

·基础研究·

改良大鼠双侧颈总动脉结扎方式建立血管性痴呆模型的评价研究*

谭洁¹ 韩国栋² 张泓¹ 黎帅¹ 卢锦华¹ 潘爱环¹

摘要

目的:通过比较不同造模方法建立的血管性痴呆模型大鼠在学习记忆能力、术后死亡率、海马组织学检查等方面变化,探讨改良颈部小切口双侧颈总动脉永久性双重结扎血管性痴呆模型建立的可行性,为建立操作简单、死亡率低的血管性痴呆模型提供客观依据。

方法:将经水迷宫筛选的36只雄性SD大鼠随机分为假手术组、小切口双重永久性结扎模型组及分期永久性结扎模型对照组,每组各12只。小切口双重永久性结扎模型组在麻醉下一次性结扎后剪断大鼠双侧颈总动脉;分期永久性结扎模型对照组在麻醉下先分离结扎大鼠一侧颈总动脉,1周后再次在麻醉下行另一侧颈总动脉结扎;假手术组操作基本同模型组,但分离颈总动脉后不予以结扎。在术后48h及30d内记录各组大鼠死亡率,30d后对各组大鼠行水迷宫测试检测大鼠学习记忆能力,水迷宫测试结束后处死大鼠,观察大鼠脑海马组织的形态学变化。

结果:小切口双重永久性结扎模型组与分期永久性结扎模型对照组术后48h内死亡率比较无明显差异($P>0.05$),但前者大鼠死亡数量较后者少;术后30d内小切口双重永久性结扎模型组与对照组比较死亡率明显降低,差异有显著性意义($P<0.05$);两种模型组大鼠与假手术组比较,学习记忆能力明显下降,差异有显著性意义($P<0.05$),而两种模型组大鼠学习记忆能力比较,差异无显著性意义($P>0.05$);两种模型组大鼠脑海马组织较假手术组大鼠均发生明显病理形态学改变。

结论:小切口双重永久性结扎方法可以较好地复制大鼠大脑永久性慢性灌注不足引起的血管性痴呆模型,引起与记忆相关的大鼠脑海马组织损害;小切口双重永久性结扎方法与分期永久性结扎方法在造模效果上没有本质的区别,但大鼠的死亡率却显著性降低。

关键词 血管性痴呆;水迷宫;模型;大鼠

中图分类号:R749.1, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-03-0264-05

**Evaluation of vascular dementia rat model established by modified bilateral carotid artery ligation way/
TAN Jie, HAN Guodong, ZHANG Hong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(3):
264—268**

Abstract

Objective: By comparing learning and memory ability, postoperative mortality and changes of hippocampus tissue for different vascular dementia model, we investigate the feasibility of modified bilateral carotid artery ligation dementia model with small incision, which constructs the objective basis for the establishment of vascular dementia model with simple operation and low mortality.

Method: After being screened by the water maze, 36 male SD rats were randomly divided into sham group, small incision double permanent ligation group and staging permanent occlusion control group, with 12 cases in each group. Under anesthesia, we ligated and transected the bilateral carotid arteries in the small incision

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.03.004

*基金项目:湖南省“十二五”重点学科针灸推拿学开放基金重点资助项目(2015-02);湖南省中医药科研计划项目(2012120)

1 湖南中医药大学,长沙,410208; 2 湖南省脑科医院

作者简介:谭洁,女,博士,副教授;收稿日期:2016-01-22

double permanent ligation group, while isolated and ligated carotid artery ligation for one side, and for the other side after one week in the staging permanent occlusion control group. The mortality was recored in 48h and 30d postoperatively. The learning and memory ability was assessed by water maze at 30d postoperatively. Finally, the rats were sacrificed to examine the hippocampal morphological changes.

Result: Although the double permanent ligation group had the less number of dead rats, there was no obvious difference for the mortality between two model groups in 48h after operation. In 30d postoperatively, the mortality decreased significantly in the double permanent ligation group when compared with the control group ($P < 0.05$). The ability of learning and memory had significant decrease for both model groups as compared with the sham group ($P < 0.05$), while no significant difference between two model groups ($P > 0.05$). Furthermore, the hippocampus also showed the obvious pathological changes in the model groups.

Conclusion: Small incision double permanent ligation method can effectively reproduce the vascular dementia model caused by permanent chronic hypoperfusion. In spite of the same modeling results as the staging permanent ligation method, the small incision double permanent ligation method has the significantly lower mortality for rats.

