

# 脉络瘀滞型血管性痴呆动物模型研制的实验研究<sup>\*</sup>

★ 万睿 辜尊涛 罗小泉<sup>\*\*</sup> (江西中医学院 南昌 330004)

**摘要:**目的:初步建立了脉络瘀滞型血管性痴呆动物模型,为现代中医药探明血管性痴呆发病机制及合理用药提供符合中医理论的病证结合动物模型。方法:采用脂肪乳灌胃合并脑缺血再灌注制作脉络瘀滞型血管性痴呆动物模型,以 Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力,同时测定各组大鼠脑内 AchE 活性及 MDA 的含量,观察比较该模型与单纯的脑缺血再灌注血管性痴呆动物模型同正常动物之间存在的差异。结果:灌服脂肪乳合并脑缺血再灌注所造的模型较单纯脑缺血再灌注血管性痴呆动物模型可造成更加明显学习记忆障碍,且脑组织中 AchE 及 MDA 的含量明显增高。结论:该模型更符合中医理论,可作为今后中医药研究血管性痴呆的理想模型。

**关键词:**脉络瘀滞;行为学障碍;血管性痴呆;动物模型

中图分类号:R-332 文献标识码:A

## Vascular Dementia Animal Model With Types of Collaterals Siltation and Stagnant: Model Establishment and Experimental Study

WAN Rui, GU Zun-tao, LUO Xiao-quan

Jiangxi University of Chinese Traditional Medicine, 330004

**Abstract:** Objective: To establish vascular dementia animal model with types of collaterals siltation and stagnant, provide the animal model of combination of diseases with differentiation of syndromes which conforms to traditional chinese medicine and find out vascular dementia's pathogenesis and rational administration. Methods: To establish the vascular dementia animal model with types of collaterals siltation and stagnant, the rats were intragastric infused of fat galacta combine with ischemia-reperfusion. Then test the ability of learning and memory of rats by Morris water maze. And determine the intracephalic AcheE's activity and the content of MDA of each rat groups, observe the different between the model and simple ischemia-reperfusion vascular dementia animal model and normal animal. Results: compared with simple ischemia-reperfusion vascular dementia animal model, the model may obviously cause learning memory disorders, and increase the content of rats' intracephalic AcheE and MDA. Conclusion: The model was closer to traditional chinese medicine, and can be seen as a more stable and reliable animal model of vascular dementia.

**Key words:** Collaterals Siltation and Stagnant; vascular dementia; Animal Model

血管性痴呆(VD)是由于脑血管疾病和心血管疾病的原因,因缺血性、缺血性组织缺氧和出血性脑损害所导致的认识丧失的一种慢性、进行性、持续性智能障碍综合征,是老年痴呆最常见的类型之一<sup>[1]</sup>。VD 不仅严重影响患者的生活质量,而且给社会和家庭带来了沉重的经济和心理负担。鉴于目前对其发病机制尚不完全清楚,且缺乏有效的防治

措施。西医对 VD 的治疗目前没有特殊的治疗方法,也没有特效药物,主要针对危险因素(如控制高血压、抗凝治疗、抗血栓治疗、控制胆固醇水平等);或采用胆碱酯酶抑制剂(如他克林、加兰他敏、多奈哌齐等用于 VD 的治疗)和改善脑循环药物(如双轻麦角碱等),但效果均不理想。中医药治疗 VD 能改善症状和缓解病程进展,对智力的改善是不争的事

\* 江西省自然科学基金(20114BAB205072)

\*\* 通讯作者:罗小泉(1966-),男(汉族),江西都昌人,硕士学位,教授,主要从事中药学研究及动物模型的研制工作。

实,它的近期疗效与同类西药接近或优于西药,远期疗效更好。中医学认为VD的主要原因是脉络瘀滞,脑失濡养,是一本虚标实的疾患。据此我们在灌胃脂肪乳升高动物血脂的基础上进行手术,结扎双侧颈总动脉,使脑组织尤其是海马和大脑皮层产生缺血性损害,导致动物智力下降而产生痴呆。本文拟从大鼠的学习记忆能力及脑组织AchE及MDA含量进行比较,旨在建立既符合VD症状又有中医虚痰瘀证候表现的动物模型,为中医药探讨该病的发病机制和治疗打下良好基础。

## 1 材料与仪器

1.1 主要仪器和试剂 UV-1600型分光光度计(北京瑞利公司);Morris水迷宫硬件与视频分析系统(北京天鸣宏远科技发展有限公司);AchE、MDA试剂盒(均购于江苏省南京建成生物工程研究所)。

1.2 实验动物 SPF级雄性SD大鼠60只,体重(180±20)g,由湖南斯莱克实验动物有限公司提供(许可证号:SCXK(湘)2009-0004);动物经适应性喂养4天后采用Morris水迷宫定位航行进行筛选,淘汰学习记忆能力差的大鼠,将合格的动物采用随机数字表随机分成正常假手术组、单纯脑缺血再灌注模型组、高脂+脑缺血再灌注模型组。高脂组每天上午8:00及下午18:00用高脂乳剂按10 ml/kg·d灌胃,非高脂组按同样剂量灌胃纯净水,连续灌胃15天,高脂组待血脂升高后方可进行造模。

