光斑直径为 0.3 mm。再次, 通过尾静脉向小鼠体内注射孟加拉红溶液 (50 mg/kg), 注射完毕后等待 5 min, 待孟加拉红充分循环至全身, 打开激光器, 调节激光输出功率为 25 mW (如图 1(d) 所示, 将激光器面板对应数值调节为 48), 照射 MCA 近心端 3 min,

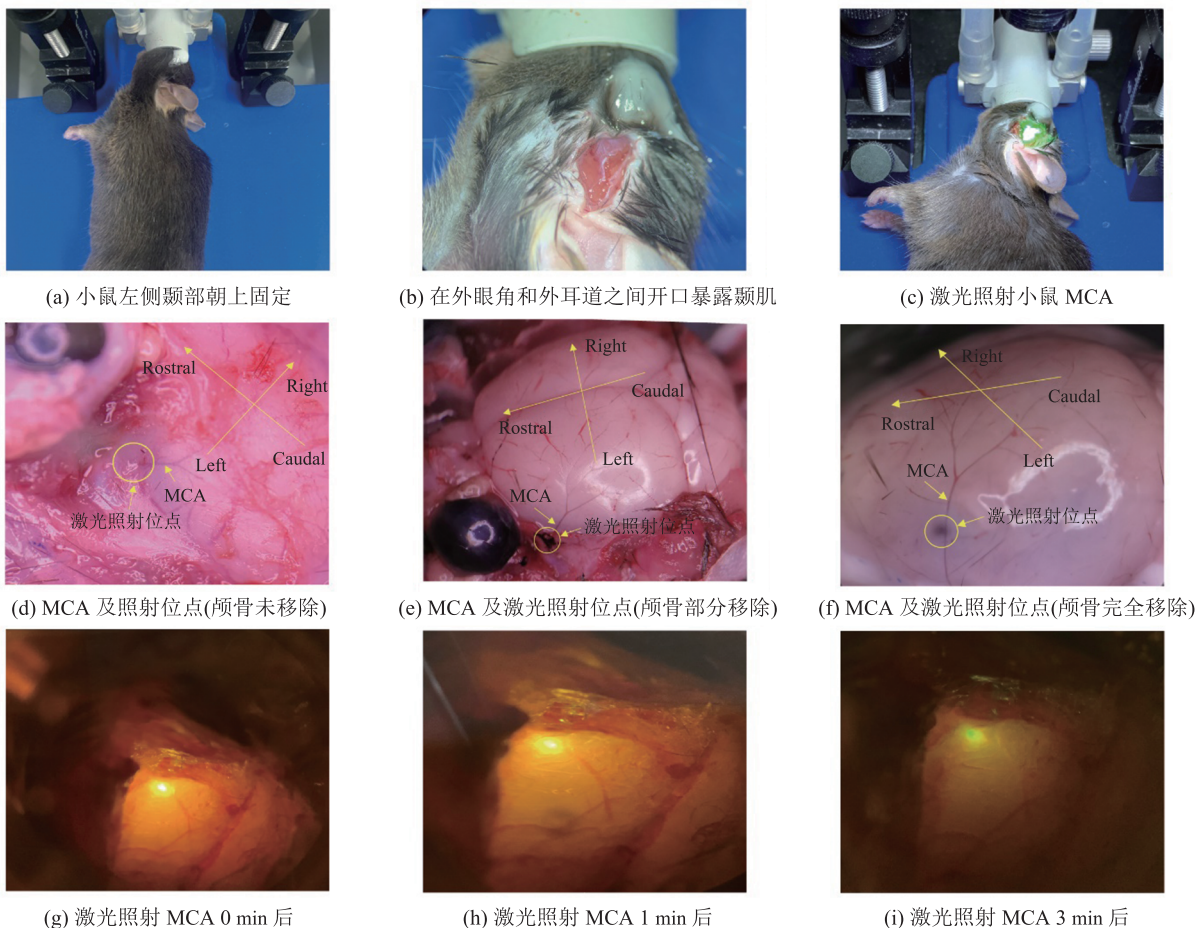


图 2 中动脉近端光化学栓塞模型造模示意图

Fig. 2 Schematic of PT-pMCAo model

待小鼠 MCA 完全堵塞后停止照射, 此时小鼠 MCA 因缺乏血供, 由红色变为无色(图 2(c)、2(g)~2(i))。最后, 将林可霉素利多卡因凝胶涂抹在小鼠伤口处消毒镇痛, 缝合后放在恒温加热垫上等待小鼠苏醒。

