

# 应用单宁酸-氯化铁法筛选长爪沙鼠脑底动脉Willis环变异\*\*★

吴晓光, 郭园园, 颜 勇, 赵淑敏, 龚秀云

## Mutation of cerebral artery Willis circle of Mongolian gerbils screened using tannic acid-ferric chloride staining

Wu Xiao-guang, Guo Yuan-yuan, Yan Yong, Zhao Shu-min, Gong Xiu-yun

### Abstract

**BACKGROUND:** Previously, whether the brain ischemia is exist or not judged by positive syndrome, which would be influenced artificially, and the target is also not strictly. The tannic acid-ferric chloride method is characterized by reliable, simple and reproducible. Accordingly, this method can make it possible for the scientific researcher to overcome the above deficiencies by screening cerebral artery circle of Willis of Mongolian gerbils.

**OBJECTIVE:** To explore a simple and reliable method for screening the Willis circle variation of arteries in Mongolian gerbils.

**METHODS:** The forebrain ischemia models of Mongolian gerbils were established by using Kirino's method. Laser spectroscopy was used to observe the blood flow in the cerebral artery, and tannic acid-ferric chloride method was used to display cerebral microvasculars.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After common carotid arteries were legend, those Mongolian gerbils, which laser spectroscopy was still able to detect the blood flow in forebrain, have circle of Willis arteries, as confirmed by tannic acid-ferric chloride method. The results demonstrated that it is quickly and reliably to screen Willis circle variation in Mongolian gerbils using tannic acid-ferric chloride method to display brain microvasculars.

Wu XG, Guo YY, Yan Y, Zhao SM, Gong XY. Mutation of cerebral artery Willis circle of Mongolian gerbils screened using tannic acid-ferric chloride staining. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(41): 7683-7686. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 以往曾采用阳性体征来判断长爪沙鼠脑缺血的有无, 但存在人为影响因素较大、指标不严谨等缺点。单宁酸-氯化铁法媒染微血管效果可靠, 方法简便易行, 重复性好, 有可能从血管角度筛选以克服上述缺点。

**目的:** 探索一种简便、可靠的筛选长爪沙鼠脑底 Willis 环变异的方法。

**方法:** 根据 Kirino 法制作长爪沙鼠前脑缺血模型, 激光多普勒血流仪监测脑组织血流量, 单宁酸-氯化铁法显示脑组织微血管。

**结果与结论:** 夹闭双侧颈总动脉后, 多普勒监测到前脑仍存在血流量的长爪沙鼠, 经单宁酸-氯化铁染色证实均存在 Willis 环变异。研究表明应用单宁酸-氯化铁法显示微血管, 可简便、可靠地筛选出脑底 Willis 环变异的长爪沙鼠。

**关键词:** 单宁酸-氯化铁法; 长爪沙鼠; Willis 环; 变异; 脑缺血模型

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.41.020

吴晓光, 郭园园, 颜勇, 赵淑敏, 龚秀云. 应用单宁酸-氯化铁法筛选长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环变异[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41):7683-7686. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

长爪沙鼠缺少联系大脑后动脉和基底动脉的后交通动脉<sup>[1-3]</sup>, 前交通支约有1/3缺乏或细弱<sup>[4-6]</sup>, 双侧颈总动脉短暂性闭塞时, 前脑缺乏来自于椎动脉重要的血液代偿, 用简单的结扎单侧或双侧颈总动脉的方法即可获得比大鼠、小鼠更加典型的前脑缺血动物模型<sup>[7-9]</sup>, 在脑缺血损伤机制及药物评价方面被国内外广泛应用<sup>[10-14]</sup>。

近年来, 不断有学者发现有的长爪沙鼠脑底动脉Willis环存在完整和部分完整后交通动脉的现象<sup>[16-21]</sup>。为了保证前脑缺血模型的成功制作和实验研究的科学性、可靠性, 应对长爪沙鼠脑底Willis环解剖结构变异引起足够的重

