

血管性痴呆动物模型制作方法的改良

黄文革¹, 郭芬芬¹, 刘慰华¹, 陈凤英¹, 张健¹, 刘本胜², 黄河清¹

(1. 中山大学实验动物中心, 广州 510080; 2. 广东同江医院, 佛山 528300)

【摘要】 目的对大鼠血管性痴呆双侧颈总动脉永久性结扎模型(permanent bilateral common carotid artery occlusion 2VO)进行改良,以提高模型动物存活率。方法 采取改良造模方法(间隔7d分2次结扎双侧颈总动脉)和传统的2VO方法(同时结扎双侧颈总动脉)建立血管性痴呆模型,观察并比较2种方法大鼠的存活率、学习记忆能力改变及病理形态学变化。结果 术后7d,改良模型组动物存活率(86.7%)明显高于传统模型组(40.0%)($P < 0.05$)。术后8w与12w,与假手术组比较,两种方法模型组逃避潜伏期均明显延长($P < 0.05$),而改良法与传统法造模组之间相比较无显著性差异。HE染色显示:改良法与传统法造模组的大鼠海马区神经元有相似程度的明显变性、坏死和凋亡。结论 2VO改良造模法是降低大鼠血管性痴呆模型动物死亡率的成功方法,值得进一步研究、推广。

【关键词】 模型; 动物; 血管性痴呆; 颈总动脉; Morris水迷宫

【中图分类号】R332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2011)05-0049-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2011.05.012

Improvement of Vascular Dementia Model in Rats

HUANG Wen-ge¹, GUO Fen-fen¹, LIU Wei-hua¹, CHEN Feng-ying¹, ZHANG Jian¹,
LIU Ben-sheng², HUANG He-qing¹

(1. Experimental Animal Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Guang Dong Tong Jiang Hospital, Foshan 528300, China)

【Abstract】 Objective To Modify the permanent bilateral common carotid artery (CCA) occlusion (2VO) for vascular dementia (VD) rats model, in order to increase the survival rate of model animals. **Methods** Vascular dementia was established by the modified 2VO method (ligate unilateral CCA at first, ligate another one 7 days later) and the traditional 2VO method, respectively, and compared the differences of the two kind of methods in survival rates of rats, learning and memory ability and pathological morphology. **Results** One week after the operations, the survival rate of modified model group animal (86.7%) was obviously higher than traditional model group (40.0%, $P < 0.05$). Morris water maze test results showed that memory abilities in both modified and traditional model group were decreased obviously compared with the sham operation group ($P < 0.05$), and there was no significant difference between modified model group and traditional model group. The neurons in hippocampus in modified and traditional model rats were all shown significant degeneration, necrosis and apoptosis. **Conclusion** The modified 2VO method is an ideal way to establish rat model of VD.

【Key words】 Model, animal; Vascular dementia; Common carotid artery; Morris water maze

[作者简介] 黄文革(1966-),女,主管技师,研究方向:动物实验与管理;E-mail: huangwg@mail.sysu.edu.cn.

[通讯作者] 黄河清(1965-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药心血管及糖尿病药理学;E-mail: huangheq@mail.sysu.edu.cn.

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是由多次脑卒中或长期慢性脑缺血所致的大脑皮层获得性高级功能进行性衰退性疾病。随着我国人口老龄化, VD 患者也逐渐增多。建立一个有效的 VD 动物模型, 对探究 VD 的病因、发病机制及筛选防治药物都有很大的帮助。双侧颈总动脉持久性结扎法 (permanent bilateral common carotid artery occlusion, 2VO) 是目前国内外流行的 VD 动物模型制作方法, 其优点是操作简便, 大鼠学习记忆能力降低显著, 而无神经功能缺损症状^[1]。但传统 2VO 方法对双侧颈总动脉 (common carotid arteries, CCA) 同时进行结扎, 对动物打击过大, 动物死亡率高^[2], 从而导致实验费用增加、实验周期延长。为了降低 2VO 造模法制作的血管性痴呆模型动物的死亡率, 本实验对传统方法进行了改良, 采用分次结扎双侧 CCA 制作血管性痴呆大鼠模型, 即第一次仅结扎一侧 CCA, 一周后结扎另一侧, 观察术后动物死亡率、大鼠学习记忆能力改变及其对海马区病理形态学的影响。

1 材料和方法

1.1 动物选择与分组

选用广东省医学实验动物中心提供的健康 SD 大鼠 50 只, 雄性, 250 ~ 300 g, SPF 级, 实验动物质量合格证明编号: 0055433, 饲养于中山大学实验动物中心屏障环境中, 动物实验设施使用证明编号: 0042618。动物经适应性喂养一周后采用 Morris 水迷宫定位航行实验进行筛选, 淘汰学习记忆能力差的大鼠。将合格大鼠采用随机数字表法随机分为传统法模型组 ($n = 15$)、改良法模型组 ($n = 15$)、假手术组 ($n = 10$)。

