

中国实验动物学会实验动物模型研发报告

实验动物模型名称 (中、英文)	长爪沙鼠半脑缺血再灌注损伤模型 Hemispheric Cerebral Ischemia-reperfusion Model in Mongolian gerbils		
申请人(单位)名称	首都医科大学基础医学院		
研究机构(人)地址	北京市丰台区右安门街道西头条10号		
研究机构(人)电话	010-83950423		
主要参与人员及单位	杜小燕、伍颖、陈振文、路静、郭萌、吕建祎、李长龙、霍学云、刘欣、曹立雪，首都医科大学基础医学院； 杨利峰、赵德明，中国农业大学动物医学院。		
研究起止日期	2021年1月至2023年1月		
原始资料的保存地点	首都医科大学基础医学院科研楼713实验室		
联系人姓名	杜小燕	电话: 13683251095	邮箱 duduyan@ccmu.edu.cn
一、摘要(简述研究的目的是和意义, 主要造模方法, 与临床的相似度及评价方法, 概述模型的创新点和应用价值) 长爪沙鼠因具有先天的 Willis 变异缺失特性成为制备脑缺血模型的理想实验动物。但其 Willis 环变异缺失类型多样, 导致成模率低且症状不稳定。尤其是脑缺血再灌注(Ischemia-reperfusion, I/R)模型还缺乏标准化评价体系, 桎梏了该模型动物的推广应用。本研究利用脑缺血高发长爪沙鼠近交系, 通过单侧颈总动脉结扎引发半脑缺血, 打开活结实现再灌注; 同时总结了 I/R 后动物症状变化, 拟定了详细的评分标准, 建立了以症状为导向的再灌注模型制备方法。我们在再灌注不同时间点, 通过转棒实验、抓力评分来评估运动能力变化, TTC 染色判定梗死灶大小; H&E 和 Nissl 染色评估组织病理学变化和神经元死亡情况。结果表明, 以该方法制备的半脑缺血再灌注损伤模型成功率为 56%, 即 57 只长爪沙鼠中有 32 只具有典型的疾病特征, 雄性长爪沙鼠模型死亡率显著高于雌性长爪沙鼠。制备成功的 I/R 长爪沙鼠在再灌注后 1d 后出现运动能力和抓力显著降低, 形成明显梗死灶, 出现组织水肿、神经元萎缩死亡、空泡化结构等典型病理特征, 并随再灌注时间延长而出现部分程度地恢复。本研究对长爪沙鼠单侧颈总动脉结扎 I/R 模型总结了完整的方法论, 建立了长爪沙鼠 I/R 模型的标准化体系, 为其更广泛的应用提供了新的可能性。 二、研究报告正文(可以附件形式编制, 编制要点附后) 见附件。			

中国实验动物学会动物模型研发报告编制要点

一、动物模型的命名

参考国际实验动物命名通用原则，结合动物模型类型的 I、II 和 III 级分类法进行联合命名，即“疾病+动物品种+造模方法”进行命名，命名时应尽量细化。中医药动物模型应体现中医药特点。需用中英两种文字命名。

二、研究背景

研究目的及意义；国内外研究进展并附参考文献。

三、动物模型的制备方法

包括实验材料、实验环境、实验操作规程等内容。对涉及的实验动物、实验试剂、检测仪器应标明详细信息，并符合国家相关规定。

四、动物模型的评价与验证

基于模型制备三原则（表观效度、预测效度以及结构效度）对模型指标进行评价，其中包括整体行为特征、组织器官、细胞和分子等在内的指标评价体系。

评价方法包括以整体实验为主，涵盖行为、影像、生理生化和组织切片等技术方法进行详细介绍。采用的仪器设备、试剂应满足模型评价的要求，指标完善，条件稳定。

评价指标包括核心指标（如特异的基因改变、特异的染毒病原株或高载量病毒核酸、特异性免疫抗体）；主要指标（模拟人类疾病临床症状和体征、易感器官的特征性改变和特异性生物标志物）；重要指标（模拟疾病某些方面的改变的指标）和辅助指标。

应包括阳性药物对其指标的证实效应。

应说明重复验证的批数。

中医药模型应有体现中医药特点的评价指标。

五、动物模型的生物安全性

动物模型的制备和应用实验必须在具备相应资质的实验室开展。动物模型的制备、应用过程中的监督管理、处置措施、对环境和生态影响等应符合国家相关法律规定。

六、讨论和结论

总结该模型鉴定和评价的技术方法和指标体系；分析该模型与国内外现有模型的异同；讨论该模型的技术难点、创新性和应用价值。

七、有助于动物模型鉴定和评价的其它材料

其它有助于评价的材料，包括第三方应用机构的证明、在行业一流学术刊物上发表学术论文和引用情况等材料。详细材料以附件形式一并提交。

附件：

研究报告

一、动物模型名称

长爪沙鼠半脑缺血再灌注损伤模型(Hemispheric Cerebral Ischemia-reperfusion Model in Mongolian gerbils)

二、研究背景

1. 目的

我们开发了一种以症状为导向的方法来建立沙鼠半脑I/R模型，并从运动能力、神经行为、脑梗塞大小和组织学变化等多方面对模型进行评估，从而形成一套完整的沙鼠I/R模型评估体系。

2. 意义

I/R后的神经修复过程决定了患者的结局，再灌注后尽量减少脑损伤从而减少I/R致残和死亡率一直都是亟待解决的重要临床问题。还原度高、重复性好和经济高效的I/R动物模型是研究的基础。长爪沙鼠因其独特的脑血管变异特征，一直被科研人员当做优质脑缺血模型动物。I/R模型的开发将进一步推动长爪沙鼠，这个源自我国的实验动物资源物种，在神经性疾病的运用与发展，为I/R的研究提供更新和更好的动物模型。

