文章编号:1000-5404(2009)09-0813-05

论著

小鼠慢性脑血流低灌注状态的行为学检测及病理学观察

段 炜,郑 健,桂 莉,田 洪 (第三军医大学新桥医院神经内科,重庆 400037)

摘 要:目的 观察小鼠慢性脑血流低灌注状态下行为学及其病理学变化。**方法** 62只C57BL/6小鼠均分为模型组和假手术组。模型组:采用内径为0.18 mm的微型弹簧圈套C57BL/6小鼠双侧颈总动脉,造成血管狭窄导致全脑血流低灌注状态;假手术组:仅暴露双侧颈总动脉,不圈套微型弹簧。在成模30 d时两组各取8只小鼠,采用八臂迷宫实验检测小鼠认知功能的改变,并在成模7、14 d和30 d时分别处死动物,采用Kluver-Barrera染色观察神经纤维改变及免疫组化观察胶质细胞增生程度,同时用Evans Blue荧光观察血脑屏障通透性的变化。**结果** 建模30 d后模型组八臂迷宫实验工作记忆错误显著多于假手术组($P<0.05$)。在成模7 d时未见显著病理变化,在14、30 d时观察到模型组脑白质区域神经纤维稀疏[胼胝体神经纤维损伤分级分别为(1.13±0.05)和(1.96±0.08),$P<0.05$],星形胶质细胞和小胶质细胞显著增生[胼胝体星型胶质细胞计数分别为(104.52±12.31)和(192.57±24.23),小胶质细胞计数分别为(98.25±15.27)和(172.36±18.29),$P<0.01$],Evans Blue荧光观察到脑内微血管血液成分外渗。**结论** 慢性脑血流低灌注状态导致小鼠的认知功能下降、胼胝体等白质神经纤维稀疏及胶质细胞增生。

关键词: 慢性脑血流低灌注;脑白质疏松;认知功能障碍;小鼠
中图法分类号: R-332; R363; R743.02 **文献标识码:** A

Behavioral and pathologic changes of chronic cerebral hypoperfusion in mice

DUAN Wei, ZHENG Jian, GUI Li, TIAN Hong (Department of Neurology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe behavioral characteristics and pathologic changes of chronic cerebral hypoperfusion in mice. Methods Totally 62 adult C57BL/6 mice were subjected to either sham-operation ($n=31$) or bilateral common carotid artery stenosis using external microcoils with an inner diameter of 0.18 mm($n=31$). At 30 d after the stenosis, the animals of the 2 groups (8 mice for each group) underwent behavioral test of 8-arm radial maze. In 7, 14 and 30 d, the rest mice were sacrificed for their brain tissue samples which were examined with Kluver-Barrera staining and immunohistochemical assay for markers of microglia and astroglia, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and CD11b. In 14 d after the model establishment, Evans blue dye extravasation test was performed for the blood-brain barrier function. Results The model group made significantly more errors than sham-operated group in 8-arm radial maze test at 30 d after the surgery. White matter lesions occurred and the proliferation of activated microglia and astroglia were observed in white matter in model mice after 14 and 30 d bilateral common carotid artery stenosis. The disruption of blood-brain barrier function of model mice was indicated in the evans blue extravasation test at 14 d after bilateral common carotid artery stenosis. Conclusion Cognitive impairment, white matter lesions and glial activation are successfully induced after bilateral common carotid artery stenosis in mice model of chronic cerebral hypoperfusion.

Key words: chronic cerebral hypoperfusion; leukoaraiosis; cognitive impairment; mice

供应脑的大血管狭窄或脑内广泛小血管病变导致的慢性脑血流低灌注,是脑白质疏松的常见病因,也是发生在中老年人血管性认知功能损害的主要病理类型之一[1,2],对其有效的预防和治疗有重要的临床意义。但目前对慢性脑血流低灌注造成的脑损伤的病理机制尚未完全澄清,临床治疗效果也尚不理想,有待进一步研究。

既往研究中常用大鼠和沙土鼠双侧颈总动脉结扎或缩窄造成的前脑慢性缺血模型[3,4]。众多研究已发现慢性脑血流低灌注后出现皮质下白质神经纤维疏松,胶质细胞增生[5],但其病理机制有待于进一步阐

