

大鼠永久性大脑中动脉阻塞模型的建立

许金秀, 杨牧, 周红*

(电子科技大学生命科学与技术学院, 神经信息教育部重点实验室, 成都 610054)

摘要:目的 建立稳定可靠的线栓法大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)永久性脑缺血模型。方法 对 Koizumi 和 Zea Longa 模型构建方法加以改进。40 只雄性 SD 大鼠随机均分为实验组和假手术组, 分别进行模型制作和模型缺血的评价, 采用 2,3,5-氯化三苯四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色来计算大鼠脑梗死体积。结果 大鼠 MCAO 模型制作成功率为 95%; 神经功能缺失评分 1~3 级百分率为 95%。结论 实验所采用的改良术式构建大鼠 MCAO 模型具有稳定性好、可重复率高、操作简便和手术时间短等优点, 为基于大鼠永久性脑缺血模型开展的下游相关实验提供了良好的研究平台。

关键词: 大鼠永久性大脑中动脉阻塞模型; TTC; 梗死体积

中图分类号: Q95-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2010)03-0461-05

Establishment of a Rat Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion Model

XU Jin-xiu, YANG Mu, ZHOU Hong*

(Key Laboratory for Neuroinformation of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China)

Abstract: Objective To set up a stabilized and reliable model of rat permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO). **Methods** Rat pMCAO experiment was performed based on the previous Koizumi and Zea Longa's models with significant modification. Forty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into experimental group and sham-operated group (n=20 in each group), and occurrence of rat cerebral ischemia in each group was assessed. In this study, 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining were carried out to detect the infarct area in the brain of experimental rats. **Results** In experimental group, the successful ratio of cerebral ischemia model was 95%, and neurological deficit scores of 1~3 grade was 95%. **Conclusion** This modified pMCAO model is an ideal model with better stabilization, higher reproducibility, easier execution and simpler operation when compared with the previous one.

Key words: rat permanent middle cerebral artery occlusion model; TTC; infarct volume

脑梗塞作为中老年人易患的三大疾病之一,其发病率随着全球老龄化人口的增多而呈逐年上升趋势(Liu, 1989; Bejot *et al.*, 2009; van Walraven *et al.*, 2009)。在如何防治由脑梗塞引起的局部缺血研究中,构建各种脑缺血和缺血再灌注的实验动物模型已成为研究模拟人类脑血管疾病损伤必不可少的方法,其中以大鼠大脑中动脉阻塞模型的应用最为广泛。Koizumi 等(1986)首先采用血管内栓塞堵塞大脑中动脉开口建立大鼠局灶性脑缺血模型(MCAO)。随后 Longa 等(1989)将该方法加以改进,在构建过程中不开颅、损伤小,并且构建后可复灌,能精确控制缺血和再灌注时间,模型损伤评价高,因此受到了国内外学者的高度重视。但是该模型存在术式复杂和模型动物选择条件苛刻等缺点,

并且该模型的缺血程度无量化指标,梗死灶体积不稳定,颅内血管穿通引起蛛网膜下腔出血等问题也为下游相关研究增加不少的难度。所以相关领域的学者为完善此模型进行了一系列探索,包括模型构建术式的优化(辛世萌等, 2000; Aspey *et al.*, 2000; Cao & Cao, 2004)、缺血后局部神经元坏死(Bartus *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1995)、脑血流的改变(Memezawa *et al.*, 1992)和神经功能缺失(Garcia *et al.*, 1995)等。本项研究参考以上研究结果,并结合颅脑颈部解剖的相关方法,以大鼠为模型,对永久性大脑中动脉阻塞构建术式进行改进,在结扎单侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA)的基础上,将栓线通过颈内动脉-基底动脉直达基底环-大脑中动脉分叉

收稿日期:2009-07-03 接受日期:2009-09-27 基金项目:四川省中医药管理局科研基金资助(200639)

