

侯外方,张茂森,张琳,等. 血管性认知障碍动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(4): 542-552.

Hou WF,Zhang MS,Zhang L, et al. Research progress using animal models of vascular cognitive impairment [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(4): 542-552.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.04.017

血管性认知障碍动物模型的研究进展

侯外方,张茂森,张琳,韩敏,石璇,陈美蓉,栾晶*

(陕西省缺血性心血管疾病重点实验室,陕西省脑疾病重点实验室,西安医学院基础与转化医学研究所,西安 710021)

【摘要】 血管性认知障碍(vascular cognitive impairment,VCI)是近年来医学研究的热点之一,该疾病病因较复杂,临床表现为多认知领域障碍、记忆力受损、以及痴呆等,严重影响患者生存质量。成功建立慢性脑缺血性血管性认知障碍的动物模型,是医学研究其发病机制、提供治疗并攻克此疾病的第一步。经过发展,现存在多种VCI动物建模方法,其中以啮齿类动物居多,针对大鼠有四血管闭塞法(4-vessel occlusion,4-VO)法、改良4-VO法、3期4-VO法、两血管闭塞法(2-vessel occlusion,2-VO)法、改良2-VO法、以及一侧颈总动脉闭塞一侧颈总动脉狭窄改良法(modified common carotid artery occlusion,mCCAO)等;针对小鼠有颈总动脉狭窄(bilateral CCA stenosis,BCAS)和不对称颈动脉手术(asymmetric CCA surgery,ACAS)等。根据所采用的手术建模方法不同,动物在术后的病理损伤部位、损伤程度、生存率、动物行为学表现,都存在一定的差异。本文将对上述8种啮齿鼠类动物血管性痴呆模型的手术构建方法、表型、评价指标、优缺点等进行系统的回顾,以期能够为研究者在相关动物模型的选择上提供一些指导和帮助。

【关键词】 血管性认知障碍;慢性脑缺血;动物模型;血管闭塞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)04-0542-11

Research progress using animal models of vascular cognitive impairment

HOU Waifang, ZHANG Maosen, ZHANG Lin, HAN Min, SHI Xuan, CHEN Meirong, LUAN Jing*

(Shaanxi Key Laboratory of Ischemic Cardiovascular Disease, Institute of Basic and Translational Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Corresponding author: LUAN Jing. E-mail: luanjing666@126.com

【Abstract】 Vascular cognitive impairment (VCI) has been a hot topic in medical research in recent years. The cause of the disease is relatively complex, but the main clinical manifestations are multiple cognitive disorders, impaired short-term memory, and dementia, which seriously affect quality of life. The successful establishment of animal models is an important step in the study of the pathogenesis of VCI and as a means of identifying effective treatment options for patients. Numerous animal models of VCI have been established, of which rodent models are the most widely used. In rats, these include a four-vessel occlusion (4-VO) method, a modified 4-VO method, a three-phase 4-VO method, a two-vessel occlusion (2-VO) method, a modified 2-VO method, a modified common carotid stenosis method, and a one-sided common carotid arterial occlusion method. In mice, these include a common carotid artery stenosis method and an asymmetric common carotid artery surgery method. These surgical modeling method are associated with differing postoperative site of injury, severity of injury, survival rate, and behavior. We will systematically review the surgical method, phenotypes, evaluation, advantages, and disadvantages of the nine listed rodent VCI models. We hope that this

【基金项目】陕西省教育厅重点科学研究计划(20JS136),2019年陕西省大学生创新创业训练计划项目(S201911840008),西安医学院大学生创新训练计划项目(121519032)。

Funded by Shaanxi Provincial Education Department(20JS136),Provincial University Student Innovation and Entrepreneurship Training Programs in 2019(S201911840008),University Student Innovation and Entrepreneurship Training Programs of Xi'an Medical University(121519032).

【作者简介】侯外方(1997—),男,本科,研究方向:脑血管疾病发病机制研究。Email:houwaifang0518@163.com

【通信作者】栾晶,女,博士,讲师,研究方向:自身免疫性疾病的发病机制研究。Email:luanjing666@126.com

will provide some guidance for researchers in the selection of relevant animal models.

[Keywords] vascular cognitive impairment; chronic cerebral ischemia; animal model; vascular occlusion

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

1 血管性认知障碍概述

血管性认知障碍 (vascular cognitive impairment, VCI) 是一个综合症^[1], 致病因素较为复杂, 包含有脑血管病的危险因素, 例如: 高血压病、糖尿病、高脂血症、同型半胱氨酸血症和代谢综合征等^[2-6], 涵盖了显性脑血管病, 例如: 脑梗死和脑出血等^[7] 以及非显性脑血管病如: 白质损伤和慢性脑缺血等^[8-9] 导致的从轻度认知损害到痴呆的临床综合征。它的发病和发展是一个持续的由轻至重的发展过程, 包括非痴呆性 VCI (VCI non-dementia, VCIND) 和血管性痴呆 (vascular dementia, VaD)。血管性认知障碍的病程持续加重会演变为血管性痴呆。尤其在中老年人群中发病较高^[10-13]。VCI 严重损害患者日常生活能力和社会功能, 明显降低患者的生活质量, 已经成为重大的公共卫生问题之一。

值得一提的是, VCI 是除了年龄之外最大的单一可识别的痴呆风险因素, 这意味着由血管疾病导致的痴呆症状或许是最有可能在发病早期发现, 并通过早期干预阻止病程进一步恶化的痴呆^[14-15]。成功建立慢性脑缺血性血管性认知障碍的动物模型, 是医学研究其发病机制、探索治疗方法并攻克此疾病的第一步。现有的研究显示, 脑血流量减少 40% ~ 50%, 脑细胞活动就会受到明显的抑制。在慢性缺血的条件下, 广泛的脑血管病变会导致神经元细胞的不可逆性损伤、脑灰质减少、脑白质损伤、脑脂质稳定性异常、轴突和髓磷脂损伤, 这些的病理变化会影响大脑的电生理活动, 引起中枢神经系统对信息的摄取、传递、整合、处理能力衰退最终影响认知功能造成认知功能障碍^[16-19]。因此, 通过手术法结扎或闭塞重要的脑部大血管, 是模拟 VCI 发病机理, 构建 VCI 模型的较好途径。

2 VCI 动物模型的构建

2.1 大鼠四血管闭塞法及其改良模型

2.1.1 大鼠四血管闭塞法

Pulsinelli 等^[20] 在 1979 年提出的四血管闭塞 (4-vessel occlusion, 4-VO) 法。此手术方法被广泛用于研究脑缺血性认知障碍^[21-24]。