视。但对长爪鼠willis环变异的筛选方面却少见报道。因此, 本实验根据kirino法制作长爪沙鼠前脑缺血模型, 采用激光多普勒血流仪监测脑组织血流量, 应用单宁酸-氯化铁法<sup>[21]</sup>显示微血管, 探讨有效的筛选出Willis环变异长爪沙鼠的方法。

## 1 材料和方法

**设计:** 方法学动物实验。

**时间及地点:** 于2005-08/2008-09在承德医学院基础医学研究所完成。

**材料:** 健康成年雄性长爪沙鼠40只, 12~14周龄, 体质量(75±10)g, 由首都医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(京) 2005-0006。实验过程中对动物的处置符合2006

Department of Preclinical Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

Wu Xiao-guang★, Master, Experimentist, Department of Preclinical Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China ewxg@qq.com

Correspondence to: Zhao Shu-min, Professor, Master's supervisor, Department of Preclinical Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China zhaoshumin-2008@163.com

Supported by: the Foundation of Science and Technology Bureau, No. 200621006\*, 200721073\*

Received: 2010-03-12 Accepted: 2010-04-15

承德医学院基础医学研究所, 河北省承德市 067000

吴晓光★, 男, 1975年生, 河北省承德市人, 满族, 2008年河北煤炭医学院毕业, 硕士, 实验师, 主要从事脑血管病相关研究。ewxg@qq.com

通讯作者: 赵淑敏, 教授, 硕士生导师, 承德医学院电镜室, 河北省承德市 067000 zhaoshumin-2008@163.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2010)41-07683-04

收稿日期: 2010-03-12  
修回日期: 2010-04-15  
(20100123004/ZW-Z)

年科学技术部发布的关于善待实验动物的指导性意见<sup>[22]</sup>。

**主要试剂和仪器:**

试剂和仪器	来源
单宁酸	天津佳兴化工玻璃仪器 工贸有限公司
三氯化铁	天津双船化学试剂厂
MP150 型激光多普勒血流仪, TS145 激光多普勒血流仪针式电极	美国 BIOPAC 公司
BW-SSD907 柔性颅骨钻	上海软隆科技发展有限公司
脑立体定位仪	日本 NARISHIGE 公司
Leica 振荡切片机	德国 Leica 公司
OLYMPUS 摄影显微镜, OLYMPUS 数码照相机	日本 OLYMPUS 公司

**实验方法:**

**模型建立:** 参照Kirino等<sup>[23]</sup>的方法, 无创性动脉夹夹闭长爪沙鼠双侧颈总动脉, 缺血45 min后松开动脉夹, 再灌注恢复脑血流量。

**脑组织血流量监测:** 体积分数为2%的戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉, 长爪沙鼠头部水平固定于立体定位仪上, 颅顶正中矢状切口, 于前囟后2.0 mm、中线向右旁开2.3 mm, 用颅钻钻一直径为1.5 mm的小孔, 将MP-150型激光多普勒血流仪探头插入长爪沙鼠右侧鼠脑皮质下2.5 mm, 固定探头。连续测定夹闭长爪沙鼠双侧颈总动脉前10 min至夹闭双侧颈总动脉后45 min脑组织血流灌注量, 以缺血前10 min血流量的平均值为基础血流量, 单位BPU(BPU: 组织血流量的相对单位, 其变化直接反映微循环血流量的改变, 1 BPU=5 mV电压)。监测血流期间用红外线测温仪监测长爪沙鼠耳内鼓膜温度, 并使之维持在(37.0±0.2) °C。