1.3 高脂乳剂的配制 按胆固醇10 g、猪油20 g、胆酸钠2 g、甲基硫氧嘧啶1 g、吐温-80 20 ml、丙二醇30 ml,蒸馏水加至100 ml的比例配制。先将猪油加热熔化,后加入胆固醇溶化,再加入胆酸钠和甲基硫氧嘧啶,充分搅匀,最后放入吐温-80、丙二醇和蒸馏水,不断搅拌待全溶后冷却至室温,放入4℃的冰箱保存。用时加温只37℃。

## 2 方法

### 2.1 建立模型

造模两组动物称重标记后按3.5 mg/kg腹腔注射3%戊巴比妥钠进行麻醉,常规固定消毒,小心游离双侧颈总动脉(CCA)备用。两模型组夹闭双侧CCA,5 min后,复灌5 min,连续3次,末次灌注5 min后永久结扎右侧CCA。连续3天腹腔注射青霉素钠1.3万U/100g消炎。第4天以相同的方法进行左侧CCA结扎,常规饲养,术后10天存活有显著学习记忆障碍的大鼠分别为单纯缺血再灌注模型和脉络瘀滞合并再灌注血管性痴呆模型。正常假手术组只切开而不做缺血手术。除去淘汰的不合格鼠及手术死亡的动物,每组15只动物进行实验研究。

### 2.2 学习记忆行为的检测

2.2.1 定位航行测试 将待测大鼠头朝池壁放入Morris水迷宫其中一个象限,记录大鼠找到水下平台的时间(s)。在前几次训练中,如果这个时间超过120 s,则引导大鼠到平台,让大鼠在平台上停留10 s,将大鼠移开并擦干。每只大鼠每天训练4次,两次间隔20 min,连续5天。第6天测试,记录逃避潜伏期(即大鼠从水中到找到平台后四肢爬上站台所需时间)、有效区停留时间及总路程等作为定位航行的检测指标。

2.2.2 空间搜索测试 定位航行测试后的第二天,将平台撤除,开始120 s的探查测试。将大鼠由原先平台象限的对侧放入水中,记录大鼠穿越虚拟平台的次数,有效区停留时间,有效区停留距离等作为空间记忆的检测指标。

### 2.3 AchE活性和MDA含量测定

Morris水迷宫实验结束后,将各组大鼠处死,取脑称重后加9倍重量冰生理盐水制备10%匀浆,离心取上清液,严格按试剂盒说明进行AchE活性和MDA含量测定。

## 3 结果

### 3.1 定位航行测试结果

表1 定位航行测试结果( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	逃避潜伏期/s	有效区停留时间/s	总路程/m
正常假手术组	13.64 ± 6.35	2.56 ± 0.92	410.06 ± 225.06
单纯脑缺血再灌注模型组	50.0 ± 40.23*	2.46 ± 1.86	1668.14 ± 1441.25**
高脂+脑缺血再灌注模型组	92.26 ± 39.9△*	2.48 ± 1.83	2812.16 ± 1520.56△**

注:与正常组相比\* $P < 0.05$ ;与单纯脑缺血再灌注模型组比 $\Delta P < 0.05$ 。

大鼠定位航行的实验结果:由表1可以看出高脂+脑缺血再灌注模型组和单纯脑缺血再灌注模型组在逃避潜伏期时间及总路程同正常假手术组间均存在显著差异( $P < 0.05$ );且高脂+脑缺血再灌注模型组在逃避潜伏期及总路程同单纯脑缺血再灌注模型组间均存在显著差异( $P < 0.05$ );在有效区停留时间上各组并没有显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 3.2 空间搜索测试结果

表2 空间搜索测试结果( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	2min 穿越平台次数	有效区停留时间 /s	有效区停留距离 /m
正常假手术组	3.14 ± 1.77	4.25 ± 1.60	142.89 ± 51.28
单纯脑缺血再灌注模型组	1.38 ± 1.19*	2.61 ± 1.16*	94.24 ± 40.62*
高脂+脑缺血再灌注模型组	0.77 ± 0.54*△	1.89 ± 1.25*	60.28 ± 34.45*

注:与正常组相比\* $P < 0.05$ ;与单纯脑缺血再灌注模型组比 $\Delta P < 0.05$ 。

大鼠空间搜索测试结果:高脂+脑缺血再灌注

模型组和单纯脑缺血再灌注模型组在穿越平台次数( $/2\text{min}^{-1}$ )、有效区停留时间及有效区停留距离同正常假手术组间均具有显著差异( $P < 0.05$ );且高脂+脑缺血再灌注模型组较单纯脑缺血再灌注模型组在穿越平台次数亦存在显著差异( $P < 0.05$ )。

