

T/GDPMAA

团体标准

T/GDPMAA 0020—2025

缺血性脑卒中动物模型评价技术规范 第1部分：啮齿类动物

Standard for establishment of animal models for cerebral ischemic stroke
Part 1: Rodents

（发布稿）

（本文件完成时间：2025.07.29）

2025 - 08 - 01 发布

2025 - 08 - 01 实施

广东省精准医学应用学会 发布

目 次

前 言 II

引 言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 动物质量及饲养要求 1

5 模型制备方法 1

 5.1 栓塞法 2

 5.2 光化学法 2

 5.3 电凝法 2

6 评价方法 3

 6.1 脑血流检测 3

 6.2 神经损害严重程度评分 3

 6.3 运动能力评价 3

 6.4 脑梗死体积测定 3

 6.5 组织病理诊断 3

7 结果判定 3

 7.1 模型活体评价指标 3

 7.2 脑梗死体积 4

 7.3 组织病理 4

附 录 A （资料性） 神经损害严重程度评分表 5

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省生物技术研究院（广东省实验动物监测中心）提出。

本文件由广东省精准医学应用学会归口。

本文件起草单位：广东省生物技术研究院（广东省实验动物监测中心）、中山大学附属第一医院、南方医科大学南方医院、深圳市药品检验研究院（深圳市医疗器械检测中心）。

本文件主要起草人：李舸，李韵峰，党超，黄凯滨，张健，范玉华，朱娟，关雅伦，臧德跃，陈小曲，金毅，潘速跃，曾进胜，张钰。

引 言

缺血性脑卒中 (cerebral ischemic stroke, CIS), 是指脑组织局部因血液循环障碍, 导致缺血缺氧发生, 进而引起脑组织坏死的一类疾病。流行病学调查显示, CIS是我国排名第二的致死性疾病, 年发病率约为247/10万人, 死亡率约为115/10万人, 未来随着人口结构的老龄化, 我国CIS的发病率将持续升高, 高致死和致残率将给社会和家庭造成严重负担, 因此, 近年来CIS已经成为重大慢性非传染性疾病研究的热点方向之一。

利用啮齿类构建的缺血性脑卒中模型是国内外广泛应用于CIS发病机制研究和药物评价的动物模型, 本文件将依据经典的啮齿类CIS模型, 对缺血性脑卒中动物模型制备及评价技术进行规范。

缺血性脑卒中动物模型评价技术规范 第1部分：啮齿类动物

1 范围

本文件规定了实验小鼠、大鼠缺血性脑卒中模型制备的动物质量、饲养要求、制备方法、评价方法和结果判定。

本文件适用于啮齿类动物缺血性脑卒中模型构建及应用评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 14922 实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测

