

血管内介入方法制备非人灵长类动物局部 脑缺血模型的研究进展

吴迪, 何小夺, 陈健, 丁玉川

(首都医科大学宣武医院中美神经科学研究所, 北京 100053)

【摘要】 由于多项转化研究的失败, 卒中治疗专业委员会建议, 应该在非人灵长类动物局部脑缺血模型上进行临床前研究。采用血管内介入方法制备局部脑缺血模型与人类卒中发病过程一致, 而且还可以进行血管内介入治疗, 因此是模拟缺血性脑卒中发病与治疗过程的最佳动物模型。目前研究采用多种血管内介入方法制备模型, 结果也不一致, 本文将对血管内介入方法制备的非人灵长类动物进行总结, 对各种模型的优缺点和潜在应用进行分析。此外, 本文还根据不同类型的栓子, 不同的闭塞部位, 异常的血流动力学和可能的应用范围进行进一步的分析。选择合适的非人灵长类动物模型将有助于推动转化研究开展。

【关键词】 卒中; 动物模型; 非人灵长类动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 05-0016-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.05.004

Research progress of focal ischemic stroke in nonhuman primates using endovascular methods

WU Di, HE Xiaoduo, CHEN Jian, DING Yuchuan

(China-America Institute of Neuroscience, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

【Abstract】 The Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) committee has suggested that nonhuman primates (NHPs) should be used for preclinical stroke studies owing to previous translational failures. Ischemia induced by endovascular method closely mimics thromboembolic or thrombotic cerebrovascular occlusion in patients. This method also shows potential for endovascular treatment. This review provides a detailed summary of NHP models using endovascular method, including advantages and disadvantages, and potential applications. Additionally, we also provide further analysis based on different kinds of emboli, infarct size, and abnormal hemodynamics. Selection of the optimum model will pave the way for translational research.

【Key words】 stroke; animal models; nonhuman primates, NHPs

卒中是成人致死、致残的主要原因。近年来, 已有 1000 多种神经保护药物在细胞和啮齿类动物模型上证实有效, 但转化到临床应用中却均以失败告终^[1]。其中重要的因素是人类与啮齿类动物存

在巨大的种属差异, 而非人灵长类动物 (nonhuman primates, NHPs) 在组织结构、免疫、生理和代谢等方面与人类高度近似, 因此美国卒中治疗专业委员会建议, 新的神经保护药物进行临床试验之前, 在

[基金项目] 北京市医管局青苗项目 (编号: QML20170802)。

[作者简介] 吴迪 (1980—), 男, 博士, 研究方向: 非人灵长类动物脑缺血模型制备及神经保护。E-mail: di.wu@xwhosp.org

NHPs 模型上进行临床前研究^[2-3]。

大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)是人类脑缺血的多发部位,绝大多数的脑缺血模型都是针对 MCA 展开的。NHPs 局部脑缺血模型的建立方法可大致分为血管内介入方法和开颅手术方法,其中血管内介入方法的模型制备过程与脑卒中的发病过程非常相似,因此值得特别关注^[4]。按照血管再通情况,NHPs 局部脑缺血模型可分为缺血再灌注和永久性缺血两类。本文将就血管内介入方法制备 NHPs 局部脑缺血模型的最新进展进行总结和分析。

1 永久性脑缺血模型

永久性缺血模型是指制备局部脑缺血模型后不能或不必要进行干预,不会出现自发再灌注的方法。制备 NHPs 永久性缺血模型所用的栓子包括线栓、聚苯乙烯球、黏合剂等。通过微导管将上述栓子注射到 NHPs 的 MCA,栓子闭塞血管区域将出现局部脑缺血,并且即使给予溶栓药物也不会实现再通^[5-7]。该方法具有目标血管闭塞完全,梗死灶明确等优势。

最初研究采用黏合剂作为栓塞物质,通过微导管将黏合剂注射到 NHPs 的 MCA 区域,随后影像学验证黏合剂闭塞 MCA 分支,磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)证实出现梗死灶。但是,该研究发现梗死灶大小(3.38 ~ 20.5 mL)差别很大,提示注射的黏合剂并未在注射部位局部闭塞血管^[5]。因此,闭塞部位的不确定性导致模型症状和梗死灶的不均一性。此后研究中,Zhang 等^[6]采用丝线作为栓塞物质,通过微导管将丝线送至 MCA 分支 M2 段的远端,他们发现恒河猴脑缺血模型梗死灶较小,而且模型出现对侧神经功能缺损的症状。为了更好的控制侧支代偿血流的作用,Tong 等^[7]采用丝线作为栓塞物质,通过微导管将丝线送至 MCA 分支 M3 段,而后撤出微导管至 M1 段,在此置入丝线。该研究发现,通过该方法可以降低侧支血流对于梗死灶的影响,梗死灶位置和大小相对恒定^[7]。在永久性缺血模型中,通过微导管辅助,栓塞物质能够准确闭塞 MCA 分支血管是制备 NHPs 脑缺血模型的关键。该模型的缺点是由于栓子不是血栓,尚不能进行缺血性脑卒中的溶栓、取栓等治疗。因此该模型可以很好的诱导局部脑缺血的发病过程,但是不能模拟干预过程。