1.2 VD 模型的制作

传统法模型组: 两侧 CCA 在同一时间进行永久性结扎。大鼠术前 12 h 禁食, 不禁水, 用 10% 水合氯醛 (350 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉大鼠, 仰卧位固定于手术台上, 颈前部手术区域去毛, 碘酒消毒, 于颈部正中切开皮肤及皮下组织, 取颈前正中切口, 钝性分离皮下结缔组织、颈前肌群, 仔细分离暴露左、右两侧 CCA, 以“0”号丝线结扎双侧 CCA 的近端及远端, 并从中间剪断, 以彻底阻断 CCA 血流。最后逐层缝合皮下结缔组织、皮肤。改良法模型组: 第一次仅结扎、剪断一侧 CCA, 一周后对另一侧

CCA 结扎、剪断, 手术操作步骤同传统模型组。假手术组: 大鼠仅做颈前切口, 分离、暴露双侧 CCA, 不结扎也不剪断 CCA。术后各组大鼠均在屏障环境中继续饲养、观察。

1.3 观察指标

1.3.1 术后 7 d 的存活率:

记录各组大鼠 7 d 内的死亡情况, 计算存活率。

1.3.2 学习记忆能力检测指标:

各组大鼠分别于术后 8 周、12 周进行 Morris 水迷宫 (morris water maze, MWM) 定位航行实验检测学习记忆能力。每次实验历时 5 d, 每天分上午、下午两个训练时间段, 每段训练 4 次。记录第 5 d 其在 180 s 内寻找到并爬上平台的时间, 即逃避潜伏期。若大鼠在 180 s 内未找到平台, 则逃避潜伏期记录为 180 s。

1.3.3 取材与组织学检查:

用 10% 水合氯醛 (350 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉大鼠后, 快速开胸暴露心脏, 将灌注针头插入心尖, 剪开右心耳使静脉血完全放出, 而后夹闭腹主动脉, 只灌注头部、胸部及前肢。先灌注生理盐水约 100 mL, 再用 4% 多聚甲醛 100 mL 进行灌注。断头, 暴露颅骨, 用弯钳仔细剔除颅骨, 取下大脑, 将脑置于 4% 多聚甲醛固定液中浸置 4 ~ 6 h (4℃), 而后取视交叉后 2 ~ 6 mm 至小脑前含海马区的脑组织用 PBS 漂洗, 经常规脱水、透明后, 浸蜡包埋, 蜡块 5 μm 连续切片。常规 HE 染色。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理。所有数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 χ^2 检验比较传统法模型组与改良法模型组的存活率; 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较各组大鼠的学习记忆能力, 两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后 7 d 的存活率

术后 7d, 传统法模型组 ($n = 15$) 存活 6 只, 改良法模型组 ($n = 15$) 存活 13 只, 假手术组 ($n = 10$) 存活 10 只; 改良法模型组动物存活率 (86.7%) 明显高于传统法模型组 (40.0%) ($P < 0.05$)。各组存活率见表 1。

表 1 各组大鼠存活率比较
Tab.1 Comparison of survival rate of rats

组别 Group	动物数 Animal (n)	死亡数 Death (n)	存活数 Survival (n)	存活率 Survival rate (%)	死亡率 Mortality rate (%)
传统模型组 Traditional group	15	9	6	40	60
改良模型组 Modified group	15	2	13	86.7*	13.3*
假手术组 Sham group	10	0	10	100	

注: * 与传统法模型组比较, $P < 0.05$

Note * Compared with the traditional group, $P < 0.05$

2.2 学习记忆能力检测结果

各组大鼠术后 8 w、12 w 水迷宫逃避潜伏期结果见表 2。随着术后周数的增加, 各组大鼠的逃避潜伏期均延长。在 8 w 和 12 w, 与假手术组相比较, 传统法模型组与改良法模型组逃避潜伏期均显著性延长 ($P < 0.05$), 而改良法模型组与传统法模型组之间比较无显著性差异。

表 2 各组大鼠术后 8 周、12 周逃避潜伏期比较

Tab.2 Escape latency of rats after operation
8 weeks and 12 weeks

组别 Group	例数 N	术后 8 W After 8 W	术后 12 W After 12 W
传统模型组 Traditional group	6	26.16 ± 11.95#	30.46 ± 16.11#
改良模型组 Modified group	13	21.76 ± 9.16#	30.38 ± 16.82#
假手术组 Sham group	10	8.93 ± 2.69	15.33 ± 6.74