GB/T 14924.2 实验动物 配合饲料卫生标准

GB 14924.3 实验动物 配合饲料营养成分

GB 14925 实验动物 环境及设施

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

缺血性脑卒中 cerebral ischemic stroke

是指各种原因导致的脑组织血液供应障碍，并由此产生的缺血缺氧性坏死，进而出现神经功能障碍的一类临床综合征。

3.2

神经功能评价量表 neurological function assessment scale

用于评估动物模型神经功能缺损程度和恢复情况的工具，评价内容包括意识水平、感觉系统、运动系统和骨骼肌协调等。

3.3

动物行为评价 animal behavioral assessment

以实验动物为对象，在自然界或实验室内，以观察和实验方式对动物的行为信息进行采集、分析和处理，评价动物行为信息的生理和病理意义。

3.4

运动能力评价 motor function assessment

利用不同动物运动评价设备，如步态分析系统等，观察动物在不同情境下的运动行为变化，用于测试和评价动物的运动能力。

4 动物质量及饲养要求

4.1 动物质量应符合 GB 14922 的要求。

4.2 饲养环境应符合 GB 14925 的要求。

4.3 饲料应符合 GB/T 14924.2 和 GB 14924.3 的要求。

5 模型制备方法

5.1 栓塞法

实验小鼠/大鼠缺血性卒中模型构建的经典方法，通过颈外动脉插入线栓或血栓等，导致大脑中动脉阻塞和再灌注。具体操作如下：

5.1.1 术前准备

选择小鼠（体重控制在 25-30g）、大鼠（体重控制在 250 至 300g），术前动物禁食 12 小时，自由饮水。进行麻醉、备皮、消毒等准备工作。

5.1.2 麻醉

通常采用吸入类麻醉剂进行麻醉，手术过程中保温，同时给予适量的镇痛药物。

5.1.3 手术

动物取仰卧位，从颈部正中切开皮肤，利用镊子钝性分离颈部腺体组织、筋膜，暴露并分离颈总动脉（CCA）、颈外动脉（ECA）和颈内动脉（ICA）。使用血管夹夹闭 CCA 和 ICA 分叉的近心端，结扎 ECA 远心端和近心端（留长线头），并从两个结扎点中间剪断 ECA。然后在 ECA 近分叉处用眼科剪 45° 剪一小斜口并插入线栓，松开 ICA 动脉夹，缓慢向 ICA 推入线栓，当线栓遇到轻微阻力时即可停止。25-30g 小鼠线栓插入深度通常为 9-10mm，250-300g 大鼠线栓插入深度通常为 18-22mm，实际插入深度需根据动物体重和实验需求进行调整。插入过程中避免用力过猛导致血管破裂或线栓弯曲，同时防止线栓误入翼腭动脉（PPA）。当线栓到达位置后松开 CCA 结扎，缝合皮肤。阻断血流造成脑局部缺血 60 分钟后，拔出线栓实现再灌注。缝合皮肤并消毒处理。

5.1.4 术后护理

术后将动物放置于加热垫上保暖，直至完全复苏。注意观察小鼠的生命体征变化，如呼吸、心率等。必要时给予镇痛，减轻动物的疼痛和痛苦。

5.2 光化学法

实验小鼠/大鼠皮层缺血性脑卒中模型构建的常用方法，实验操作技术简单。利用光敏剂（如玫瑰红）在特定强度光照下发生光化学反应，在大脑的照射局部产生脑水肿和血小板微血栓，形成局灶性脑梗死。具体操作如下：

5.2.1 术前准备

术前动物禁食 12 小时，自由饮水。进行麻醉、备皮、消毒等准备工作。

5.2.2 麻醉

通常采用注射类麻醉剂进行麻醉，手术过程中保温，同时给予适量的镇痛药物。

5.2.3 手术

取俯卧位，将小鼠/大鼠头部固定于脑立体定位仪上，在前囟旁划定圆形区域，该区域以外进行避光处理。从动物眼眶静脉窦注射玫瑰红溶液（10mg/mL）后，开启激光发射器（532nm），对圆形区域进行激光照射 8 分钟，形成局部永久缺血，缝合头皮，伤口皮肤消毒处理。

5.2.4 术后护理

术后将动物放置于加热垫上保暖，直至完全复苏。必要时给予镇痛，减轻动物的疼痛和痛苦。

5.3 电凝法

实验小鼠和大鼠缺血性脑卒中永久闭塞模型构建方法。利用开颅手术暴露啮齿类动物脑中动脉并进行永久性阻断。具体方法如下：

5.3.1 术前准备

术前动物禁食 12 小时，自由饮水。进行麻醉、备皮、消毒等准备工作。

5.3.2 麻醉

通常采用吸入类麻醉剂进行麻醉，手术过程中保温，同时给予适量的镇痛药物。

5.3.3 手术

动物取侧卧位，在无菌条件下进行手术操作，切开小鼠/大鼠头部皮肤，颅骨开口后暴露大脑中动脉。使用微型电凝器，将电凝探头置于小鼠/大鼠大脑中动脉的适当位置，使大脑中动脉永久性阻断。注意控制电凝时间和强度，避免损伤周围组织。缝合头皮，伤口皮肤消毒处理。

5.3.4 术后护理

术后将动物放置于加热垫上保暖，直至完全复苏。注意观察小鼠的生命体征变化，如呼吸、心率等。必要时给予镇痛，减轻动物的疼痛和痛苦。

6 评价方法

6.1 脑血流检测

采用激光散斑血流仪检测动物脑缺血情况。动物麻醉后俯卧，头部备皮消毒后，切开皮肤，暴露颅骨，在激光散斑成像仪下，观察脑血流图像，选定损伤侧缺血区域，测定10s内平均血流值，同时，选定非损伤侧相同区域测定血流值，评价大脑中动脉阻断后的缺血情况。

6.2 神经损害严重程度评分

造模前先按照附录A对动物进行神经功能评分，排除不满足评分要求的动物。造模后2小时，动物完全清醒后，在安静环境中，进行神经神经损害严重程度评价。逐项评分，所有单项分数相加则为动物神经损害程度评分，总分为18分。一般选择3名观察人员进行量表评价，统计3名观察员的平均值作为神经功能评分量值。

6.3 运动能力评价

采用疲劳转棒装置进行运动行为评价。转速设置从0rpm缓慢加速至40rpm，测试时间为300秒，测试时将动物置于旋转棒上，记录动物从旋转棒上掉落的时间。造模前，按照上述参数设置对动物进行适应性训练，待动物从旋转棒上掉落的时间稳定后，则训练完成，即可开展造模。造模后，待动物恢复运动能力后，一般术后7-14天进行试验，按照上述参数设置开展疲劳转棒试验，记录动物从转棒上掉落的时间，每天进行3次试验，每次间隔30分钟。根据3次测定的平均掉落时间评价动物运动能力。

