

• 实验研究 •

多发梗塞性痴呆大鼠模型的改进与应用*

梅建勋¹ 张云岭² 张伯礼¹

内容提要 **目的**:对多发梗塞性痴呆大鼠模型进行方法学改进,以此模型对健脑益智冲剂进行药效学观察。**方法**:从颈外动脉逆行插管注入血栓栓子造模,观察行为学和病理形态学的影响。**结果**:造模后脑内存在广泛而多发的梗塞灶,学习记忆能力明显下降($P < 0.01$, $P < 0.05$),中药健脑益智冲剂和喜得镇(Hydergine)药物干预后,上述改变得以明显改善。**结论**:此模型是进行多发梗塞性痴呆基础研究和筛选新药的理想模型。

关键词 多发梗塞性痴呆 大鼠模型 学习记忆

Improvement and Application of Multi-Infarct Dementia Model in Rats MEI Jianxun, ZHANG Yunling, ZHANG Boli Tianjin College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193)

Objective: To improve the method of inducing the multi-infarct dementia (MID) model in rats to observe the pharmacodynamic effect of Jiannao Yizhi (JNYZ) granule on MID. **Methods**: Retrograde injection with the homologous embolus through the external carotid artery initiated the multi-infarct dementia in rats. The experiment of behavior and morphology were conducted. **Results**: The extensive and multiple foci of infarction and the obviously declining ability of learning and memory were observed in the model group; the action of JNYZ granule and hydergine could obviously improve them. **Conclusion**: This model is useful to carry out basic research and screen new drugs in treating MID.

Key words multi-infarct dementia, rat model, learning and memory

血管性痴呆(vascular dementia, VD)、多发梗塞性痴呆(multi-infarct dementia, MID)和老年性痴呆(alzheimer's dementia, AD)是60岁以上老年人痴呆的最主要病型。伴随东南亚地区脑血管病的高发,MID的发病率尚有不断增高的趋势,对于本病的深入研究业已得到国内外学者的密切关注。本实验参考Kaneko^[1]与陈俊抛等^[2]方法加以改进制作MID动物模型并进行药物干预,现报告如下。

材料与方法

1 动物及分组 I级Wistar大鼠,10月龄,体重(320±40)g,雌雄各半,由天津医学实验动物中心提供。随机分为空白对照组、假手术组、手术造模组、术前中药组、术后中药组、术后西药组,用以行为学检查,每组各20只;用以病理形态学检查,每组为5、5、10、10、10、10只。

2 药物及试剂 健脑益智冲剂,主要成分:炙黄芪30g 制何首乌15g 川芎10g 女贞子15g 石菖蒲10g 葛根10g等,每袋15g,每克含生药8g,由国家九五项目课题组提供。喜得镇(Hydergine),每片含氢化麦角碱(Dihydroergotoxine)0.1mg,生产批号:971021,由天津华津制药厂与瑞士山德士制药公司合资生产。

3 主要仪器 大鼠跳台、大鼠避暗箱、大鼠Y型水迷宫,由天津市中医医学工程研究所提供;日本Olympus光学显微镜和HITACHI H-600型透射电子显微镜。

4 实验方法

4.1 模型制作及给药方法 模型制作:同种Wistar大鼠左心室内采血,于37℃温箱内干燥,研碎后用200μm筛孔过筛,应用时取血栓栓子1mg加生理盐水0.3ml,摇匀成混悬液。10%水化氯醛按35mg/100g体重腹腔麻醉,颈正中切开皮肤,剥离胸骨舌骨肌、肩胛舌骨肌与胸骨乳突肌,暴露颈总动脉、颈外动脉与颈内动脉,暂时夹闭颈总动脉,于颈外动脉逆行插管注入栓子溶液0.3ml,推注同时开放颈总动脉,使栓

* 本课题为国家九五科技攻关项目(No.96-906-09-03)

1. 天津中医学院(天津 300193);2. 北京中医药大学

子通过颈内动脉进入颅内至大脑各动脉,造成多发性脑梗塞,然后结扎颈外动脉,缝合皮肤。空白对照组:正常喂养,不给任何药物;假手术组:手术方法同模型制作,只在穿刺时以生理盐水 0.3 ml 代替栓子溶液,术后不给任何药物;手术造模组:单纯予以造模,不给任何药物。术前中药组:健脑益智冲剂连续灌胃 10 天,每天 1.2g/kg,每天 1 次,然后造模。术后中药组:造模后中药连续灌胃 10 天,每天 1.2g/kg,每天 1 次。术后西药组:造模后喜得镇连续灌胃 10 天,每天 0.2g/kg,每天 1 次。

