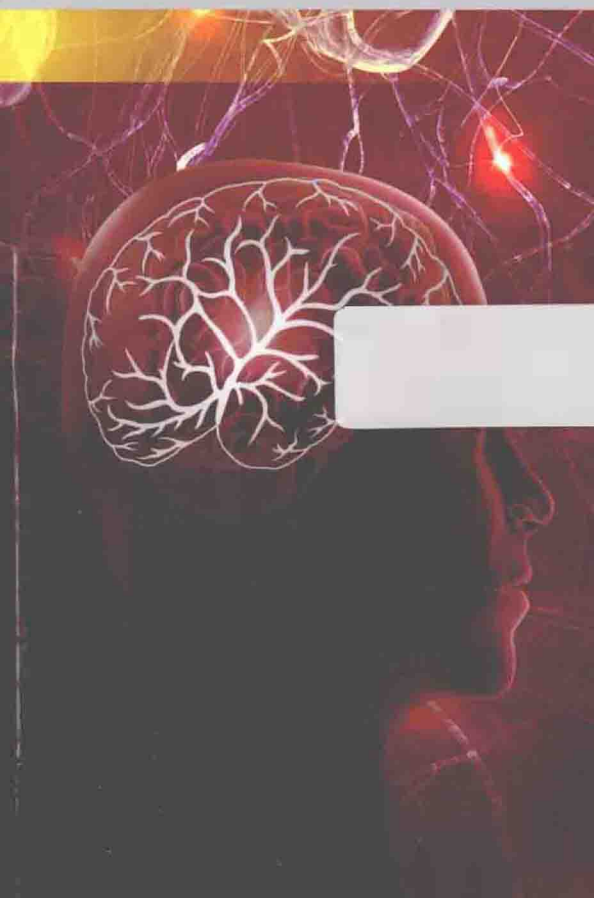




Research Methodology of
Cerebrovascular Diseases

脑血管病 实验方法学

主编 罗玉敏 闵连秋



中国医药科技出版社

脑血管病实验方法学

主 编 罗玉敏 闵连秋
副主编 赵海苹 王 筠



中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书为介绍脑血管病实验方法学的专著。总结了脑血管病实验研究中所涉及到的方法,包括模型的制作、损伤的功能评价、损伤的活体评价、损伤的组织学评价、损伤的分子水平的评价方法等。全书内容丰富,图文并茂。适合神经科医生、神经科学的研究人员、学生阅读。

图书在版编目(CIP)数据

脑血管病实验方法学 / 罗玉敏, 闵连秋主编. —北京: 中国医药科技出版社, 2014.4

ISBN 978-7-5067-6694-4

I. ①脑… II. ①罗… ②闵… III. ①脑血管疾病—实验医学 IV. ①R743-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 047378 号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100082

电话 发行: 010-62227427 邮购: 010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 880 × 1230mm¹/₃₂

印张 12³/₈

彩插 19

字数 282 千字

版次 2014 年 4 月第 1 版

印次 2014 年 4 月第 1 次印刷

印刷 三河市万龙印装有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-6694-4

定价 46.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

编 委 会

主 编 罗玉敏 闵连秋

副 主 编 赵海苹 王 筠

编写人员 (按姓氏笔画排序)

王丽晔 王荣亮 左 玮 卢 洁

闫 峰 刘 萍 刘小蒙 刘向荣

杨国源 李锦程 闵鹤鸣 张陈诚

张曦彤 林晓杰 武晓宁 周凤刚

赵咏梅 姚明江 侯金才 高 志

陶 真 曹 斌 戚智锋 梁 佳

董 雯

序 言

罗玉敏教授于1996~1999年在华山医院神经内科完成博士研究生学业后留院工作，是一名优秀的临床医生。2006年离开华山医院神经内科，我原来希望她能以临床为主去做科研，后来听说因为各种原因没有能做临床工作，只在研究室专职做脑血管病的科研工作，我为中国少了一位优秀的临床神经科医生而遗憾。

我很高兴罗玉敏教授现在能将脑血管病的研究方法编写成书，为以后的研究者提供方便，节省时间。我非常愿意为这本书写点什么。

罗玉敏教授在十几年临床神经内科医生实践经验的基础上做脑血管病的基础研究，相信能更深层次地理解脑血管病的基础与临床研究，我也相信本书能将科研中的方法学以及经验教训总结出来，可以为以后的脑血管病转化医学的研究提供良好的基础。

脑血管病的临床研究、实验研究已取得一定成绩，还有更多的问题有待探索。目前为止的很多研究都没有深入探索，如脑血管病的某些发病机制以及是否存在抗脑血管发病机制都不是很清楚，最重要的是人是否具有主动的抗病功能，也需要深入研究。希望以后的脑血管病研究工作要兼顾临床和基础研究两部分，不断探索，取得更大的进展。



