DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.011

论著

文章编号:1000-5404(2000)11-1042-04

慢性脑血流灌注不足认知功能障碍与环胞素A治疗作用的实验研究

李露斯,刘之荣 (第三军医大学附属西南医院神经医学科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨慢性脑血流灌注不足认知功能障碍和环胞素A治疗作用。方法 持久性双侧颈总动脉结扎所致慢性脑血流灌注不足的大鼠模型;用电脑控制穿梭箱记录大鼠学习记忆能力;用免疫组化研究脑内血源性白细胞和T细胞浸润的规律、分布和可能作用及免疫抑制剂环胞素A(CsA)的治疗效果。结果 慢性脑血流灌注不足2~4个月大鼠的学习记忆能力明显下降;缺血1个月后皮层、海马和白质有白细胞和T细胞的浸润,2~4月浸润的白细胞和T细胞减少;经CsA治疗者细胞浸润和学习记忆能力明显好转。结论 CsA可以抑制慢性脑血流灌注不足后脑内白细胞和T细胞的入侵,减轻脑损害,提高大鼠的认知能力。

关键词:慢性脑血流灌注不足;白细胞;T细胞
中图法分类号:R743;R975.5 文献标识码:A

Cognitive function disturbance and efficiency of cyclosporin A treatment in rats after chronic cerebral hypoperfusion

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

Abstract: Objective To explore the cognitive function disturbance and efficiency of cyclosporin A (CsA) in rats after chronic cerebral hypoperfusion (CCH). Methods The CCH model was established in Wistar rats with bilateral ligation of common carotid artery. The cognitive function of rats was measured by a computerized shuttle-training case. The infiltration of leukocytes and T cells in the brain was observed with immunohistochemical methods. The efficiency of CsA treatment was studied. Results The cognitive function was decreased obviously in rats with 2 to 4 months of CCH. There were leukocytes and T cells infiltrating into the cortex, the hippocampus and the white matter of the brain after 1 month of CCH, but the amount of the cells was reduced within 2 to 4 months. CsA could alleviate the cell infiltration and the rat cognitive function. Conclusion CsA can inhibit the infiltration of leukocytes and T cells in the brain, attenuate brain injury and improve the cognitive function of rats after CCH.

Key words: chronic cerebral hypoperfusion; leukocyte; T cell; rats

慢性脑血流灌注不足所致认知功能障碍是研究血管性痴呆的基础,其可能的发病机制与脑内免疫反应有关。以往的研究多集中在缺血急性期,而对临床上常见的各种原因引起的慢性脑血流灌注不足的血管性痴呆及治疗少有报道。本实验为其研究和防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物由四川省中药研究所及本校实验动物中心提供。选用健康、月龄≥12个月Wistar大鼠,雌雄不限,体重300~450 g。分对照组,持久性双侧颈总动脉结扎致慢性脑血流灌注不足1、2、3、4月和CsA治疗组。每组3~12只。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770273)
作者简介:李露斯(1945—),女,黑龙江省佳木斯市人,主任医师,教授,主要从事缺血性脑血管病的发病机制方面的研究,发表论文25篇。电话:(023)65318301-73070
收稿日期:2000-02-11;修回日期:2000-09-10

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

1.2　实验方法

1.2.1　模型制作　　参照文献[1, 2]制作慢性脑血流灌注不足动物模型。大鼠术前 12 h 禁食, 4 h 禁水。20% 乌拉坦 800～1 000 mg/kg 腹腔麻醉。仰卧固定大鼠, 颈前部去毛消毒后沿颈正中切开, 分离出双侧颈总动脉, 双层丝线结扎。缝合皮肤。治疗组动物采用环胞素 A 胃灌(10 mg/kg)。术前 1 d 及术前各 1 次; 术后 1 周, 1 次/d; 术后 2 周, 1 次/2 d; 术后 3 周, 1 次/3 d。对照组仅切开颈前皮肤, 不结扎颈总动脉。

