·基础研究·

阿尔兹海默病小鼠不同时期脑血管的功能改变及机制*

李明月[1] 陶玉倩[2,3] 胡昔权[1] 张丽颖[1] 吴腾腾[2] 裴 中[2]

摘要

目的:研究散发性阿尔兹海默病(sAD)小鼠模型早期、中期脑血管功能改变及机制。

方法:通过脑室内注射链脲霉素建立sAD模型,造模2周后采用Morris水迷宫评估小鼠认知功能,验证模型成立;利用活体成像技术检测假手术组、早期组(造模1周)、中期组(造模3个月)小鼠脑皮层动脉、穿支动脉、静脉及毛细血管对短暂高碳酸血症的血管反应性,并分别使用一氧化氮合酶抑制剂L-NAME及前列腺素合成抑制剂吲哚美辛阻断其相关通路,观察各组同种血管反应性变化。

结果:与假手术组相比,造模2周后sAD小鼠学习、空间记忆能力显著下降。与假手术组相比,造模1周小鼠的脑皮层动脉、毛细血管的反应性均显著下降,皮层动脉反应性于造模3个月时恢复,而毛细血管反应性无明显恢复。L-NAME可显著增加sAD小鼠脑动脉、毛细血管反应性。吲哚美辛可明显减弱sAD小鼠脑动脉反应性,但对毛细血管无影响。

结论:sAD小鼠早期存在的脑血管功能损伤,可能参与认知障碍的发生和发展,其机制与一氧化氮通路改变有关。

关键词 散发性阿尔兹海默病;认知障碍;脑血管反应性;一氧化氮

中图分类号:R493,R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-10-1143-07

A study on cerebrovascular dysfunction in mouse model of Alzheimer's disease during different stage/LI Mingyue, TAO Yuqian, HU Xiquan, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(10): 1143—1149

Abstract

Objective: To study the functional changes of cerebrovascular in sporadic Alzheimer's disease(sAD) mice in the early and middle stage and to explore the related mechanism.

Method: sAD mice were induced by intraventricular injection of streptozotocin, and the cognitive function of the mice was evaluated by Morris water maze 2 weeks after operation. Two-photon in vivo imaging was used to measure the dilatation response of surface arteries, penetrating arteries, veins and capillaries responsing to 5% CO_2 inhalation for 1 minute under thinned-cranial window in control group, sham operation group, early (1 week) and middle group (3 months). L-NAME, an inhibitor of nitric oxide (NO) synthase, Indomethacin, and an inhibitor of prostaglandin (PG) synthesis, were used to block the vasodilation pathway. The vasodilation reaction was repeatedly observed and compared between each group.

Result: Two weeks later, the sAD mice model showed learning and spatial memory impairment compared with sham operation group. One week after modeling, the cerebral capillary responsiveness decreased and persisted, the cerebral artery responsiveness of mice model group decreased than that of sham operation group, and recovered after 3 months. Compared between the sham operation group and the model group, indomethacin could re-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.10.002

*基金项目:广东省自然科学基金项目(2016A030313193);国家自然科学基金青年基金项目(81601979)

1 中山大学附属第三医院康复医学科,广东省广州市,510630;2 中山大学附属第一医院神经科;3 通讯作者

作者简介:李明月,女,硕士,住院医师;收稿日期:2018-10-13

duce the cerebral arterial reactivity to the same extent, but not affect the capillary reactivity of each group. L-NAME could weaken all types of cerebrovascular reactivity of the sham operation group, but not affect the model group.

Conclusion: The early onset of cerebrovascular dysfunction in sAD mice may be involved in the occurrence and development of cognitive impairment in mice; the damage mechanism is related to the changes of NO pathway dysfunction.