秦震 MD, FAAN

华山医院神经科终身教授

中国脑血管病的发病率目前仍有上升趋势。关于脑血管病的研究国内外均投入了大量的人力和财力，然而，目前关于脑血管病的有效治疗方法仍然很少。脑血管病的研究仍然是国内外神经病学家及神经科学家的重要研究方向，也是我国十大重点研究的慢性病之一。

首都医科大学宣武医院以神经学系著称，脑血管病的研究也是神经系统疾病中的重中之重。2006年底首都医科大学宣武医院开始筹建脑血管病研究室，至今已近7年多。借助宣武医院中心实验室、动物实验室的平台建立了脑血管病研究的各种方法，同时确立了在临床医院中进行脑血管病研究的方向。

针对研究中所遇到的问题，我们编写了这本《脑血管病实验方法学》，为从事脑血管病研究的科研人员及研究生提供详细的方法学，以减少研究人员文献检索的时间，减少研究方法建立的摸索时间，使科研人员少走弯路。

本书编者均为有实验工作经验的科研人员，编写内容均以自己的实践经验、自己在实验中的教训为基础，同时总结各种实验方法的利与弊，供以后的脑血管病研究人员参考。本书所有彩图均放于全书最后，供读者查阅。

文中不妥之处，敬请读者雅正。

编者
2013年11月

第一章 脑血管病概述	1
一、脑血管病的概念和流行病学.....	1
二、脑血管病分类.....	2
三、脑血液循环调节及病理生理.....	2
四、脑的血管.....	4
五、脑血管病的病因.....	6
六、脑血管病的危险因素与预防.....	7
第二章 急性脑缺血模型	15
第一节 局灶性脑缺血模型	16
一、大鼠局灶性脑缺血模型.....	16
二、小鼠局灶性脑缺血模型.....	33
三、家兔局灶性脑缺血模型.....	35
第二节 全脑缺血模型	42
一、大鼠全脑缺血模型.....	42
二、小鼠全脑缺血模型.....	46
三、家兔全脑缺血模型.....	52
第三节 TIA模型	54
一、TIA模型的分类	55
二、TIA模型的评价标准	57
三、常用TIA模型的制作	57



第四节 脑缺血模型神经功能损伤的评价方法	60
一、运动、平衡功能评价	60
二、感觉功能评分法	64
第五节 脑梗死体积的评价方法	73
一、TTC染色测定脑梗死体积	73
二、苏木精-伊红染色法测定脑梗死体积	74
三、焦油紫染色	77
四、磁共振成像	78
第三章 慢性脑缺血模型	83
第一节 慢性脑缺血模型的制作方法	84
一、大鼠慢性脑缺血实验动物模型	84
二、小鼠慢性脑缺血实验动物模型	97
三、其他动物	99
第二节 神经功能评价	100
一、总体状态	100
二、记忆功能评定	100
第三节 神经损伤的评价	107
一、监测脑血流	107
二、神经电生理改变	108
三、P300的测定	110
四、眩晕潜伏期测定	111
五、苏木精-伊红染色	111
第四章 脑出血模型	114
第一节 脑出血模型的制作方法	114
一、实验动物的选择及出血部位选择	114

二、大鼠脑出血模型的制作·····	115
三、兔脑出血模型·····	122
四、脑出血模型制作技巧·····	123
五、脑出血模型制作的有关问题·····	124
第二节 脑出血模型的行为学评价 ·····	127
一、Bederson评分 ·····	128
二、平衡木行走试验·····	128
三、肌力测验·····	128
四、前肢放置检测·····	129
第三节 血肿的评定及组织学观察 ·····	129
一、头颅磁共振扫描·····	129
二、CT灌注成像 ·····	130
三、组织学观察·····	130
第五章 蛛网膜下隙出血模型 ·····	132
第一节 SAH动物模型的制作方法 ·····	132
一、脑池注血法·····	132
二、颅内动脉穿刺法·····	138
三、动脉周围置血法·····	141
第二节 神经功能评价方法 ·····	142
一、平衡木实验·····	142
二、转棒实验·····	143
三、抓握牵引实验·····	143
四、走横木实验·····	144
五、Bederson评分法 ·····	145
六、Kaoutzanis 11分评分法 ·····	146
七、Garcia 18分评分法 ·····	147
八、Katz 100分评分法 ·····	147