Author's address Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208

Key word vascular dementia; water maze; model; rat

血管性痴呆(vascular dementia, VD)^[1]是多种脑血管因素(急性或/和慢性缺血、出血等)导致的,尤其是海马、皮质等脑组织累积性损伤引起的获得性智能损害综合征,病理特征是多发性脑梗死及反复脑缺血,主要临床表现为记忆、认知功能损伤,可伴有语言、运动、人格等方面障碍。从20世纪70年代末至今,关于VD的实验室研究越来越多,VD动物模型的制作方法多种多样,如:四血管阻断法、二血管结扎及夹闭缺血再灌注等模型,其中四血管阻断模型是公认的VD模型,虽能高度模拟VD的发病特点,且缺血后生理指标稳定,但是因手术复杂、死亡率过高而限制其应用。本研究将目前常用的双侧颈总动脉分期永久性结扎模型与改良的颈部小切口双侧颈总动脉永久性双重结扎模型进行评价,为探索简便、易操作、死亡率低的VD模型提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与仪器

健康清洁级雄性SD大鼠,体质量(220 ± 20)g,由湖南中医药大学动物中心提供,质量合格证: NO.43004700005187;许可证号: SYXK(湘)2013-0005。实验前行Morris水迷宫定位航行试验评测(具体方法见行为学评价方法),以搜索持续时间(逃避潜伏期)作为衡量大鼠记忆功能的标准,连续训练

5d,每天训练1次,并记录每只大鼠每次的测试成绩,计算出每只大鼠5天训练测试的平均成绩,以平均成绩作为参照,剔除个别不会游泳、体质较弱及在5次测试成绩均很差且无明显改善的大鼠。通过上述评测共筛选出36只认知能力合格的大鼠。每日光照12h,自由进食水,饲养环境22—25℃。MT-200 Morris水迷宫视频分析系统(成都泰盟科技有限公司)由湖南中医药大学实验中心提供。

1.2 实验动物分组及方法

将36只SD大鼠随机分为3组,每组12只,即假手术对照组、颈部小切口双侧颈总动脉永久性双重结扎模型组、双侧颈总动脉分期永久性结扎模型对照组。具体实验方法如下。

小切口双重永久性结扎模型组^[2]:大鼠术前12禁食,自由饮水。以10%水合氯醛(30mg/100g, ip)麻醉后,将大鼠仰卧位固定于鼠台,颈部皮肤剪毛备皮,碘伏酒精常规消毒,切口位于颈正中左侧旁开0.5cm处,长约1cm,钝性分离皮下组织后,于切口正下方的斜方肌与气管夹角处可见颈总动脉搏动,剥离迷走神经后分离出颈总动脉,在近心端与远心端处分别以4号丝线进行双重结扎并剪断颈总动脉。术中动作轻柔,避免钳夹和过分牵拉迷走神经,注意无菌原则,行间断缝合,术毕,再将颈正中右侧旁开0.5cm处切开,进行相同手术。

分期永久性结扎模型对照组:大鼠麻醉、固定,

取颈正中切口,切口长约1.5cm,钝性分离皮下组织,于一侧肌肉间隙中分别分离出颈总动脉,以4号丝线双重结扎一侧颈总动脉,1周后进行另外一侧分离结扎。其余同改良方法。

假手术对照组:双侧颈总动脉不结扎,余同传统模型组。

1.3 指标测定

1.3.1 大鼠存活率与死亡率测定:观察术后48h内及30d内各组大鼠的死亡及存活情况。

1.3.2 行为学评价方法:采用Morris水迷宫学习记忆行为测试^[3-4],对大鼠进行学习记忆能力评测。Morris水迷宫实验分为两部分:①定位航行试验(place navigation),实验开始先将大鼠放入水池中(不放平台)自由游泳2min(120s)使其熟悉迷宫环境。实验共历时5d,每天定于固定时间段,每个时间段训练4次。训练开始时,将平台置于NW象限,将受试大鼠按顺时针方向依次由第一象限,第二象限,第三象限,第四象限入水点顺序面向池壁放入水中。记录2min(120s)内寻找平台的时间(逃避潜伏期)。如果大鼠在2min内找到平台,记录2min中内实际逃避潜伏期;如果在2min内未找到平台,由实验者将其引上平台并停留15s,逃避潜伏期记录为2min。每天以大鼠4次训练潜伏期的平均值作为其当日的学习成绩。②空间探索试验(spatial probe),第6天撤除原平台,将大鼠任选1个入水点放入水中,所有大鼠必须为同一入水点,观察并记录大鼠2min(120s)内穿越原平台区域的次数。