作者简介:段 炜,女,山西省侯马市人,博士研究生,主要从事慢性脑血流低灌注所致脑损伤方面的研究。电话:(023)68755613,E-mail:cqweiduan@yahoo.com.cn
通信作者:郑 健,电话:(023)68755613,E-mail:jzheng@hotmail.com
收稿日期:2008-10-18;修回日期:2008-12-07

明,并且上述2种动物模型死亡率较高,病理改变个体差异较大。C57BL/6小鼠由于其自身脑血管解剖结构和后循环发育不良或缺如,极适合制作慢性脑血流低灌注模型。本实验采用C57BL/6小鼠建立慢性全脑血流低灌注模型,观察建模后认知功能变化及其组织病理学改变,有助于慢性脑血流低灌注状态导致的脑损伤病理机制的深入研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6小鼠62只,雄性,8~9周龄,体质量22~27 g,购于第三军医大学实验动物中心[许可证号:SCXK(渝)20020002]。运用简单随机法分为2组:模型组和假手术组,每组31只,置于24~25 ℃室温中喂养。

1.2 主要仪器

体视显微镜、冰冻切片机(Leica)、Olimpus荧光显微镜、微型弹簧(日本Sawane Spring公司,弹簧内径0.18 mm,螺距0.5 mm,全长2.5 mm)。

1.3 方法

1.3.1 模型制作 小鼠用1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,仰卧固定。颈正中去毛消毒后,行正中切口,在体视显微镜下分离肌肉并游离双侧颈总动脉,在右侧颈总动脉近、远心端分别穿过2条4-0尼龙线,用止血钳将2条尼龙线悬空并放置在微型弹簧的弹簧圈内,然后小心地将弹簧圈套在颈总动脉上,30 min后,用相同的方法将弹簧套在左侧颈总动脉上,缝合皮肤并消毒。假手术组仅暴露双侧颈总动脉并未圈套微型弹簧,其余处理均同模型组。术中维持小鼠肛温在36.5~37.5 ℃。术后监测小鼠体质量。

实验共分为2部分:模型小鼠($n=8$)和假手术小鼠($n=8$),30 d进行八臂迷宫行为学检测;另一部分模型小鼠($n=23$)手术前及术后和假手术小鼠($n=23$),分别在手术后7、14、30 d进行病理组织学观察及检测血脑屏障通透性。

1.3.2 八臂迷宫实验 手术前及术后30 d分别进行八臂迷宫实验,实验共10 d。在实验前限制饮食,使小鼠体质量维持在自由进食体质量的80%~85%。采用放射状八臂迷宫。迷宫中央区直径30 cm,向四周等角度、等长度延伸八条臂,臂末端放有食物,整个迷宫高出地面40 cm。训练前小鼠先在迷宫内适应2 d,每天1次,小鼠可自由活动和摄取食物。随后进行每天1次训练,共10 d。每次训练时均设置八臂中只有4臂(1、3、4、7臂)放有食物,为工作臂,余为参考臂。小鼠放在迷宫中央区,15 s后将四周小门打开,小鼠可选择任意1臂摄取食物。小鼠进入工作臂并摄取食物为1次正确,当某工作臂食物已摄取并再次进入同一工作臂时记为工作记忆错误(working memory error, WME),进入未放食物的参考臂为参考记忆错误(reference memory error,RME)。电脑监控并记录每只小鼠每次实验的WME和RME。

1.3.3 病理组织学观察 小鼠用1%戊巴比妥钠(60 mg/kg)麻醉后仰卧固定,经心脏灌注生理盐水,再灌注4%多聚甲醛。断头取脑,经30%蔗糖脱水后-80 ℃保存。脑组织主要取前囟前0.92 mm至前囟后0.86 mm之间区域,观察皮质下白质区域,其中主要比较胼胝体、内囊、视束3个白质区域。

1.3.3.1 Kluver-Barrera染色 恒冷冰冻切片机上切10 μm冰冻切片。0.1%固蓝溶液(Sigma,USA)37 ℃孵育过夜,经0.05%碳酸锂溶液及70%乙醇两步分色直至灰白质颜色明显分开,脱水,透明,封片。脑白质神经纤维损伤程度的分级:0级:正常;1级:神经纤维排列紊乱;2级:显著的空泡形成(神经髓鞘受损);3级:有髓神经纤维缺失(神经纤维轴突受损)[6]。

