

何小夺,吴迪,吴隆飞,等. 非人灵长类动物模型低温治疗方法及在脑卒中模型中的应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 123-127.

He XD, Wu D, Wu LF, et al. Research progress on therapeutic hypothermia and its applications in nonhuman primate models of stroke [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 123-127.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.03.019

非人灵长类动物模型低温治疗方法及在脑卒中模型中的应用进展

何小夺¹, 吴迪^{1*}, 吴隆飞¹, 陈健², 丁玉川¹

(1.首都医科大学宣武医院 中美神经科学研究所,北京 100053; 2.首都医科大学宣武医院神经外科,北京 100053)

【摘要】 近年来由于缺血性脑卒中发病率、死亡率不断攀升,治疗性低温被认为最有前景的神经保护方法,而且低温对脑损伤的保护作用已被众多研究验证并且广泛用于转化研究,但是临床研究始终未发现明确的神经保护作用。局部脑缺血的大动物模型已成为基础科研与临床转化研究间的桥梁,在神经保护研究中具有不可替代的作用。本文总结了多种非人灵长类动物局部脑缺血模型上,治疗性低温的研究进展。旨在推动治疗性低温治疗尽快用于临床研究。

【关键词】 非人灵长类;低温治疗方法;卒中;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 03-0123-05

Research progress on therapeutic hypothermia and its applications in nonhuman primate models of stroke

HE Xiaoduo¹, WU Di^{1*}, WU Longfei¹, CHEN Jian², DING Yuchuan¹

(1. China-America Institute of Neuroscience, Xuanwu Hospital, Beijing 100053, China.

2. Department of Neurosurgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053)

【Abstract】 Ischemic stroke is still a heavy burden due to its higher incidence and mortality rate. Therapeutic hypothermia is considered as the most promising treatment for ischemic stroke. However, there is still an uncertain efficacy in clinical trials despite evidence of efficacy in pre-clinical experiments. Nonhuman primates serve as the bridge between pre-clinical and clinical studies. We summarize recent progress of therapeutic hypothermia in stroke models of nonhuman primates. We want to promote the translation of therapeutic hypothermia in clinical trials.

【Keywords】 nonhuman primate; therapeutic hypothermia; stroke; animal model

缺血性脑卒中是导致严重的功能缺失和死亡的脑血管病之一,目前临床上被证实治疗卒中有效的方法只有溶栓和取栓治疗^[1]。基础研究发现,治疗性低温具有降低局部脑缺血后脑损伤以及减轻

继发性损伤的功效^[2]。但是目前为止治疗性低温在缺血性脑卒中方面的保护作用尚未得到临床证实^[1]。在非人灵长类动物模型上开展的转化研究将为治疗性低温的最终临床应用提供重要的

【基金项目】 国家自然科学基金(81871022);北京市医管局青苗项目(QML20170802)。

【作者简介】 何小夺(1994—),本科,主要从事脑血管病转化方向研究。E-mail: 1214893614@qq.com

【通信作者】 吴迪(1980—),男,博士,副研究员,副教授,研究方向:非人灵长类动物脑缺血模型制备及神经保护研究。

E-mail: di.wu@xwhosp.org

依据^[3]。

非人灵长类(nonhuman primates, NHPs)应用于医学研究已经有很长的历史,由于其在亲缘关系上与人类最接近,与人类的遗传物质有 75%~85% 的同源性,在生理结构以及免疫代谢方面与人类高度相似,是医学研究中具有极高价值的实验动物^[4]。NHPs 在脑卒中转化研究中具有巨大的转化研究优势。相比于啮齿类动物,NHPs 的止血成分、脑组织解剖结构与人类相似,适合作为临床实验前的动物载体。

低温治疗是目前公认的、明确的神经保护作用,可减轻动物和人的各种脑损伤。低温治疗在心脏外科和神经外科手术中应用逐渐广泛,取得良好的脑保护作用,但体温低于 28℃ 时,常诱发心律失常、凝血机制障碍等严重并发症。近期研究发现,脑温下降 2~3℃ 的亚低温对缺血性脑损伤也有保护作用,且无深低温所致的各种并发症,使低温治疗重新引起人们的兴趣^[5]。近几年,使用亚低温治疗脑缺血、脑缺氧和脑出血患者,取得了令人瞩目的研究成果。临床证据表明,轻度至中度低温(降低 2~5℃)可安全有效地减少细胞死亡,改善脑缺血后的功能预后^[6-8]。但是,在临床转化过程中,由于低温诱导速度、持续时间、复温速度等不确定性,近期低温治疗的临床研究均得到阴性结果。鉴于非人灵长类动物在低温转化研究中的重要作用,我们将综述灵长类动物模型上进行的低温研究以及在局部脑缺血模型中的应用。

