

- [8] English AW. Cytokines, growth factors and sprouting at the neuromuscular junction. *J Neurocytol*, 2003, 32(5-8): 943-960.
- [9] Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, et al. Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem*, 2005, 280(1): 137-145.
- [10] Hansen SM, Berezin V, Bock E. Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(23): 3809-3821.
- [11] Kiselyov VV. NCAM and the FGF-receptor. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 663(part 1): 67-79.
- [12] Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB, et al. Survival of Schwann cells in chronically denervated skeletal muscles. *Acta Neuropathol*, 2002, 103(6): 565-574.
- [13] Lavdas AA, Franceschini I, Dubois-Dalcq M, et al. Schwann cells genetically engineered to express PSA show enhanced migratory potential without impairment of their myelinating ability in vitro. *Glia*, 2006, 53(8): 868-878.
- [14] Bonfanti L, Theodosis DT. Polysialic acid and activity-dependent synapse remodeling. *Cell Adh Migr*, 2009, 3(1): 43-50.
- [15] Südhof TC, Malenka RC. Understanding synapses: past, present and future. *Neuron*, 2008, 60(3): 469-476.
- [16] Florian C, Foltz J, Norreel JC, et al. Post-training intrahippocampal injection of synthetic poly-alpha-2, 8-sialic acid-neural cell adhesion molecule mimetic peptide improves spatial long-term performance in mice. *Learn Mem*, 2006, 13(3): 335-341.
- [17] Zhang S, Xia YY, Lim HC, et al. NCAM-mediated locomotor recovery from spinal cord contusion injury involves neuroprotection, axon regeneration, and synaptogenesis. *Neurochem Int*, 2010, 56(8): 919-929.
- [18] Paveliev M, Lume M, Velthut A, et al. Neurotrophic factors switch between two signaling pathways that trigger axonal growth. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 15): 2507-2516.
- [19] Murphy JA, Hartwick AT, Rutishauser U, et al. Endogenous polysialylated neural cell adhesion molecule enhances the survival of retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(2): 861-869.
- [20] Mikkonen M, Soininen H, Alafuzof I, et al. Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*, 2001, 12(4): 311-325.
- [21] 王国栋,赵永波. A 型肉毒毒素治疗面肌痉挛、眼睑痉挛疗效观察. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2009, 36(1): 13-15.
- [22] 林涛,王雪峰,曾艳,等. 难治性癫痫患者颞叶新皮质中 NCAM-140 kDa 的表达: 颞叶新皮质的可塑性与难治性癫痫的关系. *中风与神经疾病杂志*, 2008, 25(3): 305-308.

几种模拟临床发病原因血管性认知功能障碍动物模型的研究进展

孟楠 综述 吕佩源 审校

河北省人民医院神经内科,河北省石家庄市 050051

摘要: 血管性认知功能障碍(VCI)是由一系列脑血管疾病,如缺血或出血及急慢性缺氧性脑血管病,导致脑组织损害产生的一种慢性、进行性、持续性智能障碍综合征。本文通过集中介绍能良好模拟临床发病原因的全脑慢性低灌注模型、局灶性低灌注模型、栓塞模型、高血压模型等血管性痴呆动物模型制作方法,并分析各种方法的优缺点,为开展血管性痴呆实验研究者提供参考。

关键词: 血管性认知功能障碍;脑缺血;全脑低灌注;局部灌注不足;栓塞;高血压;动物模型

血管性认知功能障碍(vascular cognitive impairment, VCI)是由一系列脑血管疾病,如缺血或出血

基金项目: 河北省自然科学基金(C2009001483);国家留学人员科技活动择优资助项目(人力资源与社会保障部 2009-11-6)