1.2.2　认知神经生物学检查　　采用电脑控制穿梭箱系统。大鼠放入穿梭箱内暗适应 5 min 后, 灯光刺激 5 s; 后给箱底通 10～20 mA、频率 10～15 Hz 的电刺激 5 s。每只大鼠每次试验进行 20 次光、电刺激, 每次刺激后给予 60 s 适应时间。结果采用灯光刺激大鼠即能自动跑到对侧无灯光无电刺激箱内躲避为完成主动回避反应(Active avoiding reaction, AAR)和经电刺激才能完成穿梭动作为被动回避反应(Passive avoiding reaction, PAR)记录。

1.2.2.1　学习能力检查　　分对照组、慢性脑血流灌注不足 2、4 月组和治疗组, 连续进行 5 d 试验, 记录成绩。

1.2.2.2　记忆能力检查　　分慢性脑血流灌注不足 2 月组和治疗组。先进行穿梭箱训练, 使大鼠 ARR 正确反应率稳定在 80% 以上, 后行双侧颈总动脉结扎制作慢性脑血流灌注不足 2 月和治疗组模型。到时限后行穿梭箱试验, 连续 5 d, 记录成绩。

1.2.3　冰冻切片制作　　取慢性脑血流灌注不足 1、2、3、4 月、治疗组和对照组大鼠各 6 只, 20% 乌拉坦 800～1 000 mg/kg 腹腔深麻醉, 生理盐水 250 ml 经左心室灌注去除血管内血细胞, 后用 4 ℃多聚甲醛 200 ml 灌注固定后分离出大脑, 切去脑干、小脑和嗅脑, 正中冠状切开, 置入 4% 多聚甲醛(4 ℃)中放置 10～12 h, 再入 10% 蔗糖溶液浸泡至沉底后, －20 ℃连续冰冻冠状切片, 片厚约 20 μm。切片放入 0.01 mol/L PBS 液中 4 ℃保存备用。

1.2.4　免疫组化实验　　冰冻切片入 3% H_2O_2 浸泡 15 min 去除内源性过氧化物酶活性。0.01 mol/L PBS 液漂洗 5 min×2 次后, 入 10% 正常山羊血清封闭, 室温孵育 10 min。切片分别与下列单抗 OX_1(1∶50)抗白细胞共同抗原, 单抗 OX_8(1∶200)抗 CD8 抗原, 单抗 W3/25(1∶200)抗 CD4 抗原, 37 ℃孵育 1 h, 4 ℃过夜, 0.01 mol/L PBS 液漂洗 5 min×3 次, 切片入生物素标记的二抗(普通型 S-P 试剂盒, 1∶100)37 ℃孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 液漂洗 5 min×3 次。切片再与辣根过氧化物酶标记的卵白素三抗(普通型 S-P 试剂盒, 1∶100)37 ℃孵育 30 min, 切片继续 0.01 mol/L PBS 液漂洗 5 min×3 次。最后切片经 DAB 试剂显色, 显色的切片经表片、风干、脱水及透明后存放备用。

1.3　统计学处理

穿梭箱实验所得数据作 χ^2 检验。

2　结果

2.1　大鼠认知神经生物学检查分析

与对照组比较, 慢性脑血流灌注不足 2 月及 4 月大鼠学习和记忆能力均下降, 4 月较 2 月更明显, 经统计学处理差异显著, 见表 1, 2, 3。经 CsA 治疗后, 与慢性脑血流灌注不足 2 月及 4 月比较, 学习及记忆能力明显提高, 学习能力提高更显著, 甚至优于对照组。

表 1　大鼠认知功能检测结果(PAR)

Tab 1　Result of cognitive function test in rat (PAR)

Group	Success	Fail
Control	595	605
CCH2	278*	522*
CCH4	246*	454*
TG	717*#△	483*#△

CCH2: 2 months of chronic cerebral hypoperfusion; CCH4: 4 months of chronic cerebral hypoperfusion; TG: Treated group; *: $P<0.001$ *vs* control; #: $P<0.001$ *vs* CCH2; △: $P<0.001$ *vs* CCH4

