

双侧颈总动脉闭塞法制作血管性痴呆大鼠模型的行为学动态评估

从琳¹, 张智龙²

(1. 天津中医药大学, 天津 301617;

2. 天津市中医药研究院附属医院, 天津 300120)

[摘要] 目的 观察双侧颈总动脉闭塞(BCCAO)法制作血管性痴呆(VaD)大鼠模型的死亡率, 并运用 Morris 水迷宫(MWM)动态观察术后大鼠的认知功能。方法 将68只智能无明显差异的雄性SD大鼠随机分为假手术组9只, BCCAO组59只, 记录术后30 d内2组大鼠的死亡率; 并于术后30~34 d、60~64 d及90~94 d行MWM行为学测试, 评估BCCAO组大鼠的认知功能, 检测BCCAO组大鼠的VaD成模率。结果 BCCAO术后30 d内, 大鼠死亡率为20.3%。MWM行为学测试中, BCCAO组大鼠的平均速度与假手术组基本相同($P>0.05$); 术后60~64 d及90~94 d的检测中, BCCAO组大鼠的逃避潜伏期较假手术组明显延长($P<0.05$), 其VaD成模率分别为97.9%和95.7%。结论 BCCAO法制作VaD大鼠模型, 方法安全可靠。术后大鼠无明显运动功能障碍, 模型大鼠的VaD表现或于术后35~60 d形成, 并可持续至术后90 d。

[关键词] 血管性痴呆(VaD); 动物模型; 认知障碍; 双侧颈总动脉闭塞(BCCAO); 测试时间

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)01-0022-06

血管性痴呆(vascular dementia, VaD)以记忆的缺失和高级认知功能障碍为主要临床表现, 现已成为继阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)之后威胁高龄人群的第二痴呆类型^[1], 约占痴呆患者的15%~20%^[2]。目前有多种造模方法用于建立VaD动物模型, 其中双侧颈总动脉闭塞(bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO)法是制作VaD大鼠模型最常用的方法之一^[3]。近年诸多实验探讨如何降低BCCAO法制作模型动物

的死亡率^[4-6]; 但此造模方法制作的VaD大鼠的认知障碍筛选时间在各文献报道中并不统一^[7-10]。有学者^[11]指出, 有必要采用一套包含测试类型和测试时间点的认知评价标准, 评估VaD动物模型。因此, 本研究以BCCAO法制作VaD大鼠模型, 记录术后30 d内的大鼠死亡率; 并于术后30~34 d、60~64 d及90~94 d行Morris水迷宫(Morris water maze, MWM)行为学测试, 动态观察BCCAO术后大鼠的认知功能, 以假手术组的逃避潜伏期均值评估BCCAO组大鼠的认知障碍, 尝试探寻评估VaD大鼠认知障碍的适宜测试时间点。

1 材料与方法

1.1 动物及环境

SPF级雄性SD大鼠70只, 6~7周龄, 体重(240 ± 10) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2016-0006]。饲养于中

[收稿日期] 2019-07-29

[基金项目] 天津市卫生计生委、天津市中医药管理局资助项目(2017027)

[作者简介] 从琳(1989-), 博士研究生, 从事中医药防治脑血管病、糖尿病及其并发症的研究。

E-mail: 770234263@qq.com

[通信作者] 张智龙(1961-), 主任医师, 博士研究生导师, 从事中医药防治脑血管病、糖尿病及其并发症的研究。E-mail: zhangzhilongtj@163.com

国医学科学院放射医学研究所动物中心[SYXK(津)2019-0002], 实验动物伦理审查批准编号 TCM-LAEC2019017。饲养环境室内温度 21~25 °C, 相对湿度 40%~70%, 明暗各 12 h 光照控制。大鼠自由饮食。

1.2 试剂和仪器

戊巴比妥钠(国药集团化学试剂北京有限公司, 69020181)。碘伏消毒液(山东瑞泰奇洗涤消毒科技有限公司, 170814)。硫酸庆大霉素注射液(天津金耀药业有限公司, 1801141)。MWM 设备及视频分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司, ZS-001)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组方法 大鼠适应性饲养 3 d 后, 以 MWM 测试剔除游泳障碍及逃避潜伏期数值极值的大鼠 2 只, 保证实验大鼠智能无明显差异。将 68 只大鼠随机分为假手术组 9 只, BCCAO 法造模 59 只。