4.2 观察项目及检测方法

4.2.1 行为学测验 采用跳台法、Y 型水迷津法,具体参见《药理实验方法学》^[3]。

4.2.2 形态学检查 将大鼠断头处死,迅速取出皮层、海马及丘脑,光镜检查者于卡诺氏液中固定,切片做 HE 和苏木素纤维素染色;电镜检查者于 3%戊二醛中固定,并按电镜常规做修块、锇酸两次固定、梯度酒精两次脱水、包埋、切片、染色,于日立 H-600 透射电镜下观察。

5 统计学方法 数据应用方差分析法进行统计学处理。

结 果

1 行为学检测

1.1 学习成绩 实验中发现,避暗法以记录每鼠从放入明室至暗室遇到电击所需的时间即潜伏期作为所测数值的离散度过大,显示此法过于粗糙,不宜用于观察药物对学习成绩的影响。跳台法与水迷津法所得结果见表 1。模型组的学习成绩较空白对照组和假手术组明显下降,而 3 个用药组可明显提高其学习能力。

表 1 各组动物学习成绩比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	学习成绩	
		跳台法(次)	水迷津法(次)
空白对照	18	1.11 ± 0.75 **	1.00 ± 0.84 **
假手术	18	0.94 ± 0.87 **	1.22 ± 0.75 **
手术造模	18	2.44 ± 1.14	2.61 ± 1.46
术前中药	18	1.05 ± 0.93 **	1.27 ± 0.89 **
术后中药	17	1.58 ± 0.87 *	1.35 ± 1.22 **
术后西药	17	0.50 ± 1.29 *	1.38 ± 1.28 **

注:与手术造模组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

1.2 记忆成绩 应用避暗法、水迷津法测试结果见表 2、3。模型组的短时记忆和长时记忆较空白对照组和假手术组明显下降,3 个用药组则有不同程度的改善。

表 2 各组动物记忆成绩(一次性训练 24h 后)

比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	记忆成绩	
		跳台法(次)	水迷津法(次)
空白对照	18	0.22 ± 0.54 **	0.66 ± 0.68 **
假手术	18	0.44 ± 0.85 **	0.61 ± 0.69 **
手术造模	18	1.88 ± 1.32	2.05 ± 1.25
术前中药	18	0.22 ± 0.64 **	0.61 ± 0.69 **
术后中药	17	0.47 ± 0.79 **	1.11 ± 1.16 **
术后西药	17	0.38 ± 0.69 **	0.83 ± 1.15 **

注:与手术造模组比较,** $P < 0.01$

表 3 跳台法观察各组动物的记忆保持(一次性训练后连续 3d) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	错误动物数[只(%)]		
		1d	2d	3d
空白对照	18	5(27.78) **	6(33.33) ** ^	6(33.33) ** ^ ^
假手术	18	6(33.33) **	6(33.33) ** ^	7(38.89) ** ^
手术造模	18	14(77.78)	15(83.33)	16(88.89)
术前中药	18	6(33.33) **	7(38.89) *	7(38.89) ** ^
术后中药	17	8(47.06)	8(47.06)	9(52.94) *
术后西药	17	8(44.44) *	12(66.67)	14(77.78)

注:与手术造模组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与术后西药组比较,^ $P < 0.05$,^ ^ $P < 0.01$

2 形态学检测

2.1 光镜检测 (1) HE 染色:手术造模组:皮层脑软膜水肿及少部分充血,部分血管腔内见有颗粒状或丝絮状物,皮层小血管腔亦见有上述改变,同时尚可见脑实质水肿及多发软化坏死灶。神经元肿胀变性,部分细胞核呈空泡样或颗粒样变性,染色质稀疏或丢失,有小胶质细胞增生。丘脑、海马部位观察结果同上。术前中药组:皮层软脑膜及实质血管腔内栓子明显减少或不见,有的管腔内见有残留的细颗粒或细丝状遗骸,脑软化及水肿不明显,神经元变性亦不明显,胶质细胞无明显增生。丘脑及海马观察结果基本同上。术后中药组:上述三部位神经元细胞轻度变性,可见软化灶,有胶质细胞增生。术后西药组:上述三部位神经元变性不明显,胶质细胞轻度增生,软化灶明显减少。(2) 苏木素纤维素染色:手术造模组:软脑膜血管及脑实质小血管内多见有呈深蓝染色的血栓。术前中药组:血管腔内血栓可见疏松溶解呈细网状或细颗粒状。术后中药组:血管腔内有栓子存在,但呈粗网状溶解。术后西药组:血管腔内见有栓子,但明显溶解呈细网状及颗粒状。