收稿日期: 2011-12-07; **修回日期:** 2012-03-13

作者简介: 孟楠(1987-),女,在读硕士,主要从事认知障碍相关研究。

通讯作者: 吕佩源(1962-),男,博士,博士生导师,主任医师,教授。主要从事神经内科临床及血管性认知障碍研究工作。

及慢性缺氧性脑血管病,导致脑组织损害产生的一种慢性、进行性、持续性智能障碍综合征。随着脑血管疾病发病率的增加以及年龄的增长,VCI 的发病率逐渐上升。建立理想的 VCI 动物模型对于探明 VCI 的发病机制,开发预防和治疗 VCI 的新药有着重要意义。根据不同病因亦可有不同的研究模型。现以全脑慢性低灌注、局部灌注不足、栓塞、高血压为发病原因所造模型予以综述。

1 全脑慢性低灌注模型

慢性全脑低灌注与临床上血管性认知障碍的发病机制比较接近,对评价慢性缺血研究血管性痴呆提供了更丰富的动物模型。制造慢性的全脑缺血模型方法多种多样,但主要的方法有双侧颈总动脉结扎、三支血管结扎、分阶段四支血管结扎等。

1.1 双侧颈总动脉闭塞法

这是目前在研究血管性认知功能障碍中最常用的模型。将啮齿类动物用 10% 水合氯醛 (400 mg/kg) 腹腔麻醉后,仰卧位,颈部正中切口,在显微镜下分离双侧颈总动脉,行永久性结扎。这种方法可导致脑组织的渐进性损害,使学习记忆损害程序性加重,能较好地模拟人类脑血管病导致的认知功能障碍或痴呆状态^[1]。

有关学者^[2]在大鼠的双侧颈总动脉结扎的模型中,观察到在手术后 7 d, Morris 水迷宫任务中,大鼠的学习和记忆能力受损。术后 4 周,可观察到海马组织有星形胶质细胞密度的增加和 CA1 区细胞的减少,海马的白质组织病理改变包括脱髓鞘、碱性蛋白的减少和小胶质细胞的激活^[3]。在闭塞手术的 12 个月能够观察血管壁纤维组织的增厚^[4]。在经过胆碱和磷酸二酯酶抑制剂——西洛他唑的治疗后,能见到脑白质病变和动物的行为能力障碍得到了明显缓解^[5]。

1.2 三支血管结扎

要想达到更严重的慢性低灌注是通过结扎三支血管,其最原始且常用的方法即为开胸结扎大鼠左锁骨下动脉及其椎动脉分支,同时行双侧颈总动脉结扎,制成慢性脑供血不足的模型。但是此模型所引起的行为学及神经病理学损害更接近于阿尔茨海默病,而与多发性血管梗死性痴呆有所不同,且该方法需要开胸,手术对动物的创伤较大,成功率低。还有方法为利用不开胸的微创手术方法使头臂干和左颈总动脉闭塞, Horecky 等^[6]学者利用这种模型研究了氧化修饰的肌酸激酶系统参与了

血管性认知功能障碍和神经元变性。此种方法国内学者较少用。

1.3 分阶段四支血管结扎

先结扎一侧的颈动脉和对侧椎动脉,7 d 后再结扎另一侧的颈总动脉和椎动脉,即为分阶段四支血管结扎。在几个认知测试中均能观察到受结扎动物显现出自发活动减少^[7]。

2 局灶性低灌注模型

2.1 立体定向注射内皮素-1

通过立体定位仪向动物脑室内注入内皮素,利用其血管收缩作用,可逆性阻断相应血管的血流,从而造成血管支配区的局部脑组织梗死。在动物的单侧纹状体注射,14 d 后即表现出预期的前肢的不对称、运动能力受损等神经功能缺损的表现,对内囊的类似实验也产生了目标梗死^[8]。

该方法的优点:对动物损伤比较小,手术相对简单。其缺点为:该法所致梗死可能与其他方法所致梗死有所不同,是否符合血管性认知功能障碍的发病机制尚有待证实,且药物筛选的实验结果也会有差异。

2.2 大脑中动脉闭塞

1986 年, Koizumi 首次报道不开颅制作大鼠可逆性线栓法致大脑中动脉闭塞模型,由于其具有不开颅,手术创伤小,特别是可进行再灌注且可以准确控制缺血及再灌注时间、与人类局灶性脑缺血的病理状态类似等优点,适用于有关局灶性脑缺血的一系列实验研究,已成为目前应用最为广泛的动物模型^[9]。

