论著

文章编号:1000-5404(2006)19-1976-03

局灶性脑缺血再灌注认知功能变化的实验研究

柳春雨[1],陈康宁[1],段 炜[1],刘国军[1],郑 霖[2] ([1]第三军医大学西南医院:[1]神经内科,[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察不同时相缺血再灌注的大脑中动脉闭塞大鼠模型认知功能的变化。**方法** 36只SD大鼠,雌雄各半,分为假手术组、缺血30 min再灌注组、缺血90 min再灌注组。采用Longa线栓法制成年SD大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。通过观察大鼠神经行为学评分、术后14 d红四氮唑(TTC)染色、水迷宫及听觉事件相关电位(P300)对认知功能的变化进行研究。**结果** 缺血30 min再灌注组、缺血90 min再灌注组大鼠神经行为学评分都在2分以上。大鼠术后第14天,TTC染色的结果显示2组缺血再灌注组大鼠的脑组织均有梗死灶。在定位航行实验、空间探索实验和听觉事件相关电位(P300)中,缺血90 min再灌注组大鼠和假手术组、缺血30 min再灌注组大鼠都存在明显差异($P<0.01$)。**结论** 局灶性脑缺血再灌注大鼠的认知功能下降并随缺血时间的不同呈正相关改变。

关键词:大鼠;缺血再灌注,大脑中动脉;认知

中图法分类号:R338.6;R651.12;R743.31 **文献标识码**:A

Cognition alteration of rats after focal cerebral ischemia-reperfusion injury

LIU Chun-yu[1], CHEN Kang-ning[1], DUAN Wei[1], LIU Guo-jun[1], ZHENG Ji[2] ([1]Department of Neurology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of cognition ability of the middle cerebral artery occlusion (MCAO) rats, following varied lengths of cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** Totally 36 SD rats (female or male) were randomly and equally divided into 3 groups, the sham group, the ischemia 30 min group and the ischemia 90 min group. The model of MCAO was made by occluding the MCA with thread according to Longa's method. Behavioral assessment was evaluated by neurological test. Brain tissue damage was detected in the ischemia animals 14 d after the surgery by triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining. Cognition ability was determined by Morris-maze test and P300 test. **Results** The score of neurological test were both over 2 points of ischemia groups of 30 min and 90 min. And both groups had infarct areas by TTC staining. The results of Morris-maze test and P300 test showed that the ischemia 90 min group were improved significantly in comparison with sham group and the ischemia 30 min group ($P<0.01$). **Conclusion** Focal cerebral ischemia can result in the cognitive impairment, which is worse along with the extension of ischemic period.

Key words: rats; ischemic-reperfusion; middle cerebral artery; cognition

缺血性脑血管病是一种严重危害人类健康的疾病,缺血性脑血管病导致的偏瘫及认知功能障碍成为影响人类生存质量的最大障碍。临床上大脑中动脉闭塞导致的脑梗塞占了缺血性脑血管病的绝大部分。既往人们往往只重视大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)导致的神经功能(如偏瘫等)障碍,而对MCAO后认知改变关注较少。我们选择Longa等法改良复制MCAO模型动物,观察MCAO导致的认知改变,为临床大脑中动脉闭塞(血栓形成或栓塞)导致的认知功能改变的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

36只SD大鼠,雌雄各半(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),体质量200~300 g,分为假手术组、缺血30 min再灌注组、缺血90 min再灌注组,每组大鼠12只。

作者简介:柳春雨(1977-),女,河北省张家口市人,硕士,医师,主要从事血管性痴呆的发病机制和临床治疗方面的研究。电话:(023)65398613,E-mail:lcymart@sohu.com

通讯作者:陈康宁,电话:(023)68765253, E-mail:ckn_640827@126.com

收稿日期:2005-10-25;**修回日期**:2006-03-22

1.2　栓塞线制备

采用日本吉田株式会社生产的鱼线，直径 0.240 mm。把鱼线剪成 30 mm，一端加热成钝形。用黑色油性标记笔分别在栓塞线的两端、10 mm 处、15 mm 处及 18 mm 处标记，以便穿线操作时观察线栓的方向及长度。紫外线消毒备用。