1.3.3.2 GFAP、CD11b免疫组化 余脑组织做20 μm冰冻切片,0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次,3% H_2O_2孵育10 min,0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次,正常山羊血清封闭30 min,分别4 ℃孵育兔抗小鼠GFAP(1∶30,北京中杉)、大鼠抗小鼠CD11b(1∶50;Serotec),0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次,分别孵育抗兔或抗大鼠的二抗及三抗(S-P 9002, PV6004,北京中杉),最后DAB显色(其中CD11b用硫酸镍胺加强显色)。每组6只小鼠,每只小鼠分别取不同位置相对应的5张切片,观察胼胝体、内囊、视束3个区域,在200倍显微镜下分别在3个区域内任意选取3个0.125 mm^2的区域,计数该区域内的阳性细胞数,计算1张切片平均阳性细胞数目,依次类推计算出每只小鼠、每组小鼠平均阳性细胞数目。

1.3.4 血脑屏障通透性检测 术后14 d小鼠腹腔注射1 ml 4% Evans Blue (Sigma,USA),1 h后1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,经心脏灌注生理盐水,断头取脑,脑组织速冻后做20 μm冰冻切片,荧光显微镜观察。

1.4 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件进行t检验,神经纤维损伤程度分级采用非参数检查(K-W检验)。

2 结果

2.1 小鼠术后一般特征

手术后小鼠自主活动灵活,未见运动功能障碍,未见转圈现象及肢体瘫痪。术后小鼠存活率为88%。2组小鼠术后第1天体质量平均值均为最低[(20.175±1.57)、(18.487±0.85) g],2者均在术后5~10 d开始恢复,30 d后小鼠体质量基本恢复至术前水平,有些小鼠体质量会略高于术前。模型组与假手术组30 d之内小鼠体质量未见明显差异($P>0.05$)。