在小鼠和大鼠,单侧大脑中动脉闭塞会导致包括皮质、尾状核和皮质下白质区域缺血损害,从而引起对侧肢体感觉及运动障碍^[10]。对其行永久性大脑中动脉闭塞,观察到动物尽管感觉运动功能会有明显恢复,但会导致学习记忆障碍持续数周之久^[11]。而短暂性大脑中动脉闭塞脑损害较轻,仅引起轻度的神经功能缺损。短暂性大脑中动脉闭塞 (90 min 之内) 的大鼠在发病后 3 ~ 15 d 之内旋臂任务会出现错误,21 d 之后会出现一些恢复迹象^[12]。而在 60 min 的短暂性闭塞,可观察到 5 周之后,感觉运动功能已显著恢复,但记忆功能和记忆保持功能尚未改善^[13]。仅部分研究者发现动物的学习功能受损,可能反应出小鼠不同品种之间的脑血管结构不同^[14]。

此类型手术中,我们需注意以下 6 个问题:①

鼠种:目前多选用大脑中动脉变异较小,术后形成的脑梗死体积一致性也较好的 SD 大鼠。②鼠龄:老龄大鼠具有与临床特点相近,但其 MCA 存在迂曲、粥样硬化、管腔狭窄等改变的机率较大,且手术死亡率较高。而青年健壮大鼠的 MCAO 模型在反映病症特点及检验临床药物疗效方面并不令人满意,这还是一个有待探讨的问题。③体重:大鼠的体重以 250 ~ 300 g 之间为宜。这样既考虑了栓线顺利通过的问题,也能避免体重过大者颅内血管增粗,难以完全阻断大脑中动脉的问题。④麻醉剂的选择:本模型采用水合氯醛。至于挥发性麻醉剂乙醚,可作为补充麻醉剂,必要时进行追加麻醉。⑤栓线的选择与处理:栓线直径 0.28 mm,该方案制作的模型成功率高,重复性好,生理指标影响小。⑥手术操作:一般认为插入深度以 (18 ± 0.5) mm 为宜。

3 栓塞模型

3.1 注射栓子

脑栓塞模型是以大鼠、家兔或猴子为实验动物,通过血管内注射悬浮的胆固醇结晶、琼脂糖或塑胶类微球体或者自体血凝块制造认知损害模型。可以见到散在的小梗死灶,或者较大面积的梗死^[15]。

3.1.1 颈内动脉注射微小栓子模型 用生理盐水 0.3 ml 加入同种大鼠血凝块 1 mg 制成混悬液(显微镜下测量直径为 40 ~ 200 μ m),从大鼠双侧颈总动脉推注此混悬液,经颈内动脉进入颅内至大脑各动脉,而造成多灶性脑梗死模型。此方法不需开颅,且缺血效果较好,很好的模拟了临床血栓入脑途径。研究发现,在注入微栓子 15 h 后 82% 的大鼠即出现典型的脑卒中后的症状。由于其能在大脑前动脉和大脑中动脉供血区形成多个梗死灶,且与临床病人所见相似故不少学者认为将其作为 VD 模型较为合适。但是其操作较复杂,梗死部位和梗死灶大小无法预测。

3.1.2 舌下静脉注入铁粉模型 在颅外安置 1100 高斯磁场的小磁铁,吸附从舌下静脉或尾静脉注入的四氧化三铁粉(56.4 mg/kg 溶于 1.5 ml 生理盐水,于 1 min 内注入),使磁铁区域血管栓塞,建立 VCI 动物模型。此法具有操作简便、创伤少、重复性好、较快导致痴呆的优点,而且能够在脑皮质、海马组织中观察到梗死灶和软化灶,较好地模拟血管性认知功能障碍的发病机制。但是注