2.2.3 光照缺血模型

利用耳杆和鼻杆将小鼠固定于立体定位注射仪上, 保证小鼠两耳连线呈水平状态。随后沿中线将小鼠头皮剪开, 并用干棉签剥离骨膜, 暴露出颅骨, 以前囟为原点, 原点右侧 2 mm 的位置作为激光照射位点(ML: 2, AP: 0)。准备完毕后, 使用胰岛素注射器将孟加拉红溶液通过尾静脉注射至小鼠体内, 注射量为 50 mg/kg。注射完毕 5 min 后, 待孟加拉红溶液随血液充分扩散至脑部, 然后打开激光光源, 调节输出功率为 12 mW (将激光器面板数值调节为 46), 激光照射 2 min 后, 对小鼠皮肤切口消毒并缝合, 将其置于恒温加热垫上等待苏醒。

2.3 氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride, TTC)染色

小鼠灌流后, 首先, 将鼠脑置入提前预冷的脑模具中进行切片, 切片厚度为 2 mm; 然后, 将切片置入提前预热的 0.5% TTC 溶液中, 于 37 °C 孵箱中孵育 10 min; 最后, 将脑片反转至另一面, 继续孵育 5 min。染色完成后, 观察切片可知, 梗死部位呈现苍白色, 而非鲜红色。将染色后的脑片置入 4% 多聚甲醛中固定 6 h, 并按顺序排列在透明塑料板上, 对脑片正反面进行扫描, 利用 ImageJ 计算出正反面脑梗死体积和脑体积。相对梗死体积 = (正面梗死体积/脑体积 + 反面梗死体积/脑体积) / 2 × 100%。

2.4 脑组织包埋及石蜡切片制备

将鼠脑用 4% 多聚甲醛固定后, 使用不同浓度的乙醇进行梯度脱水, 脱水步骤为: 30% 乙醇 30 min—50% 乙醇 30 min—70% 乙醇 30 min—85% 乙醇 30 min—95% 乙醇 30 min—

95% 乙醇 45 min—无水乙醇 30 min—无水乙醇 1 h—无水乙醇 1 h。待充分脱水后, 用二甲苯对脑组织进行透明化处理, 并置入预热的石蜡溶液中(Leica, #39601006)浸泡 1 h, 接着放入新的石蜡溶液中继续浸泡 4 h。将充分浸蜡的脑组织包埋并进行石蜡切片(脑片厚度为 5 μm), 然后将脑片放入二甲苯溶液中浸泡 10 min 进行脱蜡处理, 重复两次。上述操作完成后, 使用不同浓度的乙醇对脑片进行梯度复水, 复水步骤为: 无水乙醇 10 min—无水乙醇 10 min—95% 乙醇 5 min—90% 乙醇 5 min—85% 乙醇 5 min—70% 乙醇 5 min—70% 乙醇 5 min—双蒸水 5 min。

2.5 免疫荧光染色

将复水后的脑片浸入预热至 98 °C 的柠檬酸钠溶液中, 恒温 20 min, 待抗原修复完成后冷却至室温, 用 PBS 洗去残余的抗原修复液, 随后进行免疫荧光染色。脑片在封闭/通透液中孵育 1 h 后, 用疏水笔在脑组织周围画上疏水圈, 随后在脑片上加入一抗, 于 4 °C 进行过夜染色后, 使用 PBS 洗去未结合的一抗, 然后加入对应的荧光二抗, 室温孵育 1 h。染色完毕后, 使用 PBS 充分润洗脑片, 用无尘纸吸干, 并利用含 DAPI 的封片剂封片后, 使用荧光显微镜观察拍照。其中, 一抗: chicken anti-GFAP, Abcam, #ab134436; rabbit anti-NeuN, Roche, #11284932001。二抗: Goat anti-Chicken-488, Invitrogen, #A-11039; Donkey anti-Rabbit-594, Invitrogen, #A-21207; Fluoroshield™ with DAPI, Sigma, #F6057。

