

·综述·

卒中后抑郁啮齿类动物模型的建立与评价研究进展*

王倩¹ 由凤秋¹ 熊婧¹ 田晔^{1,2}

卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)是脑卒中后的常见并发症,是卒中首发后2—3年内的普遍结局^[1],其发病率为6%—79%^[2]。PSD以情感淡漠、兴趣缺失、睡眠障碍为主要表现,严重影响卒中患者日常生活、社会交际及神经功能的恢复^[3],并增加卒中再发危险及其他血管相关性事件的发生,导致致残率、致死率的增加^[4-5]。然而到目前为止PSD的发病机制尚不明确,而动物模型的建立有助于其机制的研究及治疗手段的探索,是基础实验的出发点。故本文对近年来文献报道中常用的啮齿类动物PSD模型的建立与评价加以阐述,其中国内文献报道多为复合模型即在卒中基础上结合相应应激刺激构建PSD模型,故文章主要分成三部分介绍:即常用卒中模型的建立与评价;PSD模型的建立;PSD模型的评价,以期建立最适PSD模型,进而对卒中后抑郁的防治提供思路。

1 卒中模型的建立与评价

1.1 线栓法建立局灶性脑缺血模型

近年来常用的线栓法为大鼠一侧大脑中动脉线栓栓塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO),其原理为通过线栓插入后形成血栓进而阻断血流的灌注建立局灶性脑缺血模型。线栓法中线栓可通过多种途径进入大脑中动脉,如王少华^[6]文献所示分离暴露颈部各血管,于颈总动脉近心端和颈外动脉分别挂线结扎,颈总动脉远心端挂线备用,血管夹夹闭颈内动脉,于颈总动脉近分叉处剪一切口,自切口插入线栓系牢栓线,放开血管夹将线栓插入大脑中动脉; Machael Dittmar等^[7]采用经颈外动脉栓塞大脑中动脉,分离暴露颈部各血管,将颈外动脉分支动脉枕动脉、甲状腺上动脉、舌动脉电凝切断,血管夹夹闭颈总动脉,结扎颈外动脉剪掉其远心端于近心端插入线栓; Matthew Boyko等^[8]将线栓直接于颈内动脉的切口栓塞大脑中动脉,分离暴露颈部各血管,分离枕动脉并电凝切断,于颈内动脉挂双线,将近心端结扎线结扎,于两线间做切口插入线栓。

线栓法自Koizumi J^[9]发明建立后经过大量学者对其包括线栓类型、线栓头包被物质、线栓插入深度等的改进完善,

已成为成熟经典的卒中模型的建立方法。此方法不仅可使梗死面积更趋稳定,改善术后体重增长,亦可建立永久性缺血及缺血再灌注模型即通过对不同再灌注时间点的研究揭示神经元缺血再灌注损伤等的发病机制;且该方法不需开颅从而减少对大鼠的创伤,降低手术难度及术后并发症。然而此方法在动脉分支的分离结扎过程中存在难度,存在30%病死率,且仅能模拟部分临床脑缺血模型,与人类卒中仍存在差异。

1.2 血管结扎局部或全脑缺血模型

血管结扎局部或全脑缺血模型包括四血管结扎全脑缺血模型及单/双侧颈总动脉永久性结扎脑缺血模型。四血管结扎全脑缺血模型是将供应脑的双侧椎动脉及颈总动脉全部结扎,以达到缺血的目的。具体方法为,将健康成年大鼠俯卧位固定于脑立体定位仪,于枕骨下第一颈椎水平正中切口,分离暴露第一颈椎翼孔,电凝器烧灼双侧椎动脉后用骨蜡封闭翼孔致永久性闭合。后取仰卧位颈部正中切口,分离双侧颈总动脉,套线待用,于禁食24h后大鼠清醒状态下固定,结扎双侧栓线,一定时间后松开恢复再灌建立全脑缺血再灌注模型。其中全脑缺血成功标志为双侧颈总动脉结扎后出现昏迷及对光反射消失,此外可以借助超声显示所结扎血管血流的阻断或血流的恢复^[10]。该模型是广泛应用的全脑缺血模型,可模拟临床全脑缺血类型。但此模型手术比较复杂,且有一定几率出现缺血性抽搐而导致模型建立失败。单/双侧颈总动脉永久性结扎脑缺血模型则是通过颈总动脉结扎建立局灶性脑缺血^[11],该模型是常用的慢性脑缺血模型,大鼠术后病死率低。