3. 背景

脑卒中（脑血管疾病）是全球第二大死亡原因和第三大致残原因^{1,2}。缺血性脑卒中占脑卒中病例的 80%-85%，在中国和全世界都有很高的发病率和致残率³。为了深入研究脑缺血病理机制和发现有效治疗靶点，建立简单、可重复性高且稳定的动物模型至关重要。目前，大小鼠、非人灵长类动物、兔子和猪是脑缺血的主要实验动物，而啮齿类动物因繁殖力强、体型小、成本低，在用作脑缺血模型动物时具有多种优势⁴。

长爪沙鼠（*Meriones unguiculatus*）是属于仓鼠科、沙鼠亚科、沙鼠属的一种啮齿类动物⁵。它们自上世纪便被作为实验动物，广泛应用于脑神经学、寄生

虫学、微生物学、内分泌学、营养学、新陈代谢学、药理学、肿瘤（胃癌）、癫痫、听力和焦虑症等多个领域，因此被称为“多功能实验动物”^{5,6}。早在1969年 Levine S 等发现该动物具有脑底动脉 Willis 环前后交通支变异缺失的解剖特点⁷，因此长爪沙鼠一直被视作脑缺血研究的理想动物模型⁴，可通过简单的单侧或双侧颈动脉结扎来制备脑缺血模型^{6,8}。目前大多数研究采用双侧颈动脉闭塞（BCO）来制作沙鼠全脑缺血模型，而单侧颈动脉闭塞（UCO）模型因为其Willis缺失类型复杂多样导致其成功率和稳定性都很低⁹。针对这一问题，我们通过选择性筛选培育出一个Willis环缺失程度高的长爪沙鼠近交系，即脑缺血长爪沙鼠（CIMG），其 UCO 模型的成功率显著提高到 75% 以上¹⁰，为长爪沙鼠作为脑缺血模型的应用提供了有力支持。

缺血后大脑血液供应中断会引发一系列病理生理过程，而随后的血流恢复和复氧是治疗缺血的必经途径，但又可能会进一步加重脑组织损伤，这种现象被称为再灌注损伤¹¹。例如，组织纤溶酶原激活剂（rt-PA）是一种临床中恢复血液灌注的有效疗法，但其治疗后的再灌注损伤仍是限制大多数中风患者恢复的重要原因¹²。研究再灌注损伤引起的继发性神经损伤对于了解血栓性脑缺血患者的生理病理恢复和探索治疗靶点至关重要，然而长爪沙鼠作为优质脑缺血模型，目前缺少统一和明确的缺血再灌注模型制备方法流程和评价体系。因此，开发沙鼠缺血/再灌注（I/R）模型并建立标准化评估系统迫在眉睫。

三、动物模型的制备方法

1. 实验动物

采用自行培育的脑缺血高发长爪沙鼠近交系 66 只，其中 57 只（34 只雄性，23 只雌性）用于评估缺血再灌注不同时间后运动能力、抓力、神经行为学及梗死体积评估；9 只（8 只雄性，1 只雌性）用于再灌注不同时间后组织病理变化的观察。动物饲养于半透明塑料笼盒中，每笼的动物不超过 5 只，环境温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 55%至 65%，动物可自由采食。动物实验经首都医科大学科学与伦理委员会批准（伦理号 AEEI-2020-042）。

2. 材料与仪器

药品：异氟烷、75%消毒酒精、生理盐水、碘伏

器材：手术刀、剪刀、弯头镊、止血钳、持针器、缝合针、4-0 非吸收手术缝合线

仪器：小动物吸入麻醉机

3. 脑缺血再灌注长爪沙鼠单侧颈总动脉结扎模型制备流程及再灌注节点判定

3.1 制备模型的手术方法与流程

为解决 UCO 半脑缺血再灌注模型因长爪沙鼠 Willis 环变异类型的差异而异常质高和成功率低这一问题，利用脑缺血高发近长爪沙鼠近交系，首次采用以症状为导向的造模思路，即以缺血后神经行为学症状评分为标准决定再灌注时机，系统地建立了症状、表型更为一致和稳定的长爪沙鼠 I/R 模型。

长爪沙鼠异氟醚麻醉后，颈部进行酒精消毒和备皮。正中位开口，暴露气管后弯镊钝性剥离右侧颈总动脉，长约 10 cm 的 4-0 号不可溶性手术缝合线穿过右侧颈总动脉，以活结结扎实现右侧脑半球缺血，表皮进行缝合、消毒；结扎手术线留出端口，结扎时间通常在 20 min 至 1 h 不等，当长爪沙鼠出现快速转圈或翻转症状后、即神经行为学评分在 5-6 之间（见表 1）等待 15 min，经短暂异氟醚麻醉后从体外解开活结，以实现再灌注（图 1）。