1.3.2 造模方法 采用 2 血管阻断法(2-VO 法)中的 BCCAO 法制作 VaD 模型。大鼠术前 12 h 禁食, 自由饮水。以 0.6% 戊巴比妥钠腹腔注射(30 mg/kg)麻醉后, 将大鼠仰卧固定于操作台, 颈部备皮, 碘伏常规消毒。切口位于颈部正中, 长度 1~1.5 cm, 剪开浅筋膜, 钝性分离二腹肌后腹、胸骨舌骨肌、胸乳突肌, 暴露颈动脉三角。钝性游离颈总动脉和迷走神经, 用玻璃分针轻柔地将其分开, 注意勿以金属器械损伤迷走神经。以 4-0 慕丝线结扎双侧颈总动脉, 丝线打结牢固, 此时可见大鼠呼吸加深加快。切口处滴注硫酸庆大霉素数滴, 对齐切口皮肤, 3-0 手术线缝合 3~4 针, 创口局部碘伏消毒。假手术方法同造模方法, 但只分离颈总动脉, 不结扎血管。

术中以加热垫保证大鼠体温, 维持生命体征平稳。术后将大鼠置于 30~35 °C 通风保温箱, 待苏醒后送回笼内正常饲养。术后 3 d, 大鼠自由饮用 10% 蔗糖水溶液; 并碘伏消毒创口后, 局部滴注硫酸庆大霉素, 以抗感染、降低死亡率。

1.3.3 行为学测试方法 以 MWM 定位航行试验, 考察大鼠的空间学习能力, 动态观察 BCCAO 术后模型大鼠的认知功能。MWM 水缸呈圆形, 高 38 cm, 直径 120 cm, 缸底及内侧壁全部为墨黑色。配一高 20 cm, 直径 12 cm 的金属圆柱体,

置于缸中作为大鼠逃避平台。配套的系统显示器将水缸从圆心处划为四个象限, 圆心正上方配有与计算机相连的摄像头, 实时同步记录大鼠的游泳路线轨迹图和各项数据。将金属圆柱体置于缸中某象限近中心处作为平台, 向缸中注入清水, 使水深没过平台 1.5 cm; 加少量黑色食品添加剂并搅拌均匀, 使从水面观察平台, 肉眼不可见; 开启设备加热装置, 使水温保持在(23 ± 1) °C。试验全程在暗室进行。



图 1 MWM 设备及实验暗室环境

Figure 1 MWM equipment and laboratory darkroom environment

每次测试的第一日上、下午, 将大鼠分别从水缸两对角象限的缸边放入水中; 后 4 d 上、下午将大鼠分别从区别于前一日的两对角象限放入水中。设定大鼠搜索到平台的时间(逃避潜伏期)为 90 s, 若大鼠 90 s 内搜索到平台, 并在平台上停留 5 s, 则生成逃避潜伏期时间; 若 90 s 内大鼠未能搜索到平台, 则逃避潜伏期时间为 90 s, 此时需人为将大鼠引导至平台停留 10 s, 以助其记忆平台位置。3 次测试的逃避平台放置于不同象限。

以假手术组大鼠的逃避潜伏期均值为参考值, 计算 BCCAO 组大鼠的平均逃避潜伏期与参考值之差占该鼠的平均逃避潜伏期比例, 该值 > 20% 者判定为 VaD 大鼠^[7]。

1.4 统计学方法

以 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。计数资料以率(%)表示, 根据数据类型, 采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法检验; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3 次检测采用 repeated measure ANOVA 检验。

以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后死亡率

造模当日至术后 30 d: 假手术组未见死亡大鼠; BCCAO 组于手术当日死亡大鼠 5 只, 次日死亡 3 只, 第 3 日死亡 2 只, 第 5 日死亡 1 只, 第 12 日死亡 1 只, 此后至术后 30 d 未发生大鼠死亡。假手术组共存活大鼠 9 只, BCCAO 组共存活大鼠 47 只(表 1)。经 Fisher 确切概率法检验, 2 组死亡率差异无统计学意义($P > 0.05$), 说明 BCCAO 造模方法较为安全。

表 1 术后 30 d 内大鼠死亡情况及死亡率

Table 1 The death count and the mortality rate of rats within 30 days after operation