作者简介:许金秀(1984~),女,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学, E-mail: xjx.2003@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, 教授, 博士生导师, E-mail: zhouhongzh@uestc.edu.cn

处,定向阻断额顶皮质及基底节区来自于单侧颈总动脉的绝大部分血供,整个操作步骤简便,模型制作时间短,模型成功率高。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

40 只 SD 雄性大鼠,体重 250 ~ 300 g,由四川大学华西医院动物中心提供(实验动物许可证号:SCXK(川)-10-2006)。随机分为 2 组,即假手术组与实验组,每组 20 只。

1.2 栓线制作

选择直径 0.28 mm 4.0 尼龙线(Johnson ETHI-CON),制备 6 cm 长线作导丝,石蜡完全浸润导线线头,并标记导线顶端 19 mm \pm 2 mm 处。解剖镜下观察,以顶端被石蜡完全包埋呈平滑帽状为合格标准。

1.3 局灶性脑缺血动物模型的建立

实验组根据改良 Koizumi 和 Longa 法,并结合以前研究所采用的术式,对大鼠大脑中动脉线栓阻塞制备局灶性脑缺血动物模型(MCAO)加以改良,具体操作如下描述。

实验组:采用 10% 水合氯醛 350 mg/kg 腹腔注射对 SD 大鼠进行麻醉(Lin *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007)。以大鼠停止自主活动,肌肉松弛为完全麻醉标准。仰卧位固定大鼠,颈部右侧旁正中切开皮肤及浅筋膜,钝性分离胸锁乳突肌与胸骨舌骨肌,暴露 CCA 与迷走神经。分离右侧 CCA 及 ECA 主干,结扎 ECA 和 CCA,再分离颈内动脉 ICA 并固定。用眼科剪于 CCA 近 ICA 分叉处开口,使用自制的栓线,由开口处沿 ICA 走向缓慢进入,推动尼龙线缓慢进入 ICA 可视区末端,其间应少量回血。若遇到较强阻挡,则表示栓线进入颈内侧枝血管,应停止进线,拔除栓线。在进入距 ICA 和 ECA 分叉处约 18 ~ 19 mm(辛世萌等, 2000; Aspey *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001)时,有区别于侧枝血管带来的阻挡感,表明栓线已越过 MCA,到达大脑前动脉(anterior cerebral artery, ACA)的起始部,即栓塞部。此时结扎 ICA 止血,剪除导线并固定血管内栓线。逐层缝合肌肉、腺体和皮肤。伤口消毒后局部使用抗生素防止感染,仰卧位置于保温箱待麻醉清醒。

假手术组:术式与模型构建相同,但是不对颈总动脉造口以及线栓,采用颈总动脉和颈外动脉结扎法作为实验对照。

1.4 动物模型缺血的评价标准

神经功能缺失体征评分参照 Bederson 等(1986)和 Longa 等(1989)的 5 级 4 分评分方法并加以改进。在栓塞 2 h 后分别对实验组和假手术组大鼠进行神经功能缺损程度的评分,标准:

0 分-无神经功能缺损症状,大鼠被提尾悬空时两前肢向地面伸直;

1 分-轻微的神经功能缺损,大鼠被提尾悬空时病灶对侧前肢呈屈曲、抬高、肩内收、肘关节伸直;

2 分-中度局灶性神经功能缺损,有向瘫痪侧旋转征象;

3 分-重度局灶性神经功能缺损,有向病灶对侧跌倒征象;

4 分-无自发活动及认知水平下降。

分值越高,说明动物行为障碍越严重。将其中 0 分(无症状)和 4 分(缺血过重)者剔除,将得分为 1 ~ 3 分大鼠定义为实验组模型构建成功。0 分(无症状)定义为假手术组构建成功。