表 2　大鼠认知功能检测结果(AAR)

Tab 2　Result of cognitive function test in rat(AAR)

Group	Success	Fail
Control	273	927
CCH2	122*	678*
CCH4	61*#	639*
TG	374*#△	826*#△

*: $P<0.001$ *vs* control; #: $P<0.001$ *vs* CCH2; △: $P<0.001$ *vs* CCH4

表 3　大鼠记忆能力检测结果

Tab 3　Result remembrance of test in rat

Group		Success	Fail
PAR	CCH2	575	225
	TG	249*	151*
AAR	CCH2	93	707
	TG	89*	311*

PAR: Passive avoiding reaction; AAR: Active avoiding reaction; *: $P<0.001$ *vs* CCH2

2.2　白细胞免疫组化检测结果

对照组未发现 OX_1 单抗标记的白细胞。脑血流灌注不足 1

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

月后皮层、海马、胼胝体和内囊处均可见白细胞浸润，以皮层、皮层下和海马区显著，在血管周及梗死区明显聚集，见图1，胼胝体和内囊处少见。从脑血流灌注不足1月到4月，上述各区白细胞浸润明显减少。CsA治疗后，在各区仅见少量白细胞。

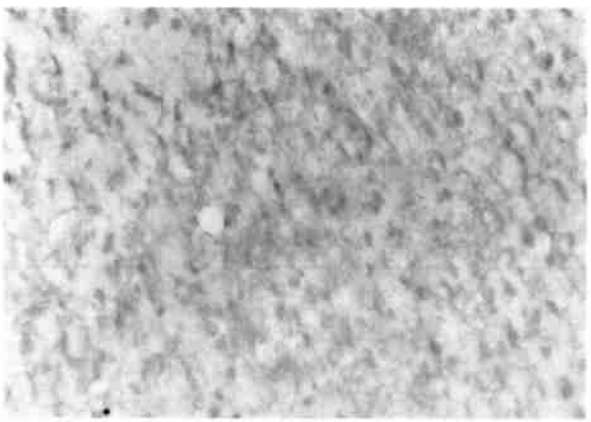


图1 CCH 1月后白细胞在皮层广泛浸润 (S-P× 200)

Fig 1 Extensive leukocyte infiltration in the cortex after 1 month of chronic cerebral hypoperfusion (CCH) (S-P× 200)

2.3 T细胞免疫组化检测结果

对照组未发现OX_8单抗标记的T细胞。脑血流灌注不足1月后皮层、海马、内囊和胼胝体处均见T细胞浸润，以皮层及皮层下为主，在梗死区和血管周聚集。从脑血流灌注不足1月到4月，皮层和海马T细胞的浸润明显减少，而皮层下白质T细胞的浸润却增多，见图2。同时发现，在缺血区活动的T细胞主要为OX_8标记的T细胞，W3/25标记OX_4的T细胞较为少见。CsA治疗后，T细胞在各区的浸润大为减少，见图3。



图2 CCH 4月后T细胞在皮层和皮层下的浸润明显增多 (S-P× 200)

Fig 2 Extensive infiltration of T cell in the cortex and subcortex after 4 months of CCH (S-P× 200)

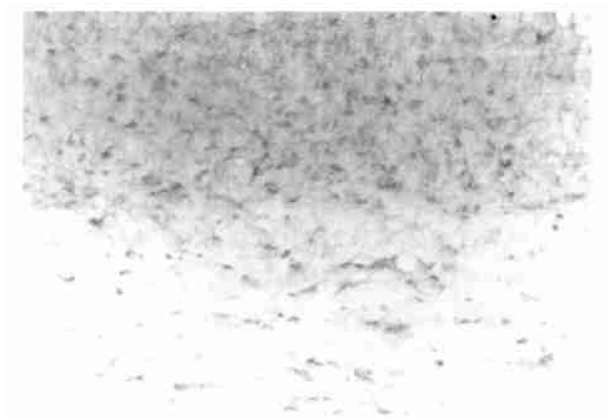


图3 CsA治疗后T细胞在皮层和皮层下的浸润明显减少 (S-P× 200)