2.6 流式细胞术

将小鼠用 PBS 灌流后, 分离脑梗死组织, 并加入配置好的混合酶液(Collagenase IV, 浓度为 1 mg/mL; Dispase II, 浓度为 1 mg/mL; Dnase I, 浓度为 2 mg/mL), 使用精细剪将脑组织剪碎后, 在 37 °C 的金属浴中消化 30 min。消化完成后, 使用 70 μm 滤膜将样本过滤至

2 mL 离心管中, 加入预冷的 DMEM 培养基 (GIBCO, #C11995500BT) 重悬后, $300\times g$ 离心 10 min。弃掉上清液后加入 450 μL 髓鞘碎片清除液 (Miltenyibiotec, #130-109-398), 并用 DMEM 补足至 2 mL。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 密度梯度离心 10 min, 离心力为 $3\ 000\times g$ 。髓鞘碎片移除后, 将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中, 加入足量的 DMEM 培养基充分稀释, $1\ 000\times g$ 离心 10 min, 弃掉上清液后, 加入 FACS buffer 重悬细胞, 转移至 96 孔板内进行抗体染色。

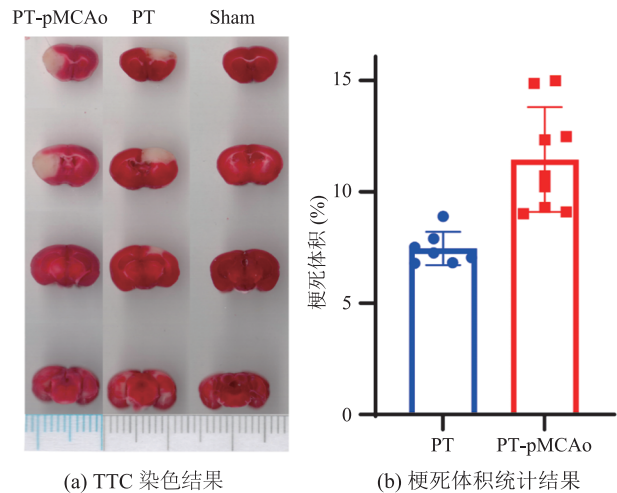
首先, 加入 CD16/32 抗体封闭 10 min, 并按照 1:100 的比例用 FACS buffer 将抗体稀释, 于冰上孵育 15 min。染色完成后, $350\times g$ 离心 5 min, 弃掉上清液, 用 FACS buffer 洗涤细胞, $350\times g$ 离心 5 min。随后将细胞悬液用 $70\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤至流式管中上样。其中, 抗体: PE anti-P2RY12, Biolegend, #48004; PE-cy7 anti-CXCR4, Thermofisher, #25-9991-82; APC anti-CD45, Biolegend, #116119; FITC anti-CD3e Thermofisher, #11-0031-82; FITC anti-CD19, Thermofisher, #11-0193-82; anti-mouse CD16/32, Biolegend, #101302; PE-CF594 anti-CD11b, BD, #562287; FITC anti-NK1.1, Thermofisher, #11-5941-82; PerCP-Cy5.5 anti-CD11b, BD, #551163; FTIC anti-Ly6G, BD, #551460。

3 实验结果

3.1 TTC 染色评估 PT-pMCAo 模型

对小鼠分别进行 PT-pMCAo 和 PT 造模 3 d 后, 进行 TTC 染色, 染色结果(图 3)显示, PT-pMCAo 和 PT 小鼠均能产生体积大小较为稳定的梗死组织。其中, PT 模型产生的梗死体积范围为 $6\%\sim 9\%$, PT-pMCAo 模型产生的梗死体积较大, 梗死体积范围为 $9\%\sim 15\%$ 。而假手术组(仅