1.5 脑梗死体积的测定

栓塞 24 h,待症状稳定后,分别将实验组和假手术组的大鼠全脑取出,测量大脑长度,冠状面 1 mm 切片。1% TTC 染色,避光 4℃ 孵育 30 min,染色标本于 4% 多聚甲醛中固定。非缺血区可被 TTC 作色,显示为玫瑰红,而梗死区由于细胞坏死,不能作色,显示为白色。将着色后的脑片按切片顺序排列,照相并使用图像分析系统计算脑梗死体积。每只大鼠采集脑片 8 ~ 10 片。图像用 Q570 图像分析系统计算每片梗死区截面积。梗死体积计算公式如下: $V = \Sigma(A_i + A_{(i+1)})/2 \times h$ 算出体积,其中 V 代表梗死体积, A_i 代表第 i 层断面梗死灶面积, $A_{(i+1)}$ 代表第 $i + 1$ 层断面梗死灶面积, h 代表脑片厚度。通过比较假手术组和实验组大鼠脑梗死体积来评价手术的稳定性,结合大鼠术后存活率数据评价手术的成功率。

1.6 统计学方法

利用 Q570 图像分析软件计算出梗死灶的体积近似值:采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 模型成功率

实验组成功制作模型 19 只,失败 1 只,成功率达 95% (19/20)。假手术组成功 20 只,成功率达 100% (20/20),见表 1。

表 1 假手术组与实验组的神经功能缺失评分及术后存活率
Table 1 Neurological deficit scores and survival ratio in sham-operated and experimental rats

神经功能 缺失评分	实验组			假手术组		
	例数	成功率(%)	术后存活数/率(%)	例数	成功率(%)	术后存活数/率(%)
0	0	0.0	0(0.0)	20	100.0	20(100.0)
1	2	10.0	2(100.0)	0	0.0	0(0.0)
2	9	45.0	9(100.0)	0	0.0	0(0.0)
3	8	40.0	7(87.5)	0	0.0	0(0.0)
4	1	5.0	0(0.0)	0	0.0	0(0.0)

2.2 神经功能缺失评分

实验组模型中,动物清醒后观察其体征:出现缺血同侧 Horner 氏征(表现为同侧眼睑下垂,睑裂变小)和右侧神经功能缺损症状,对侧肢体无力,行走时明显向对侧旋转,有追尾现象,提尾倒立时身体弯向对侧,前肢下垂。重者(3分)瘫痪,身体明显倾斜,头偏向对侧,不能自发行走。其中 19 只大鼠神经功能评分达 1~3 级,1 只达 4 级,神经功能评分在 1~3 分的大鼠所占比例为 95.00%(19/20)。假手术组神经功能评分显示均为 0 级,即无明显神经功能障碍(表 1)。神经功能评分实验组为 2.4 ± 0.7 ,假手术组为 0。

2.3 脑梗死体积

TTC 染色表现出明显的白色缺血梗死区,缺血 24 h 后梗死范围主要累及同侧大脑皮质外侧部、皮质下的尾壳核、丘脑前部和外侧部、下丘脑的外侧部(封底,图)。通过对实验组大鼠脑梗死体积图像分析统计发现,其脑梗死体积为 $(159.6 \pm 3.7) \text{mm}^3$ (表 2)。假手术组和实验组大鼠脑梗死体积之间差异有显著的差异($P < 0.05$)。

表 2 实验组大鼠的脑梗死体积
Table 2 Infarction volume of experimental rats

大鼠编号	梗死体积(mm^3)	大鼠编号	梗死体积(mm^3)
1	197.6	10	141.4
2	143.2	11	182.5
3	125.8	12	167.7
4	151.7	13	121.0
5	157.4	14	147.7
6	183.9	15	178.9
7	177.1	16	163.9
8	158.3	17	152.6
9	166.8	18	155.5

2.4 大鼠术后存活率

实验组神经功能评分达 4 级的大鼠死亡 1 只,评分达 1~3 级的大鼠死亡 1 只,术后存活率为 94.74%(18/19)。假手术组无大鼠死亡,术后成活率为 100%(20/20)(表 1)。