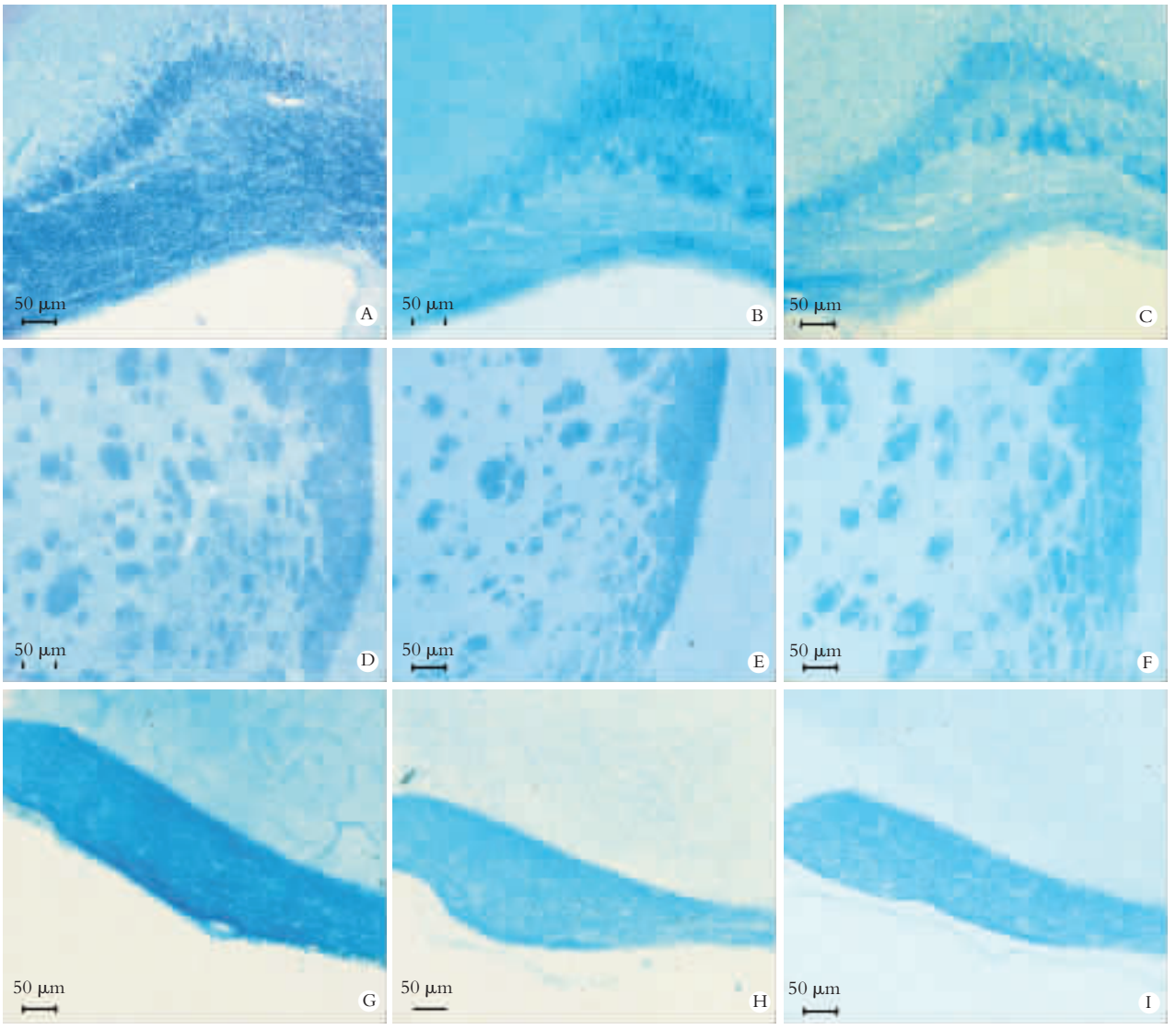
2.2 八臂迷宫实验

在术前和术后30 d时分别进行八臂迷宫实验,实验共持续10 d。每天训练1次。2组术前工作记忆错误无显著变化,但是在术后30 d,模型组的工作记忆错误较假手术组显著增多($P<0.05$),见表1。

表1 模型组与假手术组的工作记忆错误($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	术前	术后30 d
假手术组	2.36±1.97	2.45±1.97
模型组	2.32±1.89	4.10±1.40[a]

a: $P<0.05$,与假手术组比较



A、D、G:假手术组;B、E、H:模型组 14 d;C、F、I:模型组 30 d;A、B、C: 胼胝体;D、E、F:内囊;G、H、I:视束

图 1　模型组与假手术组脑白质区域神经纤维 Kluver-Barrera 染色观察

2.3　脑白质神经纤维髓鞘损伤程度

与假手术组比较,模型组 7 d 时白质区域未见明显病理改变。模型组 14 d 时观察到白质区域神经纤维排列紊乱,30 d 时白质区域神经纤维稀疏,残留神经纤维排列杂乱。均以胼胝体(侧脑室中间部)最为严重,其次是内囊,最轻为视束(图 1)。胼胝体、内囊、视束神经纤维损害程度的分级见表 2。30 d 时胼胝体损害程度接近 2 级,与假手术组比较差异有统计学意义($P<0.05$);视束损害最轻,仅接近 0.5 级。

表 2　模型组与假手术组脑白质不同部位损伤程度($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别		胼胝体	内　囊	视　束
模型组		0.22 ± 0.08	0.18 ± 0.06	0.25 ± 0.09
假手术组	14 d	1.13 ± 0.05[a]	0.42 ± 0.07	0.33 ± 0.08
	30 d	1.96 ± 0.08[a]	0.68 ± 0.03[a]	0.41 ± 0.06

