

陈炎森,林浩伟,张予菲,等. 月桂酸钠诱导脑小血管病大鼠模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 779-789.

CHEN Y S, LIN H W, ZHANG Y F, et al. Establishment and evaluation of a rat model of cerebral small vessel disease induced by sodium laurate [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 779-789.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.001

月桂酸钠诱导脑小血管病大鼠模型的建立与评价

陈炎森^{1#}, 林浩伟^{1#}, 张予菲², 林雨星¹, 曹长源¹, 赖可欣³,
吴钰婷³, 蔡巧燕^{1,4*}, 张铃^{1,4*}

(1. 福建中医药大学中西医结合学院 中西医结合研究院,福州 350122;2. 陕西学前师范学院
生命科学与食品工程学院,西安 710100;3. 福建中医药大学中医学院,福州 350122;
4. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室,福州 350122)

【摘要】 目的 通过颈内动脉单侧、单次注射月桂酸钠,建立脑小血管病(cerebral small vessel disease, CSVD)大鼠模型,并通过检测行为学、血清相关指标、脑梗死体积、脑微血管密度、血流动力学、脑组织病理学及血脑屏障相关指标,评估模型的有效性。**方法** 将SPF级雄性SD大鼠随机分为对照组(Control组)和模型组(Model组),每组6只。模型组经颈内动脉,单次注射100 μL的月桂酸钠(2 g/L),对照组行相同手术,注射等体积的生理盐水。利用Longa评分及姿势反射实验进行大鼠神经行为学评估;ELISA检测大鼠血清同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)含量;核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)检测脑梗死体积、脑血管成像观察脑血管密度改变;超声检测颈动脉血管阻力指数(resistance index, RI)及血流灌注指数(perfusion index, PI);苏木素-伊红(HE)染色观察大脑组织病理变化;免疫组化(IHC)检测脑组织中脑微血管密度CD31及紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin)的表达。**结果** 与对照组相比,模型组Longa评分与姿势反射评分均显著升高($P < 0.05$),脑梗死体积显著增加($P < 0.05$),脑血管密度明显下降,颈动脉RI、PI值及血清中HCY的含量均显著升高($P < 0.05$);HE染色结果发现模型组的脑皮质区神经元核固缩,血管周围间隙变大;免疫组化结果显示脑皮质区CD31、ZO-1、Occludin的表达显著减少($P < 0.05$)。**结论** 通过颈内动脉单侧、单次注射高浓度月桂酸钠可以快速、有效地建立CSVD模型;该方法建立的CSVD大鼠模型,存在神经行为学异常、脑梗死、脑供血不足、血管密度减少和血脑屏障破坏现象,可作为CSVD研究的有效动物模型。

【关键词】 脑小血管病;动物模型;血脑屏障;同型半胱氨酸;CD31

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0779-11

Establishment and evaluation of a rat model of cerebral small vessel disease induced by sodium laurate

【基金项目】 国家自然科学基金(82374282),福建省自然科学基金(2022J01876, 2022J01875),国家级大学生创新创业训练计划项目(202310393006),福建中医药大学青年科技创新培育计划项目(XQC2024004)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82374282), Natural Science Foundation of Fujian Province (2022J01876, 2022J01875), National Innovation and Entrepreneurship Training Programme Project for College Students (202310393006), Fujian University of Traditional Chinese Medicine Youth Science and Technology Innovation Cultivation Program (XQC2024004).

【作者简介】 陈炎森,男,在读本科生,研究方向:中西医结合防治心脑血管病。Email:1467919312@qq.com;

林浩伟,男,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治心脑血管病。Email:1437439469@qq.com。

#共同第一作者

【通信作者】 蔡巧燕,女,博士,正高级实验师,研究方向:中西医结合防治心脑血管病。Email:cqy2005899@163.com;

张铃,女,博士,副研究员,研究方向:中西医结合防治心脑血管病。Email:remona1986@126.com。

* 共同通信作者

CHEN Yansen^{1#}, LIN Haowei^{1#}, ZHANG Yufei², LIN Yuxing¹, CAO Changyuan¹, LAI Kexin³,
WU Yuting³, CAI Qiaoyan^{1,4*}, ZHANG Ling^{1,4*}

(1. College of Integrative Medicine/Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. College of Life Sciences and Food Engineering, Shanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710100, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 4. Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, China)

Corresponding author: CAI Qiaoyan. E-mail: cqy2005899@163.com;

ZHANG Ling. E-mail: remona1986@126.com

【Abstract】 Objective A rat model of cerebral small vessel disease (CSVD) was established by unilateral injection of a single dose of sodium laurate into the internal carotid artery. The effectiveness of the model was assessed by behavior scoring and analysis of serum-related indicators, cerebral infarction volume, cerebral microvascular density, hemodynamics, brain histopathology and the expression of blood-brain barrier (BBB)-related proteins. **Methods** SPF-grade male SD rats were divided randomly into a control group and a model group ($n = 6$ per group). The model group received a single injection of 100 μ L of sodium laurate (2 g/L) via the internal carotid artery, while the control group underwent the same surgical procedure but received an equal volume of saline. Neurobehavioral assessments were conducted using the Longa score and postural reflex test. Serum homocysteine (HCY) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Cerebral infarction volume was detected by magnetic resonance imaging and changes in cerebral vascular density were observed by cerebrovascular imaging. The resistance index (RI) and perfusion index (PI) were measured by ultrasonography. Histopathological changes in brain tissue were evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. Expression of the cerebral microvascular marker CD31 and tight junction proteins ZO-1 and Occludin in brain cortex tissue were detected by immunohistochemical staining. **Results** The Longa score, postural reflex score ($P < 0.05$), and cerebral infarction volume were significantly increased ($P < 0.05$) while the cerebral vascular density was decreased in the model group compared with the control group. Serum HCY levels, carotid RI, and PI values were all significantly increased in the model group ($P < 0.05$). HE staining revealed solidified neuronal nuclei and enlarged perivascular spaces in the brain cortex in the model group. Immunohistochemical staining revealed that CD31, ZO-1, and Occludin expression were significantly reduced in the brain cortex in the model group compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** A rat model of CSVD can be established rapidly and effectively by a single unilateral injection of high-concentration sodium laurate via the internal carotid artery. This model is characterized by neurobehavioral abnormalities, cerebral infarction, insufficient cerebral blood supply, reduced vascular density, and disruption of the BBB, suggesting that it may serve as an effective rat model for the study of CSVD.