注射生理盐水, 其他手术过程均相同)则无梗死组织产生, 表明 PT-pMCAo 造模所用的激光光源并不会导致小鼠额外的脑损伤。



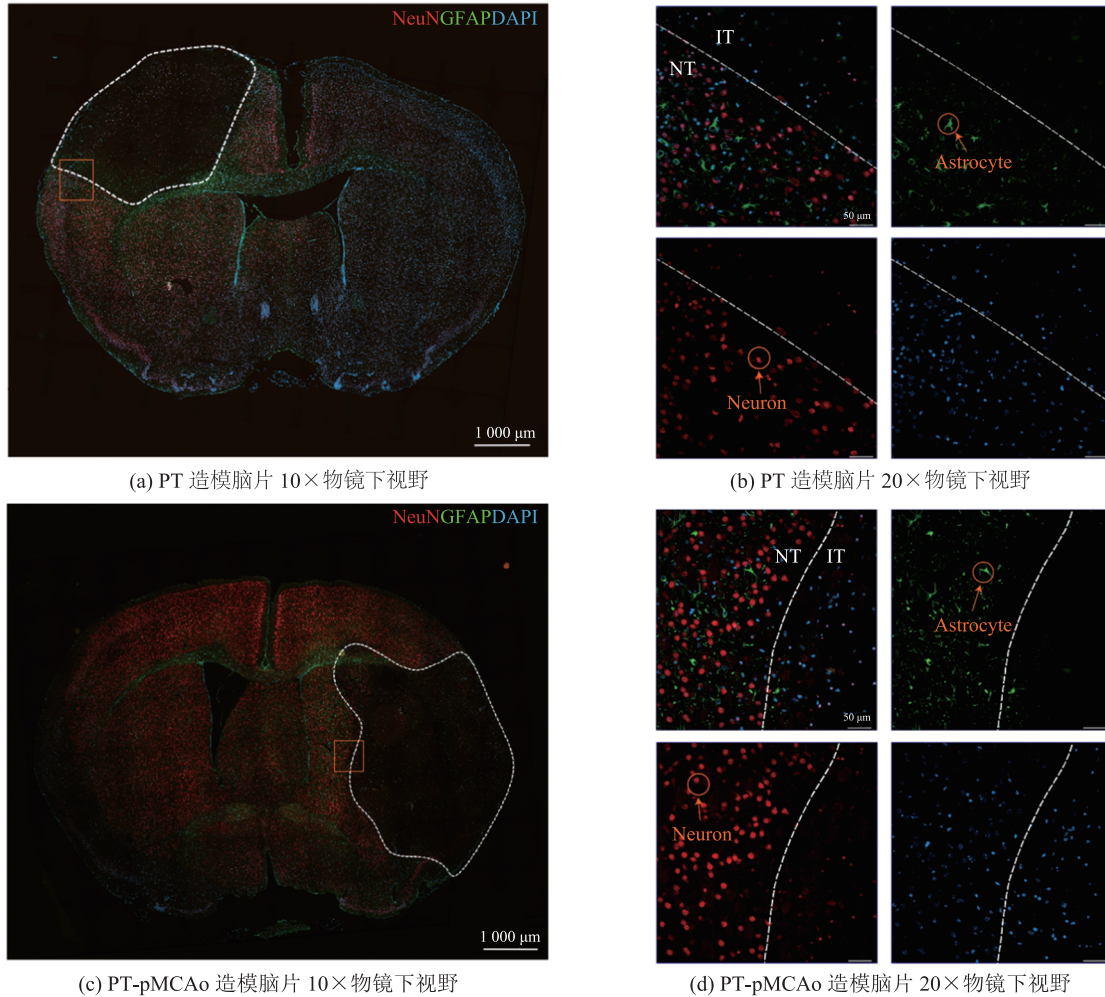
注: PT-pMCAo、PT 手术组和 Sham 组小鼠数量均为 9 只

图 3 TTC 染色及梗死体积统计结果

Fig. 3 TTC staining and statistical result of infarct volume

3.2 免疫组织化学染色评估 PT-pMCAo 模型

缺血性脑卒中产生的级联损伤会导致缺血核心区内神经元和星形胶质细胞发生凋亡, 随后正常组织中的星形胶质细胞会在梗死组织周围形成胶质瘢痕, 隔绝并限制缺血区域扩大, 促进神经损伤修复^[15]。PT-pMCAo 和 PT 造模 3 d 后, 本研究组对小鼠脑组织进行免疫荧光染色, 分别用 NeuN 和 GFAP 抗体标记神经元和星形胶质细胞, 染色结果如图 4(a) 和 4(c) 所示, 白色虚线框内为梗死组织, 该区域内 NeuN 的荧光信号强度小于正常组织, 表明梗死区域内的神经元大量死亡。在 PT 中, 梗死区仅局限于皮层部位, 并不累及其他区域; 而 PT-pMCAo 模型产生的梗死区则分布于纹状区和部分皮层区, 该现象与 TTC 染色结果相吻合(图 3(a))。此外, 在两个模型所产生的梗死区周围形成了致密的星形胶质细胞瘢痕, 该瘢痕可以作为区分梗死区和正常组织的边界(图 4(b) 和 4(d))。