1.3.3 大鼠海马组织形态学观察:最后1次水迷宫检测完成后,麻醉处死各组SD大鼠,于碎冰上及时分离出SD大鼠脑组织,将大鼠脑海马组织标本置于4%多聚甲醛溶液中固定24—48h后,再进行完全脱水处理,石蜡包埋,冠状切片,片厚5 μ m,二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水,苏木精-伊红染色处理,中性树脂封片,于光镜下观察大鼠脑海马组织病理形态学改变。

1.3.4 大鼠海马组织尼氏染色观察:最后一次水迷宫检测完成后,麻醉处死各组SD大鼠,于碎冰上及时分离出SD大鼠脑组织,取脑置4%多聚甲醛内,4℃固定24—48h,定位脑缺血区,常规脱水,石蜡包埋,冠状切片,片厚5 μ m,二甲苯脱蜡、梯度酒精脱

水,尼氏染色液染色,中性树脂封片,光镜下观察左侧脑海马组织尼氏小体变化,高倍镜下($\times 400$)随机选取3个视野,计数残存的神经元细胞数目,取平均值。

1.4 统计学分析

运用SPSS 17.0软件进行统计学分析,一般计量数据用均数 $\pm$ 标准差表示。采用 χ^2 检验比较术后死亡率,大鼠行为学数据采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠死亡率比较

术后48h内,小切口双重永久性结扎模型组死亡2只;分期永久性结扎模型对照组在间隔7d的分期结扎中共计死亡3只,两种造模方法术后48h内大鼠死亡率无明显差异($P > 0.05$)。术后30d内,小切口双重永久性结扎模型组共计死亡2只,死亡率为16.7%;分期永久性结扎模型对照组共计死亡5只,死亡率41.7%,两种造模方法术后30d内大鼠死亡率比较有显著性差异($P < 0.05$)。见表1—2。

表1 各组间术后48h内死亡率的比较

组别	死亡数	存活数	死亡率(%)
假手术组	0	12	0
小切口双重永久性结扎模型组	2	10	16.7
分期永久性结扎模型对照组	3	9	25.0

表2 各组间术后30d内死亡率的比较

组别	死亡数	存活数	死亡率(%)
假手术组	0	12	0
小切口双重永久性结扎模型组	2	10	16.7
分期永久性结扎模型对照组	5	7	41.7

2.2 各组大鼠学习记忆能力比较

造模成功后,再次经水迷宫测试,结果显示两种造模方法组SD大鼠学习记忆能力较假手术组SD大鼠降低,差异有显著性意义($P < 0.05$);小切口双重永久性结扎模型组与分期永久性结扎模型对照组两组之间比较无明显差异($P > 0.05$)。见表3。

2.3 术后各组大鼠海马组织尼氏小体变化比较

造模成功后30天,取各组大鼠海马组织行尼氏染色观察,假手术组实验大鼠呈现大量形态结构完整,排列规则的尼氏小体,核仁明显、胞核居中,无水肿、无炎性细胞浸润;小切口双重永久性结扎模型组与分期永久性结扎模型对照组,仅有少量尼氏体或

无,细胞核体积骤减,结构不清晰,胞核深染固缩,排列疏松,核仁消失,出现空泡样变。说明两组不同造模方法模型组实验大鼠有大量的海马锥体细胞凋亡,见图1。与假手术组比较,两组不同造模方法模型组均呈不同程度神经元减少,差异有显著性意义($P < 0.05$),两组不同造模方法模型组神经元数比较无明显差异($P > 0.05$),见表4。

2.4 术后光镜下观察各组大鼠海马HE染色结果

假手术组大鼠海马神经细胞多,形态结构完整、排列规则、边缘清晰,核仁明显、胞核居中,无水肿、无炎性细胞浸润。两组不同造模方法模型组大鼠海马神经细胞数目明显减少,排列稀疏,形态结构不完

整、体积变小,细胞层次不清,胞核固缩、碎裂,细胞间隙增大,有大量的炎性细胞浸润,见图2。

表3 各组大鼠术后学习记忆能力的比较

组别	例数	逃避潜伏期(s)	穿越平台次数
假手术组	12	41.2±18.3	7.2±1.7
小切口双重永久性结扎模型组	10	77.3±23.1 ^①	2.1±1.1 ^①
分期永久性结扎模型对照组	7	80.1±22.6 ^①	1.9±1.3 ^①

术后与假手术组比较:① $P < 0.05$

表4 术后各组大鼠海马组织神经元数变化比较

组别	例数	尼氏染色
假手术组	12	98.74±4.72
小切口双重永久性结扎模型组	10	70.51±3.31 ^①
分期永久性结扎模型对照组	7	69.94±7.70 ^①

术后与假手术组比较:① $P < 0.05$

图1 术后各组大鼠海马区神经元变化 (尼氏染色, ×400)

