结扎颈总动脉复合低氧致 C 57 BL/6 小鼠缺血缺氧性脑病模型的建立及溶栓胶囊的作用

徐　立　宋文婷　任建勋　王光蕊　朱　盛　姚明江　侯金才　刘建勋
（中国中医科学院西苑医院基础医学研究所，中药药理北京市重点实验室，北京，100091）

摘要　目的：通过结扎颈总动脉复合低氧建立 C 57 BL/6 小鼠缺血缺氧性脑病（HIE）的模型，并观察溶栓胶囊的作用。方法：C 57 BL/6 小鼠随机分为假手术组、模型组、溶栓胶囊大、中、小剂量组（400、200、100 mg 生药/kg）。采用左侧颈总动脉结扎并通入氧气和氮气（8∶92）15 min 的方法，建立 C 57 BL/6 小鼠缺血缺氧性脑病模型。在缺血缺氧损伤 24 h 后开始灌胃给药，1 次/d，连续给药 4 周。4 周后观察模型小鼠肌力、学习记忆能力的改变以及脑组织病理形态学变化以及 NSE、MAP-2 和 Caspase-3 的表达。结果：手术后 4 周，缺血缺氧性脑病 C 57 BL/6 小鼠肌力和学习记忆能力显著下降，NSE 和 MAP-2 低表达，Caspase-3 高表达，病理学检查可见神经元细胞排列紊乱，大量变性、坏死及凋亡细胞，另见大片软化灶，血管扩张充血，多量炎性反应细胞浸润。溶栓胶囊对上述指标有明显改善作用。结论：通过结扎颈总动脉合并低氧成功建立了 C 57 BL/6 小鼠缺血缺氧性脑病模型，溶栓胶囊可改善模型小鼠肌力、学习记忆下降等症状，减轻脑组织病理性损伤，其机制可能与其神经保护作用有关。

关键词　缺血缺氧性脑病；模型；肌力；学习记忆；溶栓胶囊

Establishment of C 57 BL/6 Mice of Hypoxic-ischemic Encephalopathy (HIE) Model by Arteria Carotis Communis Ligation Combined with Hypoxia Inhalation and Effects of Rongshuan Capsules

Xu Li, Song Wenting, Ren Jianxun, Wang Guangrui, Zhu Sheng, Yao Mingjiang, Hou Jincai, Liu Jianxun
(*Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica*, *Beijing* 100091, *China*)

Abstract　**Objective**: To establish hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) model on C 57 BL/6 mice by carotid artery ligation and hypoxia inhalation, and to observe the effect of Rongshuan Capsules. **Methods**: C 57 BL/6 mice were randomly divided into 5 groups: sham-operation group, model group, large dosage of Rongshuan Capsules, middle dosage of Rongshuan Capsules, and small dosage of Rongshuan Capsules (400 mg/kg, 200 mg/kg and 100 mg/kg). HIE model mice were established by left carotid artery ligation on C 57 BL/6 mice and hypoxia inhalation (O_2:N_2 = 8∶92) for 15 minutes. Intragastric administration was used on HIE model mice 24 hours after ischemia anoxic damage, 1 time/day and consecutively treated for 4 weeks. After 4 weeks of treatment, muscle strength, ability of learning and memory, NSE, MAP-2 and Caspase-3 expression and the brain tissue pathomorphological changes were tested. **Results**: Four weeks after model establishment, muscle strength and learning and memory ability of HIE model mice were decreased significantly. MAP-2 and NSE expression was down-regulated, and Caspase-3 expression was up-regulated. Pathological examination showed that neurons were arranged in disorders, large amount of degenerated, necrotic and apoptotic cells. Large pieces of softening lesion, expansion and congestion of vessels and inflammatory cell infiltration were also observed. Rongshuan Capsules improved these indexes significantly in drug administration groups. **Conclusion**: Caroted artery ligation with hypoxia successfully established HIE models on C 57 BL/6 mice. Rongshuan Capsules facilitated model mice of muscle strength and learning and memory ability as well as MAP-2 and Caspase-3 expression, release the pathological injury of brain tissues, whose mechanism may be related to its neural protection.

