维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)03-0412-04

脑缺血再灌致小鼠学习记忆障碍模型的建立

李 梨[1], 郭建增[1], 周岐新[1], 石京山[2]

(1.重庆医科大学生化与分子药理实验室,重庆 400016;2.遵义医学院药理教研室,贵州 遵义 563003)

【摘 要】目的:建立一种新的脑缺血再灌致小鼠学习记忆障碍模型。方法:采用双侧颈总动脉夹闭合并取血降压再回输的方法建立小鼠学习记忆障碍模型,进行自发活动、跳台和水迷宫实验、病理学检测及总抗氧化能力、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)的检测。结果:与假手术组比较,模型组小鼠神经元损伤明显,小鼠自发活动明显减少,跳台实验的上台潜伏期、电击时间明显上升,记忆成绩中的错误次数明显增多,下台潜伏期、台上总停留时间显著下降。与假手术组比较,模型组小鼠空间分辨学习记忆成绩明显降低,D3、D4、D5 的错误次数明显增加,潜伏期显著上升。模型组总抗氧化能力和 SOD 活性显著下降,MDA 含量明显升高。结论:双侧颈总动脉夹闭合并取血降压再灌注方法建立的小鼠模型可作为脑缺血再灌致学习记忆障碍的动物模型用于基础实验研究。

【关键词】脑缺血再灌;小鼠;学习记忆;动物模型

【中国图书分类法分类号】R743.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-08-31

Establishment of mice model with learning and memory deficits induced by cerebral ischemia/reperfusion

LI Li, et al

(*Research Center of Biochemistry and Molecular Pharmacology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish mice model with learning and memory deficit induced by cerebral ischemia/reperfusion. *Methods*: The mice model induced by cerebral ischemia/reperfusion were made by bilateral occlusion of both common carotid arteries and ischemic hypotension/reperfusion. Locomotive activity, step-down test and water maze were used to reflect behavior changes, as well as cell morphologic changes were evaluated, respectively. And total anti-oxidant capacity and activities of SOD(superoxide dismutase) and MDA(malondialdehyde) were also measured. *Results*: The neuronal damage in model mice was significant, compared with sham group. And locomotive activity of model mice markedly decreased. The escape latency and time of electric shock of model mice significantly increased in step-down test; and 24 hours later the number of errors significantly increased, step-down latency and time of remaining on platform markedly decreased. In maze test, the spatial learning and memory ability of model mice significantly decreased with characteristics of increase in the number of errors and latency at D3, D4 and D5, and the total anti-oxidant capacity and activities of SOD were decreased and MDA level increased in model group compared with sham group, respectively. *Conclusion*: This model of mice cerebral ischemia/reperfusion is useful for studying learning and memory deficit.

【Key words】Cerebral ischemia/reperfusoin; Mice; Learning and memory; Animal model

脑组织对缺血、缺氧非常敏感。随着社会老年化趋势和人均寿命的延长,缺血性脑血管疾病的发病率明显上升,严重危害人类健康,给社会和家庭带来沉重负担。脑缺血和再灌引起的认知功能障碍日益受到人们的重视。如何保护缺血再灌时脑细胞的功能,长期以来一直是脑血管病研究的热点。本实验拟建立一种新的脑缺血再灌致小鼠学习记忆障碍模型,为深入探讨脑缺血再灌的发病机制、病理特点及其防治打下基础。

作者介绍:李 梨(1975-),女,讲师,博士,
主要研究方向:生化药理和神经药理。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ZIL-2 型电脑程控全自动小鼠自发活动记数仪、WCX-2 型小鼠跳台仪、SMG-2 型小鼠水迷宫由医科院药物研究所研制。总抗氧化功能、SOD、MDA 测试试剂盒购于南京建成生物工程公司。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 动物模型的制备和分组

