研究报告

血管性痴呆大鼠模型制作方法的改良

顾静[1,3],李海龙[2],杨长生[2],车敏[3], 吴红彦[2,3*]

(1. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室, 兰州 730000;
3. 甘肃省中药新产品创制工程实验室, 兰州 730000)

【摘要】 目的 对血管性痴呆(VD)大鼠模型的造模方法进行改进,使血管性痴呆的实验研究更加科学可靠。**方法** 采用"反复夹闭颈动脉加注射硝普钠降压再加单侧永久结扎颈总动脉法"制备 VD 大鼠模型,并用脑复康(吡拉西坦)加以模型验证。实验从大鼠行为学和组织病理两个方面评价 VD 模型。**结果** 实验结果显示:对比假手术组,模型组大鼠定位航行潜伏期延长,空间搜索穿越平台次数减少,海马病理切片显示:细胞数量较少、细胞轮廓模糊皱缩、胞质深染、核不清晰;脑复康阳性药物对照组上述指标明显改善。**结论** 硝普钠注射量为 2.0 mg/kg 时,手术室温控制在 28℃且术后 24 h 内控制在 25℃,大鼠状态稳定,死亡数减少;术中反复阻断三次双侧颈总动脉后直接永久性结扎左侧颈总动脉,可以切断大约三分之一的脑供血,造成慢性脑供血不足状态,更接近 VD 发病机制。

【关键词】 血管性痴呆;大鼠模型;吡拉西坦;脑;海马;外科手术;病理学
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0634-05
Doi:10.3969/j.issn.1005 -4847.2015.06.017

Improvement of the method to establish a rat model of vascular dementia

GU Jing[1,3], LI Hai-long[2], YANG Chang-sheng[2], CHE Min[3], WU Hong-yan[2,3]

(1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology and Toxicology in Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs and Prescription Innovation and Transformation in Gansu Province, Lanzhou, 730000; 3. Labortory for TCM New Products Development Engineering of Gansu Province, Lanzhou 730000.)

【Abstract】 Objective To improve the method to establish a rat model of vascular dementia and to better serve the experimental studies on vascular dementia. **Methods** We used the method of "repeatedly clipping the carotid artery combined with injection of sodium nitroprusside and with permanent unilateral carotid artery ligation" to prepare a rat model of vascular dementia. The drug piracetam was used to validate the established rat model in respect of the behavior and histopathology. **Results** Different from the reports of previous research, firstly, the results of this study suggested that injection dose of sodium nitroprusside should be 2.0 mg/kg, room temperature should be controlled at 28℃ during surgical operation, and kept at 25℃ postoperatively for 24 hours. Under these experimental conditions, the rats were stable and the death rate was reduced. Secondly, "repeatedly clipping carotid artery combined with permanent unilateral carotid artery ligation" could cut off about a third of cerebral blood supply, and causing chronic cerebral ischemia, which is seemingly more consistent with the pathogenesis of vascular dementia. Experimental results showed that compared with the control group, the navigation incubation period was extended and space search ability became worse in the model group, cell number was decreased, with blurred cell contour and deeply stained cytoplasm, and cell nuclei were not clear in the hippocampal tissue. **Conclusions** Our findings indicate that the improved method "repeatedly clipping the carotid artery combined with injection of sodium nitroprusside and with permanent unilateral carotid artery ligation" can be used to efficiently establish a rat model of vascular dementia. The similar results of experiment using piracetam validate that this rat model can be used in

[基金项目]甘肃省中药药理与毒理学重点实验室自主课题(ZDSYS-ZZKJ-2013(B)-004);国家自然科学基金(81060284)。
[作者简介]顾静(1980 -),女,副教授, 博士,主要从事心血管药理生理学研究。Email: 120233234@qq.com
[通讯作者]吴红彦(1963 -),男,教授,博导,主要从事老年病学研究。Email: gujing120233234@126.com

vascular dementia-related experimental studies.