(1) 具体构建方法: 在动物麻醉的前提下进行

手术, 通过电灼法永久闭塞 Wistar 大鼠两个椎动脉, 并在双侧颈总动脉处放置松弛的可逆性卡环, 24 h 后收紧颈动脉卡环暂时闭塞双侧颈总动脉以达到四血管闭塞的目的, 根据研究目的选择在术后间隔 10、20、30 min 解除颈总动脉卡环的闭塞, 实现颈总动脉的血液再流通。

(2) 模型机制: a: 缺血受损: 通过永久性闭塞大鼠双侧椎动脉, 配合间歇性闭塞双侧颈总动脉, 主要导致大鼠前脑大脑半球严重缺血缺氧引起脑神经细胞营养供应障碍以及细胞氧代谢障碍, 引起脑组织神经元细胞坏死, 同时坏死细胞触发炎症反应, 致使白细胞和小胶质细胞活化产生多种炎症介质如: 基质金属蛋白酶 (MMP) 等生成, 最终导致一氧化氮 (NO) 和氧自由基 (ROS) 生成增多导致脑细胞水肿出血和死亡^[25], 与大鼠智能相关的区域受损严重, 而脑干部分几乎不受影响。b: 缺血再灌注损伤: 由于再通双侧颈总动脉致使血液再流通, 引起氧化应激、白细胞浸润、炎症反应过度激活、血脑屏障遭到破坏以及白细胞和补体过度激活共同加重的脑损伤^[26]。

(3) 评价指标: a: 病理学变化: 免疫组织化学结果显示在施行不同时间间隔的颈总动脉再通的 4-VO 手术后, 大鼠脑部不同区域的损伤程度不同, 且损伤程度与缺血时间成正比表现出逐级加重, 损伤涵盖了海马的 HI 区、H3-5 区和旁正中区、后新皮质的第 3、5 和 6 层以及纹状体^[27]。有研究表明 4-VO 术后的动物存在前脑短暂性缺血性不可逆性损伤, 损伤涵盖了脆弱神经元群体, 如海马 CA1 区锥体细胞等也包含在内, 这个大脑区域对学习和记忆至关重要^[28]。b: 认知行为学: 4-VO 大鼠在术后除了记忆功能障碍之外, 还存在感觉运动障碍或者非特异性认知缺陷, 出现有持续的记忆困难^[28], 该手术方法是针对鼠类最初的研究大脑缺血性疾病认知障碍的手术方法。

(4) 模型制作的注意事项: 该手术方案由于需要闭塞大鼠椎动脉, 手术较为精细复杂对于实验操作者具有较高的要求。

(5) 优点: 根据研究目的控制动脉闭塞的时间 (10、20、30 min 解除颈总动脉卡环的闭塞), 间接控制动物脑损伤的程度。

(6) 缺点: 同时闭塞四支主要供应脑部的血管可造成较高的大鼠死亡率, 现今研究已经较少应用。

2.1.2 大鼠四血管闭塞法的第 1 种改良模型

Yamaguchi 团队提出对于 4-VO 法进行改进, 改良版的 4-VO 法也被大量学者沿用^[29]。

(1) 具体构建方法: 在动物麻醉的前提下进行手术, 在手术过程中将 Wistar 大鼠双侧颈总动脉和双侧椎动脉同时夹闭、并间隔一段时间 (10 min 或 30 min) 后将四支血管进行再疏通。

(2) 模型机制: 术后大鼠脑血流量 (cerebral blood flow, CBF) 减少, 同 4-VO 中的病变机制一致。

(3) 评价指标: a: 病理学变化: 在术后 24、48、72 h, 间隔 10 min 再疏通血管实验组中动物 CA1 和 CA3 区, 以及在实验组间隔 30 min 再疏通实验组中动物的 Rb、S1、白质、丘脑、CA1、CA2、CA3 和齿状回都观察到相应细胞的损伤^[29]。b: 神经功能评分: 实验动物存在神经缺陷, 神经功能评分明显下降^[29]。

(4) 模型制作的注意事项: 该手术方案被广泛采用后, 有学者发现无论用 4-VO 还是改良 4-VO 法, 再疏通血管间隔的不同时间、手术中动物脑部处于的不同温度环境、以及术后时间的长短都会影响大脑病变损伤部位和程度^[30-33], 进而, 在研究疾病的过程中, 通过控制上述变量可得到动物的不同病理表现, 使得该手术方案的应用更加广泛。值得一提的是, 4-VO 法和改良 4-VO 法也可被应用于脑缺血和脑缺血性再灌注损伤的相关研究^[34-37], 这也体现了该手术方法适用范围的广泛性。

(5) 优点: 改良的 4VO 手术不影响血气值、血细胞比容、血红蛋白或直肠温度, 也不导致食管或气管损伤或过度出血。根据研究目的控制动脉闭塞的时间、术中脑温度等因素可间接控制动物脑损伤的程度。

(6) 缺点: 手术需同时闭塞四支主要供应脑部的血管, 大鼠因大脑缺血缺氧导致死亡率较高, 该问题目前仍旧没有得到根本性的解决。

2.1.3 大鼠四血管闭塞法的第二种改良模型

Pereira 等^[38] 2012 年通过研究提出了基于 4-VO 方案的另一种新型 Wistar 大鼠的缺血性认知功能障碍的动物模型。

(1) 具体构建方法: 在动物麻醉的前提下进行手术, 通过椎动脉和颈内动脉的永久性闭塞并且按照双侧椎动脉→颈内动脉→颈内动脉的顺序对于

该四条血管进行 3 阶段逐渐闭塞 (4-vessel occlusion/internal carotid artery, 4-VO/ICA), 选择级间间隔 (the interstage interval, ISI) 即一个闭塞阶段和下一个闭塞阶段之间经过的时间分别为 7、5、4 或 3 d。

(2) 模型机制: 术后大鼠出现慢性脑血流量 (cerebral blood flow, CBF) 灌注减少, 同 4-VO 中的病变机制一致, 不同的是术中未再进行血液再灌注, 避免脑部血液再灌注损伤, 且大鼠脑血流量逐渐减少, 大鼠生理指标较稳定。

(3) 评价指标: a: 病理学变化: 实验表明, 海马 CA1 至 CA4 亚区、RS、PtA 皮层中功能正常的锥体细胞, 随着 ISI 的缩短和 4-VO/ICA 术后闭塞血管时间的延长而减少即神经退行性程度增加。该研究团队发现 4-VO/ICA 持续时间增加, 到 90 d, 神经变性的程度仅轻微增加且不显著, 即脑损伤的程度不会出现和持续时间呈正相关的现象。研究还发现神经细胞变性和死亡的发生发展在很大程度上是在 4-VO/ICA 的最初几天内发生的^[38]。b: 认知行为学: 新型 8 臂放射状迷宫实验显示动物出现逆行性遗忘 (健忘症) 且病变程度随着 4-VO/ICA 慢性化程度的增加而增加。

