DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.005

论著

文章编号:1000-5404(2000)04-0314-04

血管性痴呆的动物模型及其胆碱能机制研究

范文辉,刘之荣,李露斯 (第三军医大学附属西南医院神经内科,重庆 400038)

提 要:目的 建立血管性痴呆(VD)的动物模型,并探讨血管性痴呆认知障碍的发病机制。方法 采用持久性双侧颈总动脉结扎法致老龄大鼠慢性前脑血流灌注不足,建立老龄大鼠血管性痴呆模型,进行数字减影血管造影(DSA)检查、穿梭箱试验和胆碱乙酰转移酶(Choline acetyltransferase, ChAT)免疫组化测定。结果 慢性脑血流灌注不足2月后出现明显的认知功能障碍,缺血4月后更明显;海马CA1区ChAT免疫反应阳性神经元分布及其数量较对照组显著减少,且与学习记忆障碍呈正相关。结论 此模型能可靠模拟人的慢性脑血流灌注不足之血管性痴呆,其额叶皮层和海马胆碱能神经元的损伤可能是认知功能受损害的形态学基础。

关键词:血管性痴呆;认知障碍;动物模型;胆碱乙酰基转移酶
中图法分类号:R-332;R749.16 文献标识码:A

Establishment of a rat model of vascular dementia and study of its cholinergic mechanism

FAN Wen-hui, LIU Zhi-rong, LI Lu-si (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish an animal model of vascular dementia (VD) in aging rat and study the mechanism of hypomnesis in vascular dementia. **Methods** An animal model of VD was established through chronic hypoperfusion of cerebral blood flow of the forebrain in aging rats with permanent bilateral common carotid arteries occlusion. The rats were tested with a computerized shuttle-training case. The changes of cerebrovascular system were observed with digital subtraction angiography (DSA). The brain tissues were studied for choline acetyltransferase (ChAT) with immunohistochemistry. **Results** The congnitive function of rats was obviously reduced after 2 months of the chronic erebral hypoperfusion and became worse after 4 months of hypoperfusion. The distribution and number of the neutrons positive to ChAT-like immunoreaction in the CA1 sector of the hippocampus were more significantly reduced in the hypoperfused rats than in those of the control and the decrease of the positive neutrons was positively correlated to memory disorders. **Conclusion** Our rat model of VD can reliably simulate the clinical manifestation of VD in human being resulting from chronic hypoperfusion of cerebral blood flow. Damages of cholinergic neurons in the cortex of the frontal lobe and hippocampus are the morphological basis of impairment of the cognition function.

Key words: vascular dementia; cognitive disorders; animal model; choline acetyltransferase

血管性痴呆(Vascular dementia, VD)是老年性痴呆的重要类型。目前认为慢性脑灌注不足是血管性痴呆的主要原因,而迄今用于脑缺血后智力减退的慢性动物模型,正处于探索阶段[1]。本实验通过持久性双侧颈总动脉结扎致老龄大鼠慢性前脑灌注不足,建立学习记忆障碍的大鼠痴呆模型。用电脑控制穿梭箱定量测试大鼠学习记忆能力,并进行胆碱乙酰转移酶免疫组织化学实验,观察鼠脑海马结构内胆碱能阳性神经元和纤维的分布及其与大鼠学习成绩的关系,初步探讨血管性痴呆认知障碍的发病机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用本校动物所提供的老龄健康Wistar大鼠(月龄>16个

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770273)
作者简介:范文辉(1968-),男,河南省郑州市人,主治医师,讲师,主要从事血管性痴呆方面的研究。电话:(023)68753750
收稿日期:1999-09-21;修回日期:1999-12-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

月，雌雄不限）共 15 只，体重 300～400 g。随机分为对照组（n =5）、缺血 2 月组（n =5）和缺血 4 月组（n =5）。

1.2 模型制作方法

参照 Ohta 等[2] 制作慢性脑灌注不足动物模型。大鼠术前 12 h 禁食，4 h 禁水。用 1%戊巴比妥钠（10 mg/kg）腹腔注射麻醉，保证手术期间有自主呼吸。仰卧固定，颈前部去毛消毒后沿颈正中切开，分离出双侧颈总动脉，双重丝线结扎，术中大鼠肛温保持在 36.5℃～37.5℃，手术后动物送至有通风和空调设备的动物房饲养。对照组动物仅行颈前切开，不结扎颈总动脉。