入的四氧化三铁不但进入脑血管,也停留于其他组织中,从而干扰指标测定结果。

3.1.3 左心室注射液体石蜡模型 将液体石蜡注入大鼠左心室中,产生多发性脑梗死,而造成大鼠多发性脑缺血模型。手术方法相对较简单,避免了颈部手术,此方法与临床病理变化相似。便于护理及多指标观察。

3.2 光活化血栓栓子

动物体内注入光敏染料,在特定波长光的作用下发生光化学反应,引起内皮细胞过氧化,释放自由基,导致内皮损伤,诱发血小板凝聚,血管内血栓形成,即产生局部梗死灶。是一种新的脑缺血动物模型。在 Morris 水迷宫测试中,急性学习功能损害会在血管受损 2 d 后显示出来,但是会在 5 周之内恢复。受损部位主要在大脑皮质,也可位于在海马、纹状体和皮质下白质。功能损害与局部水肿、反应性星形细胞增生、巨噬细胞渗出、程序性坏死和腔隙形成有关^[16]。

该模型的优点:操作简单,损伤性较小,梗死部位明确,重现性好,学习记忆障碍明显,动物存活率高,存活时间长,并且病理改变和超微结构变化与人类血管性痴呆相似。缺点:由于微血管损害和血脑屏障开放早,与人类常见的缺血性脑卒中存在差异,且光敏物质的导入使研究掺入了复杂因素。

4 高血压模型

高血压是脑血管病的持续和独立的危险因素,血压越高,卒中的危险性越大。影像学发现高血压还可以导致广泛的脑白质病变。长期的随访研究解释中年高血压明显增高认知障碍的风险。

4.1 高血压性痴呆的猴子

对短尾猴行手术致胸主动脉狭窄来制造慢性高血压模型。2007 年 Moss 等^[17]对这种模型进行了详细的回顾。术后约 12 个月之内猴子的认知功能下降。除了短期记忆缺失,还表现出注意力(与标准任务不相匹配的延迟)和执行功能障碍(抽象场景变换任务)。认知功能损害与收缩压和舒张压有关。在神经病理方面,最主要的损害是形状不规则的微梗死(直径 < 500 μ m),表现为散布于大脑皮质、脑干和小脑灰质和白质的局部神经胶质增生,尤其是大脑前部的白质区域。微梗死比人类的腔隙性梗死小,而且与小血管疾病无关,可能是穿支动脉的病变。此类损害与啮齿类动物慢性高血压的病变不同,例如自发性高血压的脑卒中大鼠

(stroke prone spontaneously hypertensive rats, SHRSP)。认知功能下降和微梗死的发生率随时间的推移而进展。

4.2 卒中易感性自发性高血压脑大鼠

研究发现,卒中易感性自发性高血压脑大鼠的海马退化性改变和星形胶质细胞的反应类似于认知功能障碍的神经元变性的症状。由此提示,此类大鼠可以作为血管性痴呆的动物模型。

此类大鼠从约 8~9 周龄出现高血压并逐渐进展,约 12 周时形成严重的高血压。正常饮食情况下(非高盐饲养),卒中事件从大约 10 月龄时开始出现^[18]。对此类动物的认知损害数据非常少,在被动回避和 Y 旋臂测试可以见到学习和记忆损害^[19]。位于不同大脑区域(主要是大脑皮质和基底节区),伴有不同面积卒中(主要为自发性出血)损害的 SHRSP,组织病理学改变可见到各种慢性血管病变。

高血压基础上形成反复再灌注模型较符合临床实际情况,这种 VCI 模型的制备,是从模拟人类 VCI 发病的某个侧面来完成的与临床实际情况还有一定的偏离,尚需不断完善。

5 结语

VCI 所致的学习记忆功能障碍是一个极其复杂的病理生理过程,脑血管病和痴呆的关系仍是未解之迷。模拟人类缺血性脑血管病发病过程,建立重复性好、生理指标控制严格、利于病理指标观察的标准化活体缺血动物模型,一直是研究者们所追求的目标,并直接关系到 VCI 动物实验研究的价值及对 VCI 的深入研究。然而目前诸多 VCI 模型尚不成熟,仍需要我们不断深入对 VCI 动物模型的研究,以促进 VCI 的基础理论及临床防治的研究。