注：白色虚线框内为梗死区。图(b)为20×物镜下图(a)橙色方框内的放大视野。图(d)为20×物镜下图(c)橙色方框内的放大视野(红色为 NeuN, 神经元特异性标志物；绿色为 GFAP, 星形胶质细胞特异性标志物；蓝色为 DAPI, 标记细胞核；虚线左侧为 NT 区(Normal Tissue), 虚线右侧为 IT 区(Infarct Tissue))

图 4 梗死组织的免疫荧光染色结果

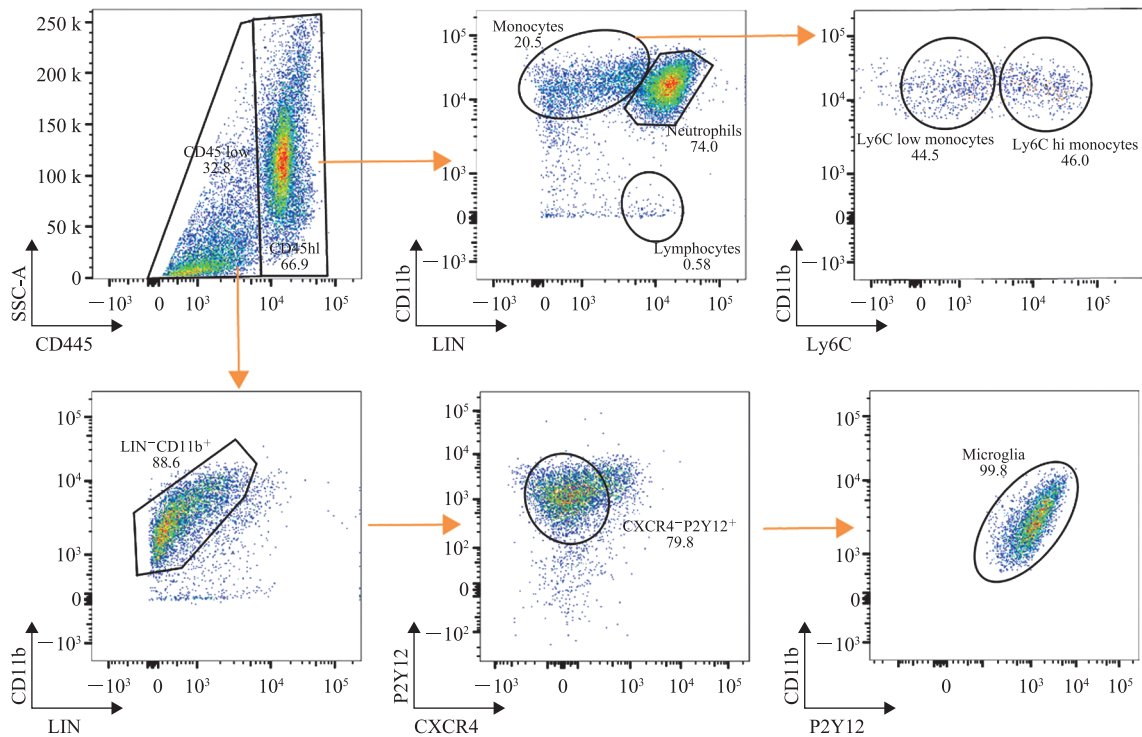
Fig. 4 Immunofluorescence result of infarct tissue