清洁级雄性 KM 小鼠(由重庆医科大学实验动物中心提供),28～33g,合格证书号 SCXK(渝)20020001。饲养和实验过程中遵守实验动物管理与保护的有关准则。采用双侧颈总动脉夹闭合并缺血降压－再灌注法制备小鼠脑缺血再灌模型。实验鼠术前 12h 禁食,自由饮水。4%水合氯醛(0.1ml/10g 体重)腹腔注射麻醉后,仰卧固定于鼠解剖板,颈正中剃毛,以碘酒和 75%酒精做皮肤常规消毒,沿前后方向正中线纵向剪开颈部皮肤约 0.5cm,钝性分离组织和肌肉,暴露并分离出双侧颈总动脉,下穿丝线备用。注意不要损伤迷走神经。于锁骨上方剪一 0.5cm 切口,分离颈总静脉。颈总静脉处插管(预先肝素内浸泡)抽血降压(总血量的 30%)。无创性微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 20min。记时结束,松开动脉夹,并回输血液,拔出导管,缝合伤口。动物随机分组为:假手术组、模型组。假手术组的麻醉及手术过程与模型组相同,但不阻断血流、不放血,以减少手术损伤造成的误差。在全部造模过程中观察动物体温,保持动物肛温在 36±0.5℃左右,以防止低温对脑缺血损伤的保护作用。术后第 15 天进行自发活动和被动回避实验,第 17 天进行空间分辨学习记忆实验。行为学检测完毕每组取 3 只小鼠,进行在体灌流固定,制作石蜡切片,HE 染色进行病理学检测。每组另取 5～6 只小鼠断头取大脑皮层组织,制备 10%的脑组织匀浆,离心取上清液进行各种生化检测。

1.3 小鼠自发活动实验

采用电脑程控全自动小鼠自发活动记数仪。测试室周围有三对光电管,通过数据传输线与电脑相连。将小鼠放入暗室中,记录 3min 内小鼠的自发活动。

1.4 小鼠被动回避反射实验

采用 WCX－2 型小鼠跳台仪。小鼠放入测试箱熟悉环境 3min,然后接通 36V 交流电。持续通电 5min。其间记录小鼠上台时间、受电击时间、错误次数。24h 后检测记忆情况。测试箱不通电,将小鼠稳当地放于安全平台上,观察 5min,记录小鼠下台潜伏期、在平台总的停留时间、错误次数。

1.5 空间分辨学习记忆实验

采用电脑程控 SMG－2 型小鼠水迷宫。该迷宫共有 4 个盲端和 1 个平台。从实验开始到小鼠达到平台所用时间为寻台潜伏期。小鼠进入盲端记为错误次数。训练 5 天,分别记录经 3～5 天成绩:3min 内到达平台的潜伏期和错误次数。

1.6 总抗氧化能力检测

机体中许多抗氧化物质能使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+},后者与菲啉类物质形成稳固的络合物,通过 520nm 的吸光度值反映其抗氧化能力的高低。按试剂盒说明书进行操作。活性单位定义:37℃时每毫克组织蛋白使反应体系中吸光度值增加 0.01 时为一个总抗氧化能力单位(U/mg.prot)。

1.7 SOD 的活性测定

通过黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基,后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色,550nm 处有最大吸收峰。按试剂盒说明书进行操作。酶的活性单位定义:每毫克组织蛋白在 1 毫升反应液中 SOD 抑制率达 50%所对应的 SOD 量为一个酶活性单位(U/mg.prot)。

1.8 MDA 定量测定

过氧化脂质降解产物中的丙二醛可与硫代巴比妥酸缩合,形成红色产物,在 532nm 处有最大吸收峰。具体操作按试剂盒说明书进行。单位为 nmol/mg.prot.

1.9 数据统计

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用方差分析或 t 检验。

2 结 果

2.1 小鼠自发活动实验

如表 1 所示,模型组小鼠自发活动明显减少,与假手术组比较,有显著性意义($P<0.01$)。

表 1 小鼠自发活动记数($\bar{x} \pm s$)

Group	n	locomotive activity
Sham	11	149.2±34.6
Model	11	102.4±31.2**

**: $P<0.01$ compared with corresponding sham group

2.2 小鼠被动回避反射实验

模型组在跳台学习记忆测试中成绩明显差于假手术组的成绩。表现为训练中上台潜伏期、受电击时间明显上升,与假手术组相比有显著性意义($P<0.05$);模型组训练的错误次数虽然有所增多,但与假手术组相比无显著性意义;记忆成绩中的错误次数明显增多,下台潜伏期、台上总停留时间显著下降($P<0.01$)(表 2)。

表 2 小鼠跳台实验的学习记忆成绩($\bar{x} \pm s$, $n=11$)