九、Morris水迷宫实验	148
十、Endo4级评价法	149
第三节 神经损伤的评价方法	150
一、大体病理观察	150
二、病理学检查	150
三、脑含水量测定	151
四、脑血流量的测定	151
五、常规生理参数的监测	152
六、血-脑屏障通透性的测定	153
七、大脑动脉血管截面积测量	154
八、磁共振成像扫描	155
九、经颅多普勒	156
十、数字减影血管造影	157
十一、三维CT血管造影	158
第六章 小动物脑的整体实验方法	160
第一节 激光多普勒检测脑血流	160
一、激光多普勒检测局部脑血流	161
二、激光多普勒检测特定位点的脑血流	162
第二节 高速摄像检测细静脉管径及红细胞	
流速动态观察	162
大鼠和小鼠软脑膜细静脉管径和红细胞	
流速动态观察	163
第三节 活体观察软脑膜细静脉血栓形成的	
动态变化	165
一、光化学刺激诱导小鼠脑细静脉血栓形成	165
二、ADP表面滴加诱导小鼠脑细静脉血栓的形成	167
第四节 脑血管新生的观察	168

一、可视化颅窗法观察脑血管形态变化·····	169
二、同步辐射X射线检测小动物脑微血管·····	169
第五节 活体观察脑血管通透性的动态变化·····	174
一、伊文思蓝法检测血-脑屏障通透性·····	174
二、FITC荧光标记的白蛋白在大鼠软脑膜细静脉 漏出动态的连续观察·····	176
第六节 活体观察在微脑血管白细胞滚动及黏附的 动态变化·····	178
第七章 标本的留取方法·····	180
第一节 血液的采集·····	180
一、眼眶采血法·····	181
二、尾部采血法·····	182
三、心脏采血法·····	183
四、大动脉血管采血法·····	184
五、静脉采血法·····	186
六、采血时的注意事项·····	186
第二节 脑脊液采集方法·····	187
一、大小鼠脑脊液的采集·····	187
二、家兔脑脊液的采集·····	188
第三节 外周血免疫细胞的分离·····	189
一、外周血中中性粒细胞、淋巴细胞、单核 细胞的分离·····	189
二、外周血中血小板的分离·····	192
第四节 脑组织单细胞悬液的制备方法·····	193
一、脑组织单细胞悬液的制备方法·····	193
二、流式细胞术急性分离小鼠小胶质细胞·····	194
第五节 脑组织石蜡切片的制备·····	195



第六节 脑组织冰冻切片的制备	199
第七节 脑组织电镜标本的制备	203
第八节 脑组织蛋白的提取	209
一、脑组织取材	209
二、总蛋白提取	210
三、脑组织的膜蛋白、浆蛋白、核蛋白的提取	214
第九节 脑组织微血管的分离	215
第十节 脑组织线粒体的分离	216
一、二次蔗糖密度梯度离心纯化线粒体	217
二、试剂盒方法	219
第八章 脑血管病研究的在体实验方法	221
第一节 苏木精-伊红 (HE) 染色	221
一、石蜡切片的HE染色	222
二、冰冻切片的HE染色	223
第二节 尼氏染色观察神经元	223
一、焦油紫染色 (石蜡切片)	224
二、甲苯胺蓝染色 (石蜡切片)	225
三、改良后的甲苯胺蓝染色方法 (石蜡切片)	225
四、硫堇染色 (石蜡切片)	226
第三节 镀银法染色观察神经元纤维	227
一、Golgi-COX染色 (可用石蜡或冰冻切片)	228
二、Cajal法神经原纤维镀银染色 (可用石蜡或冰冻切片)	230
第四节 神经胶质细胞特异染色	231
一、Holzer神经胶质纤维染色方法 (石蜡切片)	232

二、Penfield胶质细胞染色（冰冻切片）	233
三、改良的Holzer神经胶质纤维染色方法	234
第五节 神经髓鞘的特异染色	235
一、Luxol Fast Blue 染色（冰冻切片）	235
二、多内给（Donaggio）法	236
三、玛气（Marchi）法	237
第六节 脑组织的TUNEL染色	237
一、石蜡切片的TUNEL荧光染色	238
二、冰冻切片的TUNEL荧光染色	239
第七节 脑组织的细胞增殖BrdU染色	240
第八节 脑组织的过氧化物DHE染色	242
一、利用荧光探针直接测定脑组织冰冻切片活性氧的形成	243
二、利用荧光探针直接测定线粒体活性氧的形成	244
第九节 脑内的淀粉样物质的染色	245
一、甲基紫法（石蜡切片）	245
二、刚果红甲醇法（石蜡切片）	246
三、改良刚果红甲醇法（石蜡切片）	247
第十节 免疫组织化学及免疫荧光化学	248
一、免疫组化（石蜡切片）	248
二、免疫组化（冰冻切片）	250
三、免疫荧光（石蜡切片）	252
四、免疫荧光（冰冻切片）	253
第十一节 酶联免疫吸附剂测定ELISA	253
第十二节 免疫印迹	255
第十三节 免疫共沉淀	259