组别	术后时间/d				存活数	死亡率/%
	1	5	12	30		
假手术组	0	0	0	0	9	0
BCCAO 组	5	11	12	12	47	20.3

2.2 行为学测试

2.2.1 平均速度 表 2 结果显示, 随着大鼠的生长, 2 组大鼠的平均速度均逐渐增快。经 repeated measure ANOVA 检验, 大鼠在 3 次检测中的平均速度差异有统计学意义($P < 0.05$)。平均速度与时间因素无交互作用($P = 0.970 > 0.05$), 表明 2 组大鼠平均速度随检测时间的走势无差异。在 3 个检测时间点, 2 组大鼠的平均速度差异均不具有统计学意义($P > 0.05$), 表明较假手术组大鼠, BCCAO 组大鼠不存在运动功能障碍, 说明 BCCAO 组大鼠较假手术组大鼠出现的逃避潜伏期差异并非因动力因素造成。

2.2.2 逃避潜伏期 表 3 结果显示, 随着检测次

表 2 大鼠 3 次行为学测试的平均速度

Table 2 Average speed of rats in three behavioral tests

组别	cm/s		
	术后 30~34 d	术后 60~64 d	术后 90~94 d
假手术组	5.25 ± 0.53	10.33 ± 0.68	15.89 ± 2.49
BCCAO 组	5.04 ± 0.71	10.16 ± 0.63	15.53 ± 2.68
P 值	0.825	0.715	0.370

数的增多, 2 组大鼠的逃避潜伏期均逐渐下降。经 repeated measure ANOVA 检验, 大鼠在 3 次检测中的逃避潜伏期差异有统计学意义($P < 0.05$)。逃避潜伏期与时间因素无交互作用($P = 0.138 > 0.05$), 表明 2 组大鼠逃避潜伏期随检测时间的走势无差异。2 组大鼠的逃避潜伏期, 在术后 30~34 d 的检测时间点, 差异不具有统计学意义($P > 0.05$); 在术后 60~64 d 和 90~94 d 的检测时间点, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明在 BCCAO 造模术后 30~34 d, BCCAO 组大鼠较假手术组大鼠尚未出现明显的认知功能障碍; 而在术后 60~64 d 及 90~94 d 的检测中, 较假手术组大鼠, BCCAO 组大鼠已出现明显的认知功能障碍。

表 3 大鼠 3 次行为学测试的逃避潜伏期

Table 3 Escaping latency of rat in three behavioral tests

组别	术后 30~34 d	术后 60~64 d	术后 90~94 d
假手术组	37.98 ± 10.10	16.68 ± 1.92	9.90 ± 1.68
BCCAO 组	42.64 ± 14.77	31.72 ± 9.92	22.95 ± 9.75
P 值	0.371	0.001	0.001

2.2.3 VaD 成模率 实验观察期间对照组大鼠均未见 VaD 表现。术后 30~34 d, BCCAO 组出现 VaD 表现大鼠 15 只, 占 31.91%。术后 60~64 d、90~94 d, 出现 VaD 表现大鼠分别占 97.87% 和 95.65%。表明术后 60 d 时, BCCAO 术后大鼠已基本出现 VaD 表现。因此建议术后 35~60 d 筛选模型较为适宜。

3 讨论

反复的脑缺血再灌注和长期慢性脑低灌注 (chronic cerebral hypoperfusion, CCH) 是 VaD 的主要病因^[12]。经多普勒血流仪测定, BCCAO 法可使大鼠的全脑血流量下降 70%^[13], 造成大鼠 CCH, 诱发白质稀疏、海马与皮质神经元损害等病理改变, 最终导致大鼠渐进性认知功能障碍。此方法模拟了人类由动脉粥样硬化等慢性病导致的 VaD^[14], 且操作简单, 可重复性强, 术后大鼠无明显感觉和运动功能障碍, 因此是近年制作 VaD 大鼠模型最常用的造模方法之一^[3]。

大鼠具有前循环颈内动脉系统与后循环椎基底动脉系统构成的 Willis 动脉环, 双侧颈总动脉结

扎后, 亦可通过后循环代偿及侧支循环的建立, 保证脑部供血^[15]; 且价格低廉、易于存活、便于行为学及其他各种检测, 因此是以 BCCAO 法建立 VaD 模型最为适宜的动物。虽然 BCCAO 法可对视网膜灌注产生损伤^[16,17], 但 SD 大鼠与 Wistar 大鼠相比, 视觉对行为学产生的影响较小^[18], 且在 BCCAO 术后的死亡率低, 体质量恢复良好。文献报道^[19]雌激素可降低造模诱导的 VaD, 且有学者^[20]认为 2-VO 法以体质量 230~270 g 大鼠最为适宜。综合文献并结合预实验经验, 本实验最终选择体质量 230~250 g 雄性 SD 大鼠作为实验对象。较传统 BCCAO 的操作方法^[4-6], 本实验于术后 3 d 予大鼠自由饮用 10% 蔗糖水溶液, 最终 BCCAO 术后大鼠的死亡率低至 20.3%。笔者认为, 上述操作或为 BCCAO 造模方法的有益操作步骤。