参 考 文 献

- [1] 张海宁,孙莉,汤跃宇,等. 脑脉泰对慢性脑缺血致血管性痴呆大鼠脑血流量及海马神经元凋亡的影响. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36(4): 290-293.
- [2] Pappas BA, de la Torre JC, Davidson CM, et al. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. Brain Res, 1996, 708(1-2): 50-58.
- [3] Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, et al. Protective effect of cyclosporin A on hite matter changes in the rat brain after chronic cerebral hypoperfusion. Stroke, 1995, 26(8): 1415-1422.
- [4] De Jong GI, Farkas E, Stienstra CM, et al. Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment. Neuroscience, 1999, 91(1): 203-210.
- [5] Wang J, Zhang HY, Tang XC. Huperzine a improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion. J Neurosci Res, 2010, 88(4): 807-815.
- [6] Horecky J, Baciak L, Kasparova S, et al. Minimally invasive surgical approach for three-vessel occlusion as a model of vascular dementia in the rat-brain bioenergetics assay. J Neurol Sci, 2009, 283(1-2): 178-181.
- [7] Plaschke K, Yun SW, Martin E, et al. Interrelation between cerebral energy metabolism and behaviour in a rat model of permanent brain vessel occlusion. Brain Res, 1999, 830(2): 320-329.
- [8] Lecrux C, McCabe C, Weir CJ, et al. Effects of magnesium treatment in a model of internal capsule lesion in spontaneously hypertensive rats. Stroke, 2008, 39(2): 448-454.
- [9] Xie M, Yi C, Luo X. Glial gap junctional communication involvement in Hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion. Ann Neurol, 2011, 70(1): 121-132.
- [10] Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. Stroke, 1996, 27(9): 1641-1646.
- [11] Yonemori F, Yamaguchi T, Yamada H, et al. Spatial cognitive performance after chronic focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19(5): 483-494.
- [12] Sakai N, Yanai K, Ryu JH, et al. Behavioral studies on rats with transient cerebral ischemia induced by occlusion of the middle cerebral artery. Behav Brain Res, 1996, 77(1-2): 181-188.
- [13] Hattori K, Lee H, Hurn PD, et al. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. Stroke, 2000, 31(8): 1939-1944.
- [14] Gibson CL, Murphy SP. Progesterone enhances functional recovery after middle cerebral artery occlusion in male mice. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(7): 805-813.
- [15] Rapp JH, Pan XM, Neumann M, et al. Microemboli composed of cholesterol crystals disrupt the blood-brain barrier and reduce cognition. Stroke, 2008, 39(8): 2354-2361.
- [16] Alexis NE, Dietrich WD, Green EJ, et al. Nonocclusive common carotid artery thrombosis in the rat results in reversible sensorimotor and cognitive behavioral deficits. Stroke, 1995, 26(12): 2338-2346.
- [17] Moss MB, Jonak E. Cerebrovascular disease and dementia: a primate model of hypertension and cognition. Alzheimers Dement, 2007, 3(2 suppl): S6-S15.
- [18] Hainsworth AH, Markus HS. Do in vivo experimental models reflect human cerebral small vessel disease? A systematic review. J

Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(12): 1877-1891.

[19] Amenta F, Di Tullio MA, Tomassoni D. Arterial hyper-tension and brain damage-evidence from animal models (review). Clin Exp Hypertens, 2003, 25(6): 359-380.

sion and brain damage-evidence from animal models (review). Clin Exp Hypertens, 2003, 25(6): 359-380.