【Keywords】 cerebral small vessel disease; animal model; blood-brain barrier; homocysteine; CD31
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脑小血管病 (cerebral small vessel disease, CSVD) 是由于颅内微小血管的动态弥漫性病变所致的脑微血管疾病, 是脑卒中和血管性痴呆的主要病因, 具有高隐匿性、高发病率、高致残率等特点^[1]。该疾病的隐匿性强, 对脑部的损害又不及脑卒中迅速且明显, 临床上往往难以发现而进展为更严重的脑卒中和血管性痴呆等脑部疾病^[2]。近年来, CSVD 逐渐成为国内外学者研究的热点, 但目前关于该疾病的动物模型尚不成

熟, 缺乏统一性。若能模拟 CSVD 的病理发展进程与疾病临床特点, 对于该病发病机理研究和相关治疗方法的探索及治疗药物的研发具有重要的理论与现实意义。

目前有 4 种常见的 CSVD 动物模型: 低灌注损伤^[3]、高血压相关性^[4]、基因修饰相关^[5] 和微小栓子栓塞^[6]。以上 4 种造模方式虽能够造成脑组织影像学以及神经行为学改变, 但存在不同程度的靶器官 (如肾等) 功能损害、微梗死的偶发

性、造模周期长、价格昂贵以及操作复杂性、难以全面推广等缺点。

研究发现,脑小血管病与低灌注^[7]、内皮功能障碍及血脑屏障破坏^[8]、组织间液回流障碍^[9]、炎症反应和遗传因素^[7]等相关。而颅内小血管内皮损伤在脑白质的缺血损伤中扮演着重要角色,是 CSVD 发病机制的重要环节^[10]。月桂酸钠因其对血管内皮具有强烈的损伤作用,可造成内皮细胞脱落,常常被用于构建外周动脉血栓模型^[11-12]。因此,本研究通过对大鼠进行颈内动脉单侧、单次注射月桂酸钠,创建一个快速、经济、易推广的 CSVD 动物模型,并通过检测大鼠的行为学、血清相关指标、脑梗死体积、脑微血管密度、血流动力学、脑组织病理学及血脑屏障完整性等指标,系统评估模型的有效性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只体质量为 (260 ± 20) g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠,7 ~ 8 周龄,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(京)2019-0008】,于福建中医药大学动物实验中心【SYXK(闽)2019-0007】饲养。饲养条件为室温:20 ~ 26 ℃,相对湿度:45% ~ 60%,12 h 明暗交替,采用自由饮水和进食方式进行喂养。所有动物饲养及其他实验操作均符合相关管理要求准则及实验动物伦理要求,本研究中所有实验动物操作均按照《实验动物护理与使用指南》指导进行,并经福建中医药大学动物伦理委员会批准(FJTCM IACU 2023080)。

1.1.2 主要试剂与仪器

月桂酸钠(批号:CSN51476,购自美国 CSNpharm 公司);苏木素-伊红(HE)染液(批号:分别为 G1140、G1100,购自北京索莱宝科技有限公司);免疫组化试剂盒和 DAB 染色液(批号分别为 KIT-9720、DAB-0031,购自福州迈新生物技术开发有限公司);ZO-1 和 Occludin(批号分别为 61-7300、33-1500,购自美国 Invitrogen 公司);CD31(批号:AB222783,购自 Abcam 公司);HCY(批号:MM-0293R2,购自江苏酶免实业有限公司)。

超高分辨率小动物超声成像系统(型号:

Vevo2100,加拿大 Visual Sonics 公司);小动物核磁共振成像仪(型号:BioSpec70/20USR,德国 BRUKER 公司);生物组织自动脱水机、生物组织石蜡包埋机、生物组织摊烤机(型号分别为 ZT-12P2、YB-9LF、YT-7FB,湖北孝感亚光医用电子技术有限公司);全自动石蜡切片机(型号:RM2265,德国 Leica 公司);光学显微镜(型号:DM300,德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 CSVD 模型的构建

小鼠适应性喂养 1 周后,进行造模。采用颈内动脉注射月桂酸钠溶液制备大鼠 CSVD 模型:大鼠通过腹腔注射 2%戊巴比妥钠进行麻醉,剂量为 0.2 mL/100 g,术中监测呼吸和心跳等重要生命体征,呈仰卧位固定,剃去手术区域毛发,75%乙醇消毒,沿大鼠颈部中线剪开,钝性分离出颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA)。结扎 CCA 和 ECA,并将 ICA 用动脉夹夹闭。在 CCA 近心端处剪一小口,PE50 导管插入 CCA,向前插入至 ICA,缓慢注入 100 μ L 的月桂酸钠溶液(月桂酸钠与 0.9%的氯化钠溶液充分溶解,配制成 2 g/L 剂量)。对照组,行相同手术,注入等体积的生理盐水。模型组选用 10 只 SD 大鼠进行手术,根据 MRI 结果,造模成功且存活下来用于实验的有 6 只。死亡原因可能与以下因素有关:梗死灶面积过大(2 只,可能与穿刺过深、注射速度过快导致血管损伤或栓塞风险增加有关)、操作时间过久(1 只,长时间的手术应激和创口暴露,导致机体代谢紊乱、感染风险增加,进而使器官功能受损)、麻醉过量(1 只,直接导致大鼠死亡)。此外,个体差异、血管状态及注射位置等因素也可能影响实验结果。另取 6 只作为对照组。

1.2.2 神经行为学评分

于实验第 1、3、5 天分别用大鼠神经受损评分(Longa 评分)及姿势反射实验对两组大鼠进行神经行为学评估。

Longa 评分标准:0 分,无症状;1 分,提尾时损伤对侧前肢不能伸直;2 分,向损伤侧旋转;3 分,向对侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识不清。

姿势反射实验:距地面 1 m 提起鼠尾,通过观

察其双前肢的姿势进行评分。无神经功能缺损者为 0 分,表现为双前肢完全伸展;轻度神经功能缺损者为 1 分,表现为左前肢贴向前胸;重度神经功能缺损者为 2 分,除有 1 分的表现外,其上半身卷曲。

1.2.3 ELISA 检测大鼠血清同型半胱氨酸 (homocysteine, HCY) 含量

准备试剂,样品和标准品,将样品和标准品加入到相应的孔中,37 °C 反应 30 min,取出酶标板,洗板 5 次,加入酶标抗体,37 °C 反应 30 min,取出酶标板,洗板 5 次,加入显色液 A、B,37 °C 避光显色 10 min,加入终止液终止反应,用酶标仪测定各孔的吸光度值,根据标准曲线计算大鼠血清中 HCY 的含量。