3 讨论

大脑中动脉(MCA)作为临床上缺血性脑血管病的易患部位,对其缺血机制和治疗手段的探索一直没有停止。而利用动物模型已经成为国内外相关研究中一种必不可少的方法。目前以大鼠为实验动物构建大脑中动脉局灶性缺血模型的方法有许多种,如开颅机械闭塞法(Bederson *et al.*, 1986)、微栓子栓塞阻断法(Alexis *et al.*, 1995)、化学刺激诱导血栓性闭塞法(Liu & Xu, 1995)、光化学诱导血栓形成法(Wang *et al.*, 1996)、血管内栓线阻塞法(Longa *et al.*, 1989)等,综合考虑操作难易度以及缺血效果等方面因素,运用最为广泛的是血管内栓线法。Longa 等(1989)采用腔内栓线法制作的大脑中动脉闭塞模型,避免开颅对颅内环境稳定性的破坏,且术中不会引起血压、体温、血气等的异常变化,对全身影响小,同时该方法制作条件要求不高,操作相对简单。

国内外许多学者根据不同的实验要求,对栓线阻塞大鼠大脑中动脉制备局灶性脑缺血模型的方法进行加工改良。本实验通过结扎颈总动脉(ICA)和颈外动脉,并采用尼龙线通过颈内动脉对大鼠大脑中动脉进行有效的栓塞,成功地制备出大鼠永久性局灶性脑缺血模型。与 Longa 和 Koizumi 线栓法相比较。我们对手术术式进行了以下改进:1)没有对双侧锥动脉进行阻断,降低了整个手术操作的复杂性和对模型动物的损伤。而随后的梗死区面积以及神经功能损伤评价显示,以该法构建的模型与 Koizumi 法的并没有显著差别;2)由于是永久性缺血损伤,不必在术后进行栓线拔除造成再灌注,所以我们选取 ICA 近心端造口,这样的改变能更有效地通过导线来控制栓线,降低 ECA 和 CA 的过度牵拉造成的血管钝性损伤和相关神经的功能性损伤。同时在封闭血管开口时也更加简便,只需同时固定结扎

ICA;3) 在手术过程中,由于创伤面积小,钝性分离过程中也没有破坏主要肌肉群,且没有对血管周边神经相关附件进行破坏或切除,故模型动物血气指标和体温相对稳定。这样可以大大简化术后护理操作和降低术后护理难度,对模型的存活率和后期神经损伤评价的准确性的提高非常有利。我们认为使用该改良术式构建的大鼠大脑中动脉缺血模型在缺血上具有操作简便、重复性高和病灶稳定等优点。但是由于该术式选择永久结扎一侧 CCA,故在手术中个别模型不可避免地产生局部血液凝固现象,值得进一步改进。

Markgraf 等(1993)研究发现,Wistar 大鼠 MCAO 平均脑梗死体积最小,梗死灶变异大;Fischer 344 大鼠梗死灶最大,变异最小。而我们选用的 SD 大鼠的模型效果居于 Fischer 344 大鼠和 Wistar Kyoto 大鼠之间,能体现不同模型构建方法的优点和劣势,为正确评价和改良模型构建方法提供了良好的平台。同时,从鼠源的角度出发,SD 大鼠作为中国可选研究中最普遍的大鼠,自身具有容易饲养、品系保持好和容易获得等优点。