1.3 数字减影血管造影检查

试验大鼠常规麻醉，仰卧固定。切开腹腔，暴露腹主动脉，经此插入造影管逆行至升主动脉，成功后行数字减影血管造影（Digital subtraction angiography，DSA）检查。

1.4 认知功能测试

采用电脑控制穿梭箱系统。大鼠放入穿梭箱内暗适应 5 min，然后持续灯光刺激 5 s，给箱底通电流 10～20 mA、频率 10～15 Hz 的电刺激 5 s。每次实验进行 20 次光、电刺激，每次刺激后予 60 s 适应时间。将大鼠经刺激能躲避至对侧暗箱定为成功 1 次，灯光刺激大鼠即能完成穿梭动作为主动回避反应（Active avoidance response，ARR），经电刺激才能完成穿梭动作为被动回避反应（Passive avoidance response，PAR），连续进行 5 d 训练并记录成绩。

1.5 免疫组化染色

1.5.1 灌注和切片　用戊巴比妥钠（30 mg/100 g 体重）腹腔麻醉动物，暴露心脏，先以 0.9%盐水约 500 ml 经升主动脉灌注冲洗后，灌注 4%多聚甲醛溶液（pH 7.4）500 ml，持续 2 h 后取脑，将脑置于 20%蔗糖溶液中浸置 24～48 h（4℃），冰冻冠状连续切片（厚度 50 μm），海马组织每 5 张取 1 张。

1.5.2 免疫组织化学染色步骤切片置于 0.3% Triton 中浸 30 min，PBS 液洗 3 次，每次 15 min，以下各操作后均经 PBS 液漂洗；ChAT 大鼠单克隆抗体中孵育 48 h；生物素标记二抗（1∶100）中，室温下孵育 30 min；辣根过氧化物酶标记链霉卵白素（1∶100）中，室温下孵育 30 min；二氨基联苯氨（DAB）反应液中呈色，室温下 10～20 min；常规明胶裱片、脱水、透明、DPX 封片。

1.5.3 定量分析计数方法　在海马 CA1 区的锥体细胞层，分别选择 3 个相邻视野，在 15× 10 倍光镜下做免疫反应阳性神经元计数，技术方法采用标准网格，以“/0.9 mm2”为单位，结果取 3 个视野的平均值。

1.6 统计学分析

实验数据均用 SPLM 软件分析处理，作同部位各组之间方差分析及组内不同部位之间方差分析，进行 t 检验和直线相关分析。

2 结果

2.1 试验模型血管阻断情况

DSA 示：双侧颈总动脉结扎后其血流完全阻断，脑部血液供应主要由双侧椎动脉维持，持久性结扎后 1 周侧枝循环代偿，双侧颈总动脉无再通，见图 1、图 2。

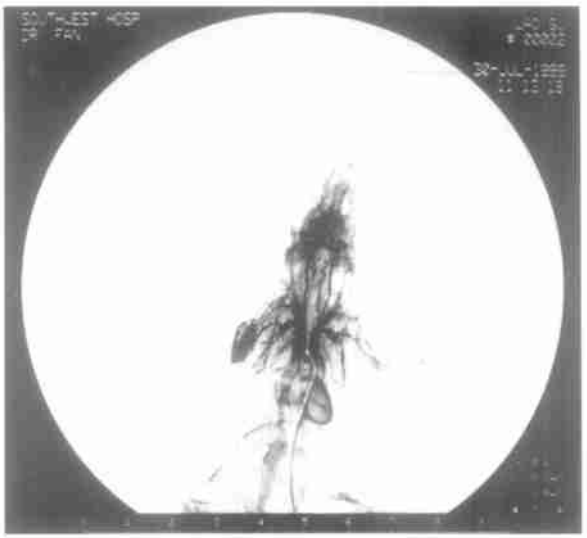


图 1　正常大鼠脑血管 DSA，示双侧颈总动脉及椎动脉

Fig 1　Cerebrovascular DSA of bilateral common carotid artery and vertebral artery in normal rats