MWM 行为学测试, 由英国心理学家 Morris 于 1981 年设计^[21]。MWM 经不断地改进与应用, 现已成为考察大鼠空间学习、记忆能力最为常用的实验装置。水缸内壁均呈墨黑色, 实验时于清水中添加黑色食品添加剂, 且试验操作全程在暗室进行, 配合以 SD 大鼠为实验对象, 避免了由于本造模方法损伤视网膜灌注而可能对行为学产生的影响。

本实验结果显示, BCCAO 术后 30~34 d 至术后 60~64 d 的 2 次检测, 2 组间的逃避潜伏期差异从不具有统计学意义($P>0.05$)到出现统计学意义($P<0.05$), 表明 BCCAO 术后大鼠的认知功能随时间的进展呈渐进性下降过程; 在术后 90~94 d 的检测中, 2 组间的逃避潜伏期差异仍具有统计学意义($P<0.05$), 表明至术后 90 d 左右, BCCAO 组大鼠的认知障碍尚未恢复。可以推论, BCCAO 术后, 模型大鼠的 VaD 认知障碍于术后 35~60 d 基本形成, 并可持续至术后 90 d。以上结果表明 BCCAO 法制作 VaD 大鼠模型, 可诱发大鼠的认知障碍, 并可持续较长时间, 是制作 VaD 大鼠模型的可靠造模方法。本实验部分证实了先前的文献报道^[22-25], 但不完全一致, 原因可能为认知的损害程度受大鼠个体差异的影响较大; 且实验大鼠的品种、鼠龄、体质量及行为学测试装置不尽相同。

本实验仅以 MWM 行为学测试动态评估

BCCAO 术后大鼠的认知功能, 后期实验中期望引入以激光多普勒血流仪测定的脑血流量(cerebral blood flow, CBF)等客观指标。通过实验数据可发现, 虽改变了逃避平台的放置象限, 但 2 组大鼠的逃避潜伏期均持续下降。MWM 的设计利用大鼠会游泳但怕水的天性, 对大鼠进行应激性刺激。此 MWM 检测是否适宜重复进行, 而且较跳台法、避暗法、穿梭箱法、Y- 迷宫、八臂迷宫、高架十字迷宫和新事物识别等行为学测试方法, 是否为评估 VaD 大鼠模型最适宜的方法尚不明确。以期上不足与疑问有待后续实验的探索, 以期进一步完善 BCCAO 术后 VaD 大鼠的各项评价标准, 使 VaD 大鼠模型能够更好地服务于 VaD 的实验研究。

(致谢: 感谢中国医学科学院放射医学研究所动物中心提供实验动物饲养场地。感谢卢轩师兄进行教学模型制作, 杨秀娟师姐协助模型制作, 王翔师兄协助 MWM 行为学测试并指导论文撰写与修改。)

参考文献:

- [1] 任庆国, 梁兵, 孟祥水. 血管性认知障碍临床诊断标准概述[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(1):1-3.
- [2] 中国痴呆与认知障碍指南写作组, 中国医师协会神经内科医师分会认知障碍疾病专业委员会. 2018 中国痴呆与认知障碍诊治指南(一): 痴呆及其分类诊断标准[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(13): 965-970.
- [3] Zhang ZY, Liu Z, Deng HH, et al. Effects of acupuncture on vascular dementia (VD) animal models: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1):302-311.
- [4] 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, 84.
- [5] 吴章福, 高晓平, 李光武. 改良双侧颈总动脉结扎法与传统的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.
- [6] 谭洁, 韩国栋, 张泓, 等. 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[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(3):264-268.
- [7] 赵宪林, 方秀斌, 李东培. 大鼠血管性痴呆模型制作[J]. 中国医科大学学报, 2002, 31(3):166-167, 176.
- [8] 张君, 程笑, 杨欢, 等. 山奈酚对慢性脑缺血大鼠学习记忆能力的影响及机制探讨[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(1):39-44.