1.2.4 小动物核磁共振扫描计算脑梗死体积

使用 7.0 T 小动物核磁共振成像仪 (magnetic resonance imaging, MRI) 进行扫描。首先,用异氟烷麻醉大鼠,在扫描过程中,监测呼吸和心跳等重要生命体征,大鼠以俯卧位固定,并用水循环加热维持体温,随时检测。进行定位扫描和 T2 加权成像扫描。具体扫描参数如下: T2WI 是弛豫增强快速采集 (RARE) 序列、重复时间 (repetition time, TR) = 2500 ms、回波时间 (echo time, TE) = 33 ms、厚度 0.8 mm、层间隔 0 mm、视野 (field of view, FOV) = 30 mm × 30 mm、矩阵 256 × 256、翻转角度 (angle of flip, FA) 180°, 扫描时间为 5 min 23 s。梗死灶体积 = 各层面梗死区域面积之和/各层面脑片面积之和 × 100%。

1.2.5 血管成像

采用 7.0 T 小动物 MRI 扫描进行 3D-TOF 核磁共振血管成像。首先,用异氟烷麻醉大鼠,在扫描过程中,监测呼吸和心跳等重要生命体征,大鼠以俯卧位固定,并用水循环加热维持体温,随时检测。具体扫描参数如下: TR = 15 ms, TE = 2.7 ms, FOV = 30 mm × 30 mm × 24 mm, 采集次数 = 1, 层数 = 1, 层厚 = 24 mm, 扫描时间为 5 min 5 s 280 ms。

1.2.6 小动物超声检测大鼠颈总动脉血流动力学改变

用异氟烷麻醉大鼠后,去除颈部、胸部及腹部毛发,采用彩色多普勒小动物超声诊断仪观察 2 组大鼠颈总动脉超声影像,使用 Vevo Lab

(3.1.0) 软件对数据进行分析,并分析左侧颈总动脉每个心动周期速度时间积分 (velocity time integral, VTI), 以及相应收缩末期流速 (peak systolic velocity, PSV)、舒张末期流速 (end diastolic velocity, EDV) 等,并通过上述检测,仪器自动计算颈动脉血管阻力指数 (resistance index, RI) 及血流灌注指数 (perfusion index, PI)。每个指标测量 5 次,取平均值。

1.2.7 HE 染色法观察缺血侧大脑皮质区病理变化

2%戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉,剂量为 0.2 mL/100 g,心脏灌注生理盐水和 4%多聚甲醛。待大鼠肢体僵硬后迅速取脑,将脑组织置于 4%多聚甲醛中先固定 2 h,随后取出切为 3 等分,继续固定 24 h 后切换至 75%乙醇中;随后使用生物组织自动脱水机进行梯度乙醇脱水;梯度脱水完成后进行石蜡包埋和切片。使用石蜡切片机将石蜡块切成厚度为 4 μm 切片,脱蜡复水,室温下进行 HE 染色,中性树脂封片并拍照。

1.2.8 免疫组化法检测各组大鼠缺血侧脑皮质区 CD31、ZO-1 及 Occludin 的表达

4 μm 石蜡切片脱蜡复水后进行抗原修复,免疫组化笔圈出组织,0.3% Triton 破膜,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,滴加封闭液,分别用 CD31、ZO-1、Occludin (抗体稀释比例均为 1:200) 4 °C 孵育过夜,二抗 (抗体稀释为 1:200) 室温孵育 1 h,滴加链霉素。DAB 染色,苏木素染核,树脂封片并拍照,采用 Image J 1.51j8 软件分析系统对阳性区域进行半定量分析。

1.3 统计学分析

所有实验结果均使用 SPSS (Ver. 22.0) 软件进行统计分析,实验结果以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组数据间比较,符合正态分布且方差齐的,采用单因素方差 (ANOVA) 分析。若不符合正态性分布,则需使用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 CSVD 大鼠行为学的变化

为了评估 CSVD 大鼠的神经行为学的损伤,通过 Longa 评分与姿势反射实验评分对两组大鼠进行动态监测,结果见表 1,表 2。对照组大鼠在

单侧颈内动脉注射生理盐水后生命活动正常,双上肢完全伸展;而模型组在单侧颈内动脉注射月桂酸钠后,于术后的第 1、3、5 天均发生不同程度左前肢贴向前胸,提尾时向左侧旋转等姿势步态平衡障碍等表现。模型组的 Longa 评分与姿势反射实验评分均显著高于对照组($P < 0.05$)。

表 1 两组大鼠 Longa 评分对比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Comparison of Longa scores between two groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	第 1 天 Day 1	第 3 天 Day 3	第 5 天 Day 5
对照组 Control group	0.00	0.00	0.00
模型组 Model group	2.33 ± 0.52*	1.8 ± 0.45*	1.75 ± 0.50*

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。(下图/表同)
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

表 2 两组大鼠姿势反射评分对比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison of postural reflex scores between two groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	第 1 天 Day 1	第 3 天 Day 3	第 5 天 Day 5
对照组 Control group	0.00	0.00	0.00
模型组 Model group	2.50 ± 0.55*	2.00 ± 0.71*	1.75 ± 0.50*

2.2 CSVD 大鼠血清中 HCY 含量的变化

HCY 通过生成超氧化物和过氧化物酶,加剧血管内皮损伤,并导致血管平滑肌缺氧,这是 CSVD 发展过程中关键的病理机制^[13-14]。采用

ELISA 法检测两组大鼠血清中 HCY 的含量,以评估造模对血管内皮损伤的影响。结果显示:与对照组相比,模型组血清中 HCY 的显著升高($P < 0.05$),见表 3。

表 3 两组大鼠血清中 HCY 含量对比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison of the content of serum HCY between two groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