Author's address Department of Rehabilitation, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangdong, Guangzhou, 510630

Key word sporadic Alzheimer's disease; cognitive impairment; cerebrovascular reactivity; NO

散发性阿尔兹海默病（sporadic Alzheimer's disease, sAD）是认知障碍最常见的原因，多个系统、机制参与疾病的发生和发展并相互作用[1]。近年来，越来越多的临床证据提示[2]，血管因素在sAD认知障碍发生发展中的重要性。临床研究发现[3—5]，sAD发病的早期，已经能观察到反映脑血管功能的重要指标——脑血管反应性（cerebrovascular reactivity, CVR）受损。常用的CVR测量方法有经颅多普勒、功能磁共振等[6—7]，皆通过测量脑血流量变化间接了解脑血管的舒缩情况。本实验采用双光子活体成像技术可在活体内无创直接观察到皮层不同种类、不同级别脑血管的舒缩情况。同时结合多次、短暂CO_2吸入策略，可在接近生理情况下研究CVR，本课题组已在前期研究中证实此实验方法的可行性及可靠性[8]。脑室内注射链脲霉素（intraventricular injection of streptozotocin，icv STZ）小鼠模型是根据脑胰岛素抵抗学说制造的，其能够模拟sAD的包括认知障碍在内的多种临床及病理表现，已广泛应用于sAD病因机制研究及药物疗效观察，但缺乏对该模型小鼠脑血管功能改变方面的研究[9—10]。本实验将关注活体icv STZ小鼠模型造模后不同时期、不同种类脑血管功能改变，并探讨其相关机制，从而进一步了解脑血管功能障碍与认知障碍的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性C57bl/6j小鼠，SPF级，6—8周龄，体重23—24g，由广东省实验动物中心提供，将实验小鼠随机分为4组，假手术组（侧脑室内注射柠檬酸缓冲液2周后，n=5），模型组（icv STZ 2周后，n=6），早期组（icv STZ 1周后，n=5），中期组（icv STZ 3个月后，n=5）。

1.2 icv STZ制备小鼠模型

小鼠使用4.2%水合氯醛，按照0.1ml/10g麻醉，icv STZ组使用总剂量为3mg/kg STZ[11]，溶于5μl 0.05mol/L柠檬酸缓冲液（pH=4.4），现配现用，使用立体定位仪注射的方案为前囟后0.3mm，矢状缝向左旁开1mm处，使用5μl微量注射器进针，深度2.5mm，缓慢注入5μl液体（控制注射速度为1μl/min），注入后留针5min，保证溶液充分弥散，再缓慢出针。处死小鼠后切片尼氏染色可观察到进针通道达到脑室，证明注射成功。

1.3 Morris水迷宫实验检测小鼠认知功能证明模型成立

模型组为STZ icv 2周的小鼠，进行Morris水迷宫实验，将目标平台置于第二象限，连续训练小鼠5天，每天随机对4个象限进行训练。第6天撤去平台，行空间探索实验。训练期每象限测试时间为60s，目标区域停留时间为2s，若超过60s未到达目标区域停留，则引导小鼠到达平台，停留10s。空间探索实验中，记录60s内小鼠穿越目标区域次数，作为空间探索能力指标。数据采集和处理由Morris迷宫自动监视处理系统完成。假手术组按照同样的方法进行水迷宫测试。

1.4 小鼠颅窗制备

采用乌拉坦（1g/kg）麻醉小鼠，将小鼠固定于立体定位仪上，剪开头皮，以前囟后1mm，外侧3mm为中心，使用高速颅骨钻磨薄直径约5mm区域的颅骨，磨颅过程中小心避免损伤颅骨下组织，当光镜下能清晰看到颅骨下小血管时完成磨颅[12]。使用改性丙烯酸酯胶将专用固定板固定于小鼠头部，通过小鼠尾静脉注射FITC荧光染料（150mg/kg）。注射完

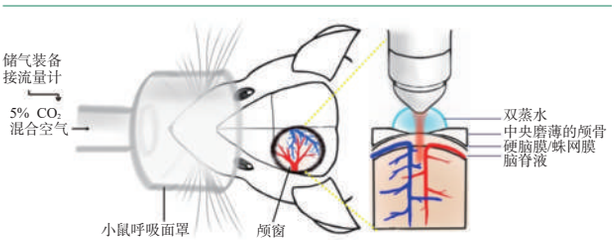
成后将小鼠固定在固定架上进行双光子活体成像。

1.5 双光子短暂吸入5%CO_2活体成像技术

使用双光子显微镜(Leica,25*,标准细胞外盐水浸润物镜),选择FITC激发波长800nm,可观察到颅窗下被FITC荧光染料填充的血管。如有染料渗出于血管外,提示脑血管有损伤,应剔除。