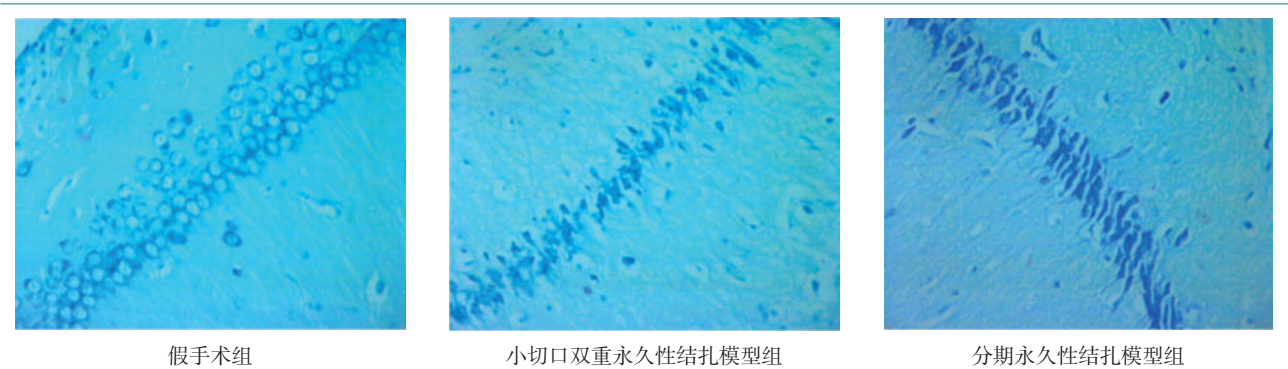
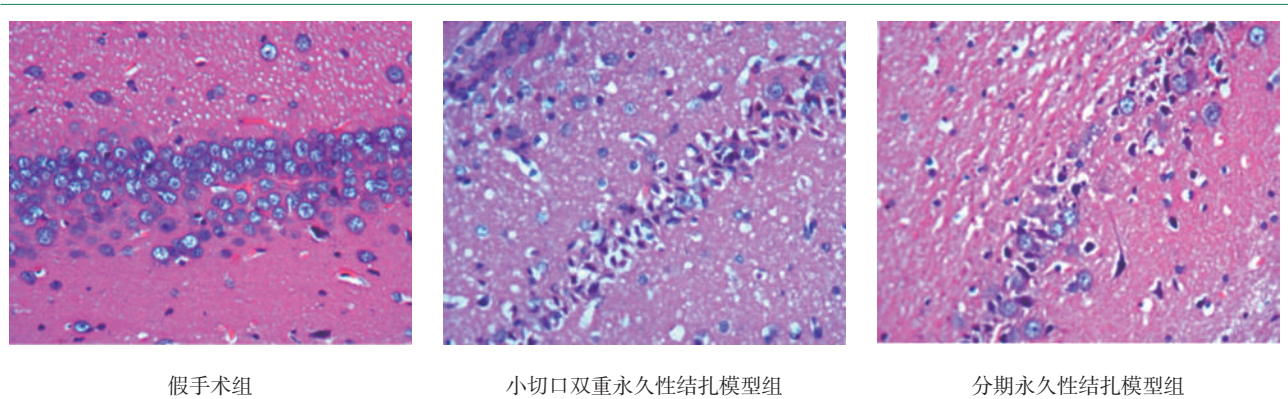


图2 术后各组大鼠海马区神经元变化 (HE染色, ×400)



3 讨论

血管性痴呆病因主要是由于脑血管病变引起供血不足而致脑组织缺血缺氧性改变,最终致使大脑功能全面衰退。基于这一基本理论,目前血管性痴呆大鼠模型构建也多采用脑血管阻断或辅以其他减少脑血流的方法制备动物模型^[5]。其中永久性双侧

颈总动脉结扎法是大鼠慢性低灌注引起血管性痴呆可靠的动物模型^[6],是目前最为常用的制作大鼠慢性全脑缺血的经典方法,并被广泛应用于血管性痴呆研究中^[7-8]。有研究显示结扎双侧颈总动脉术后大鼠额叶皮质、海马区的脑局部血流量明显下降,术后24h最为明显,术后7d大鼠在水迷宫测试中可表

