

线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的手术操作

★ 张天生 崔莉 黄英华 (成都中医药大学 2003 级研究生 成都 610075)

关键词:线栓法;脑缺血模型;手术操作

中图分类号:R 965 文献标识码:A

建立一种稳定、可重复、损伤小的动物血栓性脑缺血再灌注模型,对于缺血性卒中病理机制探索及疗效评价具有重要价值。血管内栓线阻断法 Koizumi^[1]于 1986 年首次报道不用开颅的大鼠 MCA 可逆性阻断模型的制备方法。该方法可以有效地阻断大鼠 MCA 供血区的脑血流,而且可以模拟血管再通后的再灌注情况,它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。由于它具备了上述优点,已被广泛接受和应用。本人在完成电针治疗缺血性中风时效关系的实验过程中,制备了大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,发现术中有很多操作细节,而且每一步操作对模型的成功都很关键。现就模型制备过程中手术操作的若干问题及个人体会介绍如下。

1 切口位置的选择

恰当切口位置的选择,可以使血管暴露充分,有利操作,节约手术时间,减少对动物的刺激,提高术后生存率。目前国内外学者^[1,2]多采用颈部正中切口,国内一些学者^[3,4]经改良后采用颈部旁侧手术入路。我们在操作中发现,采用颈部旁侧切口不用切开颈阔肌,出血少,便于肌肉分离,手术视野暴露较好,颈内外动脉及其分支的分离易于进行,尤其是分离深在鼓泡处的颈内动脉(ICA)分支翼腭动脉(PPA),如果采用颈部正中切口由于距切口处远而难以分离;另外颈部旁侧入口对气管刺激性小,呼吸道分泌物少,不易出现呼吸道分泌物过多和气管痉挛,手术大鼠病死率低。我们体会采用颈部旁侧手术入路应注意几点,一是中间稍偏 0.5 cm 即可,切口线正好在颈阔肌和胸锁乳突肌间隙上方,如果太靠外侧会给分离肌肉带来难度;二是用手术刀切开皮肤时不宜用力太猛,颈部静脉血管丰富,切入太深容易引起出血,给手术操作带来一定难度,以刚刚切开皮肤为度,并且切口从上到下稍微斜向内侧,并且切口尽量靠上一些,有利于分离颈外动脉。

2 寻找血管的方法

大鼠颈总动脉(CCA)位于颈阔肌和胸锁乳突肌之间,上升至甲状腺水平高度分出 ICA 和颈外动脉(ECA)。ECA 在下颌角平面以下分出枕动脉、甲状腺上动脉、咽升动脉、腭升动脉和上颌外侧动脉,在耳下方分出终末支即耳后动脉、颞浅动脉和舌动脉。ICA 在鼓泡和枕骨之间入颅,在鼓泡内侧

发出颅外分支 PPA(相当于人类上颌动脉),主干继续沿鼓室内侧延伸,进入鼓室与枕骨基板之间的后破裂孔进入颅腔。选择旁侧手术入路,切开皮肤暴露组织后,用止血钳钝性分离表层软组织和脂肪组织,然后用止血钳插入颈阔肌和胸锁乳突肌之间,并分离之,用镊子翻开颈阔肌即可看到 CCA,仔细向远心端分离出颈内外动脉的分叉处,朝上走行的是 ECA,朝下内方走行的是 ICA,继续沿 ICA 分离,位于鼓泡的后缘可分离出 PPA。尽量在肌肉的间隙中剥离,减少对肌肉的撕裂,保护血管附近的神经组织。我们在实验中发现,有些造模后的大鼠手术侧出现上肢瘫痪,这与暴露血管时损伤臂丛神经有关,因此应尽可能的保护血管周围的组织,尽量小心剥离相关组织而不要撕裂。