1.3 开颅脑损伤缺血模型

开颅脑损伤缺血模型包括通过电凝阻断大脑中动脉致大脑半球皮质和基底核缺血性损伤以模拟临床脑缺血的电凝大脑中动脉致局灶性永久性脑缺血模型;通过大脑中动脉血栓的形成阻断血流模拟临床脑梗死的大脑中动脉三氯化铁血栓致局灶性脑缺血模型,去除大鼠脑皮质血管致脑缺血模型。前两种模型均自眼眦和外耳道中线处做一切口,用咬骨钳咬去颧弓,暴露颅骨后钻孔开窗,暴露大脑中动脉^[12]。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.12.027

*基金项目:陕西省卫生厅科研基金(2012D43)

1 西安交通大学附属西安市中心医院神经内科,西安,710003; 2 通讯作者
作者简介:王倩,女,硕士研究生; 收稿日期:2013-10-27

借助电凝器阻断大脑中动脉或将沾有50%三氯化铁溶液的滤纸敷在大脑中动脉处使其形成血栓进而阻断大脑中动脉血流。去除大鼠脑皮质血管致脑缺血模型则是剪开大鼠头部皮肤,暴露左侧颅骨,分别钻6个孔,翻开左侧颅骨,暴露左硬脑膜后剪开硬脑膜暴露软脑膜,用蘸生理盐水的棉球轻轻擦拭至显微镜下见不到血管为止^[12]。开颅致脑缺血模型是在显微镜下直视操作,脑梗死率高,且颅骨开窗降低脑缺血后大脑水肿所致的颅高压等并发症降低大鼠病死率。但其缺点是开颅操作引起脑脊液漏,术后感染率高。

PSD模型中常用的几种脑缺血致卒中模型上文已描述,其中卒中模型的成功建立是前提,故对其是否成功建立的评价显得尤为重要。下面介绍2种常用的神经功能损伤的评价标准,包括:Longa^[13]评分法常在缺血后24h内评定,0=无神经功能学损伤;1=不能完全伸展其对侧前爪;2=向对侧转圈;3=肢体向对侧倾倒;4=无自发活动伴意识水平下降,一般选评分1—3分的大鼠入组。神经功能损伤严重评分(NSS)为1992年Menzies等^[14]研究创立,0=无神经功能学损伤;1=对侧前肢屈曲;2=对侧前肢握力下降;3=悬尾时肢体向对侧转圈;4=向对侧自发转圈,常作为动物入组的排除标准即选评分1—4分大鼠入组。以上2种标准主要是从运动功能改变上给予评判,此外仍包括认知、感知等多方面的评判方法,这就要求实验者根据自己实验需求选择既简便又准确的评判方法。

2 PSD模型的建立

PSD模型是在卒中成功建立基础上结合相应刺激构建而成。其构建方法目前可分为以下几种:

2.1 慢性不可预见性温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)结合孤养

CUMS最初由Willner(1997)等设计制造抑郁模型,其后经学者不断改造。CUMS包括一系列刺激如王少华^[15]新建PSD模型中的禁水禁食20h,禁水17h后暴露1h空水瓶,45°斜笼17h,持续昼夜光照36h,脏笼17h(每100g木屑中加入200ml水),双笼饲养2h,4℃水游泳5min,足电击(30min,每隔5s电击一次总共30min,电压强度为更好能引起大鼠跳跃或尖叫),夹尾1min。每天任取一种刺激持续18天,平均每种刺激给予2次。另外还包括其他相似刺激如水平震荡,噪音刺激,明暗交替(1h照明,1h黑暗,进行12h),禁食24h,禁水24h,45℃烘箱中热烘等。该系列刺激温和且多种多样符合临床上患者所经受的不可预见性的小事件,既模拟了其引起的抑郁核心症状(快感的缺失),也模拟了许多其他中性抑郁障碍的表现如运动能力,社交能力,探索行为能力等的下降。

2.2 孤养结合束缚应激

倪贵华等^[16]于卒中术后7天大鼠神经功能缺损症状恢复后将大鼠固定于特制笼中,每天2h,时间不固定,但是必须在08:00—18:00,不影响大鼠正常昼夜节律建立有效的PSD模型。

2.3 不可预见刺激结合孤养及情志刺激

钱海兵等^[17]将卒中成功大鼠予14天孤笼饲养,每天于10:00—16:00间任取2h将大鼠单独放在特制的观察笼中限制活动后接受强迫游泳和夹尾刺激。其中强迫游泳是在特制观察笼帮助下将大鼠固定于水槽中,水面至大鼠颈部,持续10min,1次/d。夹尾刺激为夹尾频率为每分钟2—3次,每次5—10s不等,10次/d,构建有效的PSD模型。