【Key words】 Vascular dementia; Rat model; Piracetam; Brain; Hyppocampus; Surgery; Pathology

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是由脑血管病(如脑梗塞、脑出血、皮层下白质的缺血性改变)引起的以记忆、认知功能缺损为主的获得性智能持续性损害。病理变化可见脑实质细胞凋亡,数目减少,脑缩小。近年来血管性痴呆已成为我国中老年人的多发病。但目前国内外对控制本病病程进展尚无有效方法和药物,因此急需相关基础研究以开发有效药物,相应的 VD 动物模型构建至关重要。

大鼠与人类有相似的脑血管解剖学结构,脑供血系统由颈动脉系和椎底动脉系合成动脉环,通过分支完成脑供血。建立准确、高真的 VD 大鼠模型,对深入探讨 VD 的病因病机、病理学特点以及早期诊断和防治具有重要意义。近年来有关血管性痴呆模型制作的研究不断完善,制作方法多样,例如常用的有:两血管阻断法及改良法(2-VO)[1-5]、三血管阻断法(3-VO)[6,7]、四血管阻断法(4-VO)、大脑中动脉梗死法、血管栓塞法、VD 自发模型[8,9]和去大脑皮层法等多种方法,各种方法仍有弊端,例如:关于"硝普钠注射量,环境温度要求,反复阻断再灌注造成短暂性脑缺血,术后大鼠可能会恢复"等问题有待改良。为了使血管性痴呆实验更加科学,VD 大鼠模型制作更易成功,本研究参考分析上述这些造模方法并做一改进,采用"反复夹闭颈动脉加注射硝普钠降压再加单侧永久结扎颈总动脉法"制备血管性痴呆大鼠模型,并用脑复康(吡拉西坦)加以模型验证。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级 Wistar 大鼠 30 只, 体重 240 ~ 260 g,60 日龄,来源于甘肃中医学院科研实验动物中心【SCXK(甘)2011 - 0001 - 62001000000062】,无菌手术在甘肃中医学院科研实验动物中心进行【SYXK(甘)2013 - 0001 - 00000077】。饲料由甘肃中医学院科研实验动物中心提供。多聚甲醛等基础试剂购自天津科化,脑复康(吡拉西坦胶囊,陕西白鹿制药股份有限公司),脑复康药液的配制:用双蒸水配制成浓度为 0.09 g/mL 水溶液,4℃储存备用;水合氯醛(上海化学试剂五联化工厂),用生理盐水配制成 10% 注射液;注射用硝普钠(湖南中南科伦药液有限公司),用双蒸水配制成浓度 0.8 mg/mL 注射液,避光保存。

1.2 实验方法

1.2.1 血管性痴呆(VD)大鼠模型制备

采用反复夹闭颈动脉加注射硝普钠降压再加单侧永久性结扎颈总动脉法。大鼠术前禁食、水,用 10% 水合氯醛麻醉,常规消毒,颈正中切口,分离双侧颈总动脉,模型组及药物治疗组在夹闭双侧颈总动脉之前,腹腔注射硝普钠 (2.0 mg/kg),随即用无创动脉夹夹闭双侧颈总动脉 10 min,随后去除动脉夹通血 10 min,共间歇阻断—再通双侧颈总动脉血流 3 次,之后结扎一侧颈总动脉,缝合伤口、保温饲养。假手术组仅分离双侧颈总动脉·。术后肌注庆大霉素预防感染。

1.2.2 动物分组及给药

大鼠随机分为 3 组:假手术组(空白对照组)、模型组、阳性对照组(脑复康)。阳性对照组给予脑复康灌胃(0.324 g/kg),假手术组、模型组给予等量生理盐水,每日一次,连续灌胃 23 d。

1.2.3 Morris 水迷宫行为学检测

Morris 水迷宫可用于检测大鼠空间学习记忆能力。分为定位航行实验和空间搜索实验两部分。训练开始时将大鼠任意从四个象限之一面向池壁入水,观察并记录大鼠寻找并爬上平台所需时间(逃逸潜伏期)。每次大鼠共游 120 s 寻找平台,若成功找到给予 15 s 休息时间,若未找到,将其引至平台也休息 15 s,逃逸潜伏期为 120 s。连续训练 4 d,上午 2 次,下午 2 次。第 5 天撤去平台,将大鼠面向池壁放入水中找记忆平台,每只大鼠限时游 60 s,记录其 60 s 内游过原平台相应位置的次数。数据采集和处理由 Morris 迷宫图像自动监视处理系统完成。