Fig 3 Infiltration of T cells markedly reduced in the cortex and subcortex after CsA treatment (S-P× 200)

3 讨论

以认知损害为主要特征的多发梗死性痴呆和Alzheimer's痴呆病人脑血流量明显减低[3]，脑血流量的减少在痴呆的发生、发展中起重要作用。文献[4]报道，大鼠持久性双侧颈总动脉结扎诱导的慢性脑血流灌注不足相应脑区血流量明显减少，并出现神经病理改变。本实验发现大鼠持久性双侧颈总动脉结扎2月后，ARR能力和PAR能力均较对照组明显减退，4月后ARR能力继续下降，提示慢性脑血流灌注不足可导致进行性和长期的学习功能障碍。另外，本实验发现大鼠持久性双侧颈总动脉结扎后2月的记忆能力与对照组相比ARR明显下降，提示慢性脑血流灌注不足2月后可导致记忆能力的减退。在本实验中，大鼠持久性双侧颈总动脉结扎2月后记忆能力测试结果ARR明显下降，甚至较大鼠持久性双侧颈总动脉结扎2月后的学习能力测试时的ARR还要差，但总体回避反应能力较对照组学习能力还好，提示记忆的保留过程尚好，但记忆的提取过程明显受损。

血源性白细胞的浸润是炎性反应的重要标志，在炎症的发生发展和转归中起至关重要的作用。本实验发现，慢性脑血流灌注不足后1月到4月白细胞浸润到整个皮层、白质和海马，白细胞的活动贯穿于整个病理过程中。同时，白细胞在梗死区高度聚集。本实验的另一个发现就是从1月到4月白细胞浸润虽贯穿于整个过程，数量却逐渐下降，尤以白质为明显。可能的解释是慢性脑血流灌注不足脑损害与修复反应并行，随着时间的演进，缺血区微环境得以重建。

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

T 细胞是细胞免疫的主要效应细胞, 正常时脑内无浸润, 只能由具有 MHC 抗原限制的抗原提呈细胞呈递的抗原所诱导。在本实验里, T 细胞广泛出现在皮层、海马和白质处, 特别在梗死区周围聚集。可能是持久性双侧颈总动脉结扎后脑内小胶质细胞被活化并表达 MHC 抗原, 成为抗原提呈细胞, 同时内皮细胞上的免疫粘附分子表达上调, 白细胞、单核细胞、淋巴细胞相继粘附转进或经破坏之血脑屏障入侵缺血区, T 细胞在小胶质细胞和单核吞噬细胞提呈的抗原介导下发挥细胞免疫效应。本实验还发现, 从脑血流灌注不足 1 月到 4 月皮层和海马 T 细胞的浸润程度明显减轻, 但在皮层下白质 T 细胞活动却增多, 提示 T 细胞的活动在慢性脑灌注不足脑损害, 尤其是白质损害中起重要作用。本实验的另一个发现是, 在 T 细胞系中, $CD4^+$ T 细胞极少发现, 浸润的大多是 $CD8^+$ T 细胞。在大鼠, $CD8^+$ 的 T 细胞可代表细胞毒性/抑制性 T 细胞和 NK 细胞。对脑白质损害可能起重作用。而白质等处的脑损害将产生认知功能障碍[5]。因此慢性脑灌注不足免疫细胞的活动促进了认知功能障碍的发生、发展。

CsA 作为一种免疫抑制剂, 被广泛地用于肾移植、类风湿性关节炎及自身免疫疾病的治疗, 疗效肯定。为贴近临床, 本实验采用 CsA 胃灌治疗。经 CsA 治疗后免疫细胞的活动明显减弱, 白细胞和 T 细胞的入侵少见, 经 CsA 治疗后大鼠学习、记忆能力明显提高, 尤其是学习能力的提高更显著, 甚至优于对照组。提示免疫抑制剂 CsA 可明显减轻慢性脑灌注不足后脑内免疫细胞的活动, 防止由这些免疫细胞活动诱发的脑损害, 提高大鼠的认知能力。

参考文献:

[1] 李露斯, 刘之荣, 肖桃元. 大鼠慢性脑血流灌注不足脑内病理组织学和超微结构的变化[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(11): 805－807.