如图1所示安装小鼠呼吸面罩,打开小鼠恒温装置,使其体温维持在37ºC。吸入用CO_2为5%CO_2混合空气,吸入时打开流量计,气流量固定为2L/min,并使用双光子显微镜录下吸入CO_2 1min影像。在吸CO_2前后,扫描脑表面0到300μm深的图像,每张图像间隔2μm,叠加150张图像后用于检测此时此区域内各脑血管直径变化。

图1 小鼠CO_2呼吸装备及双光子活体成像示意图[8]



1.6 不同药物干预吸入CO_2脑血管反应性

本实验使用一氧化氮(nitric oxide,NO)合酶抑制剂L-NAME及前列腺素(prostaglandin, PG)合成抑制剂吲哚美辛干预CVR。在测量小鼠正常CO_2 CVR后腹腔注射L-NAME(50mg/kg)[13],0.5h药物作用峰值时重复上述过程吸入CO_2测量脑血管直径变化。2hL-NAME从体内完全清除[14]后,尾静脉注射吲哚美辛(6mg/kg),0.5h吲哚美辛作用峰值时,重复吸入CO_2测量脑血管直径变化。

1.7 双光子数据测量及CVR分析

双光子采集数据时可根据血管形态、分支情况、血流方向及直径区分动脉(artery,A)、穿支动脉(penetrating artery,PA)、静脉(venus,V)、毛细血管(capillary,C),见图2。动脉为血流从主干流向分支的血管,一般长而直,分支较少;穿支动脉从脑表面穿入脑实质,其周围毛细血管分布较稀疏;静脉的血流从分支流向主干,周围有较多的分支;毛细血管不直接与动脉及静脉相连,管径小于8μm[15]。使用Leica Las AF软件测量采集的数据,血管CVR测量按照Sekiguchi[16]的方法测量同一根同一部位脑血管吸入CO_2前后直径变化率:血管直径变化率%=(同根血管吸入CO_2后直径/吸入CO_2前直径 − 1)×100%,药物干预后重复测量以上指标,每次重复测量同一血管的同一部位,见图3。

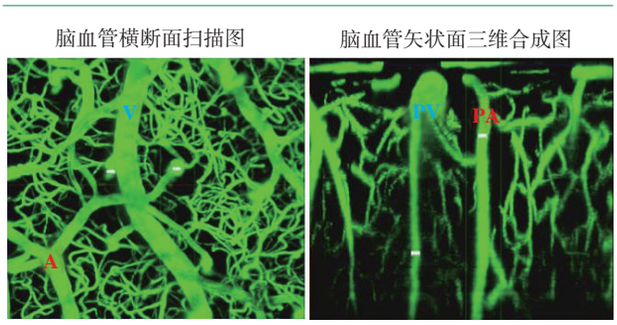
1.8 尼氏染色

小鼠结束双光子观察后行灌注脑组织取材,切片观察通向脑室的针道位置,并行尼氏染色,针道显示未损伤除局部皮层外其他结构,证明脑室注射成功,否则剔除此小鼠。

1.9 统计学分析

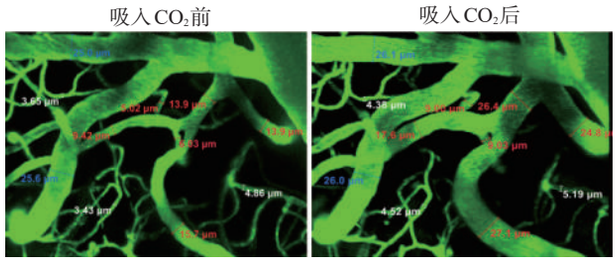
利用SPSS 19.0软件进行统计分析,各组数据均经正态性及方差齐性检验。采用paired-*t*检验药物干预CO_2吸入前后同根血管直径变化,采用单因素方差分析,对比不同组同种血管反应性,采用α=0.05,实验数据以均数±标准差,$P<0.05$为差异具有显著性意义。采用Graphpad Prism 5.0软件进行图表绘制。