1 灵长类动物常用低温方法

1.1 全身低温方法

目前常用的全身低温方法包括循环水泵低温、制冷垫低温、置入钛冷却板低温、灌注低温等。这几种方法能够控制液体温度、灌注速度和时间,有利于对灵长类动物模型的温度进行调控。

循环水泵低温方法是由冷却系统控制诱导的,包括一个冷却帽、冷水毯,和一个循环水泵。初始温度 8℃~12℃。所有恒河猴的体温由直肠温度传感器的反馈,有控制算法通过修改水温进行回应。精确控制模型的目标温度,包括轻度低温,温度控制在 35.0℃~36.5℃,中度低温,温度控制在 <35.0℃。这是一种无创的、有效的和精确的方式管理体温,研究中目标体温维持 72 h。这种低温方法选择幼年恒河猴作为动物模型,发现轻度低温可

以降低七氟烷麻醉造成的神经功能损伤,降低凋亡水平。这种方法简便、易于调控,可以严格控制低温目标温度和时长^[9-10]。

另一种常用的全身低温方法为液体灌注,将体温(直肠温度)控制在较低水平。该方法常用于心脏手术中的体外循环过程,经股动脉灌注液体后平均需要(35±7) min 达到目标温度(15℃)。冷却过程中流量逐渐减少至 60 mL/(kg·min)并维持[上套管为 20 mL/(kg·min),下套管为 40 mL/(kg·min)]直至松开主动脉。研究发现,低温的保护作用与降低主动脉阻断后脊髓下胸和腰段的脊髓血流再灌注损伤密切相关。在胸腹主动脉动脉瘤修补术中,低温心肺转流所产生的深度低温可能是一种保护脊髓的有效方法,并可能降低脊髓缺血性损伤的发生率。研究者使用成年雄性狒狒,主动脉钳夹夹闭血管,制作动脉夹夹闭脊髓缺血模型,主动脉钳夹前冷却至直肠温度 15℃,并在此温度下进行体外循环,直到主动脉被松开^[11]。他们发现经过低温后存活下来的动物神经系统损伤显著降低,但是深度低温也伴随了一定的死亡概率。

1.2 局部低温方法

冷热垫(ChillerPad)装置是另一种局部低温方法,包括一个由铸型聚氨酯制成的 20×25 mm 厚的冷垫,泡沫绝缘输入输出油管,电脑控制的泵,热电冷却器。在恒河猴创伤性脑损伤后 2.5 h,将冷却垫放置在硬脑膜上,通过激活水泵和热电冷却装置开始降温。皮质表面迅速冷却到 15℃ 并保持 24 h,随后冷却装置再从 15℃~37℃ 复温。复温方式 2.5℃/h,大约复温 10 h。Ikonomidou 等^[9]选用成年恒河猴,此低温方法可以用于外科手术开颅后、创伤性脑损伤后的局部低温,该方法具有快速降温、低温稳定、复温可控等优点,但是该方法需要局部保留硬脑膜,可能限制其应用^[12]。

另一种局部低温方法采用环形热电设备对大脑皮层表面进行局部冷却。将电热芯片黏在椭圆形的空心铜散热器的底部。通过冷盐水(0℃~4℃, 90 mL/min)灌注到散热器中进行热量交换,实现快速有效的降温。用螺丝将整个冷却装置固定在头骨上,仪器只接触到大脑皮层表面,通过温度控制系统准确控制降温速度、低温水平、持续时间和正常复温。研究中纳入 5 只成年食蟹猴,将低温组温度分别为 20℃、18℃、16℃。他们发现 20℃ 低温对癫痫的控制作用最佳^[13]。另一项研究中将 352

mm² 的钛冷却板埋入猕猴大脑的硬膜外表面,实现低温诱导和维持。7 min 后大脑皮层表面脑温降至 15℃,并保持冷却温度 30 min,通路冷却板灌注低温乳酸林格氏液,实现温度控制。脑表面温度(15±0.2)℃,液体流入温度(12±0.4)℃。冷却停止,停止循环冷却剂,复温时皮层温度同样在 7 min 内升至 35℃,复温时间约 15 min。此方法发现重度低温(15℃)可持续抑制癫痫发作,并且在降温 and 复温过程中没有发现明显的运动异常^[14]。