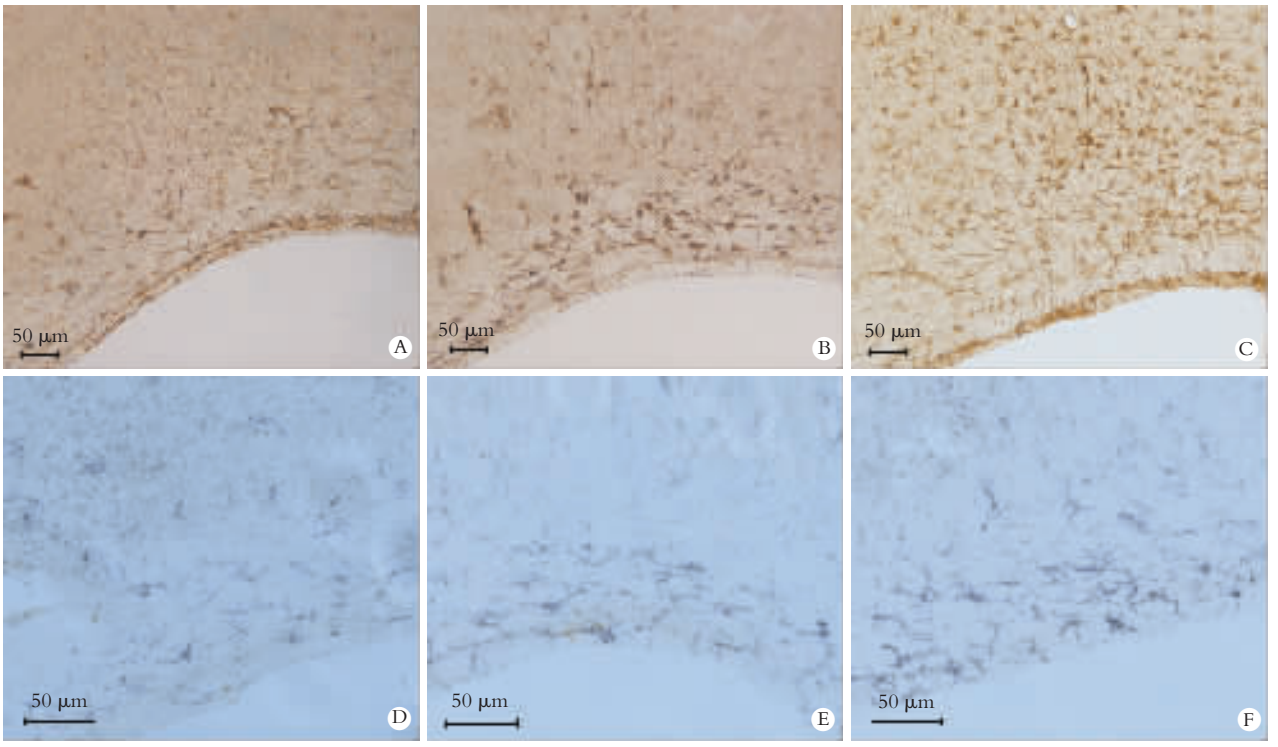
a: $P<0.05$, 与假手术组比较

2.4　脑白质区域胶质细胞增生程度

与假手术组比较,7 d 时模型组白质区域未见明显胶质细胞增生现象。在术后 14、30 d 时模型组白质区域内均可见星型胶质细胞、小胶质细胞数量显著增多,以胼胝体(侧脑室中间部)最为显著。但是小胶质细胞形态无显著变化(图 2)。胼胝体、内囊和视束 3 个区域 0.125 mm^2 内的星型胶质细胞和小胶质细胞的计数见图 3,模型组 14、30 d 时胼胝体、内囊部位星型胶质细胞和小胶质细胞数目与假手术组比较均具有统计学差异($P<0.01$)。