3 栓线位置的选择

寻找并分离 CCA、ICA、ECA 后,阻塞大脑中动脉的血流,在栓线位置的选择上,最早的国外一些学者^[1]采用 ECA 栓线,具体方法是从 ECA 上剪一小口把鱼线从剪口处插入,绕过 ECA、ECA 分叉处,插入 ICA 或直接剪断 ECA 插入栓线。经 ECA 插线有两个不足^[5],一是剪断 ICA 对实验动物的损伤太大,若不剪断,游离 ECA,该动脉与 ICA 之间的角度太小(28.25 ± 1.37),线栓不易进入 ICA,而且 ECA 比较细,剪口很难把握,稍微不注意易把动脉剪断,再灌注取出栓线时由于心脏压力较大,很容易造成内出血导致动物死亡;二是经此处插线,到达大脑中动脉的距离较长,相应的线栓较长,操作时间较长。操作时间过长会刺激血管壁,再灌注时容易形成血栓。国内一些学者^[3]经改良后有人采用在 ICA、ECA 分叉处栓线,即在 CCA 末端剪一小口把线插入,有人研究^[5]发现该动脉末端附近有颈动脉窦和颈动脉小球,这种方法操作不慎容易引起实验动物血压升高和呼吸异常。并建议经 PPA 根部插线,一是鼓泡可以作为手术操作的标志;二是其管径粗,与 ICA 之间的角度也大,也可缩短操作时间,减少对血管壁的刺激。但是我们认为栓线须经 PPA 根部插入,因大鼠的解剖特点是:手术视野小,分离难度大,易出血,且需要显微器械,因此对技术要求高。曹勇军等^[6]分离出一段长约 5 mm 的 CCA,栓线直接从 CCA 经 ICA 插至 MCA 起始部,再灌注时抽回栓线至 CCA 内即可。整个操作比较简单、方便,在肉眼直视下即可完成。我们实际操作中也发现,

曹勇军等^[6]对栓线位置的改进操作性更强,简化了操作步骤,降低了难度,但是实际操作是我们发现这种盲插法常常会遇到无法避免的问题,就是有些体重较大的老鼠容易插入 PPA,无法达到预定的深度,有时随着插入方向的调整可能会避开 PPA,但有时却无法避免,随机性很大,我们经参考各种文献,在此试验的具体栓线方法上,寻找一套可行的方案。

4 栓线的具体方法

切开皮肤皮下组织,暴露二腹肌肌腹和胸锁乳突肌,寻找到 CCA,分离 CCA 并保护迷走神经节,结扎 CCA 近心端,向上分离右 ECA 与 ICA,用小血管夹夹住 CCA 远心端(CCA 结扎处与上血管夹处保持 5 mm 左右距离),在此处放置一打好结的备用丝线,勿收紧线结,在此线下端剪一小口,插入已制备好的栓线头端,收紧线结,松去血管夹,在近 CCA 分叉处用眼科镊暂时夹闭 ECA,同时顺 CCA 经 ICA 将栓线送至颅内,遇阻力而止。我们省去了结扎 ECA 而是暂时夹闭 ECA,这样减少了因结扎 ECA 带来的损伤,提高了术后生存率,并节约了时间,大约 10 分钟就可以完成一只造模。有关是否结扎 PPA,很多学者有不同意见。PPA 是 ICA 的颅外分支,它接近颅底,位置较深,在线栓制作大鼠 MCAO 模型的手术过程中,处理起来很困难。在制作成年大鼠的 MCAO 时,多采用结扎 PPA 的方法。并且 PPA 结扎与否是影响模型成功率高低的重要因素^[7]。但有人认为在成年 SD 大鼠的 MCAO 过程中可以不必结扎 PPA,采用盲插的办法,躲开 PPA 直接进入颅内^[8]。这种方法减少了手术的创伤,是一种较理想的制作永久性 MCAO 的方法。另外一位学者发现结扎 PPA 会造成 ICA 的血栓给再灌注造成困难,提出了暂时夹闭的观点^[9]。王春霞等^[3]认为无需结扎 PPA,可提高再灌注成功率,有实验表明^[10],结扎 PPA,ICA 内的栓线易形成血栓,至管壁闭塞,再灌注时难以保证正常供血,且 PPA 不是基底节区侧枝循环的主要供应血管,结扎与否并不影响脑梗死体积和神经缺失症状。我们在实验中发现大鼠的 PPA 几乎与 ICA 直径相当,如果不处理,误插入 PPA 的机率很大,而且反复调整栓线易造成插线穿破 ICA,有脑出血之虞,于是不分离结扎 PPA,只要技术熟练并注意掌握 PPA 从 ICA 中分出的角度就不会把鱼线误导入 PPA。因此我们根据参考文献^[8]的方法,当遇到无论如何也无法插入时,就选择继续向上分离 PPA,挂线后采用了暂时阻断的办法,虽然操作上有一些难度,但弥补了上述方法的不足之处。在线栓法手术过程及术后麻醉期,大鼠呼吸功能抑制,呼吸道反应差,颈部手术过程中对呼吸道压迫及对支配相关神经损伤易使痰液阻塞呼吸道而出现呼吸困难,甚至窒息,可进行吸痰处理并尽量避免刺激神经。