**单宁酸-氯化铁法筛选:** 长爪沙鼠血流量监测完毕后, 松开动脉夹, 打开胸腔, 暴露心脏。从左心室插入灌注针至升主动脉, 并剪开右心耳。在18.62 kPa压力下应用100 mL 37 °C生理盐水快速冲净血管, 40 g/L多聚甲醛灌注固定脑组织, 然后结扎双侧颈总动脉。再用单宁酸混合媒染固定液100 mL灌注, 继以100 mL生理盐水快速冲洗血管, 预防堵塞, 之后用体积分数0.5%氯化铁溶液持续灌注20 min, 4 h后完整取脑, 大体观察, 数码相机拍照。截取视交叉平面至大脑横裂的一段脑组织, Leica振荡切片机连续冠状切片, 片厚25 μm, 每隔4片(100 μm)取1片, 裱于涂有APES的载玻片上, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 光镜观察并显微摄影。

**主要观察指标:** 长爪沙鼠全脑缺血模型脑组织血流量变化, 单宁酸-氯化铁法显示脑微血管改变及鉴别有无Willis环的变异。

**设计、实施、评估者:** 设计由第一作者在导师的指

导下完成, 实施为第一、二、三作者, 评估为全部作者。所有作者均接受过承德医学院二级实验动物中心的正规培训。

**2 结果**

**2.1 实验动物数量分析** 实验选择长爪沙鼠40只, 实验过程中无动物死亡, 全部进入最终结果分析。

**2.2 脑组织血流量监测结果** 33只长爪沙鼠双侧颈总动脉被夹闭后, 注入到大脑的血流被阻断, 脑组织血流量迅速下降[1 min, (11.6±3.3)%; 5 min, (2.5±0.7)%; 15 min, (0.5±0.3)%], 约15 min后, 血流量接近于0, 并趋于稳定。另外7只长爪沙鼠夹闭颈总动脉45 min时, 有5只脑组织血流量仍然维持在基础血流值的1%左右, 2只血流量大于其基础值的10%。

**2.3 单宁酸-氯化铁法筛选结果** 见图1。



Figure 1 The results of tannic acid-ferric chloride method  
图1 单宁酸-氯化铁法筛选结果

前脑缺血造模成功的33只长爪沙鼠, 仅小脑表面血

管显色, 大脑表面血管没有显色, 经连续震荡切片, 大脑组织内微血管也未显色(图1a, b)。脑组织血流量仍然维持在基础血流值的的大于1%的5只长爪沙鼠, 小脑全部和大脑的部分区域表面血管被单宁酸-氯化铁显色, 冠状切片可见部分脑组织微血管显色(图1c, d), 其中血流量仍大于10%的2只长爪沙鼠小脑和全部大脑表面血管均显色, 脑组织内有大量微血管显色(图1e, f)。

### 3 讨论

建立指标控制严格、重复性好的脑缺血动物模型是研究脑缺血性损伤机制和筛选抗脑缺血药物的关键<sup>[24]</sup>。长爪沙鼠易于获得, 大小适宜, 又具有独特的脑血管遗传特征, 用简单的结扎单侧、双侧颈总动脉的方法即可获得比大鼠、小鼠更加典型的人类急性前脑缺血动物模型, 在脑缺血损伤机制及药物评价方面被国内外广泛应用<sup>[2-3]</sup>。实验结果显示, 夹闭双侧颈总动脉后, 多普勒监测到前脑仍存在血流量的长爪沙鼠, 经单宁酸-氯化铁染色证实均存在后交通动脉。这与俞国平等<sup>[25]</sup>、Seal<sup>[17]</sup>及Mayevsky等<sup>[19]</sup>报道长爪沙鼠种群中存在有后交通动脉的结论一致。本次实验结果也表明该种群中有17.5%(7/40)动物不同程度的具有后交通动脉, 这与Castro-Pacheco等<sup>[20]</sup>报道的30%及杜小燕等<sup>[18]</sup>报道的14.5%的变异率相近。尽管大多数情况下后交通动脉的代偿作用较弱, 但经结扎或夹闭双侧颈总动脉造成脑缺血或缺血再灌注模型进行脑缺血研究时, 也会因此导致不全缺血, 造成实验结果的误差, 甚至得出错误结论。