2.2 电镜检测 手术造模组:神经元细胞高度变性坏死,核染色质丢失并出现髓样小体,线粒体及内质网高度变性,多呈空泡样变,神经纤维变性呈“板状”分离,微血管内见红细胞、血小板及纤维素的凝集,血管内皮收缩变性,血管周边水肿。术前中药组:神经元及

胶质细胞未见明显病变,血管腔内无凝集物,血管内皮无变性收缩。术后中药组:神经元变性,核染色质稀疏,核糖体减少。神经纤维轻度变性,但未见“板状”分离,血管内皮收缩变性,周边轻度水肿。术后西药组:神经元及胶质细胞呈轻度变性,神经纤维亦见轻度变性,但未见“板状”分离,血管内皮无明显收缩变性。

讨 论

自 70 年代以来,陆续出现的大鼠脑缺血模型有几十种⁽⁴⁾,但在病理表现上均与 MID 有一定差异。80 年代以前,有人在较大动物的颅内动脉注入血栓栓子制作栓塞性中风模型⁽⁵⁾,后来此种方法被应用到大鼠上。从颈总动脉注入小于 100 μ m 的同种血栓栓子,造成同侧皮质、海马和深部灰质结构的梗塞⁽⁶⁾,此种方法由于结扎颈总动脉从而阻断了这个脑血供主要动脉的血流。Kaneko 等人的方法⁽¹⁾克服了此缺点,从颈外动脉逆行插管至颈内动脉起始处,推注栓子使之被冲入颈内动脉。形态学观察,应用此法造模,栓子在脑内的分布是广泛的,但大脑中动脉分布区域肯定是被累及的,100%大鼠手术同侧脑部有栓子存在,30%大鼠在手术对侧的脑部有栓子存在。国内学者陈俊抛等根据 Kaneko 方法,采用同种微血栓制作多发脑梗塞性痴呆模型⁽²⁾。

本实验采用 Kaneko 和陈俊抛方法并加以改进,首先在注入栓子的同时,开放颈总动脉,并在不少于 30s 的时间内缓慢注入栓子溶液,使栓子随着血流广泛分布到脑部各个区域,以期更接近临床。另外,减少注入栓子溶液量至 0.3 ml,这两方面保证了造模后(48h 内)死亡率控制在 10%~15%以内。实验发现,快速推注栓子以及加大栓子溶液量都可使死亡率提高。造模后进行的行为学检查结果显示,手术造模组与空白对照组、假手术组比较,学习和记忆成绩均明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);病理形态学检查显示,造模后形成的多发梗塞灶在脑内分布广泛且不对称,梗

塞灶及其周边神经元变性,胶质细胞增生,血管内皮收缩变性,血管腔内可见红细胞、血小板、纤维素凝集。两方面的实验结果表明,本模型与 MID 的临床症状及病理改变有较强的相似性。

本模型也存在着不足:(1)翼突腭动脉是颈内动脉的一个分支,栓子在进入颈内动脉的同时也进入翼突腭动脉,造成颅外梗塞。(2)术后结扎了颈外动脉。实验中发现,造模后有少数大鼠术侧眼睑下垂,但一般在 24h 内即可恢复,而咀嚼及饮水未见明显受碍,分析可能和大鼠有较多的对侧血管吻合支和较强的代偿功能有关。

应用此模型,我们观察了中药复方制剂健脑益智冲剂和西药喜得镇(Hydergine)对于 MID 模型的影响,结果表明:它们均可改善其下降的学习能力($P < 0.01$, $P < 0.05$),且造模前给予健脑益智冲剂不仅可以提高 MID 模型下降的记忆保持力,而且明显优于喜得镇($P < 0.05$),病理形态学检查支持上述结果。这提示我们,利用中医中药防治本病有着一定的优势。

参 考 文 献

1. Kaneko D, Nakamura N, Ogawa T. Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: Development of a new experimental model. *Stroke* 1985;16: 76—84.
2. 陈俊抛,田时雨,于微微,等.多发性脑梗塞痴呆动物模型的研究. *中华神经精神科杂志* 1994;27(5): 311—312.
3. 徐叔云,卞如濂,陈修. *药理实验方法学*. 北京:人民卫生出版社,1982: 473—479.
4. Myron D, Ginsberg N, Raul B. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989;20: 1627—1642.
5. Hill ND. Studies in cerebrovascular disease. VII. Experimental production of cerebral infarction by intracarotid of homologous blood clot. *Mayo Clin Proc* 1955; 30: 625—633.
6. Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, et al. An animal model of cerebral infarction, Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* 1982;13: 505—508.

(收稿:1999-04-06 修回:1999-10-24)