1.3　模型制作

采用 Zea Longa 等法改良复制 MCAO 模型动物。大鼠 10% 水合氯醛腹腔注射（1 g/kg）麻醉后，将其仰卧固定。分离左颈总动脉（common carotid artery，CCA）、颈内动脉（internal carotid artery，ICA）及颈外动脉（external carotid artery，ECA），电凝其分支枕动脉和甲状腺上动脉，并挂线备用，在 ECA 远心端结扎，用动脉夹夹闭 ICA 远心端及 CCA 后凝断 ECA，于 ECA 结扎部位下端距 ICA 分叉处 3～4 mm 剪一切口插入线栓线插入 ICA 后，于入口处稍稍结扎缝合线，然后松开夹闭 ICA 的动脉夹，继续插入线栓至稍有阻力，至线插入深度为 20 mm 左右，实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血。再次结扎入口处线栓外留约 1 cm，缝合皮肤。于 30 min 及 90 min 后轻轻提拉所留线头至有阻力，实现大脑中动脉再灌，则造模完成。假手术组只游离 CCA、ECA 与 ICA。

1.4　神经行为学

1.4.1　神经行为学检查　　神经学缺失在大鼠清醒后观察。3 组大鼠抽取 6 只，神经学检查标准按照 Longa 提出的标准进行评分：0 分为正常；1 分为栓塞动脉对侧上肢不能完全伸展，而同侧上肢正常；2 分为栓塞动脉对侧上肢屈曲，向对侧推时抵抗力下降，没有旋转；3 分为栓塞动脉对侧上肢屈曲向对侧推时抵抗力下降，行走时向对侧有轻度旋转；4 分表现为行走时向对侧有严重旋转；5 分为大鼠身体向梗死对侧倒[1]。剔除有严重神经功能缺损造模动物，经评分符合入选标准者行 Morris 水迷宫实验。

1.4.2　Morris 水迷宫实验　　测试内容包括：①定位航行实验（place navigation test，PNT）：用于测量大鼠对水迷宫学习能力。实验历时 5 d，第 1 天让大鼠自由泳 2 min，以后每天分上午，下午 2 段，每段训练 4 次，训练时将大鼠面向池壁分别从 4 个不同入水点放入，记录其在 2 min 内寻找到平台的时间（逃避潜伏期，escape latency，EL）和游泳路径。如果大鼠在 2 min 未找到平台，潜伏期记为 120 s，并将其引至平台上，让大鼠停留 10 s，再放回笼中。②空间探索实验（spatial probe test，SPT）：用于测量大鼠学会寻找平台后对平台空间位置记忆的能力，即在第 6 天的第 5 次训练时撤除平台，然后任选 1 个入水点将大鼠面向池壁放入水中，记录 2 min 内大鼠在池中的游泳轨迹，分析各组大鼠在原平台象限游泳距离和总游泳距离之比（dP/dT）及平台象限游泳时间和总游泳时间之比（tP/tT）。

1.5　听觉事件相关电位（P300）

按照文献[2]的方法记录 P300 潜伏期。

1.6　红四氮唑染色（TTC 染色）

大鼠手术后第 14 天，3 组分别抽取 6 只大鼠，大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛过量（1 g/kg）麻醉，立即断头取脑，以尾状核为中心前后约 1.5 mm 处冠状切 2 mm 厚的脑片，放入 2% TTC 溶液中 37 ℃避光孵育 30 min，4% 多聚甲醛固定保存，以备拍照。