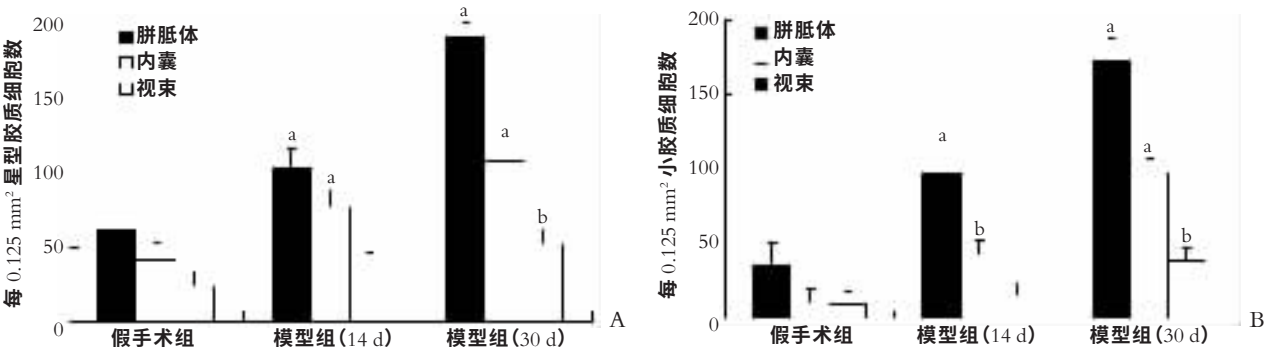
2.5　血脑屏障通透性评价

假手术组胼胝体部位的小血管未见 Evans Blue 向血管壁外渗出,血管呈细线状。模型组可见明显 Evans Blue 向血管壁外渗出现象。见图 4。



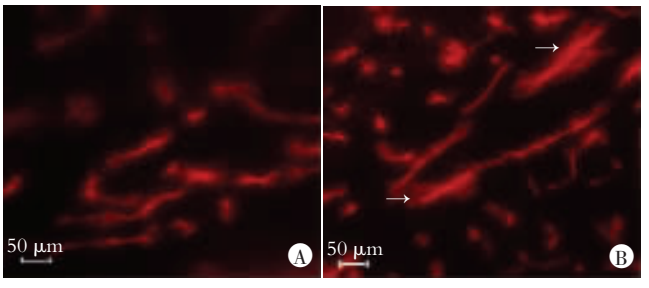
A、B、C:GFAP 染色;D、E、F:CD11b 染色;A、D:假手术组;B、E:模型组 14 d;C、F:模型组 30 d

图 2 模型组与假手术组胼胝体的 GFAP 和 CD11b 免疫组化观察 (S-P)



a: $P<0.01$, b: $P<0.05$,与假手术组比较

图 3 各组脑白质不同部位星型胶质细胞(A)和小胶质细胞(B)计数



A:假手术组;B:模型组 ↑:微血管外渗部位

图 4 小鼠胼胝体部位血脑屏障通透性 (荧光显微镜)

3 讨论

由于脑室周围白质和半卵圆区为皮层长髓支和白质深穿支供血交界区,均为终末动脉,很少或完全没有侧支循环,并经过较长的距离才终止于脑室壁附近,而且血管调节能力差,容易在多种病因的作用下发生缺血/缺氧性损伤[1]。临床研究发现慢性脑血流低灌注的主要病理改变为皮质下白质脱髓鞘样改变,临床主要表现为认知功能损害,大多数是主观记忆力下降,即缺血性白质脑病,是血管性认知损害的主要类型之一[7,8]。目前慢性脑血流低灌注导致的脑损伤的病理机制尚不十分清楚,因此对其病理改变的深入研究具有重要意义。本研究采用 C57BL/6 小鼠成功建立慢性全脑血流低灌注模型,观察其行为学及病理学变化,为缺血性白质脑病防治的深入研究奠定基础。

缺血性白质脑病动物模型的建立是对其深入研究的基础。目前常用大鼠或沙土鼠双侧颈总动脉夹闭或

缩窄模型,但建模过程中动物存活率较低,文献[9]报道为 60%。本实验模型小鼠术后 30 d 存活率为 88%,死亡时间段主要位于 8 ~ 14 d。C57BL/6 小鼠属于近交系小鼠,个体差异小,实验结果稳定性好,是目前基因修饰研究最常用的动物。因此,本研究选择 C57BL/6 小鼠作为研究对象。

本研究采用特制的微型弹簧(内径 0.18 mm,全长 2.5 mm)圈套 C57BL/6 小鼠双侧颈总动脉造成血管狭窄,导致全脑血流低灌注。建模后模型小鼠运动功能无明显改变,未见肢体瘫痪及转圈现象。既往研究发现大鼠慢性脑血流低灌注 3 ~ 7 d 后出现白质疏松现象[6,10]。本研究表明,在建立模型 14 d 病理学检查发现白质神经纤维稀疏及星形胶质细胞和小胶质细胞增生现象,在建模 7 d 时未见明显的白质损害及胶质细胞增生。同时我们在建模 30 d 后采用八臂迷宫实验检测模型小鼠工作记忆的受损程度。工作记忆反映前额叶脑区执行功能,其主要依赖于大脑前额叶皮层神经环路[11]。大量临床研究认为脑室周围白质损害可导致认知功能减退,尤其是主观记忆力损害,执行功能障碍及精神运动速度减慢。而且认知功能损害与脑白质疏松的严重程度有关[12,13]。通过病理学研究,我们观察到慢性低灌注模型动物主要是皮质下白质损伤,然而白质纤维是连接皮层与皮层、皮层与皮层下深部核团的重要纽带,其纤维受损必然造成功能障碍。本实验结果表明,模型动物工作记忆错误显著多于假手术动物,表明其记忆中间储备环节受损和空间学习记忆能力降低,反映主观认知功能损害。