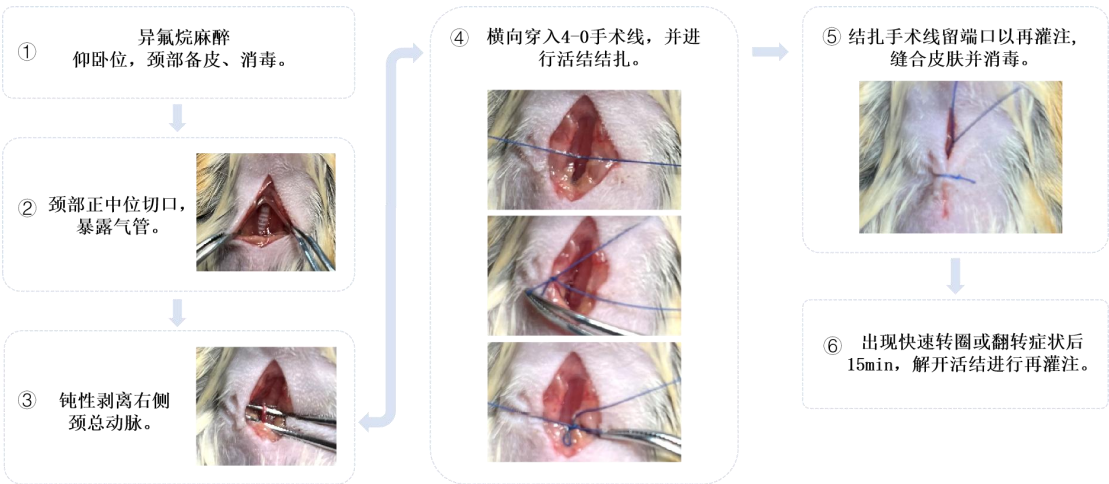


图 1 长爪沙鼠单侧颈总动脉结扎制备脑缺血再灌注模型的手术操作方法和流程。

3.2 用拟定神经行为学评分系统判定再灌注节点

脑缺血再灌注损伤后，不可逆的神经元损伤会引起患者行为学功能障碍。通过神经行为学判断模型动物的大脑损伤情况是脑 I/R 损伤研究的主要手段。在小鼠脑缺血 MCAO 模型中，Longa 与 Bederson 评分系统的标准太粗略，导致区分度低，而较为全面详细的 mNSS 评分却无法完全适用于长爪沙鼠（例如长爪沙鼠攀爬能力相对于小鼠交弱，无法完成平衡木测试）。在此，我们针对 UCO 法制备的长爪沙鼠 I/R 模型的再灌注后症状和表型进行了总结和评分划分，并将再

灌注后的症状评分与模型动物结局相联系，为后续长爪沙鼠 I/R 模型的制备提供了针对性、准确性的评估方法（表 1）。

表 1：长爪沙鼠 I/R 模型神经行为学评分等级
Table 1: Neurobehavioral scores of I/R models in Mongolian gerbils

评分	症状
1	无症状。
2	缺血侧出现眼睑下垂或闭眼。
3	提起鼠尾离地 30cm，缺血侧前肢无法完全伸展，轻微内曲，不完全影响活动或使用。
4	提起鼠尾离地 30cm，缺血侧前肢完全向内曲，且无法正常伸展活动。
5	向缺血侧转圈，或头肩向缺血侧偏倚。
6	向缺血一侧快速转圈，或身体向缺血侧严重倾斜跛行、偏瘫。
7	身体进行快速翻转、直立跳跃现象，或伴随缺血侧眼球出血。
8	严重偏瘫，无法行动，缺血对侧后肢无力，呼吸急促。
9	无意识，失去行动能力，身体蜷曲，呼吸微弱。
10	死亡。

四、动物模型的评价与验证

1. 评价方法

1.1 抓力评分

将动物水平置于由直径为 3mm 的横杆组成的爬架上，高于桌面 30cm。当前肢抓握横杆后，将爬架快速翻转至垂直，致使动物由四肢抓握悬挂于爬架上，此时开始计时，记录动物从翻转爬架至掉落的悬挂时间来评估动物四肢抓力。评分规则如下：悬挂时间≥10s，记为 0 分；10s>悬挂时间≥5s，记为 1 分；5s>悬挂时间≥1s，记为 2 分；悬挂时间为 0s，记为 3 分。评分越高表示前肢抓力损伤越严重。

1.2 转棒实验

转棒实验分为获得阶段和实验阶段两个部分。获得阶段：将长爪沙鼠置于旋转棒上，以 9rpm 进行匀速转动训练，每次 2min，每天连续 3 次，共 3 天。实验阶段：将动物置于旋转棒上，使其以初始速度为 0rpm，加速度 5rpm/min，最大速度为 15rpm 进行运动，时长 2min，记录动物掉落时间（即转棒上运动时间）。

1.3 TTC 染色

I/R 模型长爪沙鼠脑组织取出后放入模具置于冰上,切成 5 个厚度为 2mm 的均匀冠状切片,将脑切片统一朝向放入 37℃预热的 2%TTC 染液中,避光染色 10min。同面朝上进行拍照,利用 Image J 分析脑梗死体积。梗死率 (%) = $\frac{\sum \text{各切片梗死区域面积}}{\sum \text{各切片面积}} \times 100\%$ 。

1.4 Nissl 染色

厚度为 5 μ m 的脑组织石蜡切片经过二甲苯脱蜡、梯度酒精复水及蒸馏水洗涤后, Nissl 染色液 (Beyotime, C0017) 染色 10min, 神经元中的尼式小体被染色为紫红色,再分别经过蒸馏水洗涤、梯度酒精脱水及二甲苯透明,最后中性树胶封片晾干后,显微镜拍照及观察分析。

1.5 H&E 染色

厚度为 5 μ m 的脑组织石蜡切片经过二甲苯脱蜡、梯度酒精复水及蒸馏水洗涤后,苏木青染色 5min,流水冲洗后使用 1%盐酸乙醇分化数秒,蒸馏水洗涤后伊红染色 3min,蒸馏水洗涤后梯度酒精脱水和二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜拍照及观察分析。

2. 评价与验证结果

2.1 行为学评价

脑卒中具有高致残性的特点,为了评估本研究建立的 I/R 模型,我们分别在再灌注 1、3、7d 时对 I/R 模型长爪沙鼠的体重、抓力、运动能力进行了评估。再灌注后 1d, I/R 长爪沙鼠出现了显著的体重降低,直至再灌注 3d 至 7d 体重在一定程度恢复 (图 2A); I/R 长爪沙鼠再灌注后 1d 的抓力损伤评分显著升高,并在再灌注 3-7d 呈现恢复趋势 (图 2B); 与以上结果相一致,再灌注 1d 后的 I/R 长爪沙鼠运动能力 (图 2C) 的下降最为显著,而后再灌注 3-7d,运动能力逐步恢复。总体来说,我们采用以症状为导向制备的长爪沙鼠 I/R 模型在再灌注 1d 后就显著出现了体重、抓力、运动能力的下降,随后呈现恢复趋势。这些结果符合脑 I/R 病人的临床表现,表明该模型能够成功模拟人类脑 I/R 的病理过程和典型的病理表型。