### 3.3 AchE、SOD 活性和 MDA 含量检测结果

表3 各组大鼠 AchE、SOD 活性和 MDA 含量变化( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	AchE /U · mg <sup>-1</sup>	MDA /μmol · mg <sup>-1</sup>
正常假手术组	0.375 ± 0.032	1.544 ± 0.310
单纯脑缺血再灌注模型组	0.658 ± 0.1115 <sup>*</sup>	1.607 ± 0.193
高脂+脑缺血再灌注模型组	0.734 ± 0.05 <sup>*</sup>	1.972 ± 0.158 <sup>*</sup>

注:与正常组相比<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与单纯脑缺血再灌注模型组比 $\Delta P < 0.05$ 。

脑组织 AchE 及 SOD 含量测定结果:大脑组织中每毫克蛋白中 AchE 含量两模型组均高于正常假手术组,且均有显著性差异( $P < 0.05$ );而没毫克蛋白中 MDA 含量仅高脂+脑缺血再灌注模型组同正常假手术组间存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 4 讨论

有关血管性痴呆的动物模型研究非常多,主要有 M 受体阻断剂东莨菪碱致动物学习记忆障碍模型,兴奋性氨基酸基底前脑注射致动物学习记忆障碍模型,正常老年动物模型,颈总动脉缺血再灌注模型以及转基因动物模型等<sup>[2]</sup>。其中以双侧颈总动脉缺血合并再灌注动物模型在现代实验研究中应用最为广泛。

VD 是迄今为止唯一可防治的痴呆,如早期治疗会具有可逆性。近年来,随着中医对 VD 研究的广泛开展和深入,借助动物模型来进行 VD 发病机制及疗效方法的研究已越来越成为一种手段。由于动物模型不能全面反映 VD 的发病机理,现在多从某一方面或几方面着手造模。如何研制比较接近 VD 临床发病病因及证候的动物模型是我们今后努力的方向。中医理论认为痴呆的病因病机在于老年脏腑虚衰,肾精亏虚,脑髓不充,痰瘀阻络。《血证论》曰:“血在上,则浊蔽而不明矣”,痰瘀浊气杂于脑髓,使清窍不清,元神失养,而灵机记性皆失,出现神志迟钝,遇事善忘等症状。肾精亏虚,痰瘀互结,阻滞脉络是 VD 发生的基础;痰瘀蕴积,酿生浊毒,败坏脑络脑髓,是导致 VD 发生发展的关键。据此我们在中医理论的基础上,根据老年人的发病特点,在给大鼠灌胃脂肪乳一段时间待其血脂升高的基础

上合并脑反复缺血再灌注初步建立了脉络瘀滞型 VD 动物模型。这一造模方法既符合血管性痴呆脑组织缺血缺氧的病理变化,同时也符合中医脉络瘀滞的病因。

Morris 水迷宫是目前评价动物学习记忆能力最常用的实验装置,主要包括定位航行实验和空间搜索实验。其中定位航行逃避潜伏期及空间搜索的穿越平台次数作为反映动物学习记忆的主要指标。逃避潜伏期越短及穿越平台次数越多则说明动物的记忆能力越好<sup>[3]</sup>。本实验研究结果表明,高脂+脑缺血再灌注模型组及单纯脑缺血再灌注模型组同正常假手术组相比,其逃避潜伏期的时间和总路程均明显增长,在 2 min 内穿越平台次数、有效区停留时间和距离均显著缩短,在统计学上同正常假手术组存在显著性差异,表明高脂+脑缺血再灌注模型组与单纯脑缺血再灌注模型组均能引起动物的学习记忆能力下降;与此同时,高脂+脑缺血再灌注模型组在逃避潜伏期时间、总路程、2 min 穿越平台的次数及 AchE 较单纯脑缺血再灌注模型组亦存在显著性差异,说明高脂有可能是血管性痴呆发病的一个重要诱因<sup>[4]</sup>。

由以上结果可以看出,相比单纯缺血再灌注血管性痴呆动物模型,灌胃脂肪乳合并缺血再灌注血管性痴呆动物模型更接近 VD 中医临床发病病因和基本病理特征,能更有效地反映动物的学习记忆能力,有利于评价药物对学习记忆过程的作用,不失为研究 VD 的理想动物模型。鉴于该实验仅从动物行为学方面及脑组织 AchE 及 SOD 含量测定做了一些研究,在今后的工作中还需从病理变化及药物反证方面进行更深入的研究。

### 参考文献

- [1] Roman GC. Vascular dementia revisited: diagnosis, pathogenesis, treatment and prevention[J]. Medclin North Am, 2002, 86: 477 - 499.
- [2] 李斌,郭德云,李林. 三种老年痴呆动物模型行为学比较[J]. 中国实验动物学报, 1999, 7(1): 37 - 41.
- [3] 胡镜清,温泽淮,赖世隆. Morris 水迷宫检测记忆属性与方法学初探[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2): 117 - 119.
- [4] 唐启盛,黄启福,郭建文. 高脂血症大鼠脑缺血再灌注诱发行为学障碍动物模型的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 1997, 20(5): 34 - 36.

(收稿日期:2011-09-25)