另一种制备 NHPs 永久性脑缺血的血管内介入方法是通过微导管注射微球。Cook 等^[8]研究发现,向食蟹猴颈内动脉注射 10 个直径 400 μm 聚苯乙烯微球后,成功制备局部脑缺血模型。食蟹猴模型在基底节和内囊区域出现显著的梗死灶,出现显著的对侧神经功能缺损症状。但是,注射 10 个直径 200 μm 聚苯乙烯微球后仅出现轻微神经功能缺损症状;注射 10 个直径 100 μm 聚苯乙烯微球未出现神经功能缺损症状,即使增加到 20 个微球也未出现症状^[8]。该研究提示,直径 400 μm 聚苯乙烯微球可以闭塞食蟹猴 MCA 的主干,造成相应区域的梗死。另一项研究中,Sato 等^[9]向食蟹猴颈内动脉注射直径 50 μm 琼脂糖微球后,模型并未表现局部脑缺血症状,MRI 检查显示 NHPs 模型表现为腔隙性脑梗死。由于尚不能精确控制微球的闭塞部位,所以这类模型的梗死部位不确定。但是,注射微球所致的局部脑梗死,可以模拟临床缺血性脑卒中支架置入或取栓治疗过程中微栓子脱落而导致脑梗死的病理过程。

2 缺血再灌注模型

随着介入医学技术和设备的快速发展,更多的研究采用可回收的介入装置,包括微导管、微球囊、弹簧圈等,制备 NHPs 缺血再灌注模型。理论上置入上述装置后可以造成局部脑缺血,撤出装置后可以实现血管再通。该模型具有梗死部位、梗死时程可控、撤出介入装置后可以实现再通等优点,因此,多项研究采用这类方法。

2.1 微导管方法

采用微导管制备 NHPs 局部脑缺血模型相对简便和经济。de Crespigny 等^[10]将微导管置于食蟹猴 MCA 的远端分支,阻断局部血流 3 h, MRI 检查显示模型动物出现梗死灶。此后,其他研究也采用该方法制备 NHPs 局部脑缺血模型^[11]。但是,de Crespigny 等^[10]的研究仅报道模型出现较小的梗死灶(0.3 ~ 1.9 mL),提示微导管并未完全闭塞目标血管。此后,Wu 等^[12]研究采用外径更大的微导管(Rebar 18)制备 NHPs 局部脑缺血模型,即使采用相同的闭塞部位和时间,该研究发现较大的梗死体积(9.7 ~ 20.1 mL),明显超出闭塞血管的供血区域,提示微导管完全闭塞目标血管,造成局部血流显著变化。因此,选择合适的微导管、最佳的闭塞位置成为该方法制备 NHPs 模型的关键。

2.2 微球囊方法

运用血管内神经介入技术将球囊导管置入 MCA 后,加压后充盈球囊可以闭塞 MCA,释放压力后撤出球囊可以实现再灌注。Gao 等^[13]采用球囊导管置入的方式,短暂闭塞恒河猴 MCA 2 h 成功制备缺血再灌注模型,梗死灶主要位于基底节和内囊部位,模型动物出现对侧肢体瘫痪症状。另一项研究采用相似的球囊导管,短暂闭塞狒狒 MCA 3 h 也成功制备缺血再灌注模型^[14]。上述两项研究表明,球囊导管可以成功制备 NHPs 缺血再灌注模型。但是,由于上述研究所用球囊导管直径与 NHPs MCA 近端直径接近,因此,球囊导管只能闭塞 MCA 近端或颈内动脉(internal carotid artery, ICA)远端血管,梗死灶通常较大,症状较重。