Group	Escape letency(s)	Number of errors	Time of electric shock(s)	Step－down latency(s)	Number of errors	Time of remaining on platform(s)
sham	6.45±6.35	1.73±1.10	15.55±10.27	217.1±65.6	1.36±1.21	239.50±45.7
Model	13.09±5.94*	2.09±1.14	25.91±11.16*	18.3±21.0**	3.91±2.43**	63.27±63.89**

* $P<0.05$ compared with corresponding sham group ** $P<0.01$ compared with corresponding sham group

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 小鼠空间分辨学习记忆能力($\bar{x} \pm s$, $n = 11$)

Group	D3		D4		D5	
	Latency(s)	Number of errors	Latency(s)	Number of errors	Latency(s)	Number of errors
Sham	22.00 ± 11.26	3.82 ± 1.89	14.91 ± 5.47	2.55 ± 1.13	12.91 ± 1.58	2.36 ± 0.67
Model	83.91 ± 63.02**	8.91 ± 6.09*	37.91 ± 35.38*	4.27 ± 2.45*	24.73 ± 17.32*	3.64 ± 1.57*

* $P<0.05$ compared with corresponding sham group ** $P<0.01$ compared with corresponding sham group



图 1 假手术组小鼠海马(HE×25)



图 2 脑缺血再灌模型组小鼠海马(HE×25)

2.3 小鼠空间分辨学习记忆实验

与假手术组比较,模型组小鼠空间分辨学习记忆成绩明显降低。模型组 D3、D4、D5 的错误次数明显增加,有显著性意义($P<0.05$)。模型组 D3 的潜伏期显著上升,与假手术组相比,$P<0.01$。随着训练次数增多,模型组 D4、D5 的潜伏期与假手术组相比,$P<0.05$(表 3)。

2.4 病理形态学变化

HE 染色后,光镜下观察可见假手术组小鼠海马神经元数目多,呈多层,排列整齐紧密。细胞核大而清晰,核仁明显。模型组海马 CA1 神经元数目有所减少,脱失现象明显,层次少而不清,核固缩为三角形或多角形,浓染(图 1、2)。

2.5 小鼠脑组织总抗氧化能力、SOD 酶活性和 MDA 含量的检测

由表 4 可见模型组小鼠脑组织匀浆总抗氧化能力、总 SOD 活性明显下降,与假手术组比较,差异有显著性($P<0.01$)。脑缺血再灌可使模型组小鼠脑组织匀浆中 MDA 含量比假手术组明显升高($P<0.01$),说明缺血再灌引起了脂质过氧化损伤(表 4)。

表 4 小鼠脑组织总抗氧化能力(TAC)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量($\bar{x} \pm s$, $n = 5-6$)

Group	TAC(U/mg.prot)	SOD(U/mg.prot)	MDA(nmol/mg.prot)
Sham	0.48 ± 0.04	123.5 ± 14.5	0.59 ± 0.15
Model group	0.24 ± 0.04**	66.9 ± 13.9**	1.17 ± 0.24**

**: $P<0.01$ compared with corresponding sham group

3 讨 论

急性脑缺血/再灌可引起严重的神经功能障碍。研究脑缺血/再灌损伤以及寻找有效的防治药物是神经科学迫切需要解决的课题,具有重要的临床意义。随着人口平均寿命的逐年增加和社会人口的老龄化以及我国脑血管病的多发,脑缺血再灌致学习记忆障碍的发病率明显上升,因而加强对其防治的研究是当前的重要课题。目前临床预防和治疗尚无突破性进展,基础研究显得越来越重要。而基础研究离不开动物模型。建立一种可靠的脑缺血再灌模型对于深入探讨该病机制、病理特点及其防治具有重要意义。

目前国内外尚没有公认的理想脑缺血再灌致学习记忆障碍模型。常用的模型制作方法可归纳为以下几种类型[1~7]:(1)血管阻断法。如双侧颈总动脉阻断再灌注的 2-血管阻断法(2-VO)、双侧颈总动脉和椎动脉同时阻断再灌注的 4-血管阻断法(4-VO)。(2)血管内栓线阻断法。如大脑中动脉凝闭(MCAO)再灌注模型等。