注: # 与假手术组比较, $P < 0.05$

Note: # Compared with sham group, $P < 0.05$

2.3 大鼠病理形态学结果

HE 染色后, 光镜下可见假手术组大鼠海马区神经元排列整齐、密集, 细胞完整, 结构正常, 胞浆丰富, 胶质细胞无增生; 细胞核呈圆形、椭圆形, 无变性、无固缩或溶解现象。传统法模型组与改良法模型组大鼠海马区神经元排列紊乱, 神经元变性, 体积变小, 胞核与胞浆界限不清, 核固缩成三角形或不规则形 (见彩插 4 图 1)。

3 讨论

3.1 两种方法存活率的比较和分析

双侧颈总动脉永久性结扎模型是血管性痴呆研究中常用的动物模型之一, 但存活率较低。王兴华^[2]等曾报道 2VO 术后大鼠存活率为 25%, 本实验中传统 2VO 术后 7 d 内大鼠存活率为 40%。传统 2VO 方法存活率较低的主要原因可能是大鼠两侧 CCA 同时结扎, 椎动脉不能迅速有效地代偿, 以致脑缺血过重, 大脑能量供给严重不足, 大鼠不易苏醒而引起死亡。本实验分次结扎 CCA 改良法

后大鼠存活率高达 86.7%, 改良法术后动物存活率增加的原因可能与分次结扎两侧 CCA, 可使椎动脉逐步代偿, 有利于脑部血流重新分配, 机体逐渐代偿适应有关。我们认为虽然二者制作血管性痴呆模型的分子机制相似, 均与脑血管损害脑细胞缺血缺氧有关^[3], 但是改良法引入代偿机制, 提高了动物成模率和存活率, 体现了它不同于传统法的优势之处, 值得进一步研究, 在以后的研究工作中需要增加实验大鼠数量, 重复验证本改良法的可靠性和稳定性。

3.2 学习记忆能力检测结果的评价

Morris 水迷宫是目前评价动物记忆能力最常用的实验装置, 主要包括定位航行实验与空间搜索实验。其中定位航行实验通过记录大鼠每次的逃避潜伏期 (从入水到爬上平台的时间) 来反映动物对平台空间位置的记忆能力。逃避潜伏期越短则说明动物记忆能力越好^[4]。本实验中, 在术后 8 周与 12 周时, 传统法模型组大鼠逃避潜伏期与假手术组大鼠比较均显著延长, 与 évelin Vicente^[5]等报道相符。改良法模型组大鼠逃避潜伏期与假手术组大鼠比较亦显著延长, 且与传统法模型组无显著差异, 表明与传统法相似, 大鼠表现出学习记忆能力的损害, 分次结扎 CCA 改良法同样成功制备 VD 大鼠模型。

3.3 HE 染色病理形态评价

本实验 HE 染色结果显示, 假手术组大鼠大脑海马区未见明显的病理改变; 传统法模型组海马区大量细胞呈现明显的变性、坏死及凋亡特征, 与 Anastasia P. Arvanitidis^[6]等报道一致。改良法模型组与传统法模型组相比较呈现相似的病理学改变, 表明分次结扎改良法所制备的 VD 大鼠模型与传统 2VO 法一样, 可对大鼠大脑海马等记忆结构区造成明显损害, 导致其学习记忆能力下降, Morris 水迷宫结果也验证了这一点。

综上所述, 从 Morris 水迷宫测试学习记忆能力与病理形态学方面来看, 分次结扎双侧颈总动脉改

良法与传统 2VO 法一样可使大鼠海马等智能相关脑区造成严重受损,进而导致学习记忆能力显著下降,可成功制备血管性痴呆动物模型。优于传统 2VO 法的是,分次结扎 CCA 改良法可显著提高术后动物的存活率,降低实验成本,而且本改良法也更接近临床 VD 多次脑卒中后的发病过程。因此,分次结扎双侧颈总动脉改良法制备血管性痴呆动物模型值得进一步研究、推广。

参考文献:

- [1] Ryo Ohtani,Hidekazu Tomimoto, Tadakazu Kondo, et al. Upregulation of ceramide and its regulating mechanism in a rat model of chronic cerebral ischemia [J]. Brain Research. 2004, 1023(1):31-40.
- [2] 王兴华,李露斯.两种大鼠 2VO 模型制作方法的比较 [J]. 第三军医大学学报 2002. 24(12):1496.
- [3] 赵静,肖蓉,赫坚.血管性痴呆的分子机制 [J]. 医学分子生物学杂志 2005, 2(4):317-320.
- [4] 胡镜清,温泽淮,赖世隆. Morris 水迷宫检测的记忆属性与方法学初探 [J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2):117-119.
- [5] évelin Vicente, Daniel Degerone, Liana Bohn, et al. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat [J]. Brain Research 2009, 1251:204-212.
- [6] Anastasia P. Arvanitidis, Dale Corbett, and Frederick Colbourne, et al. A high fat diet does not exacerbate CA1 injury and cognitive deficits following global ischemia in rats [J]. Brain Research, 2009, 1252: 192-200.