Key Words　Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE); Animal models; Muscle strength; Learning and memory; Rongshuan Capsules

中图分类号：R285.5　　**文献标识码**：A　　**doi**：10.3969/j.issn.1673－7202.2018.01.004

缺血缺氧性脑病（Hypoxic-ischemic Encephalopathy，HIE）是指各种围产期因素引起部分或完全缺氧和脑血流减少或暂停而导致胎儿及新生儿的中枢神经损伤[1]。表现为运动障碍及姿势异常，常伴发

基金项目：国家科技重大专项“重大新药创制”（2017ZX09301018）；国家自然科学基金项目（81603617）
作者简介：徐立（1960.08—），女，大学本科，研究员，研究方向：脑血管药理学研究，E-mail：xuli1230@sina.com
通信作者：刘建勋（1955.03—），男，博士，研究员，研究方向：药理学研究，E-mail：liujx0324@sina.com

智力低下、语言障碍等。该病发病率高,在住院新生儿中仅次于新生儿黄疸和新生儿肺炎,居于第 3 位,其导致的婴幼儿残障给家庭带来痛苦,给社会带来经济负担。目前国内外对 HIE 相关动物模型的研究鲜见系统报道。本研究探索性建立小鼠缺氧缺血恢复期模型,观察该模型小鼠在抓力、学习记忆能力、脑组织病理形态以及相关蛋白的表达等方面的变化,探讨与小儿脑瘫相关的动物模型以及药物治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 C 57 BL/6 小鼠,雄性,18 ~ 22 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2009-0007,合格证号:0234931。

1.1.2 药物 溶栓胶囊,0.25 g/粒,山西中远威药业有限公司生产,实验用其不含赋形剂的中间产品,批号 20110503;异氟烷(吸入麻醉剂),山东科源制药有限公司生产,批号:1012018。

1.1.3 试剂与仪器 二元气,8% 氧气和 92% 氮气,北京千禧京城气体销售中心提供。TB-718 生物组织自动包埋机,TP10202 徕卡全自动组织脱水机,Leica 组织切片机,Nikon 显微镜。小鼠抓力测定仪(YLS-113A),济南益延科技发展有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 脑缺氧缺血恢复期模型的建立,根据文献[2-3]给 C 57 BL/6 小鼠腹腔注射水合氯醛(400 mg/kg)麻醉,颈部正中切口,分开肌肉层,暴露右侧颈总动脉,穿丝线结扎,随即缝合伤口,放入 200 mm × 150 mm × 150 mm 的容器中,通入 8% 氧气和 92% 氮气 15 min 后放回鼠盒中饲养。假手术组(10 只)只切开皮肤后缝合,不结扎颈总动脉及置缺氧环境。第 2 天观察动物行为学,轻提鼠尾,以左肩内收,身体旋转为模型成功,否则弃去不用。将模型成功小鼠随机分组(每组 10 只),模型组,溶栓胶囊 400、200、100 mg/kg 剂量组。

1.2.2 给药方法 手术后 24 h 开设灌胃给药,体积为 20 mL/kg,1 次/d,连续给药 4 周。假手术组和模型组给予等体积生理盐水。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 小鼠抓力测定 给药 4 周后,采用抓力测定仪测定动物的抓力。将动物轻轻放在抓力板上,抓住鼠尾轻轻向后牵拉,待小鼠抓牢抓力板后,均匀用力向后拉,致使动物松爪,仪器自动记录小鼠的最大抓力,重复测定 3 次,取均值。

1.2.3.2 MORRIS 水迷宫测定 水池中放入牛奶,充分混匀至水呈乳色,使小鼠无法通过视觉辨认平台位置。正式试验前,小鼠训练 1 次/d,连续训练 4 d。训练及正式试验期间,迷宫外参照物保持不变。训练日将小鼠面向池壁放入水中,训练其找到平台。训练时间 180 s。180 s 内未找到平台者,将其引至平台,使之站立台上 30 s,产生记忆。第 5 天正式试验,自动录像记录系统记录小鼠 180 s 内找到平台的时间(游泳持续时间)、游泳路径长度,同时确定搜索策略等指标。

1.2.3.3 脑组织镜下观察 给药 4 周后,麻醉动物并打开胸腔,经升主动脉段快速灌注 4 ℃生理盐水,直至剪开的肝脏流出液清亮为止;用 4% 的多聚甲醛灌注固定,断头取脑,将大脑组织置于 4% 的甲醛溶液中固定,24 h 后进行脱水、透明、常规石蜡包埋,制成 5 μm 厚切片。将石蜡切片 HE 染色,光学显微镜观察皮层神经元组织形态学变化并拍照。