2.3 弹簧圈方法

运用血管内神经介入技术将导管精确置于 MCA 特定位置后,释放弹簧圈可以精准闭塞 MCA,解压弹簧圈后可以实现局部血流再灌注。Zhang 等^[15]采用弹簧圈置入方法,短暂闭塞恒河猴 MCA 的 M1 段,缺血 2 h 后收回弹簧圈,实现再灌注, MRI 检查显示梗死灶位于基底节区域,模型可以长期存活。Guo 等^[16]采用相同的方法,短暂闭塞恒河猴 M1 段 2 h 后成功制备缺血再灌注模型。Zhao 等^[17]采用相同的方法,短暂闭塞恒河猴 M2 段 2 h 后也可成功制备缺血再灌注模型,与 M1 段闭塞模型相比, M2 段模型的梗死灶较小、症状较轻。因此,弹簧圈方法可以精准控制闭塞部位、闭塞时程,最终梗死灶大小与闭塞部位直接相关。

上述三种方法通过介入装置的置入和撤出,成功模拟血栓形成和溶栓/取栓过程。但是,由于血管介入装置对于局部血流和血管壁的影响,可能出现血管痉挛、局部血栓形成等不良反应,影响模型制备的一致性。一项研究报道,采用球囊导管制备 NHPs 局部脑缺血模型后,虽然撤出球囊导管实现 MCA 的完全再通,但是病理学结果显示,深穿支动脉出现局部血栓形成^[18]。采用上述方法制备的 NHPs 缺血再灌注模型,易于控制缺血时间和或缺血部位,可以实现血管再通。

3 血栓模型

缺血性脑卒中发生的主要原因是血栓形成和栓子脱落,而针对血栓进行的化学溶栓或机械取栓是目前缺血性脑卒中的主要治疗方法^[19]。采用血管内介

入方法制备 NHPs 局部脑缺血的血栓模型,既可以模拟脑卒中的发病过程,也可以模拟脑卒中的治疗和干预过程。因此,这种 NHPs 模型是与脑卒中发病、治疗关系最密切,也是最具有转化前景的动物模型^[20]。

早期 NHPs 血栓模型研究发现,由于不能精准控制外源性血栓在 MCA 的位置,所以梗死灶位置和大小非常不一致。Kito 等^[21]向食蟹猴 MCA 注射单条 10 cm 长的血栓后成功制备局部脑缺血模型,模型动物在基底节、皮层等部位出现梗死灶,出现行为、意识、感觉等异常表现。该项研究虽然控制外源性血栓的负荷量,但是病理学检查发现,外源性血栓并未完全在注射部位。Gauberti 等^[22]在结扎 MCA 近端和远端的基础上,注射外源性凝血酶诱导局部血栓形成,成功制备恒河猴 MCA 主干血栓形成的局部脑缺血模型。但是,上述两项研究均报道,注射血栓压力增大后,外源性血栓存在破碎的风险,造成梗死部位的不确定性。Wu 等^[12]参照啮齿类动物研究中制备白血栓的方法,改进 NHPs 自体血栓制备方法,提高了恒河猴自体血栓的韧性。注射单条血栓后发现,血栓位于 MCA 的 M1 段或 M2 段,其中 M2 段血栓闭塞模型可以长期存活,表现对侧上肢神经功能缺损,但是 M1 段血栓闭塞模型脑缺血症状严重,具有较高的死亡率^[12]。

溶栓或取栓治疗是急性缺血性脑卒中的标准治疗方法。因此,可以在 NHPs 血栓模型上模拟溶栓或取栓治疗,评估新型溶栓药物或设备。Qureshi 等^[23]报道,制备食蟹猴 MCA 血栓模型后,接受动脉给予溶栓药物(t-PA)治疗的模型血管再通比例更高。但是,该研究每组仅纳入 4 只模型动物,因此,并未进行统计学分析。另一项研究,制备食蟹猴 MCA 血栓模型后,经动脉给予尿激酶进行溶栓治疗,这样可以降低梗死体积、改善意识状态和运动功能^[24]。上述研究证明, NHPs 血栓模型可以成功模拟缺血性脑卒中的发病和治疗过程,给予溶栓治疗后可以降低神经功能缺损。

通过血管介入方法制备的 NHPs 血栓模型具有最接近临床发病、治疗过程的优点,但是血栓模型仍然存在闭塞部位不完全精准、血栓自溶、血栓延伸等不确定因素,因此,尚需辅助其他方法克服上述缺点^[4]。此外,由于 NHPs 的 MCA 直径较小,即使血栓可以闭塞 MCA,目前临床常用的取栓支架尚不能通过 NHPs 的 MCA。因此,制备更小的取栓支架后才能在 NHPs 血栓模型上进行取栓实验。