图2 双光子显微镜下吸入CO_2前后脑血管横断面扫描图和矢状面三维合成图



注:皮层血管(红色A);皮层静脉(蓝色V);穿支动脉(红色PA);穿支静脉(蓝色PV)

图3 双光子显微镜下小鼠吸入CO_2前后各脑血管直径



注:动脉、穿支动脉血管直径(红色标示);静脉血管直径(蓝色标示);毛细血管直径(白色标示)

2 结果

2.1 水迷宫实验证明造模2周后小鼠存在认知障碍

时间因素分析两组小鼠前5天定位航行实验平均到达平台持续时间即平均逃避潜伏期均随实验天数增加而缩短，但只有假手术组第2天和第3天之间差异有显著性意义（$P<0.001$）；组间因素分析，第1天及第2天训练时模型组与假手术组逃避潜伏期差别无显著性意义（$P>0.05$），而第3（$F=13.01$）、4（$F=4.92$）、5（$F=5.15$）天模型组逃避潜伏期长于假手术组，且差异有显著性意义（$P<0.05$），见图4。在第6天的空间探索实验中，模型组与假手术组穿越平台次数有显著差异（$P<0.001$，$t=20.94$），根据记录的小鼠游泳轨迹图可分析小鼠的搜索策略，假手术组小鼠搜索平台方式以趋向式及直线式搜索为主，而模型组小鼠主要采用边缘式、随机式搜索策略，见图5。

2.2 药物干预前后血管直径基线水平变化

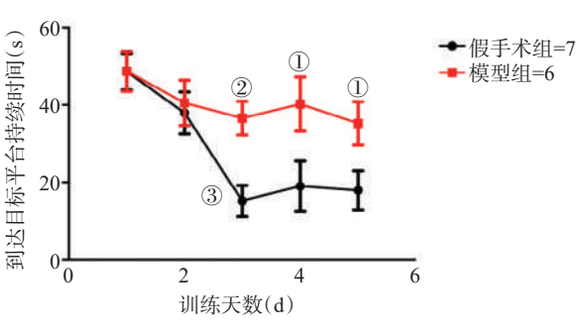
小鼠处于乌拉坦麻醉稳定状态且体温保持37ºC，无任何人为刺激情况下，各组动静脉及毛细血管直径平均值基本保持稳定，设定此时各血管直径为无药干预情况下血管直径基线水平。本实验研究发现使用L-NAME和吲哚美辛后，各组小鼠的动静脉及毛细血管直径基线水平与使用前差异无显著性意义（$P>0.05$），见图6。

2.3 对比不同条件下脑血管反应性改变

下文中所提到的组间比较代表无药物干预下同种血管早期及中期组分别与假手术组之间的对比。组内比较代表相同组内不同干预分别与干预前的对比。假设检验为各模型组与假手术组比较。

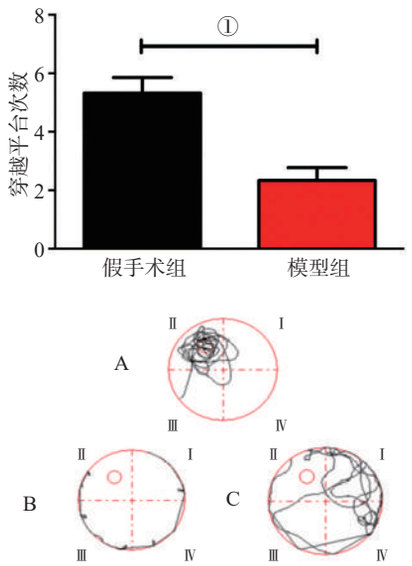
短暂吸入5% CO_2后，脑皮层动脉和穿支动脉扩张明显，扩张原直径的40%左右，其中穿支动脉扩张最大；静脉及毛细血管扩张相对较小。对比组间短暂吸入CO_2的脑血管反应性，早期组对比假手术组脑毛细血管和皮层动脉扩张程度减弱，均有显著性意义（$P<0.05$；$P<0.01$），中期组对比假手术组毛细血管及静脉扩张程度减弱，且均有显著性意义（$P<0.05$；$P<0.01$）。对比组内不同干预下血管反应性变化，假手术组小鼠使用L-NAME干预后再吸入CO_2，所有种类血管扩张明显减弱，均有显著性意义。使用吲哚美辛后只有皮层动脉和穿支动脉在小鼠吸入CO_2后扩张反应减弱。早期组在使用L-