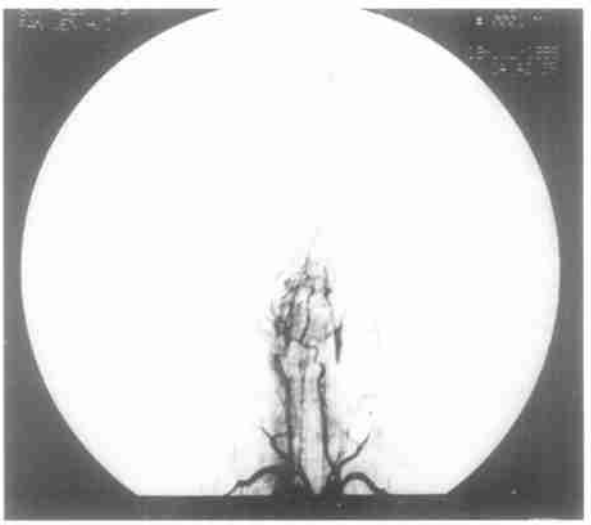


图 2　持久双侧颈总动脉结扎 1 周后大鼠脑血管 DSA，示双侧颈总动脉阻断

Fig 2　Cerebrovascular DSA of permanent occlusion of bilateral common carotid arteries 1 week after occlusion

2.2 行为学检查结果

双侧颈总动脉完全阻断后首先出现短暂惊厥，体温降低，呼吸减慢，翻正反射消失；术后早期观察动物运动减少，后肢呈“八字”，走路共济失调，或爬行和转圈；术后 7 d 试验组已基本恢复，无明显的运动障碍。

穿梭箱试验结果可以看出，与对照组比较，慢性脑灌注不足 2 月及 4 月后大鼠学习能力（PAR）均下降，4 月较 2 月明显，经统计学处理差异非常显著；大鼠学习能力（AAR）亦下降，缺血 2 月组

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

与缺血4月组比较相差不显著，说明缺血2月时，大鼠学习能力已明显下降，见表1。

表1 大鼠学习能力检测

Tab 1 Test on the learning ability of rats

	PAR		AAR	
	Correct	Error	Correct	Error
Control	273	927	595	605
Ischemia 2 months	122*	678	278*	522
Ischemia 4 months	61*	639	246*	454

PAR: Passive avoidance response; AAR: Active avoidance response; *: $P<0.0001$ *vs* control

2.3 免疫组化

对照组海马结构CA1、CA2、CA3、门区和齿状回均有大量ChAT免疫反应阳性神经元和纤维分布，其中以海马锥体细胞层和颗粒细胞层最密集；其次为海马腔隙分子层、齿状回分子层和海马门(CA4)等区域；辐射层相对较稀疏，见图3。缺血2月组海马结构内仍有一定量ChAT免疫反应阳性神经元和纤维分布，而CA1区内ChAT免疫反应阳性神经元和纤维数量显著减少，分布稀疏，见图4；CA2区、CA3区、和齿状回ChAT免疫反应阳性神经元和纤维分布基本同对照组。两组大脑皮质各层中ChAT免疫反应阳性神经元和纤维均呈弥散分布，其中以Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ层中较密集，Ⅰ层和Ⅵ层中仅有少量阳性神经元分布，两组间差异无显著性。海马CA1区ChAT免疫反应阳性神经元按每0.9 mm2计数，对照组和缺血2月组海马CA1区ChAT免疫反应阳性神经元计数分别为：(120.15±2.02)、(40.37±3.18)，组间差异有显著性($P<0.01$)，且与学习成绩呈负相关($r=-0.9803$，$P<0.01$)与学习能力呈正相关。



图3 对照组海马CA1区ChAT免疫反应阳性神经元和纤维呈密集分布 (S-P×40)

Fig 3 Control group: Densely distribution of neurons positive to ChAT like immunoreaction and its fibers in CA1 sector of hippocampus (S-P×40)

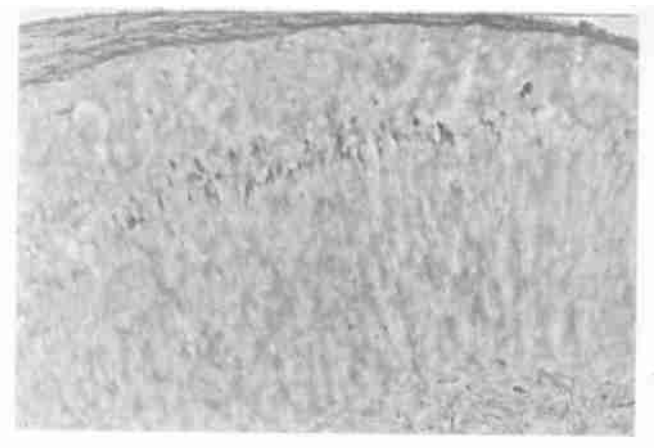


图4 缺血2月组海马CA1区ChAT免疫反应阳性神经元和纤维显著减少，稀疏分布 (S-P×40)