3.3 流式细胞术评估 PT-pMCAo 模型

对小鼠进行 PT-pMCAo 造模 3 d 后, 利用流式细胞术评估脑梗死组织, 结果显示(图 5), 流式细胞术能将梗死组织中的小胶质细胞(CXCR4⁻P2Y12⁺)、中性粒细胞(Ly6G⁺CD11b⁺)、淋巴细胞(LIN⁺CD11b⁻)、促炎型单核细胞(Ly6ChiCD11b⁺)和抗炎型单核细胞(Ly6ClowCD11b⁺)清晰地分离出来。因此, PT-pMCAo 能够作为神经炎症模型, 用于研究缺血性脑卒中后梗死组织中炎症反应和免疫调控机制。

4 讨论与分析

本研究结合 PT 和 MCAo 模型的优点, 建立了一种改良的中动脉近端光化学栓塞模型(PT-pMCAo)。针对传统的 PT 无法产生较大梗死体积和缺血半影带这一限制, 本研究将激光汇聚于 MCA 近端, 仅造成 MCA 的堵塞, 不会影响其他动脉和毛细血管的血供。TTC 和免疫荧光染色结果显示, 与 PT 相比, 该模型产生的梗死体积更大, 且分布于纹状区和部分皮质区(图 3 和图 4)。



注: LIN marker 包括 CD3 (T 细胞)、CD19 (B 细胞)、NK1.1 (NK 细胞)、Ly6G (中性粒细胞); LIN⁺CD11b⁻ 细胞群为淋巴细胞群, 包括 T、B、NK 细胞; LIN⁺CD11b⁺ 为中性粒细胞; CXCR4 为外周浸润细胞特异性 Marker, 小胶质细胞为 P2Y12⁺CXCR4⁻

图 5 梗死组织的流式细胞分析

Fig. 5 Flow cytometry analysis of infarct tissue

由于激光的穿透能力较强, 与传统的 dMCAo 模型相比, 本文模型无须将颅骨移除, 避免了额外的皮层和血管损伤。与其他改良后的 MCA 梗死模型相比, PT-pMCAo 也具有一定优势。如氯化铁诱导的 MCA 栓塞模型^[9], 虽然避免了颅骨移除及电凝造成的颅压改变和血管损伤, 但该模型为了使氯化铁溶液渗透, 使用颅钻将 MCA 上方颅骨打磨变薄, 增加了操作难度和风险, 且无法精确控制血栓在 MCA 中生成。此外, 由于溶液渗透性相比于激光的穿透性较弱, 因此, 该模型形成的梗死面积较 PT-pMCAo 更小。有研究组制备了一种磁性纳米颗粒, 通过磁场控制纳米颗粒聚集在 MCA 中造成缺血, 且能够实现缺血再灌注, 该方法能够较好地模拟临床上由于 MCA 栓塞导致的缺血性脑卒中及再灌注损伤^[10], 但是该模型需要额外制备纳米材料, 造

模成本较高, PT-pMCAo 模型则更为简单方便, 设备搭建简单, 造价低廉, 更适用于短时间大批量造模。

由于 PT-pMCAo 模型堵塞位点靠近 MCA 近心端, 其堵塞部位与线栓法 MCAo 堵塞位点距离较近, 因此, 能够产生与线栓法较为近似的缺血区域。此外, 该手术操作较为简单, 无须对颈外动脉进行结扎, 避免了插栓过程中的血管破裂, 显著提高了术后小鼠的存活率, 且 PT-pMCAo 产生的梗死体积较为稳定。由于小鼠血管的个体差异较大, 线栓法插栓过程中无法直观判断是否完全堵塞中动脉及侧枝循环, 导致梗死体积的变异率较大。当利用转基因小鼠研究脑缺血后分子机制时, 梗死体积的差异会影响表型的判断, PT-pMCAo 则很好地避免了该问题。