(4) 注意事项: 在使用该模型时, 可根据研究目的选择 ISI 和术后间隔时间。研究提示 ISI 越短动物脑灌注越不足。由于神经细胞变性和死亡的发生发展很大程度上是在最初几天内发生的, 这也提示其他学者, 如果应用该动物模型研究药物在预防永久性 4-VO/ICA 后神经元死亡方面的药效, 那么给药时间要尽可能早 (即在闭塞阶段) 或在 4-VO/ICA 完成后不久开始。

(5) 优点: 该方法避免了因动物眼部的不完全性缺血造成的动物视觉功能障碍而影响迷宫实验中评估学习和记忆的实验数据, 保证了实验数据的可靠性^[38-39]。

(6) 缺点: 因大鼠脑部主要供血的四支血管同时闭塞, 极易造成大鼠因脑部短时间供血不足而死亡。此外, 有研究表明 4-VO 法大鼠的认知障碍只存在于中老年大鼠而对于年轻大鼠无效^[40-41]。

2.2 大鼠两血管闭塞法及其改良模型

2.2.1 大鼠双侧颈总动脉结扎法

双侧颈总动脉结扎法 (bilateral common carotid arteries ligation, 2-VO) 是通过 SD 大鼠双侧颈总动脉永久性结扎的方法, 来研究慢性整体脑血液灌注不

足对于认知功能障碍和神经退行性过程的影响。利用该模型对血管性痴呆 (VD) 的研究涵盖了 2-VO 相关的脑血液灌注不足程度、代谢变化、学习和记忆障碍、神经元信号衰竭、以及海马的神经病理改变等^[42]。因而也被众多学者应用于 VCI 研究。

(1) 具体构建方法: 在动物麻醉的前提下进行手术, 于大鼠的双侧颈总动脉进行同时结扎闭塞, 从而构建大鼠脑部血液灌注不足的模式。

(2) 模型机制: 永久性结扎大鼠双侧颈总动脉, 脑组织处于慢性低灌注状态, 从而产生大脑严重缺血缺氧引起脑神经细胞营养供应障碍以及细胞氧代谢障碍, 引起脑组织神经元细胞坏死, 同时坏死细胞触发炎症反应, 致使白细胞和小胶质细胞活化产生多种炎症介质如: 基质金属蛋白酶 (MMP) 等生成, 最终导致一氧化氮 (NO) 和氧自由基 (ROS) 生成增多导致脑细胞水肿出血和死亡^[25], 脑组织的损害是渐进性的, 学习记忆功能的损害程序性加重。

(3) 评价指标: a: 病理学变化: 由于大脑中的灰质、白质、以及海马对于缺血缺氧都非常的敏感, 故缺血缺氧后常发生灰质、白质、以及海马体损伤和神经元死亡这些病理学改变会引起动物学习和记忆障碍记忆功能下降发生缺血型中风^[43-44]。b: 认知行为学: 4-VO 法构建的大鼠模型表现出持续受损的空间学习能力^[45], 2VO 法可实现相同的表型^[46], 2-VO 法构建的大鼠存在学习和记忆障碍。

(4) 注意事项: 在进行手术的过程中, 结扎动脉时保证实现血管的完全闭塞。

(5) 优点: 由于 2-VO 法术后出现的病理学损伤的病因和其手术操作比 4-VO 法相对简单, 术后动物表现出持续受损的空间学习能力, 与 4-VO 一致。2-VO 随后被认为是大脑缺血后认知障碍病和血管性痴呆 (VD) 的理想模型。该手术方案相对简单, 手术成本也较低。

(6) 缺点: 该模型仍存在不足, 例如因需同时结扎双侧颈总动脉, 动物脑部迅速发生低血流量灌注, 导致较高的死亡率; 此外, 有报道发现 2-VO 术后动物表现出的认知缺陷有部分原因是术后动物眼部的不完全缺血造成视网膜损伤^[47-48], 影响了动物的视觉功能, 混淆了行为学中评估学习和记忆表现的实验数据。

2.2.2 改良大鼠双侧颈总动脉结扎法

随着对血管性痴呆研究的深入, Sarti 等^[49]提出了将大鼠^[50]两侧颈总动脉分别间隔 1 周做两次手

术结扎即改良的 2-VO 法。

(1) 具体构建方法: 在动物麻醉的前提下进行手术, 用结扎线对于大鼠的双侧颈总动脉进行间隔 1 周的结扎闭塞。

(2) 模型机制: 机制同 2-VO 法, 间隔 1 周分两次永久性结扎大鼠双侧颈总动脉, 脑组织处于慢性低灌注状态, 从而产生缺血缺氧性损害, 脑组织的损害是渐进性的, 学习记忆功能的损害程序性加重。

(3) 评价指标: a: 病理学变化: 存在海马 CA1 区神经元出现明显损伤, 白质区也有损伤。b: 认知行为学: Morris 水迷宫等行为学实验结果也验证了相对与假手术组, 实验组大鼠的学习和记忆成绩潜伏期明显延长 ($P < 0.01$)^[51]。以上结果说明改良后的手术方案能够复制大鼠的血管性痴呆的模式, 且显著提高术后动物的成活率。

(4) 注意事项: 在进行大鼠的动脉闭塞过程保证结扎线完全闭塞动脉血管, 实现颈总动脉的完全闭塞。

(5) 优点: 改良 2-VO 手术法避免了同时结扎双侧颈总动脉导致的大鼠脑急速缺血缺氧, 从而降低大鼠死亡率。吴章福等^[51]采取 Sarti 等^[49]提出的设想验证了采用改良的 2-VO 法, 发现在术后大鼠 48 h 和 60 d 的成活率相对于传统的同时结扎双侧颈总动脉 (2-VO) 而言, 有显著的提高: 传统 2-VO 实验组 60 d 的成活率为 40%, 而改良组 60 d 的成活率为 75% ($P < 0.05$)。此外, 该手术操作简单, 手术成本较低。

(6) 缺点: 由于手术分两次进行, 首次手术和二次手术间隔时间为 1 周, 实验周期延长。

2.3 大鼠一侧颈总动脉闭塞一侧颈总动脉的狭窄法。

根据现有的研究, Mansour 团队提出了对于成年 SD 大鼠的一侧颈总动脉闭塞一侧颈总动脉的狭窄模型 (modified common carotid artery occlusion, mCCAO)。