1.2.4 海马组织病理切片观察

禁食 12 h 颈椎脱臼处死大鼠,使头置于冰块上开颅取出脑,冰盘上剥离取出大脑皮质及海马,保存于 -80℃备用。

将海马放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,常规乙醇梯度脱水,二甲苯透明后石蜡包埋;海马区石蜡切片、脱蜡、复水、苏木素染色;盐酸乙醇分化、伊红复染、乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜下观察。

1.3 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立

样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,数据处理用 SPSS 20.0 软件完成,以 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫行为学检测结果

水迷宫定位航行实验结果如表 1,图 1A、1B(图中亮色曲线是大鼠在水池中的游动轨迹,图 21 游动轨迹越短说明大鼠用越短的时间爬上平台,即逃逸时间越短;图 1B 游动轨迹穿越平台区(图中最小圆形区)次数越多说明在一定时间大鼠找到平台的次数越多。根据图片显示大鼠认知能力与数据分析结果趋势一致。)显示:模型组与假手术组比较,大鼠逃逸潜伏期明显增长(5.7 倍),差异有显著性($^{\star}P<0.05$),与模型组比较阳性对照组大鼠逃逸潜伏期缩短了 35.2%,差异有显著性($^{\blacktriangle}P<0.05$);空间搜索实验结果显示:模型组与假手术组比较,大鼠穿越平台次数显著减少了 70%,差异有显著性($^{\star}P<0.05$),与模型组比较阳性对照组大鼠穿越平台次数增加了 1 倍左右,差异有显著性($^{\blacktriangle}P<0.05$)。

2.2 海马组织病理切片观察

根据大鼠海马病理切片显示的神经细胞特点,从细胞轮廓、细胞数量、胞质深染程度、胞核清晰度等 4 个方面描述评价神经细胞损伤程度。每个观察指标按下述标准依次评分为 1、2、3 分,各指标累计评分越高表示细胞损伤越严重。

根据表 2,图 2 大鼠海马病理切片分析:假手术组 4 个观察指标海马神经细胞损伤合计为 4 分,模型组为 12 分,阳性对照组为 10 分(模型组和阳性对照组图中圈内为细胞固缩深染主要区域)。因此大鼠海马病理切片分析结果显示:与假手术组比较,模型组海马神经细胞数量较少、细胞轮廓模糊皱缩、胞质深染、核不清晰,损伤严重;与模型组比较,阳性对照组海马神经细胞损伤程度均有好转。

表 1 水迷宫检测 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Results of water maze test

组别 Groups	n	定位航行潜伏时间/s Navigation latency time	空间搜索次数 Number of space search
假手术组 Sham operated group	7	9.3 ± 3.25	5.0 ± 0.82
模型组 Model group	6	62.3 ± 3.67*	1.5 ± 0.55*
阳性对照组 Positive control group	5	40.4 ± 2.61$^{\star\blacktriangle}$	3.0 ± 1.00$^{\star\blacktriangle}$

注:与假手术组比较$^{\star}P<0.05$,与模型组比较$^{\blacktriangle}P<0.05$。

Note. Compared with the control group, $^{\star}P<0.05$; compared with the model group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

表 2 病理切片细胞损伤评分表

Tab. 2 Scores of the cell damage assessment

组别 Groups	细胞轮廓 Cell contour	细胞数量 Cell amount	胞质深染程度 Cytoplasmic staining	胞核清晰度 Nuclear clarity	合计总分 Total scores
假手术组 Sham operation	1	1	1	1	4
模型组 Model	3	3	3	3	12
阳性对照组 Positive control	2	2	3	3	10