3 PSD模型的评价

PSD模型成功建立的评价为卒中成功建立基础上的抑郁症状的检测,包括通过行为学检测和/或神经递质、激素的表达变化等方面。行为学检测包括糖水消耗试验,旷场试验,悬尾试验,强迫游泳试验,穿梭箱试验等。其中糖水消耗试验作为快感检测的标准,因快感缺失是抑郁的核心症状,故糖水消耗试验成为抑郁建立的首选检测标准。旷野试验反应卒中抑郁后运动功能及活动兴趣的降低。强迫游泳试验及悬尾试验中静止不动时间的增加及穿梭箱试验中逃避次数的减少都是抑郁中绝望行为的表现,具有相同的作用。神经递质如去甲肾上腺素、五羟色胺、多巴胺等含量减少,糖皮质激素水平增加,且与假手术组相比数据具有显著性意义说明PSD模型建立成功。下文主要介绍几种常用的行为学检测方法。

3.1 糖水消耗试验

即PSD模型建立前后对糖水的消耗量及糖水偏嗜比作为参考指标评价其快感的变化。糖水消耗试验方法较多其主要区别在于糖水适应及糖水消耗试验的测量时间上,但因是对同批动物前后采用相同标准且最后是对数据显著性差异的比较,故实质意义相同,差别不大。如在Benelli A等^[17]的报道中采用的具体方法为:先给予大鼠糖水训练检测其基线值,即先24h的两瓶1%蔗糖水,再24h的一瓶糖水一瓶自来水,禁水禁食23h后测1h糖水消耗(一瓶糖一瓶水30min后交换位置最后统计糖水消耗量及糖水偏嗜比即糖水摄取值/糖水和水的总摄入量),给2h的正常饮水饮食,21h的禁水禁食后测量1h的糖水消耗,继续正常饮水饮食4天后24h禁水禁食测1h的糖水消耗,以最后一次数据作为基线值,并根据该数据将大鼠随机分组。在Huang Z等^[18]文献中先24h的两瓶1%蔗糖水,再24h的一瓶糖水一瓶自来水,禁水禁食24h后测4h糖水偏嗜比,其中大鼠单笼饲养可自由获取糖水(100ml)和自来水(100ml)。糖水消耗试验常在CUMS开始后于每周的固定一天禁水禁食后测量,模型建立成功标志是模

型组与对照组相比糖水消耗量及糖水偏嗜比下降,且数据具有显著性差异。

3.2 旷野试验

指将动物置于一宽阔环境中观察其在新环境下的水平、垂直、修饰等运动。常选用80cm×80cm×40cm的正方形箱子或直径80cm高40cm的底为白色四周为黑色的箱子,记录大鼠3或5min内的活动包括水平运动(即水平穿越的格子数若沿线行走以10cm记录为一个格子数),反应运动活动性水平;垂直运动(即大鼠的直立次数一般为双侧前肢离开地面直至完全放下记录为一次),反应动物对新鲜环境的好奇程度;修饰运动(即大鼠用两前爪整理头面部或身体至双足完全落下记录为一次),反应动物对周围环境的要求和对自身的关注程度;中央格停留时间的长短反应大鼠启动活动潜伏期^[6]。于PSD模型建立前测试大鼠的基线数据选取数据相近的大鼠入组,其成功建立的标志为模型组与对照组相比水平运动,垂直运动,修饰运动次数减少且数据有显著性差异。

3.3 强迫游泳试验

指将动物放于局限的空间内游泳,开始时它们泳动试图逃跑,尝试多次失败后处于绝望漂浮的不动状态,即仅保持头部露出水面的四肢滑动。其中大鼠造模前需测量基础值,第1天将大鼠放入高40cm直径18cm的玻璃圆筒内,桶内水深15cm(水温度为23℃),15min后取出,用吹风机吹干,24h后将大鼠再次放入圆筒内,记录5min内大鼠的不动时间和挣扎时间。小鼠造模不需要预游泳,直接测试将小鼠放入水桶(高20cm、直径14cm、水深约10cm)中游泳6min中记录后4min内的不动时间^[19],PSD组与对照组相比不动时间延长,且数据具有显著性差异表示模型建立成功。