5 栓线的深度

栓线深度过深会导致动物死亡,不足又无法造模成功,因此栓线深度至关重要。一般报告认为从 ECA 或 CCA 分叉处插入,其深度为 (18 ± 0.5) mm;曹勇军^[11]在实验中测量发现,经 CCA 插入的栓线长度为 (23 ± 0.5) mm 比较适宜,而经 ECA 插入的栓线长度为 (20 ± 0.5) mm 比较适宜。因为大鼠

的体重与血管 MCA 长度呈正相关,并且大鼠的体重与栓线直径之间有正交互作用,因此栓线的长度、直径要与大鼠的体重相匹配。在对理想栓线探讨的实验中,关云谦^[12]等发现:进入 ICA 的尼龙线深度超过 18~19 mm 可致使颅内 Willis 环的血管被尼龙线刺破而形成蛛网膜下腔出血(SAH);辛世萌^[13]在实验中找到的最佳匹配方案为:大鼠体重 250~330 g、线长 17 mm 或 18 mm、栓线直径 0.28 mm,该方案制作的 MCAO 模型成功率高、重复性好、生理指标影响小,并且发现栓线插入长度 17 mm 或 18 mm 对造模效果的影响没有统计学上的差异。综合不同的研究结果,对于体重适宜造模的大鼠,理想的栓线长度为 17~18 mm;我们在栓线深度上用有色笔在栓线的 20 mm 处做标记,直到把有颜色的标记送入分叉处,才能保证栓线深度,这时感觉有阻力时即停止插入,并向外稍拉出一点即可。

6 术后处理

由于术后动物尚未清醒,因此护理也很重要。但为保证栓线成功,达到预期的阻塞时间,防止栓线脱落暂时把动物留在手术台上,保证动物不会因挣扎而把栓线过早脱落,但仍需监测体温,并注意保暖。再灌注后动物可放入笼中。另外笼中应保持干燥,没有积水及粉尘,防止动物误吸而窒息。我们在实验中发现一些模型症状不典型甚至没有症状,都是由于动物苏醒后极力挣扎使栓线过早脱落所致。手术后大鼠存活期可以满足通常的实验需求,一般来讲,随着栓塞和再灌注损伤时间的延长,死亡率会上升。大鼠在术后 24~48 小时最容易死亡,这种死亡是严重脑缺血损伤造成的,较直接的因素是脑水肿。用线栓制作持续性局灶性脑缺血模型时,术后要肌注庆大霉素预防感染;如果动物模型要生存 1 周以上,必要肌注速尿,防止因脑水肿动物在短期内死亡。术后饮水中加入葡萄糖,保证动物术后有充足的能量生存到实验要求的时间。

线栓法模型制备的手术操作过程中,鱼线入颅后的操作是非直视下进行的,血流阻断与否无法直接判断。制备该模型时切口位置的选择、血管的寻找、栓线位置、栓线的具体方法、入线深度等都需要进行相应调整,其中任何一个环节配合不好,都会导致模型失败,使缺血发生率降低。因此,模型的操作需要一个熟练过程,只有熟练手术操作者才能复制出稳定的梗死灶。

参考文献

- [1] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experiments studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebroischemia in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. Jpn J stroke, 1986, 8: 1
- [2] 顾振, 韩群颖, 苏殿三, 等. 大鼠短暂性局灶性脑缺血模型的改进[J]. 中国解剖与临床, 2001, 6(1): 8
- [3] 王春霞, 刘春风, 包仕尧. 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型改良后的实验研究[J]. 苏州医学院学报, 1999, 19(2): 124
- [4] 陈春富, 李劲松. 栓线法大鼠局灶性脑缺血模型的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1996, 13(1): 18
- [5] 张成英, 赵旭东. 栓线法制作大鼠局灶性脑缺血模型插线部位的选择[J]. 四川解剖学杂志, 2004, 12(2): 110

中药专业本科生实践教学改革的探索与思考^{*}

★ 刘红宁 左锋云 薛铁瑛 朱卫丰 (江西中医学院 南昌 330004)