图4 模型组和假手术组平均逃避潜伏期对比



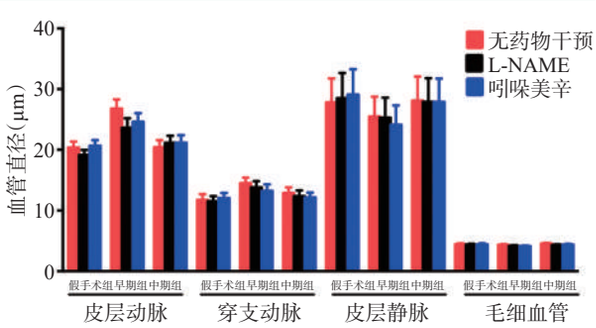
注：①当前时间点两组相比较$P<0.05$；②当前时间点两组相比较$P<0.01$；③与前一天比较$P<0.001$

图5 模型组和假手术组平均穿越平台次数对比统计图及穿越平台轨迹图



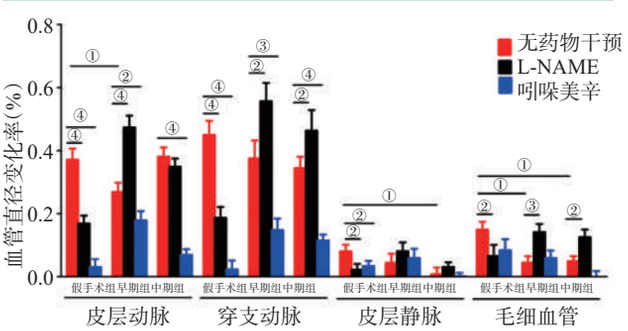
注：①两组对比$P<0.001$；红色小圈表示撤掉的平台位置，其中A示假手术组小鼠直线、趋向式搜索并多次穿越平台，B、C示模型组小鼠边缘式、随机式搜索平台

图6 药物干预后各血管直径基线水平变化



NAME干预后再吸入CO_2,皮层动脉、穿支动脉及毛细血管扩张明显增加(P<0.001;P<0.05;P<0.01),中期组使用L-NAME干预后皮层动脉血管反应性与用药前无明显差异但穿支动脉及毛细血管反应性反而增加(P<0.05;P<0.05)。早期组及中期组在使用吲哚美辛后动脉(P<0.05;P<0.01)、穿支动脉(P<0.001)血管反应性与用药前相比均有显著下降且有显著性意义。在早期组及中期组用L-NAME、吲哚美辛药物干预前后静脉反应性的变化均无显著性意义。所有组别使用吲哚美辛后小鼠脑毛细血管吸入CO_2后扩张程度对比使用前无显著性意义(P>0.05),见图7。

图7 各组小鼠在无药物干预、使用L-NAME及吲哚美辛干预对各脑血管扩张的影响



注:无药物干预时组间比较①P<0.05;组内比较②P<0.05,③P<0.01,④P<0.001

3 讨论

本研究发现,对比假手术组,sAD模型小鼠造模2周后学习、空间记忆能力减退。活体成像直接观察乌拉坦麻醉后小鼠脑皮层动脉、穿支动脉、静脉、毛细血管在吸入1min 5% CO_2后的扩张反应,发现sAD小鼠模型造模1周后存在脑皮层动脉、毛细血管血管功能障碍,其中脑毛细血管功能损伤显著且可持续至造模后3个月。分别使用药物阻断NO、PG相关的血管扩张通路观察脑血管功能,发现其血管损伤机制与NO通路改变有关。