1.7　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

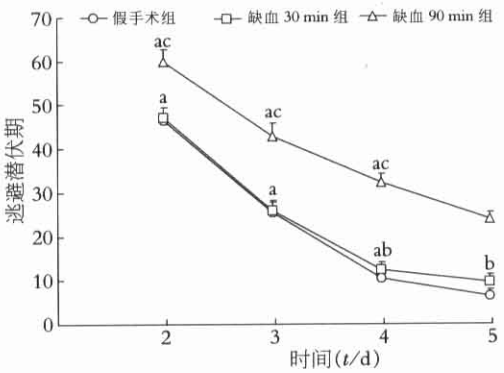
2　结果

2.1　神经行为学

2.1.1　神经行为学检查　　两脑缺血组大鼠麻醉清醒后均表现不同程度的局灶性神经功能障碍，表现为右下肢无力、伸直行走时向右侧转圈，严重时向右侧倾倒；提尾时表现为右侧前肢屈曲、内收，后肢伸直并向右侧旋转。各大鼠神经行为学评分都在 2 分以上。

2.1.2　Morris 水迷宫实验

2.1.2.1　大鼠 4 d 的逃避潜伏期观察结果　　大鼠第 2～4 天在水迷宫中的学习情况见图 1。结果第 2、3、4 天缺血 90 min 再灌注组大鼠和假手术组、缺血 30 min 再灌注组大鼠找到平台的时间存在明显差异（$P<0.01$）；缺血 30 min 再灌注组与假手术组在第 2、3 天无明显差异（$P>0.05$），但在第 4 天和第 5 天与假手术组存在显著性差异（$P<0.05$）。



a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与假手术组比较；c：$P<0.01$，与缺血 30 min 组比较

图 1　缺血再灌注大鼠逃避潜伏期变化（$n=6$）

2.1.2.2　撤除平台后各组动物游泳路径图　　图 2 显示，缺血 90 min 再灌注组大鼠在撤除平台后在水迷宫中运动轨迹在 4 个象限均分布，而假手术组大鼠运动轨迹主要集中在原平台象限。缺血 30 min 再灌注组大鼠运动轨迹介于二者之间。

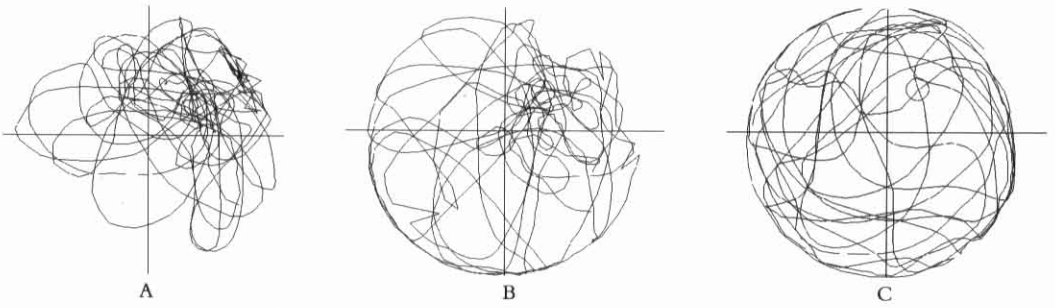
2.1.2.3　大鼠空间探索实验　　tP/tT 和 dP/dT 结果见表 1。缺血 90 min 再灌注组两种比值均显著小于假手术组和缺血 30 min 再灌注组（$P<0.05$，$P<0.01$）；缺血 30 min 再灌注组显著小于假手术组（$P<0.05$）。

2.2　P300 潜伏期

P300 测试结果显示：假手术组（250 ± 12.71），缺血 30 min 再灌注组（335.33 ± 17.61），缺血 90 min 再灌注组（389.33 ± 12.06）。三者之间均存在明显差异（$P<0.01$）。

2.3　TTC 染色的结果

大鼠术后第 14 天，TTC 染色的结果显示两缺血再灌注组大鼠的脑组织均有梗死灶，假手术组没有梗死灶。



A：假手术组；B：缺血30 min组；C：缺血90 min组

图2 撤除平台后大鼠游泳轨迹图

表1 大鼠空间探索实验结果($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

组别	tP/tT	dP/dT
假手术组	54.12±3.48	56.01±6.47
缺血30 min组	45.31±7.51[a]	45.51±8.52[a]
缺血90 min组	36.16±5.62[bc]	36.14±4.78[bc]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与假手术组比较；c：$P<0.05$，与缺血30 min组比较