- [9] 张新萍. Humanin (HN)衍生物 -Rattin 对血管性痴呆大鼠认知功能损害的影响[D]. 济南: 山东大学, 2013:20-21.
- [10] 贺晓丽, 毕明刚, 杜冠华. 慢性脑缺血大鼠脑组织线粒体蛋白质组与能量代谢相关性研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9):1200-1205.
- [11] Venkat P, Chopp M, Chen J. Models and mechanisms of vascular dementia[J]. *Exp Neurol*, 2015, 272:97-108.
- [12] Juma WM, Lira A, Marzuk A, et al. C-reactive protein expression in a rodent model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Brain Res*, 2011, 1414:85-93.
- [13] Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1):162-180.
- [14] 张海燕. 五脏温阳化瘀汤对动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠作用机理的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2013: 41.
- [15] 王丽萍, 陈志刚, 罗玉敏. 动物慢性脑缺血模型的研究现状[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4):67-73.
- [16] 王淑雅. 血红蛋白载氧体在大鼠视网膜慢性低灌注损伤中对视网膜的保护作用[D]. 天津: 天津医科大学, 2012: 10.
- [17] 谢国丽, 傅强, 赵露, 等. 大鼠眼缺血综合征动物模型的制备[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(22):1841-1843.
- [18] Kim SK, Cho KO, Kim SY. White matter damage and hippocampal neurodegeneration induced by permanent bilateral occlusion of common carotid artery in the rat: comparison between Wistar and Sprague-Dawley strain[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2008, 12(3):89-94.
- [19] 唐慧, 张文丽, 朱莹, 等. 雌激素通过上调 VEGF 表达降低大鼠脑慢性低灌注诱导的微血管损伤[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(11):1552-1556.
- [20] 陈金. 肉苁蓉总苷对血管性痴呆大鼠学习记忆、p-tau 蛋白表达及蛋白组学的实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2015:22.
- [21] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 1984, 11(1): 47-60.
- [22] 刘汇波, 叶翠飞, 李斌, 等. 双侧颈总动脉结扎对大鼠学习记忆功能和海马组织形态学的影响[J]. 基础医学与临床, 1998, 18(4):54-58.
- [23] 李斌, 刘汇波, 郭德玉, 等. 双侧颈总动脉结扎大鼠行为学观察[J]. 中国实验动物学杂志, 2000, 10(1):15-18.
- [24] 孙莉, 金涛, 丁艳华, 等. 慢性前脑缺血致痴呆大鼠脑血流量及行为学对比研究[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(8):920-922.
- [25] 曹岩菁. 在血管性痴呆发生过程中 tau 蛋白影响囊泡转运体亚型的相关性分析[D]. 济南: 山东大学, 2016:18-20.

Dynamic Behavioral Assessment of Vascular Dementia Rat Models Made by Bilateral Common Carotid Artery Occlusion

CONG Lin¹, ZHANG Zhilong²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

(2. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300120, China)

[Abstract] **Objective** To observe the mortality of vascular dementia (VaD) rat models induced by bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO), and to dynamically observe the cognitive function of rats after BCCAO via Morris water maze (MWM) test. **Methods** Sixty-eight male SD rats with no significant difference in intelligence were randomly divided into sham operation group (9 rats) and BCCAO group (59 rats). The mortality of the two groups was recorded within 30 days after operation. MWM behavioral tests were performed in 30-34, 60-64 and 90-94 days after operation to evaluate the cognitive function of the rats in BCCAO group and to detect the rate of VaD model forming in BCCAO group. **Results** Within 30 days after BCCAO, the mortality rate of rats was 20.3%. In MWM behavioral test, the average speed of rats in BCCAO group was basically same as that in sham operation group, with no significant difference ($P>0.05$); the escaping latency of rats in BCCAO group was significantly longer than that in sham operation group at 60-64 and 90-94 days after operation ($P<0.05$), and the VaD model rate was 97.9% and 95.7% respectively. **Conclusion** BCCAO is safe and reliable method to make VaD rat models. There is no obvious motor dysfunction in the rats after operation. VaD in the model rats can be basically formed between 35 and 60 days after operation and lasted till 90 days after operation.

[Key words] Vascular dementia (VaD); Animal model; Cognitive impairment;

Bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO); Test time