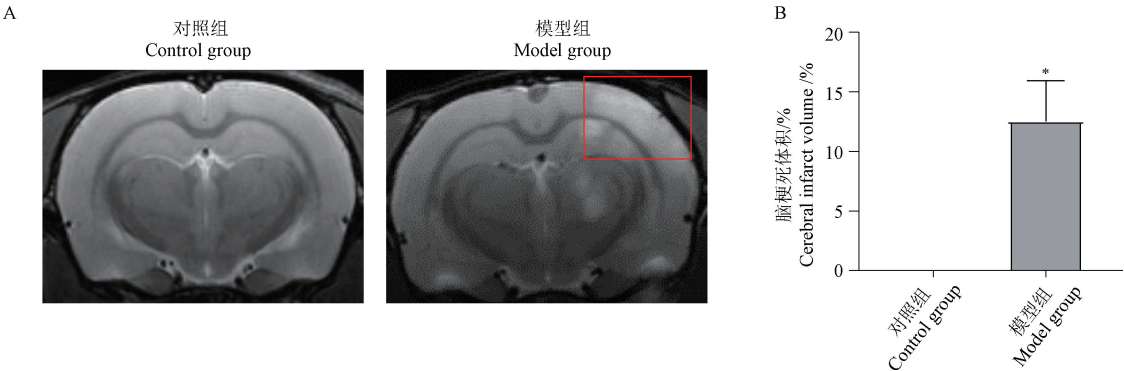
组别 Groups	HCY/($\mu\text{mol/L}$)
对照组 Control group	10.60 ± 0.62
模型组 Model group	13.31 ± 1.15*

2.3 CSVD 大鼠脑梗死体积的变化

进一步利用 MRI 检测 CSVD 大鼠脑梗死体积,结果显示:与对照组相比,模型组右侧出现多发性脑微梗死灶,梗死体积显著升高($12.52 \pm 9.07\%$, $P < 0.05$),见图 1。

2.4 CSVD 大鼠脑微血管密度的变化

在造模后 24 h 行脑血管成像检测造模对大鼠脑微血管密度的影响。与对照组相比,模型组脑微血管密度明显下降,见图 2。此外,利用免疫组化检测脑血管密度标志物 CD31 的表达,结果显示:对照组与模型组的 CD31 表达量分别为 ($7.05 \pm 0.36\%$)、($2.19 \pm 0.47\%$)%,与对照组相比,模型组脑皮质区中 CD31 的表达显著减少($P < 0.05$),结果说明了模型组的脑微血管密度降低,见图 3。



注:A:两组大鼠 MRI 成像代表图,红框:脑梗死;B:两组大鼠脑梗死体积统计。

图 1 两组大鼠的 MRI 成像及梗死体积的对比

Note. A. Representative MRI images of the two groups of rat. Red box. Cerebral infarction. B. Statistical of cerebral infarction volume of the two groups of rats.

Figure 1 Comparison of MRI imaging and infarct volume between two groups of rats

2.5 CSVD 大鼠血流动力学的变化

慢性低灌注是 CSVD 的核心病理机制^[15]。如图 4,通过超声检测大鼠颈动脉的 RI 和 PI,初

步评估造模后是否成功诱导脑部低灌注状态。结果显示:对照组的颈动脉血管阻力指数 RI 与血流灌注指数 PI 分别为 0.65 ± 0.02 、 1.10 ± 0.06 ;

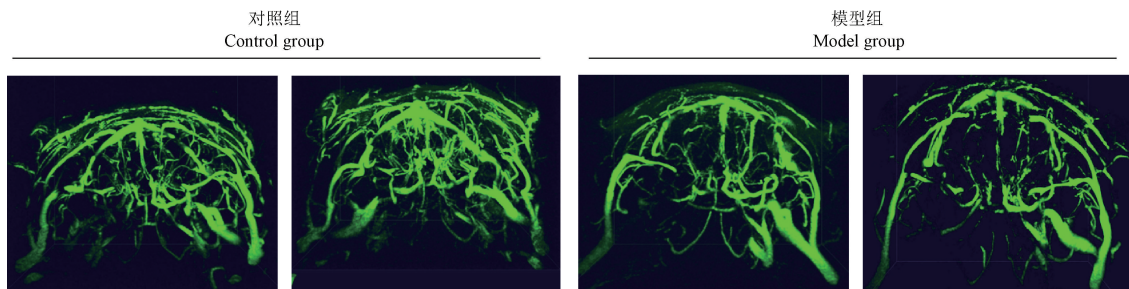
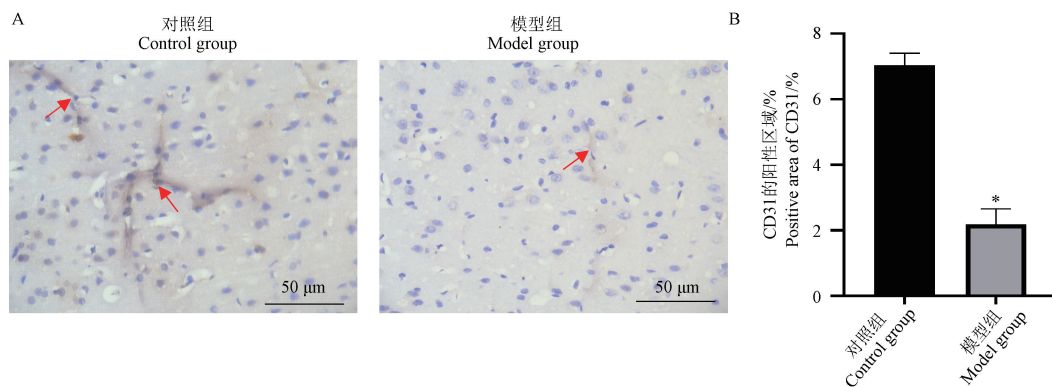


图 2 两组大鼠脑微血管密度的对比

Figure 2 Comparison of cerebral microvessel density between two groups of rats



注:A: 两组大鼠脑皮质区 CD31 表达量的代表图,红色箭头:阳性区域;B: 两组大鼠脑皮质区 CD31 的阳性区域统计。

图 3 两组大鼠脑皮质区中 CD31 表达量的对比

Note. A. Representative images of CD31 expression in the cerebral cortex of the two groups of rats. Red arrow. Positive area. B. Statistical of positive area of CD31 in the cerebral cortex of the two groups of rats.