(1) 具体构建方法: 在动物麻醉的前提下进行手术, 用 6-0 号丝线将左侧颈总动脉进行结扎, 同时, 将右侧颈总动脉与动脉和较钝的 29 号针捆绑在一起, 而后抽出针的建模方法, 这种技术保留了该侧动脉的部分血流, 成功构建了一侧颈总动脉闭塞一侧颈总动脉的狭窄 (modified common carotid artery occlusion, mCCAO)。

(2)模型机制:机制同 2-VO 法,脑组织处于慢性低灌注状态,从而产生缺血缺氧性损害。

(3)评价指标:a:影像学:mCCAO 引起中度缺血脑部血流量灌注下降,但是没有脑梗塞,随着时间的推移该模型动物狭窄一侧动脉会出现自发闭塞,动物椎动脉和基底动脉形成了侧支代偿循环,动物 CBF 在进行手术后第 1 周表现出逐渐适量减少,在第 2 周趋向于平稳,然后从第 3 周到第 4 周开始恢复。b:病理学变化:研究显示海马 CA1 亚区受损神经元的百分比在 mCCAO 术后第 4 周约为 30%,在 mCCAO 术后第 8 周约为 23%。由大脑缺血导致的脑白质损伤(WM)约在第 4 周出现并在第 8 周开始出现缓解。c:认知行为学:研究表明动物的脑血流量在第 4 周开始恢复,第 8 周由缺血导致的 WM 损伤有缓解趋势。但大鼠认知障碍在第 8 周仍然存在且有加重的趋势。此外,mCCAO 术后大鼠仅存在空间学习障碍,而无运动功能障碍或出现不活动大鼠^[52]。

(4)注意事项:对大鼠的体重要求严格,手术过程中尽可能的避免损伤血管,在将血管针捆绑而后抽针的过程避免血管的损伤。

(5)优点:可通过不同型号的针构建不同程度的颈总动脉狭窄,因此应用范围较为广泛,手术花费较少。

(6)缺点:此模型的构建更倾向于烟雾病^[53]的病理模型,模型的局限性在于 4 ~ 8 周后脑白质的损伤会得到一定的逆转,这一特点对研究血管性痴呆的治疗效果以及病程进展研究存在干扰,不利于对疾病预防和治疗的进一步探索。此外,该模型有潜在的脑脊液瘘形成。

2.4 小鼠双侧颈总动脉狭窄法(BCAS)

最初针对 VCI 的研究都是以大鼠为实验对象展开的,缺少小鼠的模型。由于 C57BL/6 品系小鼠的后交通动脉存在发育不良,因此有学者通过手术将 0.18 mm 的金属微线圈套在小鼠双侧颈总动脉上,造成小鼠颈总动脉狭窄(bilateral CCA stenosis, BCAS),脑部血液灌注不足、脑组织缺血缺氧的,以此方法成功构建晚期皮质下缺血的血管性痴呆模型。

(1)具体构建方法:选取 C57BL/6J 小鼠在麻醉的前提下进行手术,采用 0.18 mm 的金属微线圈套在小鼠双侧颈总动脉,对于两支颈总动脉进行狭窄化处理。

(2)模型机制:机制同 2-VO 法,因双侧颈总动脉狭窄,脑组织处于慢性低灌注状态,从而产生慢性缺血缺氧性损害。

(3)评价指标:a:病理学变化:经检测,约 30 d 后小鼠出现脑白质损伤,8 个月后在脑白质严重的损伤的前提下,小鼠海马也受到明显的影响发生明显的萎缩和凋亡,这是白质损伤后通过信号调节间接介导海马损伤的结果^[54]。同时研究发现动物的血脑屏障通透性增加。b:认知行为学:实验小鼠表现出空间工作记忆障碍以及运动功能受损(皮质下血管性痴呆的关键特征之一)。

(4)注意事项:该手术很复杂,在手术过程中尤其要注意避免微线圈套入动脉过程中损伤动脉。

(5)优点:动物在术后出现感觉/运动缺陷(即皮质下血管性痴呆的典型特征之一),动物出现的海马病变与人类患者这有相似之处,研究发现实验动物不涉及视神经损伤。

(6)缺点:在术后第 3 个月动物才开始出现感觉/运动缺陷(即皮质下血管性痴呆的典型特征之一)。此外,术后 30 d 里 BCAS 小鼠模型并未出现皮质下 VCI 的其他的如认知障碍和记忆力减退的表型。该手术花费较高,且手术难度高。

2.5 不对称双侧颈总动脉狭窄法(ACAS)

ACAS 模型较成功的复制了伴有梗塞和运动功能障碍的皮质下低灌注型 VCI。

(1)构建方法:不对称颈动脉手术(asymmetric CCA surgery, ACAS),选取 C57BL/6 小鼠在麻醉的前提下进行手术,用金属微线圈套在 C57BL/6J 小鼠的一侧颈总动脉,另一侧颈总动脉采用 Ameroid 环^[55]进行结扎,由此构建具有运动功能障碍和脑白质梗死损伤模型。

(2)模型机制:机制同 2-VO 法,因一侧颈总动脉狭窄,一侧侧颈总动脉渐进性闭塞,脑组织处于慢性渐进性血液低灌注状态,从而产生慢性缺血缺氧性损害

(3)评价指标:a:病理学变化:该模型动物 CBF 下降趋势较平缓,在术后第 14 天和第 32 天可观察到多个白质梗死灶,皮质下的胼胝体、内囊、海马伞和尾状核都存在梗死相关病灶。b:认知行为学:动物表现出明显的认知记忆障碍、执行功能障碍、和运动功能障碍^[56]。

(4)注意事项:该手术需要两种技术较为复杂,在手术过程中尤其要注意避免微线圈套入动脉过

程中损伤动脉。

(5) 优点: 采用 Ameroid 环进行手术实现了对于该侧颈总动脉进行逐渐进行性的狭窄化处理, 更加符合 VCI 的疾病进展。

(6) 缺点: ACAS 小鼠不会发生微血管病理学变化, 这与大多数 VCI 人类的发病机制存在差异^[57]。术后, 微线圈会对动脉血管内皮产生不利影响^[58-59]。该手术难度较高, 且手术成本花费是 BCAS 法的两倍以上。

3 以上不同手术方案的对比

继大鼠 4-VO 法的提出与广泛应用, 针对啮齿类动物 VCI 模型构建方法的改进包括从手术方法(如: 同时结扎 4 支供应脑部的主要血管, 到分批次结扎椎动脉和颈总动脉等)到实验对象(从大鼠到小鼠)的尝试。现对以上几种模型构建方法进行横向比较。

3.1 2-VO 法、4-VO 法、mCCAO 法对比

与 4-VO 法比, 2-VO 法在一定意义上降低了由于同时闭塞四支主要脑部供血的血管而导致的因脑组织急性缺血缺氧造成的高死亡率。此外, 2-VO 的手术操作更简单。