1.3 自体血低温保护方式

自体血低温也是一种特殊全身低温方法,冷血灌注可迅速降低体温,并使体温降低到一定程度,从而产生有意义的神经保护作用。这种技术在减少手术干扰、设备简单、对血液的需求最小等方面具有全身灌注的优点。同时,由于其通过冷却动物模型的自身血液,对模型目标温度、持续时间的调控更加准确和精准。Schwartz 等^[7]和 Arthur 等^[15]在狒狒上证实低温保护方式。暴露锥动脉、颈内动脉、颈外动脉、颈总动脉,通过颈部的正中切口。局部脑低温通过一个小型热交换器完成。从股动脉中泵出血液经过交换器泵入颈总动脉中的 T 型套管,放置后即刻开始灌注,两椎动脉、颈总动脉立即恢复在灌注,在未灌注侧的颈动脉分叉处和双侧颈外动脉均通过预设的圈套结扎血管。通过一个单独的颈内动脉为大脑提供低温血液,并在很大程度上防止了全身的暖血对脑血管的干扰。灌注开始时的流速与动物的脑血流量相等。达到目标温度,灌注流速就降低到维持水平。大脑温度保持恒定持续的低温灌注 30 min。结果表明,灌注单侧颈总动脉与灌注单侧颈内动脉大脑冷却速度相同、效果一致。低温灌注 7~8 min 后,记录的大脑不同区域的最大温差为 2.7℃。大脑不同区域温度相差约 1℃。单一颈内动脉冷却 34 min 至大脑深部温度 7℃。Mack 等^[16]导管被置入股静脉后进入下腔静脉。造模缺血 6 h 后,冷却到目标温度 32℃持续 3 h(185.3±17.5) min。通过核心温度反馈来控制冷却系统,并在整个卒中诱导、再灌注、冷却和再升温过程中记录核心和大脑温度。用加热毯将动物加热(1.0±0.1)℃/h 到正常核心温度(36.5±0.5)℃用时超过 6 h。^[7,15-17]

通过灵长类动物的脑低温灌注研究发现,该方法降温快速、稳定,低温的大脑可以通过以低流速持续灌注冷血来维持所需的温度水平。体温保持

的相对较好,但全身血压和心率等全身不良反应较为严重,可能显著影响低温保护作用。有研究发现,脑温度维持在 8℃~9℃时,出现 2 只动物死亡现象^[15]。如何保留低温的保护作用,降低其不良反应值得深入研究。

1.4 血管内低温保护方式

Wang 等^[18]采用介入方法,将微导管置于大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA),在正常恒河猴模型上评估局部低温效果。研究者将 100 mL 林格氏液(4℃)经过微导管注入大脑中动脉。经大脑中动脉局部灌注冷的林格氏液能迅速降低大脑皮层和纹状体区的温度,在皮层,降幅从(37.7±0.1)℃降低到(34.0±0.6)℃,在纹状体从(37.6±0.1)℃降至(33.9±0.3)℃。局部大脑中动脉灌注乳酸林格氏液 20 min 后大脑温度降到最低的治疗温度。因此,局部血管内低温具有降温速度快以及血管内介入方法可以协同应用的巨大优势。局部低温林格氏液灌注后直肠温度仅从(37.5±0.2)℃降为(37.1±0.2)℃($P<0.05$)。所监测的主要生理体征指标(血压、动脉血氧含量、呼吸频率、心率等)均在正常范围波动。所有模型动物均能耐受局部低温,未出现手术并发症导致的生命体征变化和行为学改变。以上结果显示,血管内局部低温对于灵长类动物模型具有安全性。

2 低温治疗方法在灵长类动物脑缺血模型中的应用

2.1 ET-1 模型制作

内皮素-1(endothelin-1, ET-1)是一种血管收缩剂,常用来诱导啮齿类动物和猕猴局部脑缺血^[19]。近期有研究报道,采用 ET-1 成功诱导恒河猴局部脑缺血^[6]。ET-1 可诱导非人灵长类动物局灶性脑缺血是研究脑卒中机制及脑卒中后修复的潜在的模型。