Figure 3 Comparison of CD31 expression in the cortical regions of the brain between two groups of rats

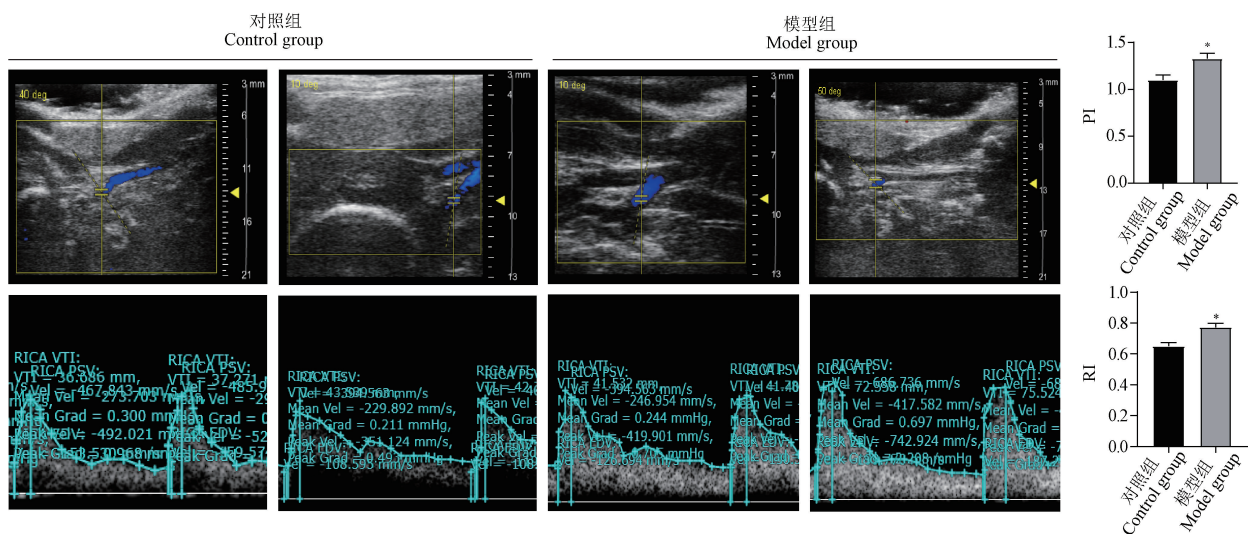


图 4 两组大鼠颈动脉 RI 和 PI 的对比

Figure 4 Comparison of carotid artery RI and PI between two groups of rats

模型组的 RI 与 PI 分别为 0.77 ± 0.03 、 1.33 ± 0.06 ;与对照组相比,模型组 RI 及 PI 均显著升高 ($P < 0.05$)。

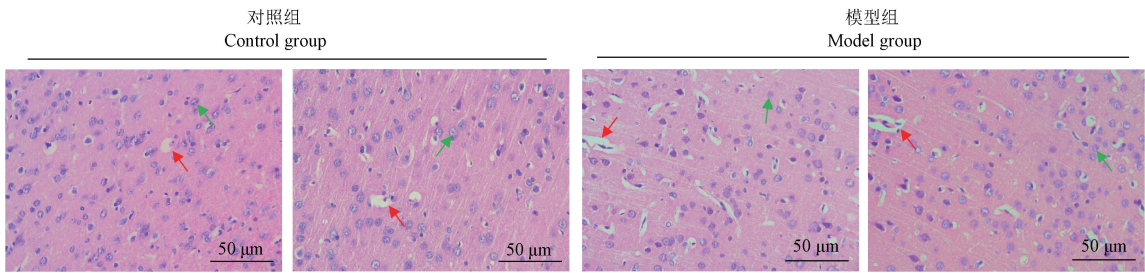
2.6 CSVD 大鼠脑皮质区病理学的变化

通过 HE 染色评估 CSVD 大鼠脑小血管结构及神经元的改变,结果显示:对照组大鼠脑皮质

区神经元排列整齐,血管管腔完整。模型组大鼠脑皮质区的神经元存在固缩及血管周围间隙变大的现象,见图 5。

2.7 CSVD 大鼠血脑屏障的变化

CSVD 发展过程中会发生不同程度的血脑屏障破坏^[16-17],如图 6,图 7,为了检测造模后 CSVD

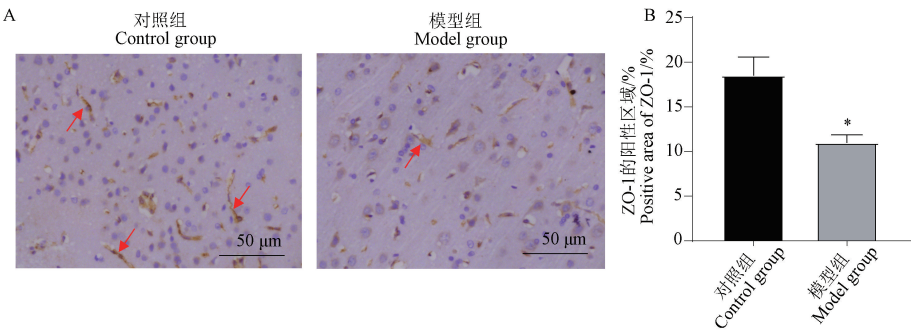


注:绿色箭头:神经元固缩;红色箭头:血管周围间隙变大。

图 5 两组大鼠脑皮质区 HE 染色

Note. Green arrow. Neuronal shrinkage. Red arrow. Enlarged perivascular spaces.

Figure 5 HE staining of the cortical area of the brain between two groups of rats

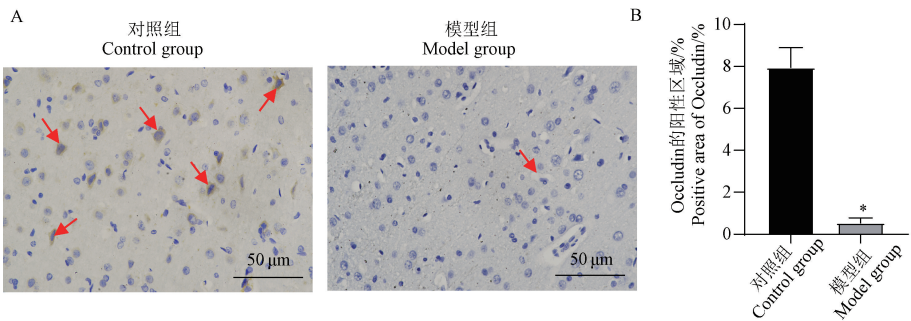


注:A:两组大鼠脑皮质区 ZO-1 表达量的代表图,红色箭头:阳性区域;B:两组大鼠脑皮质区 ZO-1 的阳性区域统计图。

图 6 两组大鼠脑组织皮质区 ZO-1 表达量的对比

Note. A. Representative images of ZO-1 expression in the cerebral cortex of the two groups of rats. Red arrow. Positive area. B. Statistical of the positive area of ZO-1 in the cerebral cortex of the two groups of rats.