3.1 sAD小鼠模型脑血管反应性改变及可能机制

本课题组前期实验已观察到[8],正常小鼠短暂高碳酸血症后所有血管均有明显扩张反应,其中脑皮层动脉及穿支动脉扩张最显著。其扩张主要与平滑肌的舒张功能有关,穿支动脉是重要的毛细血管前阻力血管,其舒张能力是衡量脑血管储备的重要标志;而静脉的扩张是相对被动的,主要受整体血流量增加影响;毛细血管扩张除受血流量控制外,还与血管周细胞主动舒张有关,受神经血管耦联影响[17]。根据吸入CO_2脑血管反应性的可能机制[4],我们使用L-NAME和吲哚美辛介入干预吸入CO_2后血管的舒张反应,它们不改变静息状态各血管的直径,提示血管静息状态的维持同时受多方面因素共同调节,单独阻断NO或PG相关血管扩张通路不影响其稳定性。因为在本实验条件下,血管在药物干预后基线直径稳定,所以可以直接对比同一根血管不同药物干预后血管直径的变化率,以此表示药物对血管反应性的影响。

本研究发现造模早期皮层动脉CVR已有下降,而造模中期CVR恢复,且对于皮层动脉,使用吲哚美辛后造模中期比造模早期CVR下降更明显,提示随着血管反应性相关NO通路损伤时间的增加,PG通路在CVR反应中代偿程度也随之增加,随着时间的进展,可以恢复并维持正常的高碳酸血症脑血管反应。Toda等研究[18]支持本研究结果,其发现离体小猪脑皮层血管在长期使用吲哚美辛后,L-NAME能更大程度的下调高碳酸血症造成的血管扩张。以上结果均提示PG和NO作用通路相互独立又有内在联系,如果某一条通路障碍,另一条通路可进行代偿,从而维持正常的高碳酸血症血管扩张反应,影响早期发现CVR异常。正常老鼠使用吲哚美辛干预后脑毛细血管CVR下降不明显,而使用L-NAME时有明显下降,提示脑毛细血管反应性主要受NO通路影响,可见介导不同种类血管反应性的通路有所不同。早期毛细血管反应性对比假手术组有显著的下降,脑毛细血管中NO通路受损,但PG通路无法代偿,因此到造模中期CVR仍无明显恢复,可见毛细血管对NO通路损伤后的表现更为敏感,可作为观测早期sAD血管功能异常的指标。

正常机体在吸入CO_2后产生少量NO,主要来自NOS包括神经来源的NOS和内皮来源的NOS[19],其作用于脑血管平滑肌从而使平滑肌舒张致血管扩张。L-NAME为非选择性一氧化氮合酶阻滞剂,可以同时阻断两种合酶,减少NO的产生从而减弱高碳酸血症后的脑血管反应性,因此假手术组小鼠使用L-NAME后所有脑血管的扩张程度均减弱。而

过量的NO不能继续扩张血管，反而有一定程度的抑制作用。由于造模后鼠脑呈胰岛素抵抗状态，IRS-PI3K-PKB-mTOR是重要的胰岛素相关信号通路，其中NO是PI3K-PKB通路的下游信号，因此，NO信号通路功能紊乱也是胰岛素抵抗的特征性表现[20]。胰岛素抵抗中血管NO通路受损可表现为NOS解耦联、诱导型NOS（iNOS）活性增加，iNOS可导致NO的大量产生。造模后小鼠使用L-NAME，可减少过量NO对CVR的抑制作用，从而解释我们实验中发现的早期、中期组小鼠使用L-NAME后各血管反应性反而改善的现象。由于静脉血管扩张较被动，主要依赖血流量的变化，我们发现造模中期静脉反应性显著下降，提示脑血流量下降，脑部血流整体储备能力不足。