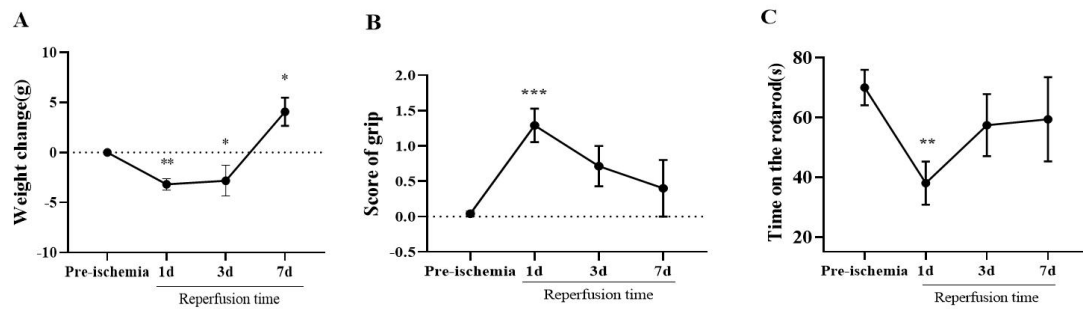


图 2: 在 I/R 后 1、3 和 7 d, 记录沙鼠体重变化(2A), 用抓握评分检测前肢力量(2B), 通过转棒实验测量运动能力(2C)。

Figure 2: At 1, 3 and 7 d after I/R, gerbils body weight changes were recorded(3A), forelimb strength was detected by griping score(2B), motility ability was measured by rotarod test(2C).

2.2 病理组织学评价

利用我们的方法制备的 I/R 模型中, 再灌注 1 d 可在缺血半球出现明显的梗死灶, 在随后的 3-7 d 时梗死灶在逐步恢复 (图 3)。缺血区域的神经元死亡是形成梗死灶的主要表现, 神经元死亡是 I/R 损伤的直接表现。我们通过 Nissl 染色检测了长爪沙鼠 I/R 模型再灌注不同时间神经元的死亡情况。结果表明, 再灌注 1 d 时, 缺血半脑的海马区、皮层和中脑区域的神经元均出现显著死亡, 再灌注 3 d 至 7 d 后则呈现不同程度的恢复 (图 4)。H&E 染色结果表明, 脑缺血再灌注后 1d 缺血半脑皮层组织水肿明显, 梗死区域细胞周围间隙变宽呈现空泡样结构, 神经元细胞核皱缩死亡, 再灌注 3 d 和 7 d 时水肿逐步恢复, 空泡样结构减少, 但仍存在神经元死亡皱缩 (图 5)。

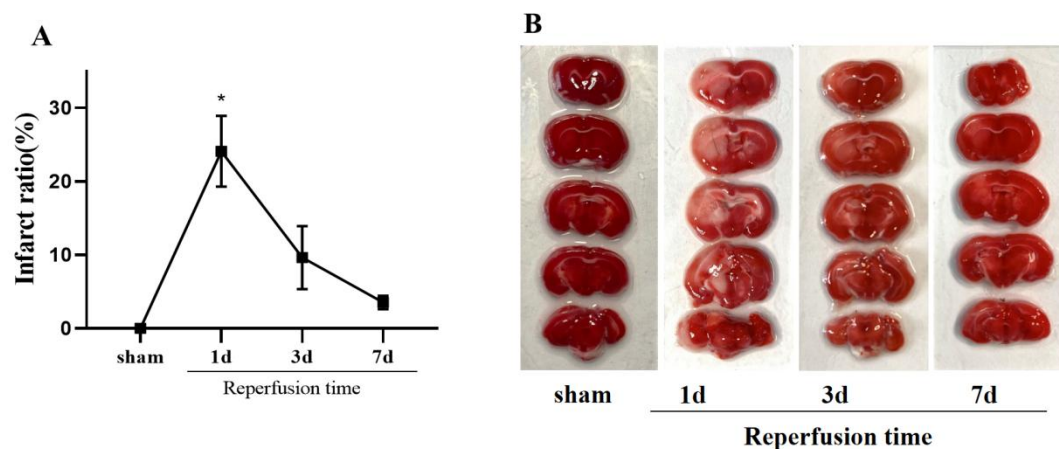


图 3: TTC 染色检测长爪沙鼠 I/R 模型再灌注 1、3、7 d 后梗死体积变化。

Figure 3: Changes in infarct volume after 1, 3, and 7 d of reperfusion in the I/R model gerbis were detected by TTC staining.