以上研究中,通过局部开颅手术,暴露灵长类动物的大脑中动脉,局部给予 ET-1 后,大脑中动脉闭塞,实现局部脑缺血。术后影像学研究显示,注射 ET-1 后 7 d 出现梗死灶、脑水肿等表现,行为学评估发现,模型动物出现手部精细运动障碍等神经功能缺损症状。局部注射 ET-1 的方法易于操作,但是每只模型动物对于 ET-1 反应不完全相同,而且不能控制缺血和再通时间,出现的临床症状通常较轻^[20]。

目前有文献报道给予大鼠 ET-1 诱导局部脑缺

血后,局部低温可以减轻神经损伤。但是,尚无灵长类动物模型的相关报道。由于注射 ET-1 需要开颅,所以首选低温方法应该是置入钛冷却板低温或冰帽低温。优点是可以直接针对大脑物理降温,液体温度、作用时间、流速都是可控的。也可以在再灌注后连接自体血低温或血管内低温。

2.2 动脉夹闭模型制作

研究者通常采用翼点入路法开颅,然后进行动脉夹闭造成局部脑缺血。此方法优点是动脉夹简便易行很容易得到,缺血和再通时间均可控。缺点是由于手术中需要开颅,导致颅内压改变,因此出现的造模后相关并发症,术后创伤感染几率大增,影响术后行为学评估严重时危及实验动物生命^[7,15,21-22]。

Schwartz 等^[7]和 Huang 等^[23]在狒狒上进行动脉夹闭模型的制作,血管闭塞是通过在左侧大脑前动脉近端至前交通动脉处,右侧大脑前动脉近端、左侧锁骨内动脉闭塞处持续放置微型动脉夹来完成的。血管夹闭持续 1~2 h,然后取出夹子以便再灌注^[7,15,21,23]。

由于该模型制备过程中已经开颅,因此可以连接冷热交换器进行局部低温,通过热交换等放实现局部快速降温。同时,也可以给予该模型全身低温方法,观察低温(深度、持续时间、延迟)等因素对明确血管再通情况下的神经保护作用^[15]。另外,由于该方法已经开颅操作,不建议再进行血管内低温或介入手术引导的局部低温,降低低温方法对于模型的影响以及重复手术对动物造成二次伤害。

2.3 血管内介入方法制备脑缺血模型

运用血管内介入的方法进行造模手术,将导管由股动脉以介入方法放入 MCA 分支,阻断血流 2~3 h。栓子可以选用球囊、血栓,血栓模型梗死后使用重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)溶栓并给予自体血低温或血管内低温干预^[8,24-26]。此方法接近临床,基本模拟了临床上血栓栓塞,但是缺点在于:血栓位置很难控制,梗死位置不固定,或者血栓有自溶现象^[24]。

由于该方法已经采用介入方法,因此非常适合进行自体血低温或局部微导管介导的低温干预方法。这两种方法均可以通过控制液体流速和流量的方法实现低温的准确调节^[15]。我们团队近期研究显示,通过微导管局部注射低温盐水,可能实现局部低温,对恒河猴局部脑缺血模型具有明确的神

经保护作用,同时并未影响动物模型的重要生理指标^[8]。

3 动物伦理问题

非人灵长类动物研究应遵守“减少”、“替代”、“优化”(Reduce, Replace, Refinement, 3R)原则,动用非人灵长类动物之前应该先经过其他基础实验验证,例如:细胞→啮齿类动物→比格犬→非人灵长类动物。采用统计学方法,以达到尽量减少非人灵长类动物的使用,尊重动物生命、减少浪费。在手术过程及术后治疗过程中选择恰当的麻醉方式,减少动物痛苦程度。

以各种非人灵长类动物脑缺血模型为基础。相信可以在科研与临床之间起到良好的转化功能。有重大的研究意义。因此可以根据不同的实验需要运用不同的脑缺血模型模拟不同的临床情况,建立重复性好、死亡率低、容易控制、梗死面积相对均一的模型以满足不同的实验目的。

参考文献:

- [1] 吴隆飞, 吴迪, 刘向荣, 等. 脑动脉选择性亚低温治疗缺血性卒中的研究进展 [J]. 中国脑血管病杂志, 2017, 14(3): 155-158.
- [2] Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia [J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13(4): 267-278.
- [3] 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, 62.
- [4] Wu D, Chandra A, Chen J, et al. Endovascular ischemic stroke models in nonhuman primates [J]. Neurotherapeutics, 2018, 15(1): 146-155.
- [5] Wu L, Wu D, Yang T, et al. Hypothermic neuroprotection against acute ischemic stroke: The 2019 update [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 40(3): 461-481.
- [6] Dai P, Huang H, Zhang L, et al. A pilot study on transient ischemic stroke induced with endothelin-1 in the rhesus monkeys [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45097.
- [7] Schwartz AE, Finck AD, Stone JG, et al. Delayed selective cerebral hypothermia decreases infarct volume after reperfused stroke in baboons [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2011, 23(2): 124-130.
- [8] Wu D, Chen J, Hussain M, et al. Selective intra-arterial brain cooling improves long-term outcomes in a non-human primate model of embolic stroke; efficacy depending on reperfusion status [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 40(7): 1415-1426.
- [9] Ikonomidou C, Kirvassilis G, Swiney B, et al. Mild hypothermia ameliorates anesthesia toxicity in the neonatal macaque brain

- [J]. Neurobiol Dis, 2019, 130: 104489.
- [10] Wyatt JS, Gluckman PD, Liu PY, et al. Determinants of outcomes after head cooling for neonatal encephalopathy [J]. Pediatrics, 2007, 119(5): 912-921.
- [11] Rokkas CK, Sundaresan S, Shuman TA, et al. Profound systemic hypothermia protects the spinal cord in a primate model of spinal cord ischemia [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1993, 106(6): 1024-1035.
- [12] King C, Robinson T, Dixon CE, et al. Brain temperature profiles during epidural cooling with the chillerPad in a monkey model of traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2010, 27(10): 1895-1903.
- [13] Ren G, Yan J, Tao G, et al. Rapid focal cooling attenuates cortical seizures in a primate epilepsy model [J]. Exp Neurol, 2017, 9(295): 202-210.
- [14] Inoue T, Fujii M, Kida H, et al. Epidural focal brain cooling abolishes neocortical seizures in cats and non-human primates [J]. Neurosci Res, 2017, 122: 35-44.
- [15] Donald DE, White RJ. Selective brain perfusion in the monkey effects of maintained cerebral hypothermia [J]. J Surg Res, 1962, 2(3): 213-220.
- [16] Mack WJ, Huang J, Winfree C, et al. Ultrarapid, convection-enhanced intravascular hypothermia [J]. Stroke, 2003, 34(8): 1994-1999.
- [17] Mattingly TK, Lownie SP. Cold blood perfusion for selective hypothermia in acute ischemic stroke [J]. Brain Circulation, 2019, 5(4): 187-194.
- [18] Wang B, Wu D, David D, et al. Local cerebral hypothermia induced by selective infusion of cold lactated ringer's: a feasibility study in rhesus monkey [J]. Neurol Res, 2016, 38(6): 545-552.
- [19] Virley D, Sarah J, Jenny C, et al. A new primate model of focal stroke: endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion and reperfusion in the common marmoset [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(1): 24-41.
- [20] Fan J, Li Y, Fu X, et al. Nonhuman primate models of focal cerebral ischemia [J]. Neural Neural Regen Res, 2017, 12(2): 321-328.
- [21] Schwartz AE, Stone JG, Finck AD, et al. Isolated cerebral hypothermia by single carotid artery perfusion of extracorporeally cooled blood in baboons [J]. Neurosurgery, 1996, 39(3): 577-582.
- [22] Cook DJ, Teves L, Tymianski M, et al. Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain [J]. Nature, 2012, 483(7388): 213-217.
- [23] Huang J, Mocco J, Choudhri T, et al. A modified transorbital baboon model of reperfused stroke [J]. Stroke, 2000, 31(12): 3054-3063.
- [24] 吴迪, 何小夺, 陈健, 等. 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 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(5): 16-20.
- [25] 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.
- [26] 张默, 吴迪, 何小夺, 等. 多参数高场强磁共振成像评估恒河猴急性脑梗死血栓-溶栓模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(5): 1-5, 111.

[收稿日期]2020-07-13