6.4 脑梗死体积测定

采用2,3,5-三苯基氯化四氮唑（TTC）染色评价动物脑梗死体积。动物安乐死后取脑，并在脑模具中将脑切成厚度相同的切片，随后将切片置于TTC染液中，避光37℃烘箱孵育。待正常脑组织呈现出鲜红色，脑梗部位呈现出苍白色后，将脑片置于4%多聚甲醛中固定后拍照，并将图像导入医学图像处理软件Image J分别计算每张脑切片的面积，所有切片梗死灶所在半脑正常脑组织面积、对侧正常半脑面积相加后乘以切片厚度，得到梗死灶所在半脑正常脑组织体积及对侧正常半脑体积，并利用公式计算脑梗死体积比。

6.5 组织病理诊断

动物麻醉后放血，分别用生理盐水和多聚甲醛对脑组织进行灌注，分离脑组织，经4%多聚甲醛固定，梯度酒精脱水，二甲苯透明后进行石蜡包埋制成蜡块，在组织切片机上将蜡块切成厚度为4 μm的切片，切片应包含整个梗死灶及周边半暗带组织，然后结合评价需要，选择进行苏木素-伊红、尼氏或Fluoro-Jade C等染色并封片。由实验动物病理学专家进行双盲阅片诊断，观察梗死灶和半暗带组织神经元坏死及炎症细胞活化情况。

7 结果判定

7.1 模型活体评价指标

评价指标应包括：脑血流、神经损害严重程度评分、运动能力、运动能力。

7.1.1 脑血流

造模后，可见动物脑缺血区域血管内血流信号明显减弱，表明动物出现脑局部缺血。

7.1.2 神经损害严重程度评分

神经损害严重程度评分：神经损害严重程度评分越高说明损伤越严重，其中，1-6分为轻度损伤，7-12分为中度损伤，13-18分为严重损伤。造模后，模型组动物神经评分应至少达到轻度损伤或以上。

7.1.3 运动能力

造模后，模型组动物从旋转棒上掉落时间平均值应显著低于造模前。

7.1.4 磁共振成像

必要时，造模小鼠通过磁共振扫描显示典型的梗死特征。

7.2 脑梗死体积

动物处死后，TTC染色显示脑梗死部位明显的苍白色。可通过下列公式计算动物脑梗死体积比：

$$CIVR = \frac{CBV - IBV}{CBV} \times 100\%$$

式中：

CIVR——Cerebral infarction volume ratio，脑梗死体积比；

CBV——Contralateral hemisphere brain volume，对侧正常半脑体积；

IBV——Ipsilateral hemisphere brain volume，梗死灶所在半脑正常脑组织体积。

7.3 组织病理

动物处死后，病理诊断可见梗死灶内大量神经细胞坏死，神经元核固缩、胞浆呈嗜酸性，在半暗带区可见星形胶质细胞和小胶质细胞过度活化，胶质细胞胞体增大和大量聚集以及炎症细胞浸润。

附 录 A
(资料性)
神经损害严重程度评分表

神经损害严重程度评分见表A.1。

表A.1 神经损害严重程度评分表

运动功能测试	分数
从尾部提起动物	出现下列表型时，每项计 1 分
前肢屈曲	1
后肢屈曲	1
头部在 30s 内上仰超过 10°	1
将动物放于平台上	根据下列表型选择计分，最高计 3 分
正常爬行	0
无法笔直爬行	1
围绕偏瘫侧打转	2
向偏瘫侧跌倒	3
感觉测试	出现下列单项表型时，每项计 1 分
浅感觉测试（视觉和触觉）	1
本体感觉测试（患肢置于桌子边缘，动物无肢体收缩）	1
横杆平衡测试	根据下列表型选择计分，最高计 6 分
平衡	0
抓住横杆一侧	1
抱住横杆，一肢体掉下	2
抱住横杆，两肢体掉下或抱横杆旋转>60s	3
尽力平衡，但失败掉下（>40s）	4
尽力平衡，但失败掉下（<20s）	5
掉下（<20s）	6
反射和异常动作	出现下列单项表型时，每项计 1 分
耳郭反射（刺激耳道后摇头）	1
角膜反射（棉花刺激角膜后眨眼）	1
惊吓反射（听到突然声响后运动反射或尖叫）	1
抽搐，肌阵挛，肌张力异常	1
最高分	