[2] Wakita M D, Tomimoto M D, Akiguchi M D, *et al*. Protective effect of cyclosporin A on white matter change in the rat after chronic cerebral hypoperfusion[J]. Stroke, 1995, 26(6): 1 415－1 422.

[3] Rogers R L, Meyer J S, Mortal K F, *et al*. Decreased cerebral blood flow precedes multi-infarct dementia, but follows senile dementia of Alzheimer type[J]. Neurology, 1986, 36(1): 1－6.

[4] Tsuchiya M, Sako K, Kura S, *et al*. Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats[J]. Exp Brain Res, 1992, 89(1): 87－92.

[5] Jian-Wei Ni, Matsumoto K, Hong-Bin Li, *et al*. Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rat[J]. Brain Res, 1995, 673(2): 290－296.

（编辑　薛国文）

（上接 1041 页）

表 1　5 项检测结果

吸毒方式	检测人数	抗-HIV	抗-HCV	HBsAg	梅毒	ALT
		阳性(%)	阳性(%)	阳性(%)	阳性(%)	>40 单位(%)
静脉注射	16	1(6.25)	9(56.25)	5(31.25)		5(31.25)
肌肉注射	11		6(54.55)		2(18.18)	3(27.27)
烫吸	11		2(18.18)	1(9.10)	1(9.10)	2(18.18)
合计	38	1(2.63)	17(44.74)	6(15.79)	3(7.90)	10(26.32)

3　讨论

有报道我国云南某地区静脉吸毒者中 HIV 感染率为 66.5%, HCV 感染率高达 94.9%[1]。西南地区 HIV 感染主要为吸毒人员, 传播途径为静脉注射毒品[2]。来我院戒毒和治疗的吸毒者 350 名进行抗-HIV 初筛检测发现 1 例阳性者。此患者有多年静脉吸毒史。本次调查结果 HIV 感染人数虽较云南地区阳性率低, 但也显示重庆地区吸毒人员中 HIV 感染状况不容乐观。

造成吸毒者中 HCV 感染因素: 在 17 名抗-HCV 阳性吸毒者中, 15 名以静脉、肌注方式吸毒, 2 名为烫吸方式吸毒。在调查中发现造成 HCV 感染流行, 于吸毒人员合用注射器注射毒品或使用被污染的稀释溶液等因素有关。有报道静脉吸毒者 100%静注时皮肤不消毒, 85.6%注射器不消毒, 55.5%与人合用注射器[3]。因此可以认为吸毒者中 HCV 感染流行与使用毒品的方式有明显的关系。

同其它传染病一样, 预防 HIV 应从三方面入手, 即处理传染源, 切断传播途径, 保护易感人群。目前没有防治 HIV 的特效药, 也没有可靠的疫苗可供使用。因此只的切断传播途径是控制 HIV 的首要措施。广泛的宣传与教育, 针对不同的传播方式制定具体的措施, 以主要人群尤其是青壮年进行教育。严厉打击吸毒、贩毒行为。动员社会各方力量, 共同承担责任。

关键词: 吸毒; 戒毒; HCV; HIV; 感染
中图法分类号: R749.91　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 李大勤, 郑锡文, 张桂云, 等. 云南吸毒人群中 HIV 及 HCV 感染流行状况的研究[J]. 中华流行病学杂志, 1994, 15(2): 74－75.

[2] 郑锡文. 我国艾滋病流行形式及预防与控制成就[J]. 中华流行病学杂志, 1999, 6(20): 132－133.

[3] 叶淑荣, 黄慧俐, 韩德科, 等. 177 例毒瘾者丙肝病毒感染的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 1993, 14(1): 45－46.

（编辑　王　红）

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