1.2.3.4 脑组织免疫组化方法 采用 PV-6000 二步法免疫组化法。每组取 6 只动物切片,随机取 3 个视野,取其平均值。将采集的图像应用 Image-pro Plus 5.1 分析系统进行分析,所得数据作免疫组织化学染色阳性信号累积光密度(IOD),以 IOD 值作为组织表达的定量标准。累积光密度(IOD) = 平均光密度(AHD) × 阳性面积(A)。

1.3 统计学方法 实验结果以均数标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 One-Way ANOVA(单因素方差分析)方法,方差齐性用 Student-Newman-Keuls 检验,方差不齐用 Tamhane′s T2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 HIE 小鼠动物抓力的影响 给药 4 周后,模型组小鼠的抓力下降,与假手术组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较,溶栓胶囊 3 个剂量组小鼠抓力均显著增加 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 对 HIE 小鼠学习记忆能力的影响 造模 4 周后,模型组小鼠学习记忆能力明显降低,与假手术组比较,寻找水迷宫平台时间以及路径长度均明显延长($P < 0.05 \sim 0.01$)。给药 4 周后,与模型组比较,溶栓胶囊 200、400 mg 生药/kg 组小鼠寻找水迷宫平台的时间以及路径长度均明显缩短($P < 0.05$),溶栓胶囊 100 mg 生药/kg 组小鼠寻找平台时间及路径长度均无明显改变。见表 1。

表 1　对 HIE 小鼠抓力和学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$,$n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	抓力(g)	寻找时间(s)	路径长度(mm)
假手术组	—	43.4 ± 10.6	27.05 ± 20.26	273.87 ± 208.28
模型组	—	29.7 ± 6.1 **	98.92 ± 75.48 **	561.66 ± 331.18 *
溶栓胶囊组	100	44.1 ± 20.8 △	70.49 ± 59.76	555.42 ± 364.92
溶栓胶囊组	200	43.9 ± 15.2 △△	45.50 ± 51.59 △	333.01 ± 304.50 △
溶栓胶囊组	400	45.6 ± 11.6 △△	28.55 ± 25.93 △	271.78 ± 252.65 △

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

2.3　脑组织病理形态变化　脑组织 HE 染色可见假手术组皮层为正常神经元组织结构;模型组动物神经元细胞排列紊乱,大量变性、坏死及凋亡细胞,另见大片软化灶;在溶栓胶囊大剂量组(400 mg/kg)中,神经元细胞排列较整齐,细胞变性程度减轻,见少量坏死区域;但仍有小胶质细胞增生,血管扩张充血,炎性反应细胞浸润。见图 1。

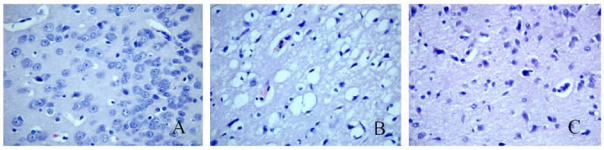

图 1　HIE C 57 BL/6 小鼠神经元病理形态(HE 染色,×400)

注:A 假手术组;B 模型组;C 溶栓胶囊 400 mg 生药/kg 组

2.4　对 HIE 小鼠脑组织 NSE、MAP-2 以及 Caspase-3 表达的影响　免疫组化结果表明,模型组小鼠脑组织 NSE 和 MAP-2 呈低表达,与假手术组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),Caspase-3 呈高表达,与假手术组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$);溶栓胶囊 3 个剂量组小鼠脑组织 NSE 和 MAP-2 表达均高于模型组($P < 0.01$),Caspase-3 表达均低于模型组($P < 0.01$)。见表 2、图 2。

表 2　对 HIE 小鼠脑组织 NSE、MAP-2 及 Caspase-3 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	NSE(IOD 值)	MAP-2(IOD 值)	Caspase-3(个/HP)
假手术组	—	6 332.0 ± 815.2	5 610.2 ± 1 042.9	27.68 ± 3.98
模型组	—	3 650.8 ± 899.7 **	3 219.2 ± 686.6 **	50.50 ± 6.12 **
溶栓胶囊组	100	4 259.8 ± 909.6 △△	3 942.2 ± 830.1 △△	44.37 ± 8.50 △
溶栓胶囊组	200	4 355.6 ± 824.7 △△	4 111.9 ± 954.4 △△	40.70 ± 6.86 △△
溶栓胶囊组	400	6 367.7 ± 636.5 △△	5 436.7 ± 883.3 △△	35.05 ± 5.07 △△