帕金森病的免疫治疗研究进展

杨云鹏 综述 彭国光 审校

重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆市 400016

摘要: 帕金森病的发病机制尚不完全清楚, 目前还没有根本有效的药物治疗。近年来免疫治疗在帕金森疾病的治疗方面显示出良好的前景。免疫治疗主要通过三个方面: 一是 α -突触核蛋白抗体的被动免疫治疗; 二是依赖 T 淋巴细胞的疫苗免疫治疗; 三是核酸疫苗主动免疫治疗。

关键词: 帕金森病; α -突触核蛋白; 核酸疫苗; 免疫治疗

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见于中老年人的进行性中枢神经系统变性疾病。PD 的病因和发病机制尚不完全清楚, 目前还没有根本有效的药物治疗。临床使用的药物治疗只是围绕神经递质多巴胺 (dopamine, DA) 的缺乏进行对症治疗, 还无法针对其病理的主要环节, 延缓或阻止疾病的进展。因此, 探索更加有效的防治 PD 的策略成为不容忽视的问题。PD 的主要病理特点是黑质区出现以异常聚集的 α -突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 为主要成分的路易小体 (Lewy body)。目前普遍认为 α -syn 是 PD 发病机制的核心。 α -syn 的积聚不仅具有神经毒性作用, 对突触功能和信号的传递也有影响, 参与 PD 的发生和发展过程^[1,2]。研究表明 PD 的发生发展与 α -syn 的错误折叠和毒性有关, PD 患者 α -syn 的突变可破坏 α 螺旋结构, 使之形成 β 折叠, 进而聚集并产生具有神经毒性的寡聚体, 最终导致神经变性^[3]。另外, α -syn 基因的致病单核苷酸突变 (A30P、A53T 和 E46K) 的发现对研究 PD 的致病机制具有重要意义^[4,5]。本文就以清除异常聚集的 α -syn 为目标的 PD 免疫治疗研究进展做一综述。

1 α -syn 抗体被动免疫及治疗机制

Zhou 等^[6] 采用 α -syn 高亲和力 scFv 抗体——

D10, 将 D10 scFv 基因转染到过表达野生型 α -syn 的 HEK293 细胞株, 在核定位信号的引导下, 进入细胞内高度表达, 并与野生型 α -syn 单体结合形成稳定可溶性的 α -syn, 从而抑制不溶性的 α -syn 聚集产物出现。只是, 细胞内抗体的研究和检测还仅限于组织培养中。Masliah 等^[7] 用重组人类 α -syn (human α -synuclein, h α -syn) 抗体接种 h α -syn 转基因 PD 小鼠, 产生了 DA 神经元保护作用。接种后产生的高亲和力抗体, 不仅抗体滴度高, 而且可识别 α -syn 的 C 末端表位; 同时发现 h α -syn 抗体可与神经元细胞体、细胞突起及突触胞膜, 形成直径约 0.4 ~ 0.8 μ m 的环状细胞结构并呈 cathepsin D 免疫反应阳性, 提示和 α -syn 反应的 h α -syn 抗体可通过溶酶体途径清除。这些研究表明中枢神经系统循环的 h α -syn 抗体可能识别与神经元细胞膜结合的 α -syn 聚集体, 进而激活溶酶体途径促进异常聚集的 α -syn 清除。此外与神经元细胞表面紧密结合的 h α -syn 抗体还可能通过与细胞表面的某些受体结合, 进而通过胞吞作用进入胞浆, 从而促进 α -syn 的清除降解。

2 依赖 T 淋巴细胞的疫苗免疫治疗

Benner 等^[8] 使用共聚物-1 (copolymer-1, Cop-1) 免疫脾细胞进行过继转移, 进行了疫苗的多巴

基金项目: 重庆市医学科研计划重点项目 (2009-1-58); 重庆市医学科研计划项目 (2011-2-131)

收稿日期: 2011-09-13; 修回日期: 2012-01-08

作者简介: 杨云鹏 (1984-), 男, 住院医师, 在读硕士研究生, 主要从事帕金森病的基础与临床研究。

通讯作者: 彭国光 (1945-), 男, 主任, 教授, 博士生导师, 主要从事帕金森病的基础与临床研究。