Figure 6 Comparison of ZO-1 expression in the cortical regions of the brain between two groups of rats



注:A:两组大鼠脑皮质区 Occludin 表达量的代表图,红色箭头:阳性区域;B:两组大鼠脑皮质区 Occludin 的阳性区域统计。

图 7 两组大鼠脑组织皮质区 Occludin 表达量的对比

Note. A. Representative images of Occludin expression in the cerebral cortex of the two groups of rats. Red arrow. Positive area. B. Statistical of the positive area of Occludin in the cerebral cortex of the two groups of rats.

Figure 7 Comparison of Occludin expression in the cortical regions of the brain between two groups of rats

大鼠血脑屏障的改变,通过免疫组化检测血脑屏障相关紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达,结果显示:对照组的 ZO-1、Occludin 的表达分别为 $(18.53 \pm 1.79)\%$ 、 $(7.94 \pm 0.95)\%$;模型组的 ZO-1、Occludin 的表达分别为 $(10.98 \pm 0.79)\%$ 、 $(0.54 \pm 0.23)\%$;与对照组相比,模型组大鼠 ZO-1、Occludin 的表达均显著减少 ($P < 0.05$),说明 CSVD 大鼠发生了血脑屏障的功能障碍。

3 讨论

CSVD 是严重危害我国人民健康的常见疾病,由于其具有隐匿性,患者无或仅有轻微的临床表现,导致其诊断和防治受限,而无较好的动物模型又使其临床前基础研究受限^[18]。国外曾有学者将月桂酸钠在实验的第 1、3 天分别注入大鼠颈内动脉,选择性地损伤脑穿支动脉内皮,导致微小动脉内原位血栓形成^[19]。然而,该方法存在手术难度大、需两次麻醉增加戊巴比妥钠暴露风险、造模周期长以及手术过程中模型大鼠死亡率较高等局限性。与上述实验不同,本研究采用单侧、单次注射高浓度(2 g/L)月桂酸钠后并对颈内动脉进行结扎,同样可以造成脑微血管的损伤及脑组织低灌注状态。相较于上述实验,本实验方法具有安全、耗时短、操作相对简便,避免了多次手术造成实验大鼠死亡等优点。在造模的基础上,通过行为学、脑梗死体积、脑微血管密度、血流动力学、脑组织病理学及血脑屏障等多方面的检测结果验证,均表明 CSVD 大鼠模型建立成功,并且与 CSVD 的病理特点、发病机制有高度的相适性。

近年来,越来越多的研究开始关注 CSVD 对肢体障碍的影响。CSVD 患者会出现以卒中样症状、步态异常等神经功能损伤为主的临床表现^[20]。本研究观察到,单侧、单次经颈内动脉注射月桂酸钠后,大鼠出现不同程度的左前肢贴向前胸,提尾时向左侧旋转等姿势步态平衡障碍等表现,即 Longa 评分和姿势反射实验分值较对照组均有显著升高 ($P < 0.05$)。鉴于本实验诱导的 CSVD 模型大鼠均会出现不同程度的姿势平衡障碍,与 CSVD 临床特点相符。

研究表明,CSVD 患者所表现出来的认知功能障碍与血清 HCY 的含量密切相关^[21-22]。临床

上,CSVD 合并认知功能障碍患者的 HCY 含量更高,重度认知功能障碍患者 HCY 含量明显高于轻度认知功能障碍患者,说明 HCY 含量可以反映 CSVD 患者认知功能障碍及水平^[23-25]。HCY 属于蛋氨酸代谢的中间产物,该产物可以通过产生超氧化物及过氧化酶,加重机体血管内皮损伤,促使血管平滑肌缺氧,最终将逐渐形成 CSVD 的病理状态^[13-14]。本研究中观察到,单侧、单次经颈内动脉注射高浓度月桂酸钠后,模型组血清同型半胱氨酸的含量明显高于对照组 ($P < 0.05$),提示模型组可能存在认知功能障碍,这与临床上 CSVD 患者的血清 HCY 增高的征象相符,说明 CSVD 大鼠模型建构成功。

CSVD 临床表现多样,部分患者起病隐匿、缓慢进展、高度依赖影像学的诊断。而头部的 MRI 为筛查 CSVD 的有效手段^[26]。临床上 CSVD 在 MRI 的主要表现为腔隙性脑梗死^[27]。本研究中观察到,单侧、单次经颈内动脉注射高浓度月桂酸钠后,模型组右侧出现多发性脑微梗死灶,且脑梗死体积远大于对照组 ($P < 0.05$),提示出现典型的脑小血管缺血的影像学表现,受损部位常与 CSVD 模型大鼠出现不同程度的姿势平衡障碍密切相关,进一步可验证 CSVD 大鼠模型的成功建立。

在 CSVD 引起的微循环障碍病理过程中,血管内皮细胞功能及结构的异常起着关键作用^[28-29]。CD31 在发育中和成熟个体的所有血管内皮细胞均有高度表达,CD31 表达越高,提示微血管数量越多,因此 CD31 是一种重要的微血管标志物^[30]。本研究发现,单侧、单次经颈内动脉注射高浓度月桂酸钠后,模型组脑组织 CD31 表达减少,脑微血管成像结果也显示,模型组脑微血管密度明显下降,均证实月桂酸钠诱导的 CSVD 模型大鼠脑微血管数量减少,这与 CSVD 临床特点相符。

脑内小血管皮质区功能的损伤及结构的改变达到一定程度后可直接形成脑血流量的低灌注状态,长此以往出现脑组织缺血性的改变^[15]。颈动脉超声是一种无创性检查技术,它能够直观地监测血管内的血流动力学变化。目前,该技术已成为筛查脑血管病的主要影像学手段之一^[31-32]。本研究中观察到,单侧、单次经颈内动

脉注月桂酸钠后,模型组的颈动脉 RI 及 PI 升高 ($P < 0.05$),提示模型组大鼠颈动脉血运不畅,可能存在血管狭窄,脑血流量下降、血流动力学不稳定等表现,与 CSVD 的疾病演变相符。进一步的 HE 染色结果显示,模型大鼠脑皮质区呈现广泛的神经元核固缩及血管周围间隙增大的病理特征,符合 CSVD 的典型病理改变。