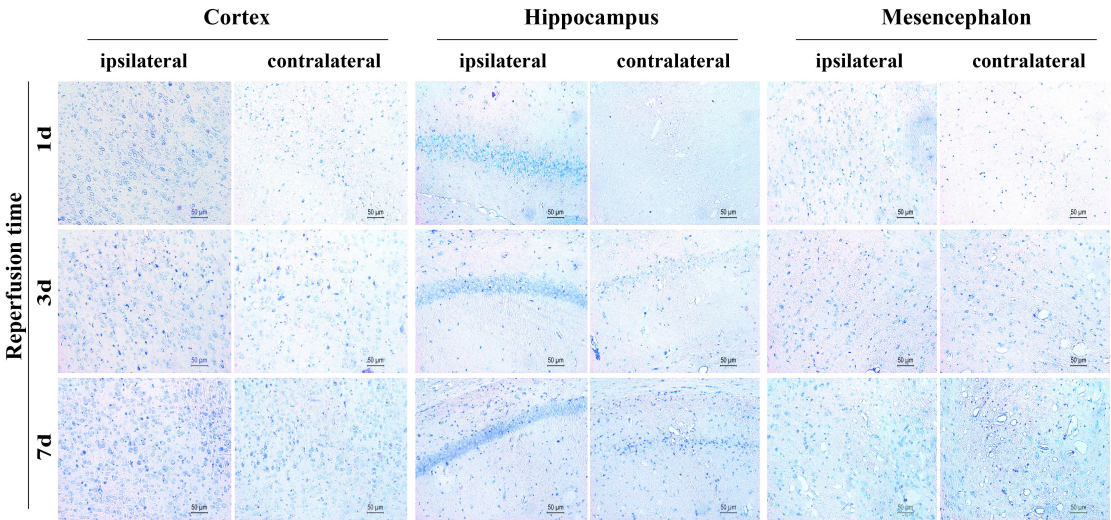


图 4: Nissl 染色检测长爪沙鼠 I/R 模型再灌注 1、3、7 d 后大脑皮层、海马区、中脑的神经元丢失。

Figure 4: Loss of neuron of the cerebral cortex, hippocampus and mesencephalon after 1, 3 and 7 d of reperfusion in the I/R gerbils by Nissl staining.

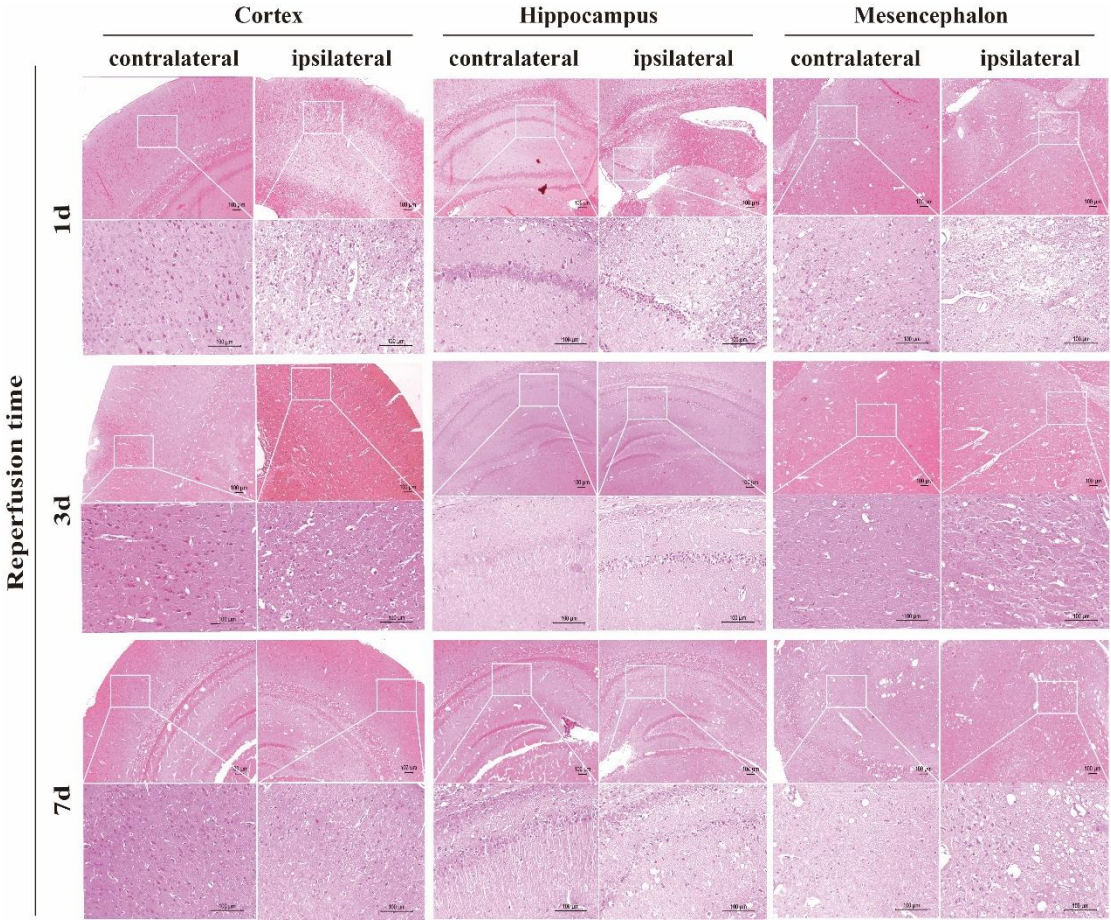


图 5: H&E 染色检测长爪沙鼠 I/R 模型再灌注 1、3、7 d 后大脑皮层、海马区、中脑的病理

特征。

Figure 5: Pathological features of the cerebral cortex, hippocampus and mesencephalon after 1, 3 and 7 d of reperfusion in the I/R gerbils by H&E staining.