激光多普勒血流仪可实时显示脑组织血流, 对缺血情况有直观的把握<sup>[26]</sup>。此方法应用激光多普勒血流仪连续测定夹闭双侧颈总动脉前10 min至夹闭双侧颈总动脉后45 min脑组织血流灌注量, 发现血流量仍然维持在基础血流值的1%左右的沙鼠, 单宁酸-氯化铁法可验证脑底动脉Willis环存在后交通动脉。而夹闭双侧颈总动脉后血流量为0的沙鼠, 经单宁酸-氯化铁法染色大脑组织未见微血管显色, 证实不存在后交通动脉。因此, 当不用激光多普勒血流仪的监测, 或无此条件, 仅在取材前用单宁酸-氯化铁媒染法进行椎基底动脉供血区微血管构筑, 同样能收到筛除脑底动脉Willis环变异的效果。

研究表明, 单宁酸-氯化铁媒染法媒染效果可靠, 方法简捷易行, 重复性好<sup>[27-29]</sup>。单宁酸-氯化铁媒染法的技术关键点如下: ①单宁酸必须充分溶解过滤, 防止阻塞毛细血管。②先用体积分数4%多聚甲醛灌注固定好脑组织, 双侧颈总动脉结扎线一定要扎实、可靠, 再进行椎基底动脉血管构筑染色。③及时取脑并切片观察, 防止单宁酸弥散至周围组织, 而致血管模糊、界限不清。

综上所述, 单宁酸-氯化铁媒染法筛选Willis环变异

长爪沙鼠简便、可靠。此方法既克服了大多实验室不具备昂贵激光多普勒血流仪器硬件条件要求, 也避免了激光多普勒血流仪监测血流时开颅手术及开颅对颅内压稳定的影响; 更重要的是, 用单宁酸-氯化铁媒染法对脑缺血造模的长爪沙鼠进行筛选, 剔除Willis环存在变异的部分, 但不影响免疫组化检测、超微结构观察等后续实验结果, 保证了研究结果科学和可靠性, 节约了人力、物力及实验动物资源。