另外,在实验中选择雄鼠作为模型动物是因为有研究发现雄性大鼠梗死体积较雌性大鼠大(Cai *et al.*, 1998),且神经损伤症状更加明显。在手术过程中,雄性大鼠在麻醉剂和手术损伤上体现了较雌性大鼠更强的耐受能力,这在永久性中动脉栓塞模型等一类重度损伤模型的构建中显得尤为重要。但是,为了更加接近于临床上卒中人群的发病比例,我们拟探索基于雌性大鼠的大脑中动脉缺血模型构建方法。对于选择多大周龄大鼠的问题上,至今仍有不同观点(Wang *et al.*, 1995; 辛世萌等, 2000)。尽管脑梗塞多发于老年人群,但由于纯系大鼠的 MCA 随着周龄的增加会发生不同程度的迂曲、管腔狭窄、粥样硬化等解剖及病理上的改变,造成个体模型之间血管走向差异较大,个体之间梗死面积和神经功能缺损评价等存在较大变异系数等问题,因此不宜盲目选择老年大鼠(Wang *et al.*, 1995)。且很多相关研究表明,4~5 周龄的 SD 大鼠在血管发育和手术耐受等指标上体现了良好的均一性,故若无特殊实验要求,目前仍以该周龄段的大鼠为模型构建的最佳选择。

经回归分析观察到在大鼠永久性中动脉栓塞模型中,梗死时间与梗死面积存在一定的相关性。同时相关研究发现,在大鼠局部缺血 2 h 后,在基底节

区开始出现梗死灶,4 h 时梗死体积明显扩大并随时间渐趋扩大。但是栓塞 12 h,梗死面积已经趋于稳定,与 24 h 时梗死面积没有显著性差别(Koizumi *et al.*, 1986; Longa *et al.*, 1989; Cao & Cao 2004)。这是因为基底神经节具有丰富的动脉分支,对突发性缺血非常敏感,故首先出现梗死灶。在血供得不到恢复的情况下,由于侧枝血管机能丧失和局部血栓的形成,造成周边水肿带范围扩大,进而产生新的梗死区,使整个梗死体积增加。但是,由于对侧 CCA 在同一时间出现代偿性供血,以及少量的椎动脉的补充供血,使这一梗死增益效果能在短时间内出现抑制。这一效果一般出现在梗死发生后 12 h 左右。为了排除这种生理性代偿效果带来的影响,在本实验中选用了中动脉栓塞后 2 h 作为检测时间点,能更加准确地评价由中动脉栓塞直接导致的大脑局部区域梗塞。Schmid-Elsaesser 等(1998)在缺血再灌注的相关研究中也选择了相似的时间(1.5 h)作为一次损伤的监测点,间接印证了我们的观点。

动物模型成功与否关键在于脑梗死部位与范围的恒定,重复性好,并且病理生理过程尽可能模拟人的发病过程。建立成功率高、重复性好及稳定性高的局灶性脑缺血模型是一个很重要的环节(范红杰等,2003)。本实验采用的颈内动脉栓塞法成功阻断大鼠大脑中动脉,制备出局灶性脑缺血的动物模型,具有操作简便、快速、耗时少等优点。后期相关检测和评价显示实验结果稳定、重复性好、模型成功率高、大鼠死亡率降低。该手术术式还具有无需开颅、创伤小,栓塞 MCA 后不会引起血压、血气和体温的异常变化等优点。当然,目前对大鼠 MCAO 模型的大量研究显示采用不同方法构建的模型都有其利弊,应根据动物模型的构建原理,结合实验目的合理选用,以期达到最好的效果。

4 参考文献

- 范红杰,于维东,欧阳巍,等. 2003. 栓线法建立大鼠中动脉局灶缺血实验模型对再灌注损伤的评价意义[J]. 中国临床康复,7(16): 2292~2293.
- 辛世萌,刘远洪,聂志余,等. 2000. 栓线长度、直径及大鼠体重与栓线法大鼠局灶性脑缺血模型关系的研究[J]. 大连医科大学学报,22(2):105~107.
- Alexis NE, Dietrich WD, Green EJ, *et al.* 1995. Nonocclusive common carotid artery thrombosis in the rat results in reversible sensorimotor and cognitive behavioral deficits[J]. Stroke: a journal of cerebral circulation, 26(12): 2338~2346.
- Aspey BS, Taylor FL, Terruli M, *et al.* 2000. Temporary middle cerebral

- artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke and reperfusion[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*,26(3):232~242.
- Bartus RT, Dean RL, Cavanaugh K, *et al.* 1995. Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion: implications for therapeutic intervention and the role of calpain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*,15(6):969~979.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, *et al.* 1986. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,17(3):472~476.
- Bejot Y, Ben Salem D, Osseby CV, *et al.* 2009. Epidemiology of ischemic stroke from atrial fibrillation in Dijon, France, from 1985 to 2006 [J]. *Neurology*,72(4):346~353.
- Cai H, Yao H, Ibayashi S, *et al.* 1998. Photothrombotic middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats: influence of substrain, gender, and distal middle cerebral artery patterns on infarct size [J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,29(9):1982~1987.
- Cao X, Cao BZ. 2004. A study of rat focal cerebral ischemia model established by middle cerebral artery occlusion through ligation with rat moustache instead of nylon monofilament [J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*,8(10):1958~1959.
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, *et al.* 1995. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,26(4):627~635.
- Ito D, Tanaka K, Suzuki S, *et al.* 2001. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain[J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,32(5):1208~1215.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, *et al.* 1986. Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,8(11):1~8.
- Lin LL, Liu AJ, Liu JG, *et al.* 2007. Protective effects of scutellarin and breviscapine on brain and heart ischemia in rats[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*,50(3):327~332.
- Liu C, Wu J, Gu J, *et al.* 2007. Baicalein improves cognitive deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*,86(3):423~430.
- Liu LS. 1989. Hypertension studies in China[J]. *Clinical and experimental hypertension*,11(5-6):859~868.
- Liu XG, Xu LN. 1995. A rat middle cerebral artery thrombosis model for evaluation of thrombolytic and antithrombotic agents[J]. *Yao Xue Xue Bao*,30(9):662~667.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,20(1):84~91.
- Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, *et al.* 1993. Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats[J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,24(2):286~292.
- Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK, *et al.* 1992. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,23(4):552~559.
- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, *et al.* 1998. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry[J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,29(10):2162~2170.
- van Walraven C, Hart RG, Connolly S, *et al.* 2009. Effect of age on stroke prevention therapy in patients with atrial fibrillation: the atrial fibrillation investigators[J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,40(4):1410~1416.
- Wang LC, Futrell N, Wang DZ, *et al.* 1995. A reproducible model of middle cerebral infarcts, compatible with long-term survival, in aged rats [J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*,26(11):2087~2090.
- Wang W, Dong WW, Fu YY, *et al.* 1996. The MCA occlusion and reperfusion model induced by photochemistry[J]. *Chin J Neurol Ment Dis*,22(1):27~30.

(上接第 451 页)

- Conover MR, Pitt WC, Kessler KK, *et al.* 1995. Review of data on human injuries, illnesses, and economic loss caused by wildlife in the United States[J]. *Wildlife Society Bulletin*,23:407~414.
- Cook A, Rushton S, Allan J, *et al.* 2008. An evaluation of techniques to control problem bird species on landfill sites[J]. *Environmental Management*,41:834~843.
- Darryl LY, Richard ME, John LC, *et al.* 2001. A review of the hazards and mitigation for airstrikes from Canada geese in the Anchorage, Alaska bowl[J]. *Integrated Pest Management Reviews*,6:47~57.
- Li X, Yang GS, Jiang CY, *et al.* 2007. Assessing the hazard grade of bird-strike in spring at Baita Airport, Hohhot [J]. *Zoological Research*,28(1):161~166.
- MacArthur RH, MacArthur JW. 1971. On bird species diversity [J]. *Ecology*,42(4):594~598.
- Servoss W, Engeman RM, Fairairl S, *et al.* 2000. Wildlife hazard assessment for Phoenix Sky Harbor International Airport [J]. *International Biodegradation*,45:111~127.