3.4 悬尾试验

将小鼠于试验开始前60min放于测试房间,将其尾巴固定在挂钩上,在计算机系统帮助下记录鼠在6min中的不动时间,当PSD组与对照组相比不动时间延长,且数据具有显著性差异表示模型建立成功。该试验主要适用于小鼠,评估小鼠对抗抑郁药、兴奋药、镇静药物的疗效^[20]。

3.5 被动躲避试验

将大鼠放于暗室中,当大鼠受到电击后逃至明室。当大鼠再次进入暗室时会再次受到电击,此时记录为1次,直至大鼠在明室呆上2min或遭受电击达20次,记录大鼠遭受电击的总次数及其总的被电击时间,当PSD组与对照组相比总电击次数及时间增加且数据具有显著性差异表示模型建立成功^[21]。

3.6 穿梭箱试验

以声或光刺激与电击为联合刺激,使实验动物由被动回避建立主动回避的条件反射,反应动物的学习与记忆能力。在Masaya Kato等文献^[22]中缺血2h再灌注大鼠于第7、8、9天

行3天训练试验,第13、14、15天行测试试验其中以第15天的数据作为最终数据。将大鼠置于穿梭实验箱(45cm×20cm×19.1cm,箱底部分为安全区和电击区)内先适应5min中后测试30次,每次间隔30s,先给予最长3s的80—90dB的声音刺激,此期间大鼠可逃至安全区避免随后的电击刺激即为主动躲避。随后给予最长3s的0.8mA的电刺激,此期间大鼠进入安全区为被动躲避。若大鼠在声或电击刺激结束后未躲避为躲避失败。结局显示缺血两小时再灌注大鼠给安慰剂组较给抗抑郁药组在主动及被动躲避次数上明显减少且数据有显著性意义,说明PSD模型建立成功。

除以上常用的几种评价方法外,一项关于PSD动物多导睡眠电图研究发现PSD大鼠较对照组及卒中组快动眼睡眠潜伏期缩短,快动眼睡眠时间百分比降低且数据有显著性差异,该表现与抑郁及卒中后抑郁患者睡眠障碍改变如睡眠潜伏期延长,睡眠总时间减少,早醒,睡眠效率下降相一致,故多导睡眠图可以作为PSD模型的检测指标^[23]。最近有学者对卒中后抑郁样症状下了定义:即出现糖水偏嗜比<50%,5min的强迫游泳试验不动时间>60s,穿梭箱试验中主动躲避<10次,被动躲避>20次^[24],则NSS评分≥1分的大鼠出现上述抑郁表现后认为卒中后抑郁模型成功建立。

4 小结

目前脑卒中后抑郁动物模型的建立国内外文献报道较少,其中国内文献常采用复合模型来建立即先创建脑缺血模型引起脑神经功能损伤后再结合相应应激刺激。其最常见的是大脑中动脉栓塞术后结合慢性不可预见性应激及孤养构建PSD模型^[25-27],进而去研究其潜在的相关机制或药物作用机制等。国外文献常是在卒中模型建立一段时间后检测几种抑郁症的行为学表现,出现抑郁样表现且数据具有显著性差异即认为模型建立成功^[22,28]。关于卒中模型的建立方法很多且较成熟,但对于初学者来说仍存在较大挑战,首先是模型的掌握需要一段时间,包括手术的熟练及细致程度;其次是卒中的稳定性即卒中严重程度,其中以轻、中度神经功能损伤较好便于动物的存活;最后是动物的病死率,因卒中手术损伤大且术后伴有各种并发症致动物病死率高,因此,要求实验者从手术到术后营养、生存环境等各环节高度注意。此外关于该模型成功建立的评价尚未有一个确切标准,这为广大学者提供一个建立稳定的模型及评价方法的契机。