3 讨论

3.1 常用 VD 大鼠模型复制法分析

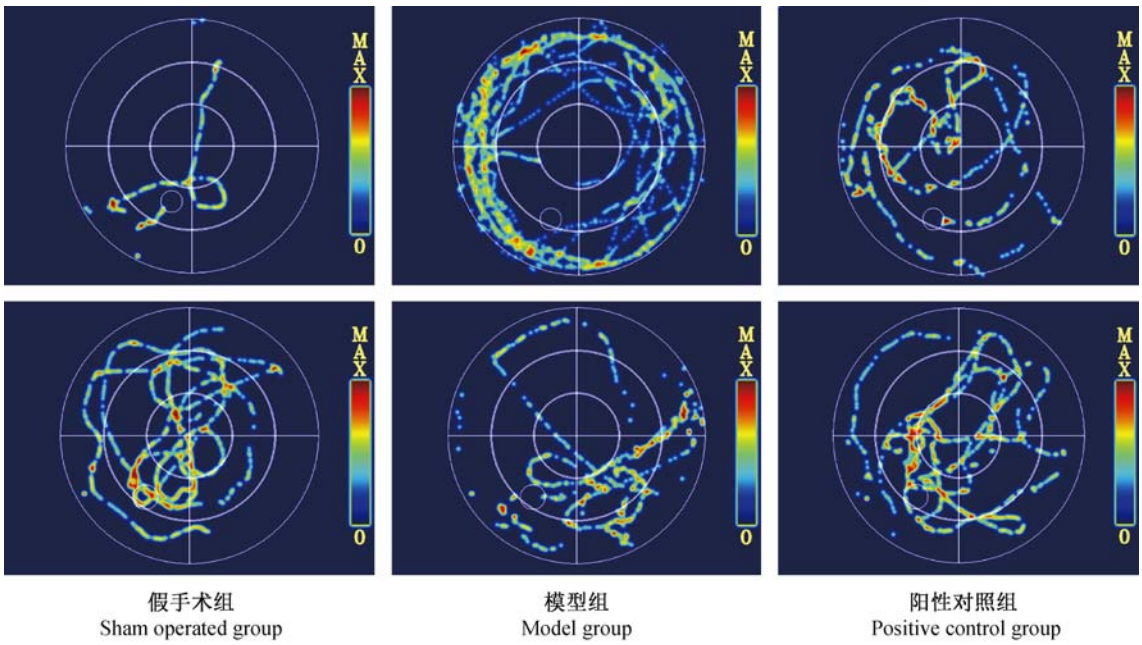
西医认为血管性痴呆病因主要是脑血管病变引起供血不足而致脑组织缺血缺氧性改变,最终使大脑功能全面衰退。基于这一基本理论,目前 VD 大鼠模型构建也多采用脑血管阻断或辅以其他减少脑血流的方法制备动物模型。下面针对目前常用的 VD 大鼠模型的制作方法进行优劣分析。

3.1.1 两血管阻断法(2-VO)

2-VO 法是将大鼠双侧颈总动脉(common carotid artery,CCA)永久性结扎,使大脑处于慢性低灌注状态,造成海马区、皮层等缺血缺氧损伤。此法操作简便却存在较高的死亡率。

3.1.2 2-VO 改良法

这种改良法又包括以下四种:① 分次结扎颈总动脉法:分两次结扎颈总动脉,间隔一星期,此方法能降低动物死亡率,且大鼠海马区变性、坏死程度与 2-VO 法变相似[1,2];② 2-VO 法联合高血脂症:高脂饲料喂养大鼠一个月,确定血脂升高后再用 2-VO 法,此方法模拟了高脂血症引发 VD 的发病机制[3,4];③ 肾血管高血压法:夹闭大鼠双侧肾动脉,造成肾血管性高血压模型,43 d 后阻断再通双侧颈总动脉。此模型与人类高血压脑动脉损害相似;④ 反复阻断-再灌注联合并腹腔注射硝普钠:夹闭双侧 CCA 之前,腹腔注射硝普钠降低血压,加重脑缺血



注：A 定位航行轨迹图；B 空间搜索轨迹图。

图 1　水迷宫记忆功能检测轨迹图

Note. A. Navigation path chart; B. Space search path chart.