2.3 模型成功率、重复性及其应用

模型制备时，在原有 UCO 制备缺血模型的基础上，以症状为导向确定再灌注时间，以症状反映脑损伤程度，能有效避免因 Willis 环变异缺失类型差异而造成的成模率低的问题。以该方法制备的 57 只长爪沙鼠 I/R 模型中，56%（32 只）沙鼠在再灌注 24h 后成功存活并表现出闭眼、转圈、翻转等相应缺血脑损伤典型症状，25%沙鼠再灌注 24h 内发生死亡，19%无症状（图 6A-C）。同时，我们发现 I/R 模型中，雄性沙鼠的死亡率（25.3%）显著高于雌性沙鼠（9%）（图 2D）。

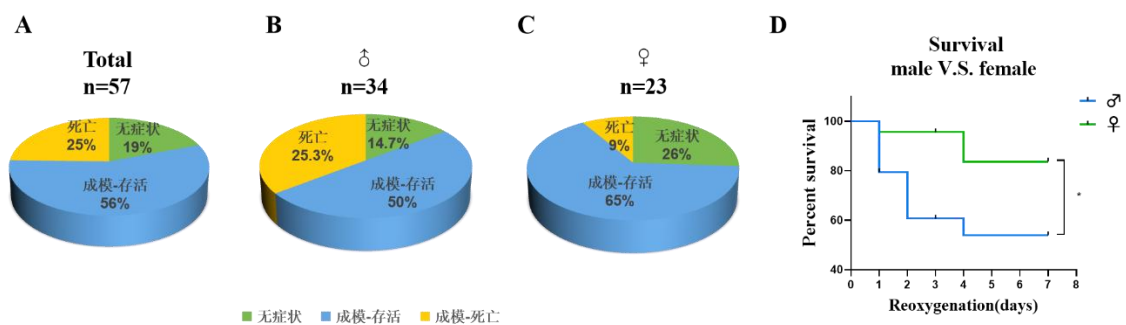


图 6: 再灌注 24h 后 I/R 长爪沙鼠的成功率、死亡率及无症状率饼状图（6A-C）。雌雄 I/R 长爪沙鼠再灌注 7d 后的生存率（图 6D）。

Figure 6 : Pie chart of success, mortality and asymptomatic rate of I/R gerbils after 24h reperfusion(6A-C). Survival of male and female I/R gerbils after reperfusion 7d (6D).

在脑卒中的临床治疗中，由于脑卒中的病理机制尚不完全清楚，目前阿替普酶是一种组织纤溶酶原激活剂(tPA)，是唯一一种美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration)批准的用于缺血性中风中血栓形成/闭塞血管系统再通的血栓阻断药物。但对于再灌注后的神经修复，在临床中并无明确的治疗药物，因此在该模型无法进行阳性药物对其指标的证实效应。但在本团队后续的研究中，我们在探究半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C（Cystatin C, CysC）的 I/R 后神经保护作用及机制研究中，我们对长爪沙鼠 I/R 模型进行了重复，并得出了差异性结果。CysC 在多个研究中表现出神经保护作用，并且也有研究发现 CysC 对于脑缺血具有保护作用¹³。在我们对研究外泌体装载的 CysC 神经保护作用及其机制研究中，成

功利用了本模型及其评价体系。在该研究中，我们使用了 42 只脑缺血高发近交系长爪沙鼠来制备 I/R 模型，成功制备了 24 只长爪沙鼠半脑 I/R 损伤模型（成功率为 57.14%），由此可见该模型的成功率比较稳定。另外，我们在该研究中运用了新拟定的神经行为学评分系统，以及其他的评价指标。如图 7 所示，我们成功发现，相比与 I/R 长爪沙鼠（I/R 组）和 I/R 后注射载体对照外泌体的长爪沙鼠（I/R+OC-Exo 组），经过 I/R 手术后注射外泌体 CysC 的长爪沙鼠（I/R+OE-Exo 组）神经行为学损伤评分降低（图 7B），运动能力得到提高（图 7C），并且抓力损伤显著降低（图 7D），体重下降更少（图 7E），梗死灶变小（图 7F-G）（未发表数据）。在该部分的研究内容中，该模型制备成功率相对稳定，并且在探究外泌体装载神经保护因子 CysC 的作用中，我们也得到了重复性较好的结果，也证明了该模型的可行性。