与 2-VO 相比, 4-VO 可根据研究目的控制其他变量, 间接控制动物脑损伤的程度, 因此该方法的应用范围更加的广泛。且 4-VO 术后的动物不存在眼睛的不完全缺血导致视网膜损伤影响动物的视觉功能。

与 2-VO 和 4-VO 相比, mCCAO 法可使狭窄一侧动脉自发闭塞, 血管病理变化更接近脑血管疾病的发生发展机制。然而在术后第 3 周到第 4 周动物脑血流量开始逐渐恢复, 因缺血导致的脑白质损伤(WM)损伤逆转并且出现缓解。此外, mCCAO 法大鼠仅存在空间学习障碍, 该特点对血管性痴呆的治疗效果以及病程进展研究存在缺陷。

3.2 大鼠模型与小鼠模型对比

小鼠模型的构建使得对 VCI 的研究不再仅局限于以往的大鼠研究, 但因小鼠的组织器官更小, 在进行手术时操作难度高于大鼠。小鼠手术方案(ACAS, BCAS)实现了颈总动脉血管逐渐闭塞, 这对于临床上的心脑血管疾病的研究都具有重要的意义。此外, 目前大部分转基因动物为不同品系小

鼠, 如果研究目的涉及特定的基因功能, 需要应用转基因小鼠来进行建模。

大鼠的优势在于术后所出现的认知功能障碍相对小鼠更加明显, BCAS 小鼠模型 30 内并不出现皮质下 VCI 的如认知障碍等表型, ACAS 小鼠不出现微血管病理变化。

3.3 BCAS 法与 ACAS 法对比

传统 VCI 手术方案以大鼠为实验对象, ACAS 和 BCAS 的手术方案将实验对象改为小鼠, 使在该疾病的模式动物研究中有更多选择, 此外, 这样创新性的尝试也有利于发现新的脑缺血缺氧后的病理损伤因素以及认知功能障碍的影响因素。两种手术方案的操作难度相似, ACAS 手术方案以一侧的 Ameroid 环代替 BCAS 手术方案中的金属微线圈, 二者都成功实现了颈总动脉血管逐渐闭塞的效果, 可开展小鼠血管性痴呆的相关机制研究。BCAS 模型的成功建立了晚期的皮质下缺血性血管性痴呆, 但是无出现皮质下 VCI 如认知障碍和记忆力减退等表型。ACAS 动物表现出明显认知记忆障碍、执行功能障碍和运动功能障碍, 但 ACAS 小鼠无微血管病变, 这与大多数人类 VCI 发病机制存在差异。

4 结合研究目标选择最优手术方案

本文归纳总结以上几种手术方案的特点(表 1)及优缺点(表 2)如下:

4.1 4-VO 法及其改良模型

4-VO 以及第一种改良 4-VO 模型是通过 4 血管闭塞(双侧椎动脉以及双侧颈总动脉)而后再灌注血液成功建模。一系列氧化应激反应是缺血再灌注损伤的重要病理生理学机制之一^[60], 有研究表明在 4-VO 术后大鼠出现如肝功能异常、糖尿病等代谢性疾病^[61-62], 因此在研究 VCI 与缺血再灌注损伤相关的机制以及 VCI 与糖尿病相关的研究可以优先考虑 4-VO 法。三种 4-VO 法对应的脑损伤部位存在一定差异, 4-VO 法脑损伤包含了新皮质以及纹状体, 第 1 种改良版的 4-VO 法脑损伤包含了白质和丘脑的损伤, 第 2 种改良版 4-VO 法损伤包含了皮质, 故在此提示研究者在进行 VCI 的机制研究以及药物治疗研究过程中针对损伤部位的不同而对应优选方案。

表 1 常见血管性认知障碍动物模型对比

Table 1 Comparison of common animal models of vascular cognitive impairment

模型 Models	品种品系 Strains	手术部位 Surgical site	机制 Mechanisms	脑损伤部位 Brain injury site	认知行为学 Cognitive behavior
大鼠四血管闭塞法 4-VO in rats	Wistar 大鼠 Wistar rats	双侧椎动脉、双侧颈总动脉 Bilateral vertebral artery (BVA) and bilateral common carotid arteries (BCCA)	脑组织缺血坏死、缺血再灌注损伤 Ischemic necrosis of brain tissue and cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI)	海马、新皮质、纹状体 Hippocampal, neocortex and striatum	记忆功能障碍、感觉运动障碍 Memory dysfunction, sensorimotor disorder
大鼠四血管闭塞法—第一种改良模型 Modified 4-VO in rats	Wistar 大鼠 Wistar rats	双侧椎动脉、双侧颈总动脉 BVA, BCCA	脑组织缺血坏死、缺血再灌注损伤 Ischemic necrosis of brain tissue and CIRI	海马、白质、丘脑 Hippocampal, white matter and thalamus	神经功能下降 Neurological decline
3-阶段四血管闭塞法 3-stage 4-VO in rats	Wistar 大鼠 Wistar rats	双侧椎动脉、双侧颈总动脉 BVA, BCCA	脑组织缺血坏死 Ischemic necrosis of brain tissue	海马、皮层 Hippocampal and cerebral cortex	逆行性遗忘 Retrograde amnesia
两血管闭塞法 2-VO in rats	SD 大鼠 SD rats	双侧颈总动脉 BCCA	脑组织缺血坏死 Ischemic necrosis of brain tissue	灰质、白质、海马体 gray matter, white matter and hippocampal	学习记忆障碍 Dysfunction of learning memory
改良两血管闭塞法 Modified 2-VO in rats	SD 大鼠 SD rats	双侧颈总动脉 BCCA	脑组织缺血坏死 Ischemic necrosis of brain tissue	海马、白质 Hippocampal and white matter	学习记忆障碍 Dysfunction of learning memory
大鼠一侧颈总动脉闭塞—侧颈总动脉的狭窄法 MCCAO in rats	SD 大鼠 SD rats	双侧颈总动脉 BCCA	脑组织缺血坏死 Ischemic necrosis of brain tissue	海马、白质 Hippocampal and white matter	空间学习障碍 Spatial learning disorder
双侧颈总动脉狭窄法 BCAS in mice	C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	双侧颈总动脉 BCCA	脑组织缺血坏死 Ischemic necrosis of brain tissue	白质、海马 White matter and hippocampal	空间工作记忆障碍、运动功能受损 Impairment of spatial working memory and impaired motor function
不对称双侧颈总动脉狭窄法 ACAS in mice	C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	双侧颈总动脉 BCCA	脑组织缺血坏死 Ischemic necrosis of brain tissue	白质、海马 White matter and hippocampal	认知记忆障碍、执行功能障碍、运动功能障碍 Cognitive memory disorder, executive dysfunction and motor dysfunction