血脑屏障受损引起功能障碍是 CSVD 的重要发病机制^[16-17]。紧密连接蛋白是血脑屏障的重要组成部分,对维持血脑屏障的结构和功能发挥重要作用^[33]。而紧密连接蛋白的表达下降以及血脑屏障受损增加血管的渗漏,使得血浆白蛋白等大分子物质通过血脑屏障进入脑实质造成脑白质病变^[9]。在本研究中观察到,单侧、单次经颈内动脉注射高浓度月桂酸钠后,模型组大鼠脑组织中的紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 的表达量减少,说明月桂酸钠造模后大鼠出现了血脑屏障的受损。

此外,本研究不足之处在于样本量偏小,仅探索了加倍剂量的造模方案,且未尝试更高浓度月桂酸钠对微血管及冠状动脉的损伤程度,因而未明确当剂量增加至何种水平时会导致大鼠的死亡率升高或损伤到大血管,后续实验可在此基础上进一步探索。另外,月桂酸钠可能会导致全身微循环障碍,本研究未进行相关评估,后续实验中应注意观察。同时,需要注意的是,该造模方法对操作者有如下要求:(1)需熟悉相关的实验动物解剖学的知识,掌握该模型的构建原理;(2)需提高操作的熟练度,以便在短时间内完成操作;(3)术中密切关注大鼠状况,及时调整麻醉深度,避免因麻醉过浅致苏醒挣扎或麻醉过深致呼吸抑制而死亡;(4)需精准暴露颈动脉,避免损伤迷走神经和交感神经;(5)注意区分 CCA、ICA、ECA,经 ICA 注入月桂酸钠时要求匀速、轻柔及缓慢,同时严格控制穿刺力度及深度。

综上所述,单侧、单次颈内动脉注射高浓度月桂酸钠创建的 CSVD 大鼠模型,会造成不同程度的左前肢贴向前胸并且提尾时向左侧旋转等姿势平衡障碍的表现;血清同型半胱氨酸数值增高;脑组织出现多发性微梗死灶;脑微血管数量减少;脑供血不足;脑组织中的神经元固缩、血管周围间隙变大;并出现了血脑屏障损坏,符合

CSVD 的临床表现可为 CSVD 研究提供一种简便、稳定、有效的实验动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] 王香元,余瑞宁,方锐,等. 脑小血管病实验动物模型及制备方法研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5851-5860.
WANG X Y, SHE R N, FANG R, et al. Research progress on experimental animal models and preparation methods of cerebral small vessel disease [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(18): 5851-5860.
- [2] DAS A S, REGENHARDT R W, VERNOOIJ M W, et al. Asymptomatic cerebral small vessel disease: insights from population-based studies [J]. J Stroke, 2019, 21(2): 121-138.
- [3] 郭文娟. 慢性脑低灌注小鼠模型构建及活血方对其神经纤维损伤的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2023.
GUO W J. Construction of a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion and the effect of blood-activating formula on its nerve fiber damage [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2023.
- [4] MENG P, LIU T, ZHONG Z, et al. A novel rat model of cerebral small vessel disease based on vascular risk factors of hypertension, aging, and cerebral hypoperfusion [J]. Hypertens Res, 2024, 47(8): 2195-2210.
- [5] HAINSWORTH A H, MARKUS H S. Do *in vivo* experimental models reflect human cerebral small vessel disease? A systematic review [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(12): 1877-1891.
- [6] 陈超, 聂郁林, 陆心恬, 等. 改良线栓法建立 SD 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型 [J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18(10): 569-573.
CHEN C, NIE Y L, LU X T, et al. Modified thread embolization method for establishment of focal cerebral ischemia-reperfusion model in SD rats [J]. Neural Inj Funct Reconstr, 2023, 18(10): 569-573.
- [7] 张阳, 何俐. 脑小血管病的病因和发病机制的最新进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2024, 41(4): 296-297, 288.
ZHANG Y, HE L. Latest advances in the etiology and pathogenesis of small cerebral vessel disease [J]. J Apoplexy Nerv Dis, 2024, 41(4): 296-297, 288.
- [8] 孔倩倩, 黄浩, 骆翔. 血脑屏障与脑小血管病相关研究进展 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2023, 23(11): 972-977.
KONG Q Q, HUANG H, LUO X. Research progress on the correlation between blood-brain barrier and cerebral small vessel disease [J]. Chin J Contemp Neurol Neurosurg, 2023, 23(11): 972-977.