与既往研究不同的另一发现是,本研究通过组织病理学及 Evans Blue 渗透特性观察模型小鼠的病理学改变发现,模型建立 14 d 后出现白质神经纤维稀疏、胶质细胞增生,并且通过 Evans Blue 发现血脑屏障破坏。对皮质下白质脑区主要观察胼胝体、内囊和视束 3 个区域,结果显示胼胝体病理损伤最为严重,其次是内囊,病变最轻为视束,仅在胼胝体部位观察到 Evans Blue 外渗现象。然而既往大鼠动物模型实验均发现慢性低灌注状态导致的病理损害最明显的区域是视束,其次是胼胝体、内囊[10,14]。分析其可能原因是由于本模型小鼠的双侧颈总动脉并未完全闭塞,故由颈内动脉直接供血的眼动脉缺血程度较轻,因此视觉系统的损害降至最低。

本研究结果表明,小鼠慢性脑血流低灌注状态的主要病理改变是皮质下白质损伤,胶质细胞增生和血脑屏障功能受损,在建模 14 d 后出现。病理损害最严重部位是胼胝体,其次是内囊,视束最轻;神经功能缺损主要表现认知功能损害,而运动功能无障碍。

参考文献:

[1] Munoz D G. Leukoaraiosis and ischemia: beyond the myth[J]. Stroke, 2006, 37(6): 1348 - 1349.

[2] Kuller L H, Longstreth W T Jr, Arnold A M, *et al*. White matter hyperintensity on cranial magnetic resonance imaging: a predictor of stroke[J]. Stroke, 2004, 35(8): 1821 - 1825.

[3] Farkas E, Luiten P G, 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.

[4] Kurumatani T, Kudo T, Ikura Y, *et al*. White matter changes in the gerbil brain under chronic cerebral hypoperfusion[J]. Stroke, 1998, 29(5):1058 - 1062.

[5] Farkas E, Donka G, de-Vos R A, *et al*. Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain[J]. Acta Neuropathol, 2004, 108(1): 57 - 64.

[6] Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, *et al*. Glial activation and white matter changes in the rat brain induced by chronic cerebral hypoperfusion: an immunohistochemical study[J]. Acta Neuropathol, 1994, 87(5): 484 - 492.

[7] Roman G C, Erkinjuntti T, Wallin A, *et al*. Subcortical ischaemic vascular dementia[J]. Lancet Neurol, 2002, 1(7): 426 - 436.

[8] O'Sullivan M, Morris R G, Huckstep B, *et al*. Diffusion tensor MRI correlates with executive dysfunction in patients with ischaemic leukoaraiosis[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004, 75(3): 441 - 447.

[9] Pittman H W, Gain D D. Bilateral occlusion of the carotid artery[J]. Ariz Med, 1963, 20: 32 - 37.

[10] Lavinsky D, Arterni N S Achaval M, *et al*. Chronic bilateral common carotid artery occlusion: a model for ocular ischemic syndrome in the rat[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2006, 244(2): 199 - 204.

[11] 郭春彦. 工作记忆:一个备受关注的研究领域[J]. 心理科学进展,2007,15(1):1 - 2.

[12] Pantoni L, Poggesi A, Basile A M, *et al*. Leukoaraiosis predicts hidden global functioning impairment in nondisabled older people: the LADIS (Leukoaraiosis and Disability in the Elderly) Study[J]. J Am Geriatr Soc, 2006,54(7): 1095 - 1101.

[13] 刘其强, 孙治坤, 朱永林. 尼美舒利对大鼠慢性脑缺血后白质损伤的改善作用[J]. 郑州大学学报:医学版,2005,40(6):1090 - 1093.

[14] Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, *et al*. Axonal damage and demyelination in the white matter after chronic cerebral hypoperfusion in the rat[J]. Brain Res, 2002, 924(1): 63 - 70.

(编辑　吴培红)