4.2 2-VO 法及其改良模型

2-VO 法及其改良模型的机制为脑部缺血性坏死, 2-VO 术后动物还存在灰质损伤, 这也是 2-VO 手术相对改良版 2-VO 存在的优势。所示改良版 2-VO 手术的优点是明显降低术后动物的死亡率。以上提示, 对于单纯性缺血性脑损伤(无缺血再灌注)可以优先考虑 2-VO 手术方案进行建模, 若相关研究涉及灰质损伤则优选 2-VO 法, 若研究仅涉及海马

和白质, 出于术后存活率的考虑, 则优选改良版 2-VO 法进行手术建模。

4.3 mC CAO 法

mC CAO 的发病机制为脑部缺血性坏死, 脑损伤部位包含海马和白质损伤, 该手术方案的优势在于可以对于脑缺血的程度进行一定意义上的控制, 然而在 4 ~ 8 周后动物的白质损伤存在一定程度的自发逆转, 故提示研究者选择该方案时需考虑以上因素。

表 2 常见血管性认知障碍动物模型优缺点比较

Table 2 Summary of advantages and disadvantages of common animal models of vascular cognitive impairment

模型 Models	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
大鼠四血管闭塞法 4-VO in rats	可根据研究目的控制动脉闭塞的时间,间接控制动物脑损伤的程度。 The time of arterial occlusion can be controlled according to the research purpose. Accordingly, the degree of brain injury can be controlled.	阻断脑部供血血管较多,术后动物死亡率较高。 This surgical plan blocked four blood vessels supplying the brain, resulting in higher postoperative animal mortality.
大鼠四血管闭塞法— 第 1 种改良模型 Modified 4-VO in rats	不影响血气值、血细胞比容、血红蛋白或直肠温度,也不导致食管或气管损伤或过度出血;根据研究目的控制其他变量,间接控制动物脑损伤的程度。 Blood gas values, hematocrit, hemoglobin, or rectal temperature are not affected. Moreover, esophageal or tracheal injury or excessive bleeding doesn't occur. The degree of brain damage in animals can be controlled according to the purpose of the research.	阻断脑部供血血管较多,术后动物死亡率较高。 This surgical plan blocked four blood vessels supplying the brain, resulting in higher postoperative animal mortality.
3-阶段四血管闭塞法 3-stage 4-VO in rats	避免了因动物眼部的不完全性缺血造成的动物视觉功能障碍进而影响迷宫实验中评估学习和记忆的实验数据。 The animal visual dysfunction caused by the incomplete ischemia of the animal's eye is avoided. The experimental data for evaluating learning and memory in maze experiments are more reliable.	阻断脑部供血血管较多,术后动物死亡率较高;4-VO 法大鼠的认知障碍只存在于中老年大鼠而对于年轻大鼠无效。 This surgical plan blocked four blood vessels supplying the brain, resulting in higher postoperative animal mortality. The cognitive impairment of rats in the 4-VO method only exists in middle-aged and old rats, but not effective in young rats.
两血管闭塞法 2-VO in rats	手术操作相对简单,花费较少;术后动物表现出持续受损的空间学习能力,与 4-VO 一致。 The surgery is relatively simple, and the cost of the surgery is low. Moreover, the postoperative animals show continuous impaired spatial learning ability, which is consistent with 4-VO.	同时结扎双侧颈总动脉,动物脑部迅速发生低血流量灌注,死亡率较高; 术后动物眼部的不完全缺血造成视网膜损伤影响行为学实验的准确性。 The BCCA need to be ligated at the same time, and animal brains will quickly undergo low blood flow perfusion, resulting in higher mortality. Moreover, the retinal injury caused by incomplete ischemia in the eyes of postoperative animals will affect the accuracy of behavioral experimental results.
改良两血管闭塞法 Modified 2-VO in rats	手术简单、花费较少;术后大鼠死亡率明显降低。 The surgery is relatively simple, and the cost of the surgery is low. Moreover, the mortality of rats after operation is significantly reduced.	两次手术存在间隔时间,实验周期延长。 There is an interval between the two operations, so the experiment period is prolonged.
大鼠一侧颈总动脉闭塞— 一侧颈总动脉的狭窄法 MCCAO in rats	根据研究目的控制动脉闭塞的程度,间接控制动物脑损伤。 The degree of arterial occlusion can be controlled according to the research purpose. Accordingly, the degree of brain injury can be controlled.	4 ~ 8 周后脑白质的损伤存在一定的逆转,不利于研究 VCI 的治疗效果以及病程进展。 After 4~8 weeks, there exists a certain reversal of the white matter damage, which is not conducive to the study.
双侧颈总动脉狭窄法 BCAS in mice	术后动物出现感觉/运动缺陷;表现出的海马病变与人类患者相似;不涉及视神经损伤。 Sensory deficits or motor deficits are shown in postoperative animals. The hippocampal lesions are similar to those of human patients. Moreover, no optic nerve damage is involved.	感觉/运动缺陷出现时间较晚;术后 30 d 里 BCAS 小鼠并未出现皮质下病变相关的其他表型;微线圈会对动脉血管内皮产生不利影响;手术难度高、花费大。 The phenotype of sensory or motor deficit appears late. BCAS mice do not develop other phenotypes related to subcortical lesions in 30 d after surgery. Micro-coils adversely affect the endothelium of arteries. Moreover, the surgery was difficult and expensive.
不对称双侧颈动脉狭窄法 ACAS in mice	实现颈总动脉进行性的狭窄,更加符合 VCI 的疾病进展。 Progressive stenosis of the common carotid artery can be achieved, which is more in line with the disease progression of VCI.	ACAS 小鼠不会发生微血管病理学变化;使用微线圈会对动脉血管内皮产生不利影响。手术难度高花费大。 No micro-vascular pathology changes are observed in ACAS mice. Micro-coils adversely affect the endothelium of arteries. Moreover, the surgery was difficult and expensive.