4 NHPs 模型制备中血流动力学改变

MCA 通常是制备 NHPs 局部脑缺血模型的目标血管,同时 MCA 闭塞时间、程度也是关系模型术后存活、症状轻重的关键因素^[25]。由于 MCA 供血区域广泛,同时发出豆纹动脉等穿支动脉,因此,临床研究发现,MCA 主干闭塞后,患者将发生“恶性脑梗死”,预后不良^[26]。制备 NHPs 局部脑缺血模型的研究通常选用青年或中年动物,无其他基础疾病,MCA 主干闭塞后,如果没有良好的侧支循环,NHPs 模型易于死亡。因此,制备 NHPs 永久性脑缺血模型的研究通常选择 M1 段的远端或 M2 段作为闭塞部位,避免闭塞 MCA 的主干。这样可以保障 MCA 主干通畅,避免出现“恶性脑梗死”。NHPs 缺血再灌注模型也仅仅闭塞 MCA 主干 2~3 h,之后血管再通,保障 MCA 主干通畅^[4, 27]。其次,血管内介入方法所用装置以及栓子(血栓或其他栓子),都将显著影响局部脑血流。上述装置以及栓子作为外源性异物,都可以触发血小板凝集,形成新生血栓,造成模型症状加重^[28]。因此,采用血管内介入方法制备 NHPs 模型过程中,应该特别关注模型局部脑血流的变化。

5 动物伦理问题

NHPs 研究应该严格遵守实验动物伦理委员会的要求,达到“3R”原则。首先,所用神经保护药物应经过细胞模型、啮齿类动物模型的验证,具有明确显著的神经保护作用^[25]。其次,采用统计学方法,计算达到研究目标所需的最少动物数量^[29]。最后,在局部脑缺血手术过程以及后续治疗过程中,选择最佳的麻醉方式,保障术中平稳,使用镇痛、麻醉药物,尽量降低模型动物的痛苦^[30-31]。

NHPs 局部脑缺血模型为基础、转化和临床研究提供了重要的研究工具,具有重要意义^[32]。因此,根据不同研究的目标和任务,建立重复性好、死亡率低且易于控制缺血时间的 NHPs 脑缺血模型是关键。

参考文献:

[1] O' Collins VE, Macieod MR, Donnan GA, et al. 1026 experimental treatments in acute stroke [J]. *Ann Neurol*, 2006, 59(3): 467-477.

[2] Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical

recommendations [J]. *Stroke*, 2009, 40(12): 2244-2250.

[3] 田朝阳, 杨守凯. 非人灵长类动物在医学科学实验中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(6): 74-77.

[4] Wu D, Chandra A, Chen J, et al. Endovascular ischemic stroke models in nonhuman primates [J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(1): 146-155.

[5] D'Arceuil HE, Duggan M, He J, et al. Middle cerebral artery occlusion in *Macaca fascicularis*: acute and chronic stroke evolution [J]. *J Med Primatol*, 2006, 35(2): 78-86.

[6] Zhang X, Tong F, Li CX, et al. Temporal evolution of ischemic lesions in nonhuman primates: a diffusion and perfusion MRI study [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0117290.

[7] Tong FC, Zhang X, Kempf DJ, et al. An enhanced model of middle cerebral artery occlusion in nonhuman primates using an endovascular trapping [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2015, 36(12): 2354-2359.

[8] Cook DJ, Teves L, Tymianski M. A translational paradigm for the preclinical evaluation of the stroke neuroprotectant Tat-NR2B9c in gyrencephalic nonhuman primates [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(154): 154ra133.

[9] Sato Y, Chin Y, Kato T, et al. White matter activated glial cells produce BDNF in a stroke model of monkeys [J]. *Neurosci Res*, 2009, 65: 71-78.

[10] de Crespigny AJ, D'Arceuil HE, Maynard KI, et al. Acute studies of a new primate model of reversible middle cerebral artery occlusion [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2005, 14(2): 80-87.

[11] Yi KS, Choi CH, Lee SR, et al. Sustained diffusion reversal with inbore reperfusion in monkey stroke models: confirmed by prospective magnetic resonance imaging [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(12): 2002-2012.

[12] Wu D, Chen J, Wang B, et al. Endovascular ischemic stroke models of adult rhesus monkeys: a comparison of two endovascular methods [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31608.

[13] Gao H, Liu Y, Lu S, et al. A reversible middle cerebral artery occlusion model using intraluminal balloon technique in monkeys [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2006, 15(5): 202-208.