- [9] 胡文立, 杨磊, 李譔婷, 等. 中国脑小血管病诊治专家共识 2021 [J]. 中国卒中杂志, 2021, 16(7): 716-726.
HU W L, YANG L, LI X T, et al. Chinese consensus on diagnosis and therapy of cerebral small vessel disease 2021 [J]. Chin J Stroke, 2021, 16(7): 716-726.
- [10] 陈雪梅. 内皮功能障碍与脑小血管病 [J]. 国际脑血管病杂志, 2016, 24(12): 1111-1114.
CHEN X M. Endothelial dysfunction and cerebral small vessel disease [J]. Int J Cerebrovasc Dis, 2016, 24(12): 1111-1114.
- [11] ASHIDA S, ISHIHARA M, OGAWA H, et al. Protective effect of ticlopidine on experimentally induced peripheral arterial occlusive disease in rats [J]. Thromb Res, 1980, 18(1/2): 55-67.
- [12] SHIRAKURA S, HIGO K, TAKEDA M, et al. Antithrombotic effects of KW-3635, a thromboxane A₂-receptor antagonist, in guinea pigs [J]. Jpn J Pharmacol, 1994, 65(2): 93-98.
- [13] 饶容丽, 王守章, 谷丽娟. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征对老年脑小血管病患者认知功能及血清同型半胱氨酸和胱抑素 C 水平的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(6): 1149-1151.
RAO R L, WANG S Z, GU L J. Effects of obstructive sleep apnea hypoventilation syndrome on cognitive function and serum homocysteine and cystatin C levels in elderly patients with cerebral small vessel disease [J]. Chin J Gerontol, 2020, 40(6): 1149-1151.
- [14] 郝栋, 李孟文, 孔艳妮, 等. 脑小血管病患者血清 Hcy、VEGF 水平及意义 [J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(7): 423-424.
HAO D, LI M W, KONG Y N, et al. Serum Hcy and VEGF levels and significance in patients with cerebral small vessel disease [J]. Neural Inj Funct Reconstr, 2020, 15(7): 423-424.
- [15] BARNES S R, NG T S C, MONTAGNE A, et al. Optimal acquisition and modeling parameters for accurate assessment of low K_{trans} blood-brain barrier permeability using dynamic contrast-enhanced MRI [J]. Magn Reson Med, 2016, 75(5): 1967-1977.
- [16] ZHANG C E, WONG S M, VAN DE HAAR H J, et al. Blood-brain barrier leakage is more widespread in patients with cerebral small vessel disease [J]. Neurology, 2017, 88(5): 426-432.
- [17] WALSH J, TOZER D J, SARI H, et al. Microglial activation and blood-brain barrier permeability in cerebral small vessel disease [J]. Brain, 2021, 144(5): 1361-1371.
- [18] 王珊珊, 徐昊, 侯培媚, 等. 基于脑小血管病临床脑血流特点构建并评估不完全性全脑缺血再灌注大鼠模型 [J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(7): 1330-1338.
WANG S S, XU H, HOU P M, et al. Construction and evaluation of an incomplete global cerebral ischemia-reperfusion rat model based on hemodynamic characteristics of cerebral small vessel disease [J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(7): 1330-1338.
- [19] 刘茅茅, 李小玲, 王拥军, 等. 腔隙性脑梗死动物模型的建立 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2003, 5(5): 334-337.
LIU M M, LI X L, WANG Y J, et al. The development of cerebral lacunar infarction model in rats [J]. Editor Dep Chin J Geriatr Cardiovasc Cerebrovasc Dis, 2003, 5(5): 334-337.
- [20] 关双, 徐蕊, 刘骏, 等. 脑小血管病诊治的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(23): 4696-4701.
GUAN S, XU R, LIU J, et al. Progress in diagnosis and treatment of cerebral small vessel disease [J]. Med Recapitul, 2019, 25(23): 4696-4701.
- [21] WANG T, SUN Z W, SHAO L Q, et al. Diagnostic values of serum levels of homocysteine and uric acid for predicting vascular mild cognitive impairment in patients with cerebral small vessel disease [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 2217-2225.
- [22] ZHENG X, SHE H D, ZHANG Q X, et al. Cystatin C predicts the risk of incident cerebrovascular disease in the elderly: a meta-analysis on survival date studies [J]. Med (Baltimore), 2021, 100(28): e26617.
- [23] 郁洁, 王滨, 洪侃, 等. 合并认知功能障碍的脑小血管病老年患者血同型半胱氨酸及炎症介质水平的改变及意义 [J]. 川北医学院学报, 2018, 33(4): 496-499.
YU J, WANG B, HONG K, et al. Change and significance of plasma homocysteine and inflammatory mediators in elderly patients with cerebral small vessel disease combined with cognitive impairment [J]. J N Sichuan Med Coll, 2018, 33(4): 496-499.
- [24] 田婧, 白永杰, 尤爱民. 血清 Hcy、SAA 和 MCP-1 在脑梗死后血管性认知功能障碍患者血清中的表达及意义 [J]. 广东医学, 2021, 42(7): 810-813.
TIAN J, BAI Y J, YOU A M. The expression and clinical value of serum Hcy, SAA and MCP-1 in vascular cognitive dysfunction after cerebral infarction [J]. Guangdong Med J, 2021, 42(7): 810-813.
- [25] 张晨, 郝建春, 李云峰, 等. 血清 HCY、Cys-C 水平在老年脑小血管病合并 OSAHS 认知障碍中的表达及严重程度评估价值 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2024, 41(3): 270-275.
ZHANG C, HAO J C, LI Y F, et al. Value of serum HCY and Cys-C levels for cognitive impairment assessment in elderly patients with both cerebral small vessel disease and

- obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. *J Apoplexy Nerv Dis*, 2024, 41(3): 270-275.
- [26] 郭雅芹, 吴雪梅, 邢海英, 等. 脑小血管病患者磁共振成像总体负荷与颈动脉内中膜厚度的相关性研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2023, 40(6): 540-543.
- GUO Y Q, WU X M, XING H Y, et al. Correlation between total magnetic resonance imaging burden and carotid intima-media thickness in patients with cerebral small vessel disease [J]. *J Apoplexy Nerv Dis*, 2023, 40(6): 540-543.
- [27] 崔羽, 冉娟娟, 王益, 等. 脑小血管病患者多模态磁共振成像特征及其与认知功能损伤的相关性分析 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2020, 28(4): 43-48.
- CUI Y, RAN J J, WANG Y, et al. Characteristics of multimodal MRI and their correlations with cognitive impairment in patients with cerebral small vessel disease [J]. *Pract J Card Cereb Pneumal Vasc Dis*, 2020, 28(4): 43-48.
- [28] FORD T J, ROCCHICCIOLI P, GOOD R, et al. Systemic microvascular dysfunction in microvascular and vasospastic angina [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(46): 4086-4097.
- [29] PRIES A R, REGLIN B. Coronary microcirculatory pathophysiology: can we afford it to remain a black box? [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(7): 478-488.
- [30] 张宏如, 陈静, 徐森磊, 等. 针刺内关和足三里双穴位对大鼠心肌缺血再灌注损伤后的血管重塑作用 [J]. *南京中医药大学学报*, 2023, 39(1): 42-49.
- ZHANG H R, CHEN J, XU S L, et al. The effect of combination acupuncture treatment of Neiguan and Zusanli on vascular remodeling after myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2023, 39(1): 42-49.
- [31] 卓晓英, 薛金光, 赵宁军, 等. 急诊颈部血管超声检查应用于急性脑梗死患者的临床价值 [J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*, 2016, 11(12): 1165-1168.
- ZHUO X Y, XUE J G, ZHAO N J, et al. Clinical value of emergency application of cervical vascular ultrasound in diagnosis of cerebral infarction [J]. *Chin J Emerg Resusc Disaster Med*, 2016, 11(12): 1165-1168.
- [32] 汪宁, 彭兆快. 脑梗死老年患者经颅多普勒超声及颈动脉超声血管检测 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(12): 2844-2847.
- WANG N, PENG Z K. Transcranial Doppler ultrasound and carotid ultrasound angiography in elderly patients with cerebral infarction [J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(12): 2844-2847.
- [33] 廖华宁, 汪宁, 王艳. 紧密连接蛋白与血脑屏障 [J]. *安徽医药*, 2012, 16(3): 377-379.
- LIAO H N, WANG N, WANG Y. Tight junction proteins and the blood-brain barrier [J]. *Anhui Med Pharm*, 2012, 16(3): 377-379.

[收稿日期] 2024-12-30