Fig 4 Trial group: Significant reduction of neurons positive to ChAT like immunoreaction and its fibers in CA1 sector of hippocampus 2 months after permanent bilateral common carotid arteries occlusion (S-P×40)

3 讨论

建立可复制的可靠动物模型是研究血管性痴呆发生发展机制及防治措施、疗效评价的关键。为阐明血管性痴呆的特征性症状，既往曾采用各种脑缺血动物模型进行研究，如沙土鼠短暂脑缺血，大鼠4血管结扎、颅外安置小磁铁吸附经舌下静脉注入四氯化三铁粉的方法[3]等。但大多数模型缺血时间短暂，或仅模拟了单一部位(额部)的缺血梗塞，或局限于缺血急性期。慢性脑缺血对认知过程的影响却很少研究。目前认为慢性脑灌注不足是血管性痴呆的主要原因，模拟慢性缺血改变对阐明血管性痴呆的病理生理过程是十分重要的。

正常情况下脑底动脉环的前交通动脉(AcoA)因双侧颈内动脉(ICA)压力相等，后交通动脉(PcoA)因ICA系统与椎基底动脉系统压力相等，Willis环的前后循环各行其道并不相混，前后交通动脉内一般并无血液通过[4]。本模型经DSA证实持久性双侧颈总动脉结扎可造成稳定的不完全性前脑缺血模型，该法造成前脑供血大幅度下降，更接近慢性脑灌注不足时脑组织病理生理演变过程，脑的幕上部分血流减少，而脑干灌流良好，维持生命中枢的基本功能，适于慢性研究。李巍等[1]观察到双侧颈总动脉阻断后20 min，额叶皮层，海马区局部脑血流量(rCBF)较正常脑血流分别减少62.3%和47.6%；Tsuchiya等[5]证实大鼠持久性双侧颈总动脉结扎后2.5 h局部(包括皮层、海马和其他15个区域)脑血流量减少了25%～87%，并且1周后仍显

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

著降低；Tanaka 等[6] 研究发现术后 6 周额叶皮层 rCBF 较对照组减低 49%。由此可见此模型造成的脑血流灌注不足的结果是确切的。

从本实验结果可以看出，大鼠持久性双侧颈总动脉结扎 2 月后，ARR 和 PAR 均较正常对照明显减退，4 月后 ARR 继续下降，但总体回避反应无明显改变，提示大鼠持久性双侧颈总动脉结扎所诱导的慢性脑灌注不足可导致进行性和长期的学习功能障碍，但没有明显的运动障碍，可以模拟人的脑血管性痴呆进行性认知功能下降，有/无定位体征的特点。

胆碱乙酰转移酶（ChAT）免疫组化结果表明：海马 CA1 区 ChAT 免疫反应阳性神经元和纤维数量明显减少，与大鼠的学习记忆障碍程度呈正相关。许多研究发现阿尔茨默型痴呆（Alzheimer type dementia，SDAT）患者存在选择性丧失胆碱能神经元，基底前脑胆碱能神经元严重退变，大脑新皮质广泛区域内的 ChAT 神经元及纤维显著减少，ChAT 活性明显下降。曾有研究发现，在 SDAT 和 MID 患者脑脊液中胆碱酯酶（AchE）活性均明显下降[7]。本研究进一步从形态学上提供了 VD 患者海马区 ChAT 阳性神经元及纤维密度减低的证据，提示中枢乙酰胆碱系统功能不足可能并非 SDAT 的特征性病理变化，血管性痴呆亦可能与中枢胆碱功能障碍有关。

参考文献：

[1] 李　巍，张世仪．小鼠脑缺血性学习记忆障碍模型的建立[J]．基础医学与临床，1995，15(6)：46－49.

[2] Ohta H，Matsumoto K，Watanabe H. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats[J]. Brain Res，1994，653(1)：231－234.

[3] 林　坚，林兴会．血管性痴呆动物模型[J]．中国应用生理学杂志，1998，14(1)：89－92.

[4] Aaslid R，Markwalde T M，nornes H. Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in the basal cerebral arteries[J]. J Neurosurg，1982，57(6)：769－774.