脑组织对缺血、缺氧非常敏感。脑缺血达到一定时间和程度可引起动物一系列神经病理改变和学习记忆障碍等行为学改变[4,5]。反复的短暂性脑缺

维普资讯 http://www.cqvip.com

血再灌注被认为是造成学习记忆障碍的主要原因之一。de-la-Torre[6]发明的2-血管阻断法(2VO)是慢性低灌注导致的缺血性痴呆模型。但是不同品系的鼠联系椎动脉和颈内动脉系统的桥梁动脉—后交通动脉有显著差异,因而2-VO法对不同品系的鼠影响程度不同。蒙古沙土鼠因为后交通动脉缺陷,只需阻断双侧颈总动脉血流即可使前脑区发生严重缺血,是理想的2-VO法导致脑缺血再灌动物模型。但是沙土鼠来源少、价格贵而不能广泛应用。对于一般品系的小鼠而言,2-VO法结扎双侧颈总动脉后早期可造成急性脑缺血,但对海马区供血影响不大。因为海马区供血主要是前循环的脉络膜前动脉和后循环的脉络膜后动脉,虽然70%的脑血流量通过颈总动脉,但仍以脉络膜后动脉为主[7]。所以急性脑缺血可以通过基底动脉和基底动脉环血流调节以及逐渐形成的侧支循环所改善和代偿。Pulsinelli发明的4-VO法虽然对双侧颈总动脉和椎动脉同时阻断能较好的模拟全脑缺血模型,但手术创伤较大、死亡率高、制作比较复杂。因而实际操作中有一定的难度。所以不少学者在2-VO基础上做了一些改进。有学者采用反复双侧颈总动脉阻断再灌注,同时尾剪放血的方法建立小鼠脑缺血再灌模型;或者采用反复双侧颈总动脉阻断再灌注结合腹腔注射硝普钠降血压的方法建立大鼠或小鼠模型。但是我们认为前者放血量有限,而且再灌注期仅以生理盐水腹腔注射补充血容量,与生理状态相去较远;后者用硝普钠降血压时因环境温度、个体差异等因素需要仪器密切监控血压,用药剂量不易控制。所以,本实验采用双侧颈总动脉夹闭合并缺血降压-再灌注的方法制备小鼠脑缺血再灌模型,易于操作而且能较好的模拟缺血再灌注的生理状态。从理论上讲,降低血压可以有效的降低缺血期后交通动脉血流量,从而减少后交通动脉的代偿作用,使脑缺血更为明显。

脑缺血再灌后神经元的损伤必然引起学习记忆功能下降。我们采用行为药理学中使用最频繁的实验方法:自发活动、跳台和水迷宫法,对实验小鼠的自发活动、被动学习记忆能力和空间探索的学习记忆能力进行测试。结果显示此种方法建立的脑缺血再灌模型小鼠行为学改变明显,病理学检测也显示神经元有一定程度的损伤,说明模型建立较成功。另一方面,自由基是一类化学性质极其活跃、外层轨道具有不配对电子的化学基团的总称。脑组织由于其自身的特点,如含有高浓度的不饱和脂肪酸、需要相对较多的氧供应及脑内相对缺乏抗氧化防御系统,使得自由基的损伤愈显严重。因而脑缺血后,尤其是再灌注期,继发性自由基生成增多是造成神经元损伤的重要因素[8]。进行组织总抗氧化能力、SOD、MDA的检测可共同反映机体自由基的生成与清除情况[9,10]。本实验发现模型组小鼠脑缺血再灌后皮层组织总抗氧化能力降低,SOD酶活性下降,MDA含量上升,从生化角度说明脑缺血再灌后机体抗氧化系统受到破坏,自由基生成增多,清除不及时。综上所述,本实验采用双侧颈总动脉夹闭合并取血降压再灌注的方法建立了小鼠学习记忆障碍模型。该模型可用于脑缺血再灌病理生理和形态学等变化的机制分析,也可用于某些药物和治疗手段的疗效研究,在基础研究中具有潜在的应用价值。

参 考 文 献

[1] Hata R, Mies G, Wiessner C, et al. A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical and magnetic resonance imaging[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998; 18: (4): 367-369.

[2] 王玉升,王 军. 中药治疗脑缺血实验研究概况[J]. 中医研究, 1997; 10(4): 52.

[3] 王芙蓉,姜永生,肖文伍,等. 颈内动脉线栓法建立小鼠局灶性脑缺血再灌注模型[J]. 中风和神经疾病杂志, 2003; 10(2): 112-114.

[4] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, et al. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats[J]. Brain Res, 1994; 653(1-2): 231-236.

[5] Jellinger KA. The pathology of ischemic-vascular dementia: an update[J]. J Neurol Sci, 2002; 203-204: 153-157.