第十四节	DNA的提取及PCR鉴定转基因小鼠基因表型	263
第十五节	RNA的提取及Real-time PCR	265
第十六节	DNA与蛋白质相互作用分析	270
第十七节	脑组织切片的原位杂交	273
第九章	脑血管病研究的离体实验方法.....	277
第一节	细胞培养室的基本条件及设备	277
一、	细胞培养室布局规划.....	277
二、	细胞培养基本设备.....	279
第二节	无菌操作	281
一、	细胞培养室及相关设备的常规灭菌消毒.....	281
二、	常用器皿清洗.....	281
三、	各类实验用品的无菌处理.....	283
四、	基本无菌操作技术及要求.....	285
五、	常见污染种类及解决办法.....	286
第三节	常用液体配置	287
一、	培养用液.....	288
二、	培养基.....	291
三、	抗生素.....	292
四、	抗有丝分裂剂.....	292
第四节	细胞培养基本技术	293
一、	原代培养.....	293
二、	神经组织常见细胞系.....	293
三、	细胞传代.....	296
四、	细胞生长状态的观察.....	297
五、	细胞冻存、复苏与运输.....	297

第五节 正常神经组织常见类型细胞的原代培养	299
一、神经元.....	299
二、脑微血管内皮细胞.....	302
三、小胶质细胞.....	305
四、星形胶质细胞.....	308
五、少突胶质细胞.....	310
六、神经干细胞.....	312
七、脑微血管内皮细胞与星形胶质细胞共培养建 立体外血-脑屏障	314
第六节 脑血管病常见离体细胞模型制作	316
一、氧糖剥夺模型.....	316
二、凝血酶模拟急性脑出血模型.....	318
三、过氧化氢氧化应激损伤模型.....	320
四、兴奋性氨基酸损伤模型.....	320
五、炎症损伤模型.....	321
第七节 常用细胞分析检测	322
一、细胞活性实验.....	322
二、细胞凋亡实验.....	326
三、细胞迁移实验.....	331
四、细胞增殖实验.....	332
五、细胞周期实验.....	333
六、细胞形态学实验.....	335
第八节 脑血管病常用的电生理技术	338
一、膜片钳记录标本的制备.....	338
二、膜片钳电生理记录.....	345
第十章 非人灵长类动物脑血管病模型.....	352
第一节 动物模型的制作	352



一、基本准备和麻醉·····	352
二、MCAO (middle cerebral artery occlusion) 模型 制作和术后护理·····	360
三、自体抗凝血制备脑出血模型·····	362
四、蛛网膜下隙出血模型·····	362
五、磁共振扫描·····	363
六、组织学检测·····	364
 第二节 非人灵长类动物模型的研究现状和评价 ·····	364
一、伦理问题·····	365
二、非人灵长类动物脑卒中模型的设计·····	365
 第十一章 脑血管病转化医学研究的现状 ·····	371

第一章 脑血管病概述

一、脑血管病的概念和流行病学

脑血管病又称脑血管意外、脑中风或脑卒中，是由脑部血液循环障碍，导致以局部神经功能缺损为特征的一组疾病。根据其病理变化分为缺血性和出血性脑血管病两大类。

脑血管病作为神经系统的常见病和多发病，是目前导致人类死亡的三大主要疾病之一，并且存活者中 50% ~ 70% 患者遗留有严重残疾，给社会和家庭带来沉重的负担。2010 年中国卫生统计年鉴显示，政府办综合医院脑梗死住院患者住院期间，直接医疗费用由 2003 年的 11.7 亿元上升为 2009 年的 81.9 亿元，年平均增长 117%，短短的 6 年间翻了 7 倍。我国 1986 ~ 1990 年大规模人群调查结果显示，脑血管病发病率为 $(109.7 \sim 217) / 10$ 万，患病率为 $(719 \sim 745.6) / 10$ 万，死亡率为 $(116 \sim 141.8) / 10$ 万。近年来，脑血管病在我国全死因顺位前移。2008 年卫生部公布的第三次全国死因调查，脑血管病的死亡率为 136.64/10 万，已经超过恶性肿瘤成为中国第一致死病因。目前，我国每年新发病例 >200 万例，死亡病例 >150 万例，存活者近 700 万，其中约 2/3 遗留有不同程度的残疾。脑血管病的发病率、患病率和死亡率随年龄增长而增加，45 岁以后明显增加，65 岁以上人群增加最为明显，75 岁以上者发病率是 45 ~ 54 岁组的 5 ~ 8 倍，寒冷季节发病率明显增高。我国脑血