### 4 参考文献

- [1] Levine S, Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of Gerbil (*Meriones Unguiculatus*). *Experimental Neurol.* 1966;16(3):255-262.
- [2] Castro PA, Foyo-Niembro E. Carotid-basilar artery communication in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Rev Neural.* 2001;32(3):225-228.
- [3] Wei YF, Wen DC, Dai LJ, et al. Guangzhou Yixueyuan Xuebao. 2003;31(1):88-89. 韦永芳, 文端成, 戴丽军, 等. 长爪沙鼠脑底动脉的解剖学观察[J]. 广州医学院学报, 2003, 31(1):88-89.
- [4] Kobayashi M. Concentrations of energy metabolites and cyclic nucleotides during and after bilateral ischemia in the gerbil cenebral cortex. *J Neurochem.* 1977;29(8):53-59.
- [5] Levy DE. Communication between vertebra-basilar and carotid arterial circulation in the gerbil. *Exp Neurol.* 1974;45(6):503-508.
- [6] Kahn K. The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbils. *Neurology.* 1972;22(5):510-515.
- [7] Ye Z, Zhang QZ, Li L, et al. Jiepu Xuebao. 1986;87(3):315-317. 叶铮, 张琼珍, 李明, 等. 蒙古种沙鼠的大脑动脉环[J]. 解剖学报, 1986, 87(3):315-317.
- [8] Xu C, Chai SH, Liu SY, et al. Zhonghua Shengjing Waikexue. 1985;25(2):69-70. 徐超, 柴松海, 刘淑英, 等. 蒙古沙鼠脑缺血模型[J]. 中华神经外科杂志, 1985, 25(2):69-70.
- [9] Clifton GL. Conditions for pharmacologic evaluation in the gerbils model of forebrain ischemia. *Stroke.* 1989;20(11):1545-1552.
- [10] Choi S, Kim KW, Choi JS, et al. Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischemia/reperfusion damaged brain of Mongolian gerbil. *Planta Medica.* 2002;68(4):330-335.
- [11] Ramos-Zuniga R, Gomez PU, Navarro Ruiz A, et al. Locomotor activity is a predictive test after global ischemia-reperfusion in Mongolian gerbils. *Minim Invasive Neurosurg.* 2008;51(2):87-90.
- [12] Li DQ, Duan YL, Bao YM, et al. Neuroprotection of catalpol in transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Res.* 2004;50:169-177.
- [13] Zhao YN, Wu XG, Li JM, et al. Sichuan Daxue Xuebao Yixueban. 2010;41(1):53-56. 赵雅宁, 吴晓光, 李建民, 等. 中药补阳还五汤对沙鼠脑缺血再灌注损伤及微循环障碍的治疗作用[J]. 四川大学学报:医学版, 2010, 41(1):53-56.
- [14] Durukan A, Tattisumak T. Preconditioning-induced ischemic tolerance: a window into endogenous gearing for cerebroprotection. *Exp Transl Stroke Med.* 2010;2(1):2-8.
- [15] Himeda T, Hayakawa N, Tounai H, et al. Alterations of interneurons of the gerbil hippocampus after transient cerebral ischemia: effect of pitavastatin. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30(11):2014-2025.
- [16] Guo YY, Wu XG, Zhao SM. Chengde Yixueyuan Xuebao. 2008;25(4):455-446. 郭园园, 吴晓光, 赵淑敏. 长爪沙鼠Willis环解剖学观察[J]. 承德医学院学报, 2008, 25(4):455-446.
- [17] Seal JB. New variability in cerebrovascular anatomy determines severity of hippocampal injury following forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. *Brain Res.* 2006;16(1073):451-459.
- [18] Du XY, Yang H, Yang X, et al. Zhongguo Shiyang Dongwu Xuebao. 2006;14(2):263-266. 杜小燕, 杨慧, 孟霞, 等. 长爪沙鼠脑底前后交通动脉变异类型分析[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(2):263-266.
- [19] Mayevsky A, Breuer Z. Brain vasculature and mitochondrial responses to ischemia in gerbils. Basic anatomical patterns and biochemical correlates. *Brain Res.* 1992;598(122):242-250.
- [20] Castro-Pacheco A, Foyo-Niembro E. Carotid-basilar artery communication in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Neurol.* 2001;32(3):225-228.
- [21] Zhao SM, Kong XY. Jiepu Xue Zazhi. 2001;24(1):91-92. 赵淑敏, 孔祥玉. 一种媒染血管的新方法—单宁酸-氯化铁法[J]. 解剖学杂志, 2001, 24(1):91-92.

- [22] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China.Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals.2006-09-30.  
中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [23] Kirino T, Tamura A, Sano K. A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus. Stroke. 1986; 17(5):455-456.
- [24] Li JM. The temperature-dependent modulation of an inhibitory circuit in hippocampal slices as revealed by a population spike recording is mediated by extracellular adenosine. Jpn Physiol. 2007; 7(12):1147-1151.
- [25] Yu GP, Fang M, Chen HZ, et al. Weixunhuan Zazhi. 1997;7(3): 21-22.  
俞国平,方敏,陈慧珍,等.蒙古沙土鼠完全性脑缺血模型的研究[J].微循环杂志,1997,7(3):21-22.
- [26] Shao MB,Yao YM, Zhang QF, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng yu Linchuang Kangfu. 2010;14(5):838-842.  
邵洪波,姚月明,张庆富,等.己酮可可碱干预随意皮瓣的成活[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(5):838-842.
- [27] Xu P, Xiao JX, Li H. Tianjin Yiyao. 2006;34(9):636-637.  
徐鹏,霄金迅,李红.单宁酸-氯化铁法对SHR肾微血管密度的观察[J].天津医药,2006,34(9):636-637.
- [28] Xie HL, Yang ZJ, Guo S, et al. Jiepouxue Zazhi. 2008;31(1):77-79.  
谢红林,杨振军,郭森,等.大鼠海马微血管构筑的定量分析及衰老变化[J].解剖学杂志,2008,31(1):77-79.
- [29] Zhao SM, Zhou HJ, Han L, et al. Chengde Yixueyuan Xuebao. 2008;25(3):236-238.  
赵淑敏,周红九,韩莉等.SSTF预处理对脑缺血再灌注大鼠海马微血管的影响[J].承德医学院学报,2008,25(3):236-238.