4.4 BCAS 以及 SCAS

C57BL/6 品系小鼠的后交通动脉发育不良,这与大鼠的解剖结构存在明显差异,这也提示构建小鼠 VCI 模型对于该疾病研究具有重要意义。BCAS 和 ACAS 小鼠模型的发病机制为脑部缺血性坏死,BCAS 模型术后小鼠出现感觉/运动缺陷(即皮质下血管性痴呆的典型特征之一),ACAS 满足颈总动脉进行逐渐进行性的狭窄化,更符合人类 VCI 的发病过程。由此提示广大研究者,尤其是对 VCI 的疾病的治疗以及病程病理研究感兴趣的学者,在经费充足的前提下可优先选择 ACAS 和 BCAS 方案。

5 总结

啮齿类动物的脑白质较少,这与人类大脑的结构表现出的明显的差异性,该特点限制了动物模型在探索人类 VCI 疾病机制的应用。VCI 病因复杂,迄今还未有能够完全复制人类 VCI 所有特征的动物模型出现。然而在此综述的 8 种模型对于研究 VCI 疾病的发生发展以及药物治疗及预防都具有一定的积极意义,是现今应用较为广泛的 VCI 动物模型。以上动物模型针对模型构建方法不同,实验动物发生的病理损伤也存在差异,研究人员需根据研究目和需求谨慎选择造模方法和手术方案,并在手术过程中注意避免感染、动物麻醉过度等现象,此外,动物伦理相关事项也需注意,在实验观察终点对需实验动物进行安乐死。

参 考 文 献(References)

[1] O'Brien JT, Erkinjuntti T, Reisberg B, et al. Vascular cognitive impairment [J]. *Lancet Neurol*, 2003, 2(2): 89-98.

[2] Brundel M, Kappelle LJ, Biessels GJ. Brain imaging in type 2 diabetes [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014, 24(12): 1967-1981.

[3] Reijmer YD, van den Berg E, Ruis C, et al. Cognitive dysfunction in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2010, 26(7): 507-519.

[4] van den Berg E, Dekker JM, Nijpels G, et al. Blood pressure levels in pre-diabetic stages are associated with worse cognitive functioning in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2009, 25(7): 657-664.

[5] Sudduth TL, Weekman EM, Price BR, et al. Time-course of glial changes in the hyperhomocysteinemia model of vascular cognitive impairment and dementia (VCID) [J]. *Neuroscience*, 2017, 341: 42-51.

[6] Yaffe K. Metabolic syndrome and cognitive decline [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4(2): 123-126.

[7] Calabrese V, Giordano J, Signorile A, et al. Major pathogenic

mechanisms in vascular dementia: Roles of cellular stress response and hormesis in neuroprotection [J]. *J Neurosci Res*, 2016, 94(12): 1588-1603.

[8] Yang T, Zhang F. Targeting transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) for the intervention of vascular cognitive impairment and dementia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(1): 97-116.

[9] He J, Huang Y, Du G, et al. Lasting spatial learning and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion are associated with hippocampal mitochondrial aging in rats [J]. *Neuroscience*, 2019, 415: 215-229.

[10] Suda S, Nishimura T, Ishiwata A, et al. Early cognitive impairment after minor stroke: associated factors and functional outcome [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29(5): 104749.

[11] Li X, Ma X, Lin J, et al. Severe carotid artery stenosis evaluated by ultrasound is associated with post stroke vascular cognitive impairment [J]. *Brain Behav*, 2016, 7(1): e00606.

[12] Li HB, Liang WB, Zhou L. The experimental research on neuroplasticity in rats' hippocampus subjected to chronic cerebral hypoperfusion and interfered by Modified Dioscorea Pills [J]. *Heliyon*, 2020, 6(1): e2897.

[13] Wang DP, Yin H, Kang K, et al. The potential protective effects of cannabinoid receptor agonist WIN55, 212-2 on cognitive dysfunction is associated with the suppression of autophagy and inflammation in an experimental model of vascular dementia [J]. *Psychiatry Res*, 2018, 267: 281-288.

[14] Chaaya M, Phung TK, El AK, et al. Validation of the Arabic Rowland Universal Dementia Assessment Scale (A-RUDAS) in elderly with mild and moderate dementia [J]. *Aging Ment Health*, 2016, 20(8): 880-887.

[15] Azarpazhooh MR, Hachinski V. Vascular cognitive impairment: a preventable component of dementia [J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 377-391.

[16] 王丽晔, 陈志刚, 罗玉敏. 动物慢性脑缺血模型的研究现状 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(4): 67-73.

Wang LY, Chen ZG, Luo YM, et al. Current research status on animal models of chronic cerebral ischemia [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24(4): 67-73.

[17] Jellinger KA. Pathogenesis and treatment of vascular cognitive impairment [J]. *Neurodegener Dis Manag*, 2014, 4(6): 471-490.

[18] Severiano DLR, Oliveira-Lima OC, Vasconcelos GA, et al. Cerebral lipid dynamics in chronic cerebral hypoperfusion model by DESI-MS imaging [J]. *Neuroscience*, 2020, 426: 1-12.

[19] Chen BH, Park JH, Lee YL, et al. Melatonin improves vascular cognitive impairment induced by ischemic stroke by remyelination via activation of ERK1/2 signaling and restoration of glutamatergic synapses in the gerbil hippocampus [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 687-697.

[20] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267-272.