3.2 sAD小鼠模型CVR改变与认知障碍的关系

本研究发现sAD小鼠在造模后1周即出现显著的脑毛细血管、脑动脉反应性下降，在2周后出现空间记忆能力下降，造模3个月后脑动脉反应性部分恢复。结合此模型认知障碍方面的其他研究结果，Knezovic等[21]发现造模后1周认知功能下降不显著，1个月时下降最明显，造模后3个月认知功能有部分恢复，之后认知功能呈持续缓慢下降趋势。提示我们制造的模型小鼠脑血管功能损伤可能发生在认知障碍前，到达损伤顶峰后，脑血管功能与认知障碍有同步恢复的现象。脑血管功能损伤可影响神经血管耦联，导致脑供血不足、神经功能下降，因此，脑血管功能损伤可能参与了此小鼠认知障碍的发生和发展，需要我们进一步研究。Deramecourt等[22]及Kuljis等[23]研究AD患者尸检发现认知障碍越严重的患者脑血管病变越严重，神经退行性变显著的部位通常分布在脑毛细血管丰富的区域。脑毛细血管为神经血管单元的重要组成部分，影响神经血管耦连所致的功能性充血，提示脑毛细血管损伤在影响神经退行性变及认知障碍中可能有重要作用。Yezhuvath等[24]已发现检测患者前额叶脑血管反应性可早期发现AD，结合本研究结果，为了更加敏感、更早期发现AD，可以通过检测脑毛细血管反应性来实现。目前广泛认为[25]，血管因素与神经退行性变协同损伤认知功能，且越来越多的研究发现[26—28]，针对血管性危险因素（如糖尿病、高血压、高脂血症等）的治疗可以有效改善AD患者的认知功能。本实验发现icv STZ早期、中期组小鼠使用L-NAME后各脑血管反应性增加，Misra等[29]研究发现使用L-NAME可通过减轻此icv STZ模型的脑内氧化应激反应改善认知功能，因此L-NAME可同时改善小鼠脑血管功能及认知功能，提示NO相关通路在脑血管功能及认知功能改善中的重要地位，可能是改善血管性危险因素从而改善认知功能的关键机制之一。

3.3 本研究的技术优势

本研究所使用的双光子显微镜可在活体内直接观察到磨薄的颅窗下脑皮层内充满染料的脑血管的实时动态变化，可无损的扫描皮层达300μm深度，经处理后得到加成的血管影像图，能准确地测量各血管直径变化。我们使用短暂CO_2吸入策略，动物不会因为吸入过多的CO_2导致全身酸中毒，且允许反复吸入，有助于我们在不同药物干预后重复观察，进一步研究血管反应性变化的相关机制。大多AD脑血管功能改变的研究是通过检测脑血流量变化，间接了解脑血管功能。但脑血流量变化与脑新陈代谢息息相关，AD本身导致的脑糖代谢降低将显著降低脑血流量，不能很好地反映脑血管本身的舒缩功能改变。而能直接观察到某根血管扩张的技术目前主要有脑血管体外分离，脑片培养及开颅等方法，皆为有创性操作，其结果受众多因素影响。我们采用小鼠颅骨磨薄技术，保留一定厚度的颅骨作为支撑，维持了正常颅内压及内环境，从而直接观察生理状态下局部血管的舒缩反应。

综上所述，本实验研究发现在sAD小鼠早期即有脑血管功能异常，可能参与了小鼠认知障碍的发生和发展。脑毛细血管功能损伤显著且持续，可能是早期发现AD的敏感指标。脑血管损伤机制与脑胰岛素抵抗相关的NO通路改变有关，使用L-NAME可改善sAD的脑血管功能。本实验的小鼠模型可模拟包括脑血管功能改变等sAD多方面病变，为检测相关药物或康复治疗手段改善sAD脑血管功能从而改善认知障碍的效果，以及进一步机制研究提供了很好的平台。

参考文献

[1] Kivipelto M, Mangialasche F, Ngandu T. Lifestyle interven-

tions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease[J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14:653—666.

[2] Gongora-Rivera F, Cordero-Perez A, Gonzalez-Aquines A, et al. Impaired cerebral vasomotor reactivity in Alzheimer's disease[J]. Int J Alzheimers Dis, 2018, 2018:9328293.

[3] den Abeelen AS, Lagro J, Van Beek AH, et al. Impaired cerebral autoregulation and vasomotor reactivity in sporadic Alzheimer's disease[J]. Curr Alzheimer Res, 2014, 11:11—17.

[4] Glodzik L, Randall C, Rusinek H, et al. Cerebrovascular reactivity to carbon dioxide in Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2013, 35:427—440.