Fig. 1　Water maze memory testing path chart

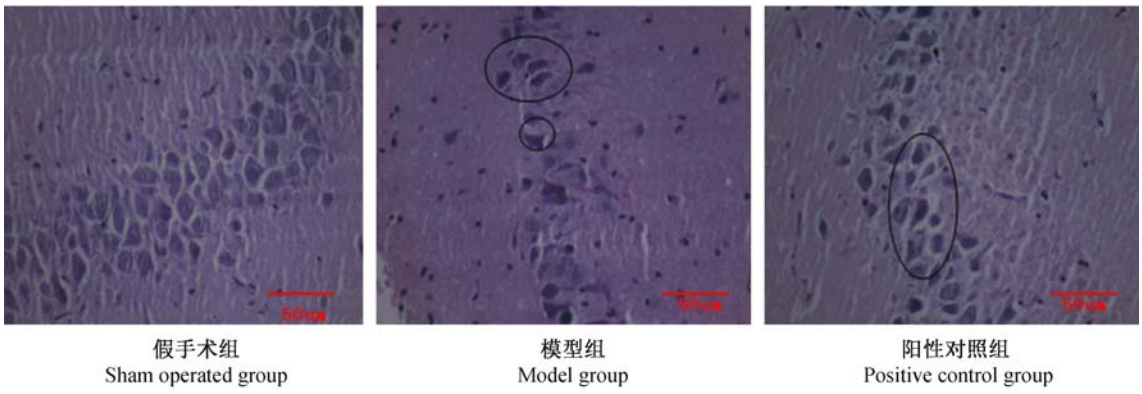


图 2　海马组织病理切片（HE，×40）

Fig. 2　Histological changes of the hippocampal tissue

损伤，反复夹闭—再灌注三次，每次间隔 10 min，此方法稳定，操作简便创伤小而且存活率高，但应该注意此方法对硝普钠注射量、环境温度要求较高[5]。

3.1.3　三血管阻断法（3-VO）

该方法阻断大鼠基底动脉与双侧颈总动脉，制成一种慢性脑供血不足，优点是缺血迅速，再灌注血流迅速恢复，适用于急性全脑缺血性 VD 研究，但缺点是手术创伤大，大鼠存活率低[6,7]。

3.1.4　四血管阻断法（4-VO）

先阻断大鼠双侧椎动脉，再可逆性阻断双侧颈总动脉，结果海马等部位受损严重，但该法操作复杂，难度高，创伤严重，大鼠生存率很低。

3.1.5　大脑中动脉梗死法

从颈总动脉切口插线经至 MCA，实现 MCA 阻塞，导致脑缺血，该法缺血效果可靠，MCA 供血区有典型的神经细胞坏死，但操作技巧要求高，创伤大，死亡率高。

3.1.6　血管栓塞法

本方法采用外源性栓子从大鼠一侧颈动脉注入大鼠体内，造成多发性脑梗，致缺血性中风。

3.1.7　VD 自发模型

自发性高血压大鼠（spontaneously hypertensive rat，SHR）亚系自发性高血压脑卒中倾向大鼠（stroke-prone，SHR）能够很好模拟长期高血压与持

续低灌注共同导致的 VD,与长期高血压后中风 VD 高度相似,是比较理想的 VD 模型,但与非高血压 VD 发病情况不一致,而且来源限制性,价格昂贵等原因限制此方法在实验中的应用[8,9]。

3.1.8 去大脑皮层法

大脑皮层法是将除去大鼠软脑膜血管,模型可使大鼠皮质、海马等处细胞造成损伤,贴切的模拟了 VD 病理改变,缺点是打开硬脑膜时对动物损伤过大,导致动物死亡率高。

3.2 “反复夹闭颈动脉加注射硝普钠降压再加单侧永久结扎颈总动脉法”制备血管性痴呆大鼠模型

通过对 VD 大鼠模型制作方法的研究,我们认为“2-VO 改良法—反复阻断再灌注联合腹腔注射硝普钠法”重复性、稳定性好,操作简单,对动物创伤小,存活率高,并且与 VD 发病机制相似,但应该注意两点:第一,此方法对硝普钠注射量、环境温度要求较高;第二,考虑反复阻断再灌注造成短暂性脑缺血,术后大鼠可能会恢复。基于此方法我们采用“反复夹闭颈动脉加注射硝普钠降压再加单侧永久结扎颈总动脉法”制备血管性痴呆大鼠模型,通过设立药物阳性对照组观察大鼠行为学、组织病理学等指标分析模型构建情况。以下是本法对“2-VO 改良法—反复阻断再灌注联合腹腔注射硝普钠法”两个问题的改良和分析:

第一,关于“硝普钠注射量、环境温度要求”的问题改良:本实验开始前进行了预实验,摸索硝普钠的注射条件,发现硝普钠注射量按文献 2.5 mg/kg[5] 的量过大,所以对硝普钠剂量进行了实验研究。实验分 3 个组制作 VD 模型,每组 15 只大鼠,注射硝普钠剂量分别为 2.5、2.0 mg/kg 和没有注射硝普钠,其他方法 3 组一致。结果 2.5 mg/kg 组大鼠死亡率高达 73%,2.0 mg/kg 组大鼠死亡率降至 40%,没有注射硝普钠组大鼠死亡率为 33%,和 2.0 mg/kg 组接近,因此确定硝普钠注射量为 2.0 mg/kg 时,手术时室温控制在 28℃,术后 24 h 内控制在 25℃时大鼠状态稳定,死亡数减少。

第二,关于“反复阻断再灌注造成短暂性脑缺血,术后大鼠可能会恢复”问题的改良:手术中反复阻断三次双侧颈总动脉后直接永久性结扎左侧颈总动脉,这样可以切断大约三分之一的脑供血,造成慢性脑供血不足状态,更接近 VD 发病机制。

另外需要说明的是,大鼠在水迷宫实验检测行为记忆功能时,由于重复性实验会使动物记忆功能受反复学习因素的影响,通过多次强化训练,其空间搜索和定位航行能力提高,所以比较同只(组)大鼠在造模前与造模后的行为记忆功能是不客观、不符合实验需求的。因此本实验采用假手术组与模型组造模后的组间比较,不进行同只(组)的造模前后比较。

通过术后大鼠行为学和病理学检测,造模手术后水迷宫定位航行实验结果显示造模组较假手术组大鼠逃逸潜伏期明显增长,而空间搜索实验结果显示在一定时间内模型组大鼠穿越平台区次数少于假手术组,说明模型组大鼠学习记忆能力较假手术组显著降低;HE 病理切片也显示模型组较假手术组海马区神经元细胞多数皱缩、消失,细胞间隙增宽、排列紊乱,部分神经元细胞胞核固缩,神经细胞凋亡程度高于假手术组,证明采用“反复夹闭颈动脉加注射硝普钠降压再加单侧永久结扎颈总动脉法”制造血管性痴呆大鼠模型比较理想。阳性对照药物脑复康干预后,以上各指标均有改善,验证了此模型可有效用于同类药物的开发和基础研究。

参 考 文 献

[1] 王兴华, 李露斯. 两种大鼠 2-VO 模型制作方法的比较 [J]. 第三军医大学学报,2004, 24(12): 1496 - 1499.

[2] 黄文革, 郭芬芬, 刘慰华, 等. 血管性痴呆动物模型制作方法的改良 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(5): 49 - 52.

[3] 唐启盛, 黄肩福, 郭建文. 高脂血症火鼠缺血再灌流诱发行为学障碍模型的实验研究 [J]. 北京中医药大学学报,1997, 20(5): 34 - 36.

[4] 雷燕, 黄启福, 王永炎. 复圣散对高脂大鼠脑缺血再灌后的脑保护作用 [J]. 中国中医基础医学杂志,1999, 5(12): 22 - 25.

[5] 王蕊, 杨秦飞. 大鼠拟血管性痴呆模型的改进 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 914 - 916.

[6] 高东, 周中和. 血管性痴呆模型制作的问题 [J]. 国外医学老年学分册, 2002, 23(2): 59 - 61.

[7] Kameyama M. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat three vessel occlusion model [J]. Stroke, 1985, 16: 489 - 496.

[8] 乔松, 冯加纯, 杨晶, 等. 自发性高血压和持续低灌流模型大鼠记忆能力与脑组织病理学对比研究 [J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(6): 725 - 729.

[9] 王超, 张志国, 贾晓旭. 自发性高血压大鼠脑损伤研究概况 [J]. 中国药理学报,2009, 25(10): 1272 - 1274.

[收稿日期] 2015 - 06 - 16