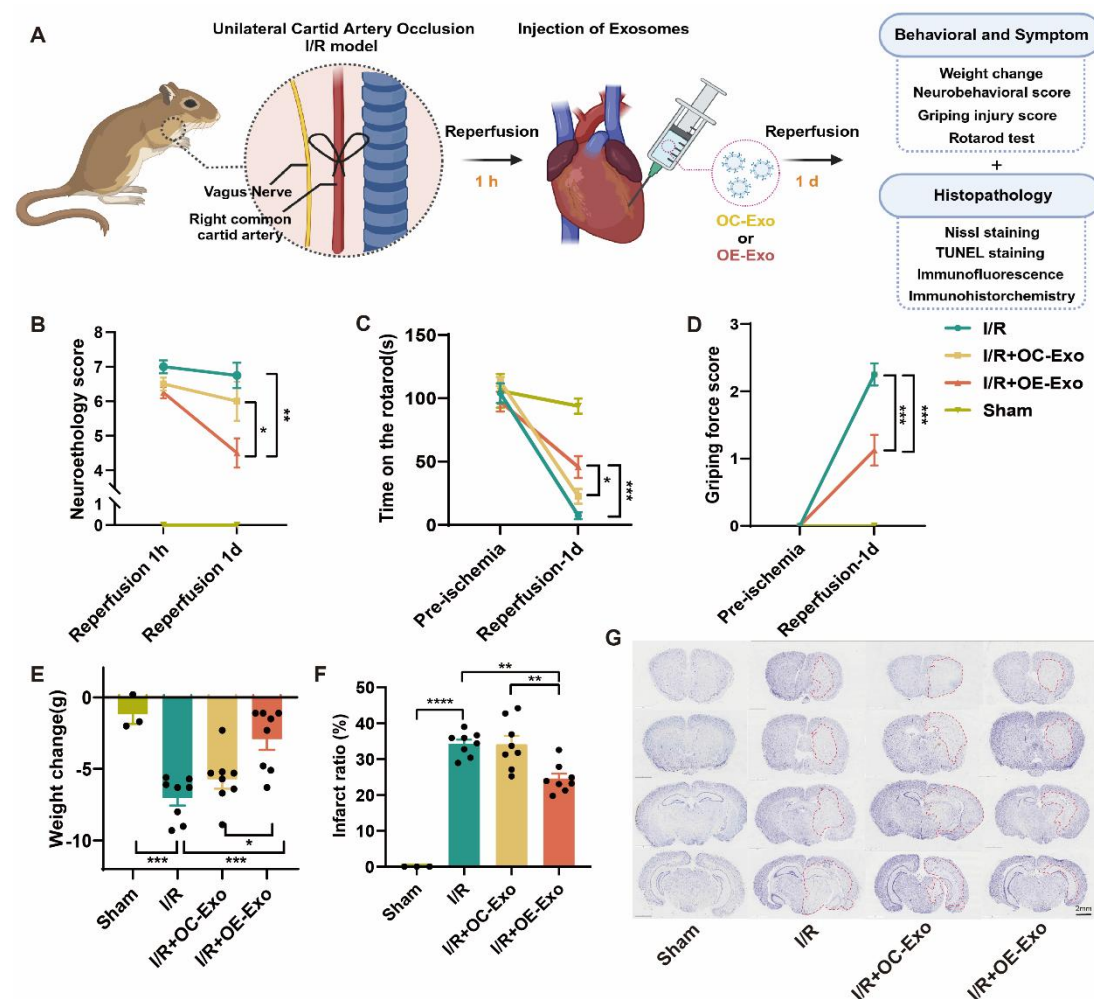


图 7: I/R 手术后立即给沙鼠腹腔分别注射 100 μ g OC-Exo 和 OE-Exo (7A)，再灌注 1 d 后检测沙鼠神经行为评分 (7B)、转棒实验 (7C)、握力评分 (7D),并记录体重变化 (7E)。

脑组织切片的 Nissl 染色显示了梗死区域，用 Image J 计算了单个切片的梗死面积，并计算和统计了相对梗死体积（%）（7F，G）。

Figure 7: Immediately after I/R surgery, gerbils were intraperitoneally injected with 100 μ g of OC-Exo and OE-Exo, respectively, and gerbils were examined for body weight recordings (7C), neurobehavioral scores (7D), rotarod test (7E), gripping force scores (7F), and infarct foci (7A-B) after reperfusion 1 d. Nissl staining of gerbil brain tissue sections showed infarcted areas, and the infarcted area of individual sections was calculated by Image J. Relative infarct volume (%) was calculated and counted (Figure 7A-B).

五、动物模型的生物安全性

首先，该模型动物的饲养和繁育符合生物安全要求；本模型使用的是本实验室自行培育的脑缺血高发近交系，饲养于清洁环境中，严格遵守实验动物饲养管理原则，符合标准的饲养和喂养要求，除普通动物应排除的病原外，不携带对动物危害大和对科学研究干扰大的病原体的实验动物。**其次，该模型制备过程安全；**在模型制备过程中，除麻醉药物外，无需任何危险性药品，操作简便，并且整个造模过程均在特定实验室完成，不存在生物安全风险。**最后，实验动物的使用严格遵守伦理和实验动物管理要求；**实验完成的动物均采用颈椎脱臼的方式进行处死，实验动物尸体消毒后用专用塑料袋进行包装密封后置于-20℃冰箱集中处理。综上，该动物模型具不存在生物安全隐患。

六、讨论和结论

研究脑缺血的致病过程需要基因稳定且可重复的动物模型¹⁴。目前最常见的脑缺血模型是大鼠和小鼠^{15,16}。长爪沙鼠作为源自我国的实验动物资源，与啮齿类动物一样，具有“繁殖快、成本低”的优点，而且由于先天性 Willis 环变异缺失，具有制作脑缺血模型手术简单的优势。此前，沙鼠主要通过 BCO 法制备脑缺血模型¹⁷，只有 38% 的普通沙鼠在结扎 BCO 后出现典型症状¹⁸。脑缺血模型在沙鼠身上难以实践和利用主要有两个原因：首先，野生沙鼠的 Willis 环形态各异，导致 Willis 环缺失的发生率较低。因此，我们通过定向选择成功培育了脑缺血高发的近交系长爪沙鼠（Cerebral Ischemia Mongolian Gerbil, CIMG），其中几乎 100% 的 CIMG 都表现出 Willis 环后交通支缺失，UCO 缺血模型的比例则提高到 75% 以上¹⁰。然而，在利用 CIMG 动物建立 I/R 模型时，我们发现很难

在统一结扎时间和再灌注时间下建立一个稳定的模型，因为 Willis 环的异质性仍然存在。本研究首次采用了症状导向原则（以缺血后神经行为症状作为决定再灌注时间点的标准），利用脑缺血发生率较高的 CIMG 近交系沙鼠，提高了脑缺血发生率。

缺血性卒中占卒中的 80%以上，已成为中国成人死亡和致残的主要原因¹⁹。溶栓是治疗缺血的首选方法。不幸的是，I/R 损伤经常发生在手术溶栓后的严重再灌注过程中，这会导致相对密集的血液恢复和氧气供应，进而导致进一步的脑损伤²⁰。要研究 I/R 脑损伤，必须先建立脑 I/R 损伤模型，但遗憾目前还没有建立标准的沙鼠 I/R 模型，沙鼠 I/R 的评价体系也没有建立。在本研究中，我们首先总结了以神经行为症状作为再灌注后脑损伤程度标志的方法，以打破 Willis 环多重变异差异造成的障碍。用这种方法制备的半脑 I/R 沙鼠，具有典型缺血症状特征的存活率达到 56%，与小鼠 MCAO 模型(70%)²¹ 和大鼠 MCAO 模型（约 50%）²² 的成功率相当。重要的是，与广泛使用的 MCAO 方法相比，我们建立的模型操作更简单、更快捷²³。沙鼠在 I/R 后体重变轻，运动功能受损，再灌注后 1 天出现明显梗死灶，并且梗死半球在组织学上表现出神经元萎缩和死亡、空泡化结构和水肿。