关键词:中药专业;本科;实践教学;改革

中图分类号:G 424 文献标识码:A

培养大学生的创新实践能力是 21 世纪高等教育的使命,是衡量一所大学办学质量和水平的重要标志。近年来,我院结合承担的教育部——世行贷款 21 世纪初高等教育教学改革项目《中药产、学、研合作教育培养创新人才研究与实践》,开展了中药专业本科生实践教学改革、培养创新能力和实践能力的探索,取得了一些成效,为进一步完善产学研合作教育人才培养模式,培养适应社会进步和产业发展需要的创新型、实践型、创业型人才奠定了基础。

1 改革背景

由于受起步时间晚、普及程度低等诸多因素的制约,我国中药高等教育人才培养模式单一,且一直以培养专才型人才为主。1999 年,我们在组织实施国家中医药管理局高等中医药教育面向 21 世纪教改项目《中药产业技术人才需求与培养模式研究》过程中,对中药产业群内各方面人才的现状与需求进行了调查,在调查中我们发现,中药高等教育人才培养模式与社会进步和经济发展对人才特别是高层次中药人才的需求之间存在着相互脱节的现象。中药毕业生专业知识老化,对现代科学技术和现代医学知识,特别对这些新知识、新技术在中医药中的应用了解不多或不深;毕业生知识面狭窄,知识结构不尽合理,缺乏宽厚的基础知识,加之终身教育制度措施不力,大多数人再学习能力弱,缺乏自学习惯,对大学课堂上老师未教过的东西知之甚少,从而导致新知识、新技术存量不足,对新事物不敏锐;缺乏创新意识,创新能力不强,思维方式以模仿型、再现型为主。

面对这种状况,我们开始酝酿在我院中药专业实施实践

教学改革,探索培养创新型、实践型、创业型人才的有效途径,我们认为,这种实践教学改革的至少应包含有以下 4 个方面内容:

(1)强调学生创新能力。中药人才的素质、知识、能力与社会、经济、科技的发展需求不相适应,中药专业毕业生创新意识淡薄、创新能力不强,已经成为制约中药产业发展的瓶颈。21 世纪是知识经济的时代,创新是国家和民族发展的不竭动力,中药事业的发展也离不开创新,因此,在中药人才培养模式改革中,必须突出强调学生创新精神和创新能力的培养。

(2)培养学生学习能力。高等学校人才培养的内容应包括:学习能力和思维能力、动手能力、创新能力等,这也是人们在成长中必须具备的能力。在“四大能力”中,学习能力尤为重要,它包括学习方法和思维方法,是学生获取知识、获得成功的基础能力,是形成和提高其他三种能力的动力和源泉。为了培养学生的学习能力,必须实现从“以教为主”到“以学为主”的转变。

(3)适应中药产业发展需要。中药产业作为增长性产业,其产业链涉及中药农业、中药工业、中药知识产业、中药服务业等诸多行业,近 10 年来其销售额平均年增长 20% 以上,利润和利税平均年增长 24%,呈现出强劲的发展势头。有专家预测,中药产业作为具有高科技含量和巨大增长潜力的行业,将是中国加入世界贸易组织后受惠最深的行业之一,也是最具国际竞争力的行业之一,在我国 21 世纪产业结构调整中将起到举足轻重的作用。因此,中药产业的快速发

^{*} 教育部世行贷款 21 世纪初高等教育教学改革重点项目“中药产学研合作教育培养创新人才研究与实践”(项目代码 1292B16013)

- [6]曹永军,程彦斌.线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的改进与探讨[J].中国应用生理杂志,2001,17(2):198
- [7]曹霞,曹秉振,赵玉武,等.线栓法复制局灶性脑缺血模型影响因素探讨[J].中国病理生理杂志,2000,16(2):157
- [8]曹永军,程彦斌.线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的改进与探讨[J].中国应用生理杂志,2001,17(2):198
- [9]窦永臣,王任直,张波,等.大鼠局灶性脑缺血模型制作方法的探讨[J].中国脑血管病杂志,2004,1(2):23
- [10]刘九丁.实验性局灶性脑缺血再灌注动物模型的改进及评价

[J].中风与神经疾病杂志,1997,14(2):87

- [11]曹勇军,程彦斌.线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的改进与探讨[J].中国应用生理学杂志,2001,17(2):198
- [12]关云谦,孙明,徐超.大鼠颈内动脉线栓法制备局灶性脑缺血模型及影响因素[J].国外医学脑血管疾病分册,2001,9(3):151
- [13]辛世萌,刘远洪,聂志余.栓线长度、直径、及大鼠体重与栓线法大鼠局灶性脑缺血模型关系的研究[J].大连医科大学学报,2000,22(2):105

(收稿日期:2005-05-16)