总之,本文对国内外常用的模型建立及评价的相关标准、行为学试验方法做了较详细的描述,希望对研究该领域的初学者有所帮助。

参考文献

- [1] Berg A, Palomaki H, Lehtihalmes M, et al. Poststroke de-

- pression: An 18-month follow-up[J]. *Stroke*, 2003, 34(1): 138—143.
- [2] Whyte EM, Mulsant BH, Vanderbuilt J, et al. Depression after stroke: a prospective epidemiological study[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2004, 52(5): 774—778.
 - [3] Gillen R, Tennen H, McKee TE, et al. Depressive symptoms and history of depression predict rehabilitation efficiency in stroke patients[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2001, 82(12): 1645—1649.
 - [4] Lenze EJ, Rogers JC, Martire LM, et al. The association of late-life depression and anxiety with physical disability: A review of the literature and prospectus for future research[J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2001, 9(2): 113—135.
 - [5] Schulz R, Beach SR, Ives DG, et al. Association between depression and mortality in older adults: the cardiovascular health study[J]. *Arch Intern Med*, 2000, 160(12): 1761—1768.
 - [6] Wang SH, Zhang ZJ, Guo YJ, et al. Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression[J]. *J Psychopharmacol*, 2009, 23(3): 295—304.
 - [7] Dittmar M, Spruss T, Schuierer G, et al. External Carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Stroke*, 2003, 34(9): 2252—2257.
 - [8] Boyko M, Zlotnik A, Gruenbaum BF, et al. An experimental model of focal ischemia using an internal carotid artery approach[J]. *J Neurosci Meth*, 2010, 193(2): 246—253.
 - [9] Koizume J, Min Z, Imanaka T, et al. Temperature-dependent plasmid integration into and excision from the chromosome of *Bacillus stearothermophilus*[J]. *J Gen Microbiol*, 1986, 132(7): 1951—1958.
 - [10] 曾建平, 石学银, 缪小勇. 细胞间黏附分子-1单克隆抗体对全脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用[J]. *中国麻醉学杂志*, 2010, 1(1): 83—85.
 - [11] 钱海兵, 王毅, 黄国钧. 一种脑卒中后抑郁症模型的建立[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(3): 746—747.
 - [12] 何晓山, 林青, 周宁娜. 脑卒中后抑郁常用动物模型[J]. *医学信息*, 2011, 24(3): 1459—1461.
 - [13] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84—91.
 - [14] Menmes SA, Hoff JT, Bets AL. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model[J]. *Neurosurgery*, 1992, 31(1): 100-6:discussion 6—7.
 - [15] Wang SH, Zhang ZJ, Guo YJ, et al. Decreased expression of serotonin 1A receptor in the dentate gyrus in association with chronic mild stress: a rat model of post-stroke depression[J]. *J Psychopharmacol*, 2009, 170(2-3): 245—251.
 - [16] 倪贵华, 邵蓓, 范虹. 卒中后抑郁实验动物模型的研究[J]. *温州医学院学报*, 2006, 36(6): 524—527.
 - [17] Benelli A, Filafferro M, Bertolini A, et al. Influence of S-adenosyl-L-methionine on chronic mild stress-induced anhedonia in castrated rats[J]. *Brit J of Pharmacol*, 1999, 127(3): 645—654.
 - [18] Huang Z, Zhong XM, Li ZY, et al. Curcumin reverses corticosterone-induced depressivelike behavior and decrease in brain BDNF levels in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 493, 145—148.
 - [19] 秦琴, 刘利学. 抑郁症动物模型概述及评价[J]. *实验动物学*, 2010, 27(1): 53—59.
 - [20] Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice[J]. *Neurosci Biobehav R*, 2005, 29(4-5): 571—625.
 - [21] 刘福友, 杨石, 陈卫根, 等. 脑卒中后抑郁大鼠模型的建立[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(42): 91—94.
 - [22] Kato M, Iwata H, Okamoto M, et al. Focal cerebral ischemia-induced escape deficit in rats is ameliorated by a reversible inhibitor of monoamine oxidase-a: implications for a novel animal model of post-stroke depression[J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(4): 406—410.
 - [23] 王旭生, 宋景贵. 卒中后抑郁大鼠睡眠图研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 2010, 26(4): 510—512.
 - [24] Boyko M, Kutz R, Gruenbaum BF, et al. The influence of aging on poststroke depression using a rat model via middle cerebral artery occlusion[J]. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 2013, 13:847—859.
 - [25] Li DQ, Li XJ, Duan JF, et al. Effects of Wuling Capsule on hippocampal dependent cognitive changes in post-stroke depression rats[J]. *International Journal of Pharmacology*, 2011, 7(1): 50—57.
 - [26] Yan YM, Fan WT, Liu L, et al. The effects of Xingnao Jieyu capsules on post-stroke depression are similar to those of fluoxetine[J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(19): 1765—1772.
 - [27] Zhang ZH, Wu LN, Song JG, et al. Correlations between cognitive impairment and brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of post-stroke depression rats[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(4): 889—893.
 - [28] Nabavi SF, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SM, et al. Bi-3-azaxoisoaporphine derivatives have antidepressive properties in a murine model of post stroke-depressivelike behavior[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2013, 10(2): 164—171.