3 讨论

本实验通过改良线栓法制做MCAO大鼠模型，即在手术当中不结扎PPA。我们在术后第14天处死大鼠进行脑组织TTC染色显示了较大脑梗死的面积，梗死灶的存在证实了此改良法可以制成切实可靠的实验模型。

大脑的认知功能包括感觉、知觉、记忆、想象、思维和语言等。认知功能障碍是脑损伤患者最常见的表现之一[3]。研究表明，认知障碍对日常生活活动能力的影响有时远远超过躯体功能障碍，不但影响患者的社会适应能力，而且给家庭和社会造成沉重的负担，既往人们只关注MCAO后神经功能的变化，而很少关注其认知功能的改变。我们通过观察临床常见MCAO患者认知功能的变化，结果显示MCAO可以导致严重的认知功能障碍。Sachdev等[4]通过研究也证实了伴有或不伴有痴呆的缺血性脑血管病患者有认知功能的下降。我们通过动物实验观察，结果显示大鼠逃避潜伏期脑缺血组潜伏期显著延长，动物游迷宫形式是远离平台围绕周边。空间探索实验中缺血组大鼠的原平台象限时间和路径与总时间和总路径比值明显低于假手术组。这一变化反映了大鼠在MCAO后认知功能下降，并且随着缺血时间的延长，这一改变更加显著。

P300是一种认知事件相关电位(event2related potentials，ERP)，被认为是指明刺激过程中认知和记忆功能的"索引"，已广泛应用于神经心理认知功能障碍的研究。以往一些研究结果表明ERP可鉴别皮层下和皮层性痴呆，P300潜伏期可区分痴呆患者和抑郁相关的假性痴呆患者。还有报道用于鉴别早期阿尔茨海默病患者和正常人。P300潜伏期反映了概念性的知识，如言语抽象、概括、理解能力、语义记忆、长时记忆等方面的认知功能[5]。潜伏期越短，认知行为越好。P300潜伏期延长，反映了认知功能障碍[6]。本实验应用P300来测试大鼠MCAO后认知功能的改变，结果表明两缺血组大鼠P300潜伏期明显比假手术组延长，从而证明MCAO后大鼠认知功能下降。

综上实验结果表明在大脑中动脉闭塞后，确实存在着认知功能的下降，并且随着缺血时间的延长，认知损害更严重。

参考文献：

[1] DING Y, ZHOU Y, LAI Q, *et al*. Impaired motor activity and motor learning function in rat with middle cerebral artery occlusion [J]. Behav Brain Res, 2002, 132(1): 29-36.

[2] 黄 敬,余善纯,包 敏, 等. 慢性低灌注大鼠P300的变化与记忆功能[J]. 中国临床康复,2003,7(19): 2654-2655,封3.

[3] MULLER S V, HILDEBRANDT H, SACHSENHEIMER W. Analysis of the need for clinical neuropsychology in inpatient neurological rehabilitation (phases C and D)—an empirical study of 788 patients[J]. Rehabilitation (Stuttg), 2000, 39(1): 17-25.

[4] SACHDEV P S, BRODATY H, VALENZUELA M J, *et al*. Progression of cognitive impairment in stroke patients[J]. Neurology, 2004, 63(9): 1618-1623.

[5] PORTIN R, KOVALA T, POLO-KANTOLA P, *et al*. Does P3 reflect attentional or memory performances, or cognition more generally? [J]. Scand J Psychol, 2000, 41(1): 31-40.

[6] RUSHBY J A, BARRY R J, JOHNSTONE S S. Event-related potential correlates of serial-position effects during an elaborative memory test [J]. Int J Psychophysiol, 2002, 46: 13-27.

(编辑 龙 亮)