现出明显的学习障碍和记忆损伤^[9-10],随着脑血流量持续下降,额叶及海马区的锥体细胞出现水肿、缺血、凝固性坏死,并逐渐发展为严重脱失、基质疏松及微空泡形成^[11];但传统双侧颈总动脉结扎法存在手术创伤大及术后大脑供血减少和Willis动脉环的代偿不足的缺陷,仍有较高的死亡率^[12]。而分次结扎双侧颈总动脉的方法虽然可以使大鼠大脑供血减少趋势变缓,避免了同时结扎双侧颈总动脉引起术后大鼠脑血流量急剧减少而导致的应激性死亡,但分次结扎方法却存在因多次手术过程造成麻醉意外、出血、感染等诸多不确定性因素增加,进而增加术后大鼠死亡率的缺陷。有研究显示实验中常用的麻醉药物如苯巴比妥钠、水合氯醛可以使大鼠的呼吸频率下降50%左右,致使动物容易出现酸中毒和二氧化碳潴留^[13],因此,多次麻醉手术操作,会造成大鼠麻醉后苏醒时间延长,身体功能减弱,免疫力下降,术后感染概率增加,导致大鼠的死亡风险增大。本研究旨在通过采用改良的颈部小切口双侧颈总动脉双重永久性结扎法,达到减少手术创伤,有效规避麻醉意外、出血、感染等手术的不确定性因素,进而达到提高术后大鼠存活率目的;本研究实验结果证实,两种造模方法术后48h大鼠死亡率无明显差异($P>0.05$),但颈部小切口双侧颈总动脉双重永久性结扎法可有效降低实验动物术后48h—30d内的死亡率,优于分次结扎组($P<0.05$)。实验中我们观察发现虽然同时行小切口双重永久性结扎存在实验大鼠应激性死亡的风险,但大鼠的死亡率明显小于预期,可能主要与手术创伤小,刺激强度小,复原时间短及大鼠脑血管的代偿能力非常强大有关;同时由于采用小切口手术,结扎颈总动脉时要注意分离保护伴行的迷走神经,避免因损伤迷走神经造成的大鼠死亡。

综上,双侧颈总动脉小切口双重永久性结扎模型基本符合操作简单、手术死亡率低、生理病理指标稳定、可重复性强的特点^[14],同时模型动物存在明显的学习记忆障碍,是较理想的血管性痴呆模型,适用于血管性痴呆的发病机制和药物疗效评价研究。

参考文献

- [1] 马大勇,范吉平,朱陵群,等.3种拟血管性痴呆大鼠模型的比较[J].北京中医药大学学报,2011,34(12):832—835.
- [2] 梁慧英,林阳阳,燕铁斌,等.电针对血管性痴呆模型大鼠记忆能力的影响[J].中国康复医学杂志,2015,30(6):527—531.
- [3] Han D, Tian Y, Zhang T, et al. Nano-zinc oxide damages spatial cognition capability via over-enhanced long-term potentiation in hippocampus of Wistar rats[J]. Int J Nanomedicine, 2011, (6):1453—1461.
- [4] Parle M, Bansal N. Antiamnesic activity of an ayurvedic formulation chyawanprash in mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011, (2011):898593.
- [5] 顾静,李海龙,杨长生,等.血管性痴呆大鼠模型制作方法的改良[J].中国实验动物学报,2015,23(6):634—638.
- [6] Jiwa NS, Garrard P, Hainsworth AH. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review[J]. J Neurol Sci, 2010, 299(1—2):188—192.
- [7] Ghanbarabadi M, Iranshahi M, Amouei S, et al. Neuroprotective and memory enhancing effects of auraptene in a rat model of vascular dementia: Experimental study and histopathological evaluation[J]. Neurosci Lett, 2016, (623):13—21.
- [8] Lee CH, Park JH, Ahn JH, et al. Effects of melatonin on cognitive impairment and hippocampal neuronal damage in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. Exp Ther Med, 2016, 11(6):2240—2246.
- [9] Vicente E, Degerone D, Bohn L, et al. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat[J]. Brain Res, 2009, (1251):204—212.
- [10] Wang F, Geng X, Tao HY, et al. The restoration after repetitive transcranial magnetic stimulation treatment on cognitive ability of vascular dementia rats and its impacts on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area[J]. J Mol Neurosci, 2010, 41(1):145—155.
- [11] 孙莉,吴江,王守春,等.血管性痴呆大鼠脑血流量及细胞凋亡的研究[J].中华老年心脑血管病杂志,2001,3(6):409—411.
- [12] 吴章福,高晓平,李光武.改良双侧颈总动脉结扎法与传统法制备的大鼠慢性脑缺血模型比较[J].中国康复医学杂志,2012,27(3):206—210.
- [13] Janssen BJ, De Celle T, Debets JJ, et al. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(4):H1618—H1624.
- [14] 马明,赵晴,杜建时,等.大鼠颈总动脉分次结扎建立血管性痴呆模型评价[J].中国老年学杂志,2012,32(1):72—74.