(修回日期)2010-10-12

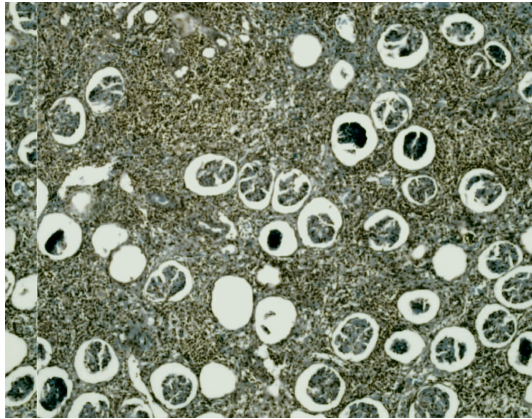


图 1 术后 3 周病理改变(HE)

Fig. 1 Pathology of renal allograft at week 3 (HE)

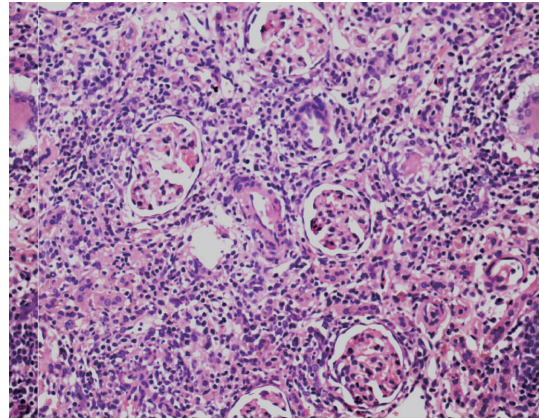


图 2 术后 6 周病理改变(HE)

Fig. 2 Pathology of renal allograft at week 6 (HE)

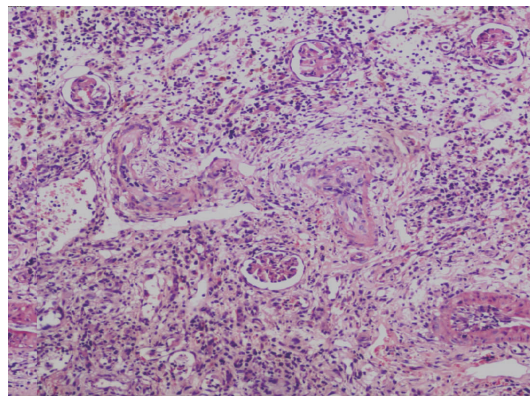
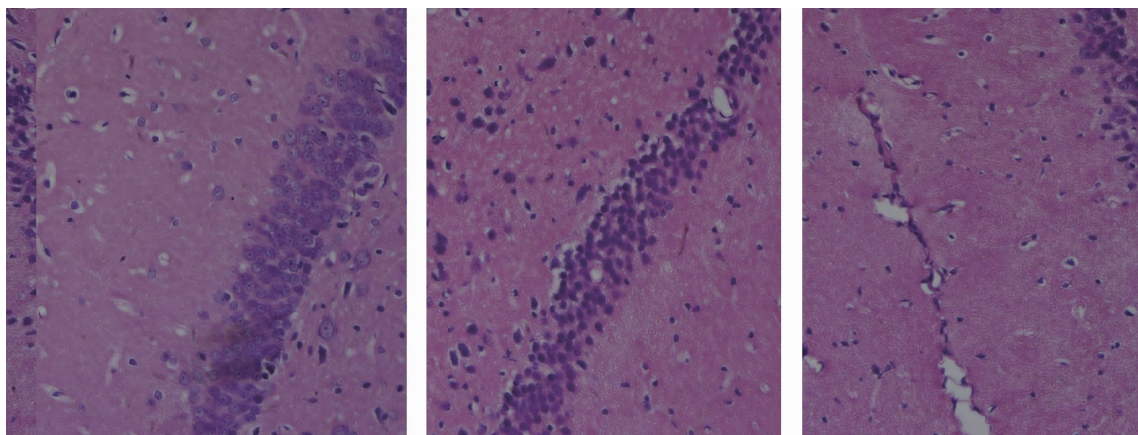


图 3 术后 9 周病理改变(HE)

Fig. 3 Pathology of renal allograft at week 9 (HE)



假手术组
Sham group

传统法模型
Traditional group

改良法模型组
Modified group

图 1 大鼠海马区病理改变(HE)

Fig. 1 Pathological changes in rat hippocampus (HE)