来自本文课题的更多信息——

**基金资助:** 承德市科技局(200621006, 200721073)。课题名称: 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤后微循环变化的影响; 单宁酸-氯化铁法筛选脑底动脉 Willis 环结构变异沙土鼠的探索。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的创新点:** 单宁酸-氯化铁媒染法媒染效果可靠, 可以显示脑组织内各级微血管的形态结构, 方法简捷易行, 重复性

好。但应用于筛选微血管变异, 从血管角度验证脑缺血模型的可靠性还尚未见此类报道。

**课题评估的“金标准”:** 实验通过MP150型激光多普勒血流仪在国内仅有几台, 目前多用于体表微循环的检测和评价, 对开颅术中脑皮质灌注及血流变化的研究尚不多见, 但此仪器可实时显示脑组织血流量的变化, 是评价脑缺血与否的金标准。单宁酸随灌流液进入脑实质内各级动脉分支血管, 与血管壁内的糖蛋白、胶原等结合, 再与氯化铁中铁离子反应, 形成蓝黑色的单宁酸铁盐沉积于血管壁, 从而完整地显示沙

鼠脑实质内各级血管的形态。因此, 只要微血管有血流通过, 就会被单宁酸显色。单宁酸-氯化铁的筛选效果与激光多普勒的筛选效果完全具有一致性。

**设计或课题的偏倚与不足:** 课题虽证明单宁酸-氯化铁媒染微血管方法可以筛选出存在 Willis 环变异的沙鼠, 但只能在整体动物实验结束后进行, 并不能解决动物资源浪费的问题。

**提供临床借鉴的价值:** 为 Willis 环变异沙鼠的筛选提供了经济、有效、简洁, 可行性高的筛选手段; 媒染微血管的方法可以用来评价脑缺血模型是否成功。

CRTER 杂志“软组织工程”栏目关于“泌尿组织工程”研究的组稿内容

- 组织工程膀胱构建中材料及其性能评价
- 以膀胱脱细胞基质体内外构建组织工程化尿路上皮研究
- 天然细胞外基质及其在泌尿组织工程中的应用发展
- 组织工程化尿路上皮结构体内外构建研究
- 兔膀胱移行细胞原代培养及其与丝素膜相容性的研究
- PCL-卵磷脂静电纺丝材料构建组织工程尿道
- 灌注法制备大鼠全肾脏脱细胞基质支架的细胞相容性
- 人脐静脉构建组织工程尿道的初步研究
- 脱细胞羊膜修复兔尿道组织缺损的可行性
- 胶原膜与膀胱移行上皮细胞相容性的体外研究
- 人尿路变移上皮种子细胞的体外培养与鉴定
- 组织工程化尿路上皮-支架复合体的制备及其体外培养
- 丝素蛋白膜修复犬尿道缺损的实验研究
- 尿路组织工程材料的血管化
- 组织工程尿道支架修复战伤性尿道狭窄的实验研究
- 膀胱移行上皮细胞支架复合物的制备
- 基因增强组织工程化尿道的实验研究
- 组织工程化尿路上皮-支架复合体的制备
- PGA编织型尿管的制作及性能研究
- 组织工程技术在泌尿系统肌性管腔中的应用