- [21] Kim YO, Kim HJ, Abu-Taweel GM, et al. Neuroprotective and therapeutic effect of *Cordyceps militaris* on ischemia-induced neuronal death and cognitive impairments [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(7): 1352–1357.
- [22] Chu K, Yin B, Wang J, et al. Inhibition of P2X7 receptor ameliorates transient global cerebral ischemia/reperfusion injury via modulating inflammatory responses in the rat hippocampus [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 69.
- [23] Zhao YN, Li JM, Chen CX, et al. Effect on intensity of treadmill running on learning, memory and expressions of cell cycle-related proteins in rats with cerebral ischemia [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 40633–40642.
- [24] Kim YO, Kim HJ, Abu-Taweel GM, et al. Neuroprotective and therapeutic effect of *Cordyceps militaris* on ischemia-induced neuronal death and cognitive impairments [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(7): 1352–1357.
- [25] Kawabori M, Yenari MA. Inflammatory responses in brain ischemia [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(10): 1258–1277.
- [26] Lin L, Wang X, Yu Z. Ischemia-reperfusion injury in the brain: mechanisms and potential therapeutic strategies [J]. *Biochem Pharmacol (Los Angel)*, 2016, 5(4): 213.
- [27] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267–272.
- [28] Volpe BT, Pulsinelli WA, Tribuna J, et al. Behavioral performance of rats following transient forebrain ischemia [J]. *Stroke*, 1984, 15(3): 558–562.
- [29] Yamaguchi M, Calvert JW, Kusaka G, et al. One-stage anterior approach for four-vessel occlusion in rat [J]. *Stroke*, 2005, 36(10): 2212–2214.
- [30] Green EJ, Dietrich WD, Van DF, et al. Protective effects of brain hypothermia on behavior and histopathology following global cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 1992, 580(1–2): 197–204.
- [31] Modo M, Sowinski P, Hodges H. Conditional discrimination learning in rats with global ischaemic brain damage [J]. *Behav Brain Res*, 2000, 111(1–2): 213–221.
- [32] Robison PM, Clemens JA, Smalstig EB, et al. Decrease in amyloid precursor protein precedes hippocampal degeneration in rat brain following transient global ischemia [J]. *Brain Res*, 1993, 608(2): 334–337.
- [33] Sadelli K, Stamegna JC, Girard SD, et al. Global cerebral ischemia in rats leads to amnesia due to selective neuronal death followed by astroglial scar formation in the CA1 layer [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2017, 141: 168–178.
- [34] Nejad KH, Gharib-Naseri MK, Sarkaki A, et al. Effects of ellagic acid pretreatment on renal functions disturbances induced by global cerebral ischemic-reperfusion in rat [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(1): 75–82.
- [35] Liu M, Shen J, Zou F, et al. Effect of ulinastatin on the permeability of the blood-brain barrier on rats with global cerebral ischemia/reperfusion injury as assessed by MRI [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 412–417.
- [36] Wei R, Wang J, Xu Y, et al. Probenecid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting lysosomal and inflammatory damage in rats [J]. *Neuroscience*, 2015, 301: 168–177.
- [37] Wang Y, Fu W, Zhang S, et al. CXCR-7 receptor promotes SDF-1 α -induced migration of bone marrow mesenchymal stem cells in the transient cerebral ischemia/reperfusion rat hippocampus [J]. *Brain Res*, 2014, 1575: 78–86.
- [38] Pereira FM, Ferreira ED, de Oliveira RM, et al. Time-course of neurodegeneration and memory impairment following the 4-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats [J]. *Behav Brain Res*, 2012, 229(2): 340–348.
- [39] Ferreira ED, Romanini CV, Mori MA, et al. Middle-aged, but not young, rats develop cognitive impairment and cortical neurodegeneration following the four-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Eur J Neurosci*. 2011, 34(7): 1131–1140.
- [40] Ancer RJ, Villarreal-Silva EE, Salazar-Ybarra RA, et al. Four-vessel occlusion model using aged male Wistar rats: a reliable model to resolve the discrepancy related to age in cerebral ischemia research [J]. *Anat Sci Int*, 2016, 91(3): 226–237.
- [41] Valério Romanini C, Dias Fiuza Ferreira E, Correia Bacarin C, et al. Neurohistological and behavioral changes following the four-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion: comparison between normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 252: 214–221.
- [42] Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1): 162–180.
- [43] Liang S, Zhang J, Zhang Q, et al. Longitudinal tracing of white matter integrity on diffusion tensor imaging in the chronic cerebral ischemia and acute cerebral ischemia [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 154: 135–141.
- [44] Yang L, Zhao H, Cui H. Treatment and new progress of neonatal hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Histol Histopathol*, 2020, 35(9): 929–936.
- [45] Samson ML, Kajitani K, Robertson GS. Nitric-oxide synthase mediates the ability of darbepoetin alfa to attenuate pre-existing spatial working memory deficits in rats subjected to transient global ischemia [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 333(2): 437–444.
- [46] Jaspers RM, Block F, Heim C, et al. Spatial learning is affected by transient occlusion of common carotid arteries (2VO): comparison of behavioural and histopathological changes after ‘2VO’ and ‘four-vessel-occlusion’ in rats [J]. *Neurosci Lett*, 1990, 117(1–2): 149–153.
- [47] Osborne NN, Safa R, Nash MS. Photoreceptors are preferentially affected in the rat retina following permanent occlusion of the carotid arteries [J]. *Vision Res*, 1999, 39(24): 3995–4002.

- [48] Tian XS, Guo XJ, Ruan Z, et al. Long-term vision and non-vision dominant behavioral deficits in the 2-VO rats are accompanied by time and regional glial activation in the white matter [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101120.
- [49] Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, et al. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models [J]. *J Neurol Sci*, 2002, 15: 203–204, 263–266.
- [50] 刘华, 刘月美, 关芮, 等. 颈总动脉穿刺法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(4): 399–402.
- Liu H, Liu YM, Guan R, et al. A modified method for common carotid artery puncture in the establishment of a rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2016, 24(4): 399–402.
- [51] 吴章福, 高晓平, 李光武. 改良双侧颈总动脉结扎法与传统法制备的大鼠慢性脑缺血模型比较 [J]. *中国康复医学杂志*, 2012, 27(3): 206–210.
- Wu ZF, Gao XP, Li GW. A comparison of modified bilateral common carotid arteries ligation method with standard method in establishing rats' chronic cerebral hypoperfusion models [J]. *Chin J Rehabil Med*, 2012, 27(3): 206–210.
- [52] Mansour A, Niizuma K, Rashad S, et al. A refined model of chronic cerebral hypoperfusion resulting in cognitive impairment and a low mortality rate in rats [J]. *J Neurosurg*, 2018, 131(3): 892–902.
- [53] Kuroda S, Houkin K. Moyamoya disease: current concepts and future perspectives [J]. *Lancet Neurol*, 2008, 7(11): 1056–1066.
- [54] Zhang T, Gu J, Wu L, et al. Neuroprotective and axonal outgrowth-promoting effects of tetramethylpyrazine nitron in chronic cerebral hypoperfusion rats and primary hippocampal neurons exposed to hypoxia [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 118: 137–147.
- [55] Anderson TS, Rance GA, Jiang L, et al. Changes in chemical and ultrastructural composition of amyloid constrictors following *in vitro* expansion [J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e207471.
- [56] Washida K, Hattori Y, Ihara M. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: from mouse to primate [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6176.
- [57] Arismendi MG, Fernandez AM. Ultrastructural cutaneous microvascular pathology of young adults aged up to 50 years with chronic kidney disease and vascular cognitive impairment [J]. *Ultrastruct Pathol*, 2010, 34(4): 214–218.
- [58] Matin N, Fisher C, Jackson WF, et al. Carotid artery stenosis in hypertensive rats impairs dilatory pathways in parenchymal arterioles [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 314(1): H122–H130.
- [59] Matin N, Fisher C, Jackson WF, et al. Bilateral common carotid artery stenosis in normotensive rats impairs endothelium-dependent dilation of parenchymal arterioles [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(10): H1321–H1329.
- [60] Godinho J, de Sa-Nakanishi AB, Moreira LS, et al. Ethyl-acetate fraction of *Trichilia catigua* protects against oxidative stress and neuroinflammation after cerebral ischemia/reperfusion [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 221: 109–118.
- [61] Zorzenon MRT, Santiago AN, Mori MA, et al. Cannabidiol improves metabolic dysfunction in middle-aged diabetic rats submitted to a chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 312: 108819.
- [62] Sá-Nakanishi AB, de Oliveira MC, O Pateis V, et al. Glycemic homeostasis and hepatic metabolism are modified in rats with global cerebral ischemia [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(12): 165934.

[收稿日期] 2020-11-23