然而, PT-pMCAo 模型仍存在一定缺陷, 该

模型为永久缺血模型,不能很好模拟缺血性脑卒中病人因溶栓导致的缺血再灌注损伤。线栓法 MCAo 模型则通过拔栓模拟缺血再灌注这一过程,更贴近临床。有研究建立了 PT-pMCAo 的再灌注模型,当激光诱导 MCA 近心端堵塞后,在相同梗死部位给予紫外照射模拟溶栓的过程,实现 MCA 再通^[16]。根据光化学诱导栓塞的原理,PT-pMCAo 会造成血管内皮损伤和血管源性的水肿,并对血脑屏障产生一定的损伤^[14,17],影响了关于卒中后血管周空间功能和结构的研究。此外,被激活的光敏染料产生了大量 ROS,加重了脑缺血后的氧化应激与炎症反应,导致 PT 与缺血再灌注损伤导致的病理反应有所差别。与 PT 相比,PT-pMCAo 模型的光斑照射面积仅覆盖血管,产生的氧化应激反应较小。本文通过流式细胞术对梗死组织进行分析,结果显示,在梗死组织中可清晰分离出脑中驻留的小胶质细胞、外周浸润的髓系细胞和淋巴细胞,表明该模型适用于缺血性脑卒中后驻留和外周浸润免疫细胞的免疫调控机制研究(图 5)。

5 结 论

本研究构建了一种改良的中动脉近端光化学栓塞模型,该模型具备稳定性高、重复性强、产生的梗死体积大、手术创伤小、操作简单以及小鼠存活率高等优点,可用于缺血性脑卒中后炎症反应和免疫调控机制的研究。

参 考 文 献

- [1] Xing LY, Jing L, Tian YM, et al. Epidemiology of stroke in urban northeast China: a population-based study 2018–2019 [J]. *International Journal of Stroke*, 2020, 16(1): 73-82.
- [2] Wu SM, Wu B, Liu M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management [J]. *The Lancet Neurology*, 2019, 18(4): 394-405.
- [3] Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR, et al. Ischaemic stroke [J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2019, 5(1): 70. <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>.
- [4] Ding QQ, Liu SW, Yao YD, et al. Global, regional, and national burden of ischemic stroke, 1990–2019 [J]. *Neurology*, 2022, 98(3): e279-e290. <https://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000013115>.
- [5] Chiang T, Messing RO, Chou WH. Mouse model of middle cerebral artery occlusion [J/OL]. *Journal of Visualized Experiments*, 2011, (48): e2761. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2761>.
- [6] Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1981, 1(1): 53-60. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.1981.6>.
- [7] Robinson MJ, Macrae IM, Todd M, et al. Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat [J]. *Neuroscience Letters*, 1990, 118(2): 269-272. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304394090906440>.
- [8] Bacigaluppi M, Comi G, Hermann DM. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia [J]. *The Open Neurology Journal*, 2010, 4(2): 34-38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2923341/?report=reader>.
- [9] Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, et al. Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl₃ application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2011, 31(6): 1452-1460. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/>

- jcbfm.2011.8.
- [10] Jia JM, Chowdary PD, Gao XF, et al. Control of cerebral ischemia with magnetic nanoparticles [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(2): 160-166. <http://www.nature.com/articles/nmeth.4105>.
- [11] Watson BD, Dietrich WD, Busto R, et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis [J]. *Annals of Neurology*, 1985, 17(5): 497-504. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.410170513>.
- [12] Dietrich WD, Watson BD, Busto R, et al. Photochemically induced cerebral infarction [J]. *Acta Neuropathologica*, 1987, 72(4): 315-325. <http://link.springer.com/10.1007/BF00687262>.
- [13] Labat-gest V, Tomasi S. Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies [J/OL]. *Journal of Visualized Experiments*, 2013, (76): e50370. <http://www.jove.com/video/50370/photothrombotic-ischemia-minimally-invasive-reproducible>.
- [14] Fluri F, Schuhmann MC, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research [J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015, 9: 3445-3454. <http://www.dovepress.com/animal-models-of-ischemic-stroke-and-their-application-in-clinical-res-peer-reviewed-article-DDDT>.
- [15] Yao H, Sugimori H, Fukuda K, et al. Photothrombotic middle cerebral artery occlusion and reperfusion laser system in spontaneously hypertensive rats [J]. *Stroke*, 2003, 34(11): 2716-2721. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.STR.0000094730.38343.73>.
- [16] Qian C, Li PC, Jiao Y, et al. Precise characterization of the penumbra revealed by MRI: a modified photothrombotic stroke model study [J]. *PLoS one*, 2016, 11(4): e0153756. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0153756>.
- [17] Lee VM, Burdett NG, Carpenter TA, et al. Evolution of photochemically induced focal cerebral ischemia in the rat [J]. *Stroke*, 1996, 27(11): 2110-2119. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.STR.27.11.2110>.