[14] Hamberg LM, Hunter GJ, Maynard KI, et al. Functional CT perfusion imaging in predicting the extent of cerebral infarction from a 3-hour middle cerebral arterial occlusion in a primate stroke model [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2002, 23(6): 1013-1021.

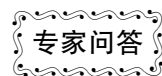
[15] Zhang Y, Fan F, Zeng G, et al. Temporal analysis of blood-brain barrier disruption and cerebrospinal fluid matrix metalloproteinases in rhesus monkeys subjected to transient ischemic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(12): 2963-2974.

[16] Guo J, Zheng HB, Duan JC, et al. Diffusion tensor MRI for the assessment of cerebral ischemia/reperfusion injury in the penumbra of non-human primate stroke model [J]. *Neurosci Res*, 2011, 33(1): 108-112.

[17] 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.
- [18] del Zoppo GJ, Copeland BR, Harker LA, et al. Experimental acute thrombotic stroke in baboons [J]. *Stroke*, 1986, 17(6): 1254-1265.
- [19] Sommer CJ. Ischemic stroke; experimental models and reality [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(2): 245-261.
- [20] Fukuda S, del Zoppo GJ. Models of focal cerebral ischemia in the nonhuman primate [J]. *ILAR J*, 2003, 44(2): 96-104.
- [21] Kito G, Nishimura A, Susumu T, et al. Experimental thromboembolic stroke in cynomolgus monkeys [J]. *J Neurosci Methods*, 2001, 105(1): 45-53.
- [22] Gauberti M, Obiang P, Guedin P, et al. Thrombotic stroke in the anesthetized monkey (*Macaca mulatta*): characterization by MRI - a pilot study [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2012, 33(4): 329-339.
- [23] Qureshi AI, Suri MF, Ali Z, et al. Intraarterial reteplase and intravenous abciximab for treatment of acute ischemic stroke. A preliminary feasibility and safety study in a nonhuman primate model [J]. *Neuroradiology*, 2005, 47(11): 845-854.
- [24] Susumu T, Yoshikawa T, Akiyoshi Y, et al. Effects of intra-arterial urokinase on a non-human primate thromboembolic stroke model [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100(4): 278-284.
- [25] Cook DJ, Tymianski M. Nonhuman primate models of stroke for translational neuroprotection research [J]. *Neurotherapeutics*, 2012, 9(2): 371-379.
- [26] Hacke W, Schwab S, Horn M, et al. 'Malignant' middle cerebral artery territory infarction; clinical course and prognostic signs [J]. *Arch Neurol*, 1996, 53(4): 309-315.
- [27] Jickling GC, Sharp FR. Improving the translation of animal ischemic stroke studies to humans [J]. *Metab Brain Dis*, 2015, 30(2): 461-467.
- [28] Joseph R, Welch KM, Oster SB, et al. A plasmatc factor may cause platelet activation in acute ischemic stroke [J]. *Circ Res*, 1989, 65(6): 1679-1687.
- [29] Fan J, Li Y, Fu X, et al. Nonhuman primate models of focal cerebral ischemia [J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(2): 321-328.
- [30] 田肇隆, 马艳辉, 李丽, 等. 恒河猴大脑中动脉 M1 段栓塞建模中麻醉方案的选择 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(6): 53-55.
- [31] 匡德宣, 叶尤松, 唐东红, 等. 浅谈兽医在非人灵长类动物实验福利中的作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(1): 55-57.
- [32] 朱华, 李秦, 徐艳峰, 等. 光化学法制作食蟹猴局部脑缺血模型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(9): 32-34.

[收稿日期]2018-03-09



问:单细胞测序技术在肿瘤医学研究中的作用?

答:肿瘤是一种基因疾病,其发病机制包括单核苷酸突变、拷贝数变异、插入/缺失等。肿瘤研究的关键是理解基因的改变在肿瘤发生、发展过程中发挥的作用。随着肿瘤标志物的不断发现及免疫技术的发展,单细胞测序技术的发展为探寻肿瘤发生中基因的改变提供了有力的工具。通过肿瘤标志物运用流式细胞术分选单个肿瘤细胞,并通过细胞测序获得大量信息,在单个细胞水平上,对基因组、转录组、表观组进行高通量测序分析,从而揭示单个细胞的基因结构和基因表达状态,反映细胞间的异质性,为肿瘤的治疗提出一个新的一体化治疗方法。单细胞测序技术不仅在肿瘤医学研究中得到应用,其在发育生物学、微生物学、神经科学等领域也发挥重要作用,正成为生命科学研究的焦点。