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

3　讨论

脑组织的能量来源几乎全部是有氧糖代谢,而脑内的糖原又很少,脑代谢所需要的葡萄糖和氧全靠脑部充分的血液循环供应。因此在缺氧、脑血流减少或暂停条件下必然导致脑组织的损伤,从而长期影响肢体功能和智力水平。研究认为脑血流量不能满足脑组织的氧需求是新生儿脑损伤的一个主要病理因素[3]。有研究显示,C 57 BL/6 小鼠对脑缺血性损伤具有一定的敏感性,特别是在 CA1 区域[4]。

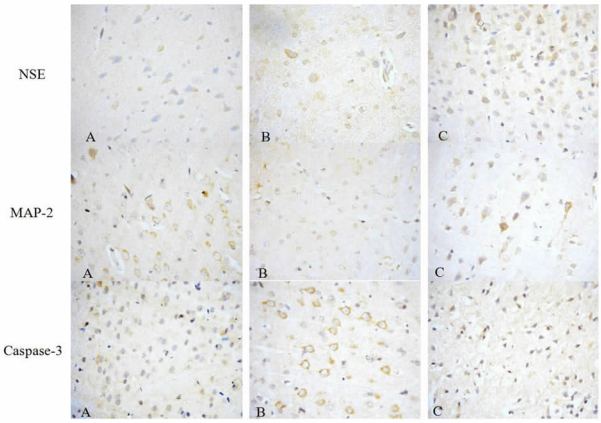

图 2　溶栓胶囊对 HIE 模型小鼠神经元 NSE、MAP-2 及 Caspase-3 表达的影响(HE 染色,×400)

注:A 假手术组;B 模型组;C 溶栓胶囊 400 mg 生药/kg 组

HIE 临床上视缺血缺氧持续时间和程度决定小儿意识、肌张力、反射、惊厥、病程和预后的程度,中度和重度缺血缺氧患儿均可表现为肌张力减弱或松软,预后较差[5],且这个过程是不可逆的,可能导致患儿永久性的智力低下、脑性瘫痪[6]。神经元特异性烯醇化酶(NSE)是糖酵解途径的关键酶,是特异性定位在神经元和神经内分泌细胞胞质内的可溶性蛋白质,占脑内可溶性蛋白质的 1.5%。文献报道,当神经元坏死时,该酶外漏释放于脑脊液;同时由于血脑屏障的开放,因此血清神经元特异性烯醇化酶可升高[7-8]。目前血清或脑脊液中 NSE 不仅是判断 HIE 的一个重要检测指标之一,而且可用于判断 HIE 的轻中重程度以及预后[9-10]。微管相关蛋白 2(MAP-2)主要在神经元胞体和树突表达,是神经元树突静态结构蛋白与细胞内肌动蛋白、神经丝和线粒体共同维持神经结构。在神经发育、分化和可塑性方面起作用,对生长因子、神经递质、合成活动和神经毒性起关键作用[11]。因此 MAP-2 被认为是神经生长和修复相关蛋白,是研究神经再塑的分子标志物。它在脑缺血损伤中呈现出敏锐的敏感性,缺血 3 min 即可表现为表达缺失。Caspase-3 属于白介素 1β 转换酶家族,是涉及细胞凋亡的蛋白酶。它参与了脑缺血后神经元损伤的病理过程,在脑缺血中起重要作用[12]。Caspase-3 介导蛋白酶水解级联过程。当体外培养的神经元被剥夺血清和处于去极化水平的 K^+ 存在的情况下,神经元出现活性 C-JUN 暂时性增加、线粒体膜电位丧失,Caspase-3 蛋白酶激活和出现核凝集、核碎片,最后神经元死亡[13]。