在建立模型评估系统的过程中，我们发现雄性沙鼠的成功率高于雌性沙鼠，这与我们之前用沙鼠制作持续性缺血模型的研究结果并不相符。然而，更多的研究报告表明，女性在脑缺血或 I/R 过程中受到的损伤比男性小²⁴，可能的解释是雌激素水平可能在 I/R 过程中起关键作用²⁵。因此，这一结果表明，本研究建立的沙鼠 I/R 模型具有研究涉及性别效应的 I/R 发生机制的有效性。

本研究在很大程度上改进了所描述的建立沙鼠脑 I/R 模型的方法。更重要的是，我们还创建了一个集行为学、组织学和病理学于一体的标准化的大沙鼠 I/R 模型评价体系。它为脑 I/R 损伤的病理研究提供了一种新的动物模型系统和方法，促进了沙鼠的深入应用和发展。

六、有助于动物模型鉴定和评价的其它材料

我们团队多年来通过定向筛选的方式，成功培育了长爪沙鼠脑缺血近交系，将长爪沙鼠的Willis环缺失比例达到了76.62%，并且使通过双侧颈总动脉结扎制备缺血模型的成功率达到了88.89%¹⁰。我们所培育的长爪沙鼠脑缺血近交系，已

通过了专家和机构的鉴定，被认定为中国实验动物资源新品系（见支撑材料），是国内外首个脑缺血模型近交系，具有自主知识产权。长爪沙鼠脑缺血近交系使UCO法制备I/R模型的改进成为可能。

References:

1. Corrigendum to: World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke*. 2022;17(4):478
2. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2023;147(8):e93-e621
3. Zhou M, Wang H, Zeng X et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2019;394(10204):1145-1158
4. Li Y, Zhang J. Animal models of stroke. *Animal Model Exp Med*. 2021;4(3):204-219
5. Ruiz T, Vilamaior P, Grigio V et al. The Mongolian Gerbil as a Useful Experimental Model in Reproductive Biology. *Reprod Sci*. 2023;30(7):2092-2106
6. Wang Y, Zhao P, Song Z et al. Generation of Gene-Knockout Mongolian Gerbils via CRISPR/Cas9 System. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:780
7. Levine S, Sohn D. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch Pathol*. 1969;87(3):315-7
8. Guan X, Li Z, Zhu S et al. Galangin attenuated cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibition of ferroptosis through activating the SLC7A11/GPX4 axis in gerbils. *Life Sci*. 2021;264:118660
9. Du X, Li C, Guo M et al. Evaluation of an ischemic model in ischemia prone and general Mongolian gerbils by neurological symptom, injury, and sex difference. *Animal Model Exp Med*. 2018;1(01):62-67
10. Li C, Du X, Wang D, Chen Z. Advances in research of the establishment of an inbred Mongolian gerbil model of cerebral ischemia and its mechanism of pathogenesis. *Acta Laboratorium Animals Scientia Sinica*. 2018;26(04):512-517
11. Li M, Tang H, Li Z, Tang W. Emerging Treatment Strategies for Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Neuroscience*. 2022;507:112-124
12. Zhang Q, Jia M, Wang Y, Wang Q, Wu J. Cell Death Mechanisms in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Neurochem Res*. 2022;47(12):3525-3542
13. Fang Z, Deng J, Wu Z et al. Cystatin C Is a Crucial Endogenous Protective Determinant Against Stroke. *Stroke*. 2017;48(2):436-444
14. Ma R, Xie Q, Li Y et al. Animal models of cerebral ischemia: A review. *Biomed Pharmacother*. 2020;131:110686
15. Zhang P, Huang Z, Yan HQ et al. Improvement of the suture-occluded method in rat models of focal cerebral ischemia-reperfusion. *Exp Ther Med*. 2014;7(3):657-662
16. Sun T, Wang P, Deng T et al. Effect of Panax notoginseng Saponins on Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion in Rat Models: A Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2020;11:572304
17. Leon-Moreno LC, Castaneda-Arellano R, Rivas-Carrillo JD, Duenas-Jimenez SH. Challenges and Improvements of Developing an Ischemia Mouse Model Through Bilateral Common Carotid Artery Occlusion. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2020;29(5):104773
18. Hatakeyama T, Matsumoto M, Brengman JM, Yanagihara T. Immunohistochemical investigation of ischemic and postischemic damage after bilateral carotid occlusion in gerbils. *Stroke*. 1988;19(12):1526-34
19. Wu S, Wu B, Liu M et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention,

and management. *Lancet Neurol.* 2019;18(4):394-405

20. Vongsfak J, Pratchayasakul W, Apaijai N et al. The Alterations in Mitochondrial Dynamics Following Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(9)
21. W W, S X, H T, M X. Establishment and optimization of mice brain ischemia reperfusion model. *Progress in Modern Biomedicine*. 2010;10(01):70-73
22. Prieto R, Carceller F, Roda JM, Avendano C. The intraluminal thread model revisited: rat strain differences in local cerebral blood flow. *Neurol Res*. 2005;27(1):47-52
23. Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS et al. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(8):1412-31
24. Liao S, Chen W, Kuo J, Chen C. Association of serum estrogen level and ischemic neuroprotection in female rats. *Neurosci Lett*. 2001;297(3):159-62
25. Vahidinia Z, Karimian M, Joghataei MT. Neurosteroids and their receptors in ischemic stroke: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Pharmacol Res*. 2020;160:105163