[5] Tsuchiya M，Sako K，Yura S，*et al*. Local cerebral glucose utilization following acute and chronic bilateral carotid artery ligation in Wistar rats：Relation to changes in local cerebral blood flow[J]. Exp Brain Res，1993，95(1)：1－7.

[6] Tanaka K，Ogawa N，Masato A，*et al*. Relationship between cholinergic dysfunction and discrimination learning disabilities in Wistar rats following chronic cerebral hypoperfusion[J]. Brain Research，1996，729(1)：55－65.

[7] Fredikson K，Brun A，Gustafson L. Pure subcortical arteriosclerotic encephalopathy：A clinicopathologic study[J]. Cerebro Vasc Dis，1992，2(1)：82－86.

（编辑　刘　鹏）

（上接313 页）

疱的效果好，而对扩张的毛细血管作用有限，而治疗组对扩张的毛细血管有明显消退作用。对照组治愈率为 37%（10/27），治疗组治愈率为 75%（21/28），两组治愈率的 χ^2 检验 $P<0.05$，后者优于前者。随访 6 个月，对照组治愈者中有 5 例（5/10）不同程度的复发，最早的 1 例发生于停止治疗后 1 个月。随着停止治疗时间延长复发例数增多。显效者中亦有 4 例病情出现反复。治疗组无 1 例复发。结果见表 1。

表 1　治疗结果

	痊愈	显效	有效	无效	痊愈率	有效率
治疗组（$n=28$）						
第 1 疗程	4	12	12	0	14.3%	100%
第 2 疗程	8	12	4	0	33.3%	100%
第 3 疗程	9	6	1	0	56.25%	100%
对照组（$n=27$）						
第 1 疗程	1	6	15	5	3.7%	81.5%
第 2 疗程	4	13	6	3	15.4%	88.5%
第 3 疗程	5	10	6	1	22.7%	95.5%

$\chi^2=6.58$，$P<0.05$

3　讨论

酒渣鼻是一种影响美容的皮肤病，但确切病因尚不清楚，可能与毛囊虫寄生、细菌感染、胃肠道疾病、精神因素、冷热气候、对日光异常敏感、过度嗜好咖啡、烟草、热饮、辛辣食物等有关，免疫机制可能也参与了发病[1]。甲硝唑可通过抗毛囊虫、幽门螺旋杆菌和厌氧菌，以及抗炎活性和免疫抑制效应发挥治疗作用[2]。对丘疹、脓疱和红斑在 2 周到 2 月见效，对毛细血管扩张和鼻赘无效[3]。但甲硝唑治疗期较长，可能增加人肝癌和宫颈癌的发生率[2]；总剂量大于 30 克可能发生周围神经病变[4]。因此不宜长期大剂量口服。而替硝唑比甲硝唑耐受性好，疗效高，抗菌效果强，但对毛囊虫的作用及治疗酒渣鼻的机制有待进一步研究。维甲酸类药物治疗酒渣鼻的机制仍不清，但可能与其降低炎症反应能力和抑制皮脂腺功能有关[1,4]。我们的观察表明，替硝唑和维胺酯治疗红斑期及丘疹脓疱酒渣鼻治愈疗程短、治愈率高、不易复发。我们还发现长期坚持外用 1%的甲硝唑霜有防止酒渣鼻复发的作用。因此，我们认为短疗程常规剂量口服甲硝唑治疗后再坚持长时间外用 1%甲硝唑霜治疗酒渣鼻是有效的；口服替硝唑和维胺酯是治疗红斑期和丘疹脓疱期酒渣鼻的可供选择的好方法。

关键词：酒渣鼻/药物治疗；维胺酯；替硝唑；甲硝唑
中图法分类号：　R758.734.05　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Ertl G A，Levine N，Kligman A M. A comparison of the efficacy of topical tretinoin and low-dose oral isotretinoin in rosacea[J]. Arch Dermatol，1994，130(3)：319－324.

[2] Torresani C. Clarithromycin：A new perspective in rosacea treatment[J]. Int J Dermatol，1998，37(5)：347－349.

[3] Nielsen P G. Metronidazole treatment in rosacea[J]. Int J Dermatol，1988，27(1)：1－5.

[4] Rebora A. Rosacea[J]. J Invest Dermatol，1987，88(Suppl 3)：56s－60s.

（编辑　谢义霞）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net