[6] Torre JC, Fortin T, Park GA, et al. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats[J]. Brain Res, 1992; 582(2): 186-195.

[7] Kazuya S. A model of proximal middle cerebral artery occlusion in rat[J]. Neurosci Methods, 1989; 30(1): 169-173.

[8] Traystman KT. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion[J]. J Appl Physiol, 1991; 71(4): 1185.

[9] Chen CJ, Cheng FC, Liao SL, et al. Effect of naloxone on lactate, pyruvate metabolism and antioxidant enzyme activity in

(下转第 455 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

的纤维组织代替,与影像学变化一致。我们显示的结果是 HIFU 区凝固性坏死组完成吸收是在 3 个月后,组织吸收时间的不同估计与坏死组织体积大小与相关脏器的功能、血流状态有关。

本实验 MRI 的图像显示猴子宫治疗区与实际的凝固性坏死区一致,与刘宝琴研究的结果一致。MRI 可以准确地反映高强度聚集超声在组织中形成的损伤及血供情况,MRI 在 HIFU 治疗过程监控及对治疗后随访和血供判断具有很重要的价值,Rowland 等[6]认为 MRI 可以无创观察 HIFU 疗效,他们使用 MRI 研究 HIFU 治疗后组织蛋白特性的连续变化,发现超声损伤的组织在治疗后 8 周开始修复,MRI 图像与组织学结果有很好的一致性。MRI 作为影像学评价的优势有:①高对比度,一般的影像学评价只有一个参数,而 MRI 有多个参数。②使组织学变化的诊断提高,TWI 对正常解剖结果显示良好,TWI 对病变组织显示较敏感。③任意方位断层,MRI 扫描在病人体位不变的情况下,通过交换层面选择梯度磁场,可行横、矢、冠或斜位断层。④软组织分辨能力极高,决定 MRI 信号强度的因素较多,正常与异常组织中只要有一个发生变化,就可在 MRI 信号上得到反应。⑤MRI 图像可以监测局部组织的血供情况,并用曲线表示出来。本研究结果对 HIFU 后组织的生物学转归提供了很好的数据及图片资料。

动态观察靶区组织的变化显示,凝固性坏死细胞坏死,没有酶活性,中央不会发生液化,分解液化从坏死边缘周围正常组织分泌酶的作用下,向心性地缓慢分解液化凝固性坏死区,逐渐吸收并由少量纤维组织代替。实验观察吸收从治疗后 15 天开始,90 天完全吸收。影像学动态观察与病理检查、酶组织化学检查的对照,进一步证实影像学是随访临床 HIFU 治疗的可靠手段,其中用 MRI 对 HIFU 治疗后定期随访更具有优势。

参 考 文 献

[1] Madersbcher S, Kratzik C, Susani M, et al. Tissue ablation in benign prostatic hyperplasia with high intensity focused ultrasound[J]. The Journal of Urology. 1994;152:1956 - 1961.

[2] Ter Harr GR, Sinnett D, Rivens I. High intensity focused ultrasound: A surgical technique for the treatment of discrete liver tumors[J]. Phys Med Biol, 1989;34:1743 - 1750.

[3] Shahram Vaezy, Fujimoto, Cheryl Walker, et al. Treatment of uterine fibroid tumors in a nude mouse model using high - intensity focused ultrasound[J]. Am J Obstet Gynecol, 2000;183(1):6 - 11.

[4] Ter Harr GR, Robertson D. Tissue destruction with focused ultrasound in vivo[J]. Eur Urol, 1993;23:8 - 11.

[5] Sibille A, Prat F, Chapelon JY, et al. Expracorporeal ablation of liver tissue by high - intensity focused ultrasound[J]. Oncology, 1993;50:375 - 379.

[6] Rowland IJ, Rivens I, Chen L, et al. MRI study of hepatic tumors following high - intensity focused ultrasound surgery [J]. Br J Radiol, 1997;70:144 - 153.

(上接第 415 页)

rat cerebral ischemia/reperfusion[J]. Neurosci Lett, 2000;287(2):113 - 116.

[10] Chong ZZ, Feng YP. Effect of 3 - n - butylphthalide on reperfusion induced lipid peroxidation following cerebral ischemia in rats and superoxide radical formation in vitro[J]. J Chin Pharm Sci, 1999;8(2):95 - 99.