[5] Alwatban M, Murman DL, Bashford G. Cerebrovascular reactivity impairment in preclinical Alzheimer's disease[J]. J Neuroimaging, 2019, doi: 10.1111/jon.12606.

[6] Fierstra J, Sobczyk O, Battisti-Charbonney A, et al. Measuring cerebrovascular reactivity: what stimulus to use? [J]. J Physiol, 2013, 591:5809—5821.

[7] 侯清华, 洪华. 脑血流调节检测研究进展[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(1):2817—2822.

[8] 李明月,吴腾腾,张赛,等.活体双光子成像观察小鼠脑血管CO_2反应性及其机[J]. 中国神经精神疾病杂志,2015,41:262—266.

[9] Grieb P. Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism[J]. Mol Eurobiol, 2016, 53: 1741—1752.

[10] 吴腾腾, 李明月, 邝亚晗, 等. 胰岛素对脑梗死小鼠梗死周围区血管直径和梗死体积的影响[J]. 国际脑血管病杂志, 2016, 24(2):174—179.

[11] Chen Y, Tian Z, Liang Z, et al. Brain gene expression of a sporadic (icv-STZ Mouse) and a familial mouse model (3xTg-AD mouse) of Alzheimer's disease[J]. PloS One, 2012, 7:e51432.

[12] Yang G, Pan F, Parkhurst CN, et al. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice[J]. Nat Rotoc, 2010, 5:201—208.

[13] Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, et al. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14:175—192.

[14] Vitecek J, Lojek A, Valacchi G, et al. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges[J]. Mediators Inflamm, 2012, 2012(2012):318087.

[15] Dorr A, Sahota B, Chinta LV,et al. Amyloid-beta-dependent compromise of microvascular structure and function in a model of Alzheimer's disease[J].Brain,2012,135:3039—3050.

[16] Sekiguchi Y,Masamoto K,Takuwa H,et al. Measuring the vascular diameter of brain surface and parenchymal arteries in awake mouse[J].Adv Exp Med Biol,2013,789:419—425.

[17] Kisler K, Nelson AR, Montagne A, et al. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18:419—434.

[18] Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances [J]. Pharmacol Rev, 2009, 61:62—97.

[19] Smith JJ, Lee JG, Hudetz AG, et al. The role of nitric oxide in the cerebrovascular response to hypercapnia[J]. Anesth Aanalg, 1997, 84:363—369.

[20] Katakam PV, Snipes JA, Steed MM, et al. Insulin-induced generation of reactive oxygen species and uncoupling of nitric oxide synthase underlie the cerebrovascular insulin resistance in obese rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32:792—804.

[21] Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, et al. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease[J]. J Neural Transm (Vienna),2015,122:577—592.

[22] Deramecourt V, Slade JY, Oakley AE, et al. Staging and natural history of cerebrovascular pathology in dementia[J]. Neurology, 2012, 78:1043—1050.

[23] Kuljis RO, Tikoo RK. Discontinuous distribution of senile plaques within striate cortex hypercolumns in Alzheimer's disease[J]. Vision Research, 1997, 37:3573—3591.

[24] Yezhuvath US, Uh J, Cheng Y, et al. Forebrain-dominant deficit in cerebrovascular reactivity in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2012, 33:75—82.

[25] Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, et al. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction[J]. Nat Med, 2019, doi: 10.1038/s41591-018-0297-y.

[26] Valenti R, Pantoni L, Markus HS. Treatment of vascular risk factors in patients with a diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review[J]. BMC Med, 2014, 12:160.

[27] Tong XK, Lecrux C, Rosa-Neto P, et al. Age-dependent rescue by simvastatin of Alzheimer's disease cerebrovascular and memory deficits[J]. J Neurosci, 2012, 32:4705—4715.

[28] Tariq S, Barber PA. Dementia risk and prevention by targeting modifiable vascular risk factors [J]. J Neurochem, 2018, 144:565—581.

[29] Misra S,Tiwari V,Kuhad A,et al.Modulation of nitrergic pathway by sesamol prevents cognitive deficits and associated biochemical alterations in intracerebroventricular streptozotocin administered rats[J]. Eur J Pharmacol,2011,659:177—186.