本研究从脑缺血缺氧的病理角度出发,采用颈

总动脉结扎复合通入氧氮二元气的方法建立 C 57 BL/6 小鼠 HIE 模型,并饲养 4 周,检测 HIE 小鼠恢复期的相关指标。研究发现,C 57 BL/6 小鼠在此复合方法的诱导下出现病理性损伤,表现为小鼠肌力下降和学习记忆能力障碍,病理形态显示神经元损伤,NSE 和 MAP-2 低表达,Caspase-3 高表达,证实该模型的检查指标与临床基本符合,制备模型的方法成立。

溶栓胶囊由地龙等提取而成,其功能为清热定惊,活血通络[14]。文献报道该药可改善缺血引起的组织损伤,促进其梗死病灶的修复[15],并能增加脑内血流量和减少其血管阻力[16],改善微循环,对小儿脑瘫症状有明显疗效[17],证实其有改善患儿运动能力,语言能力,生活自理能力,沟通能力以及社交能力,同时促进患儿脑部发育,提高其智力水平的作用[18]。本研究灌胃给药 4 周,观察到溶栓胶囊可明显改善肌力丧失及学习记忆能力障碍,保护 HIE 小鼠神经损伤,其机制可能与增加脑缺血缺氧耐受和脑储备能力有关。

参考文献

[1] Salem N, Jr. , Litman B, Kim HY, et al. Mechanisms of action docosahexaenoic acid in the nervous system[J]. Lipids, 2001, 36: 945-959.

[2] Ten VS, Sosunov SA, Mazer SP, et al. C1q-deficiency is neuroprotective against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice[J]. Stroke, 2005, 36(10): 2244-2250.

[3] Rosenbaum JL, Almli CR, Yundt KD, et al. Higher neonatal cerebral blood flow correlates with worse childhood neurologic outcome[J]. Neurology, 1997, 49(4): 1035-1041.

[4] Yonekura I, Kawahara N, Nakatomi H, et al. A model of global cerebral ischemia in C57 BL/6 mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(2): 151-158.

[5] 雷永彩. 新生儿缺血缺氧性脑病的观察护理[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(73): 220-223.

[6] 刘学敏. 新生儿缺血缺氧性脑病的护理分析与对策[J]. 文摘版: 医药卫生, 2016, 8(2): 124-124.

[7] Zaheer S, Beg M, Rizvi I, et al. Correlation between serum neuron specific enolase and functional neurological outcome in patients of acute ischemic stroke[J]. Ann Indian Acad Neurol, 2013, 16(4): 504-508.

[8] van Munster BC, Korse CM, de Rooij SE, et al. Markers of cerebral damage during delirium in elderly patients with hip fracture[J]. BMC Neurol, 2009, 9: 21.

[9] 王卫平, 毛萌, 李廷玉, 等. 儿科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 107.

[10] 潘惠妮, 吴郁丽, 张成, 等. 神经元特异性烯醇化酶与新生儿缺氧缺血性脑病及脑性瘫痪的相关性[J]. 中国临床康复, 2006, 10(18): 97-100.

[11] 刘正清, 马志健, 刘裕民. 微管相关蛋白 2 与神经元可塑性调节[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(9): 51-54.

[12] 张拥波, 罗勇, 董为伟. Caspase-3 在脑缺血神经元损伤中的作用[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2000, 8(2): 79-81.

[13] Tanabe H, Eguchi Y, Shimizu S, et al . Death2signalling cascade in mouse cerebellar granule neurons. Eur J Neurosci, 1998, 10(4): 1403-1411.

[14] 冯玲玲, 马金保. 溶栓胶囊的研制及临床应用[J]. 中草药, 1997, 28(9): 552-553.

[15] 董闽田, 管兴志, 匡培梓, 等. 溶栓胶囊对单侧颞叶皮质脑梗死大鼠空间认知能力的改善[J]. 临床神经病学杂志, 2002, 15(3): 173-174.

[16] 殷书梅, 储益平, 吴鹏. 地龙活性提取物的主要药效学试验[J]. 中草药, 2002, 33(10): 926-928.

[17] 龙纯, 苏小波, 周训, 等. 溶栓胶囊配合引导式教育在脑瘫患儿的临床运用[J]. 中国医药导报, 2012, 9(8): 28-29.

[18] 谢丽华, 全雪花, 邵小猛, 等. 溶栓胶囊联合针刺、康复训练对脑瘫患儿运动功能和语言功能的影响[J]. 河北医药, 2017, 39(10): 1499-1501.

(2017 - 12 - 20 收稿 责任编辑: 王明)