



BCAS双侧颈总动脉狭窄模型构建

高晨阳 2022.5.26

BCAS动物模型



双侧颈总动脉狭窄 (Bilateral common carotid artery stenosis,
BCAS)

通过线圈造成的双侧颈总动脉管腔狭窄而引起大脑慢性低灌注损伤。

是模拟血管认知障碍和脑小血管病疾病的良好动物模型。制作容易，
重复性好，能够模拟CVSD患者的部分病理特征和认知障碍。

制备方法



1. 实验材料：内径0.18mm线圈，显微镊2把，手术剪2把，手术颤1把，维纳斯剪1把，碘伏或70%乙醇溶液，5%水合氯醛，丝线，正置显微镜，雄性小鼠C57BL6（8-10周）

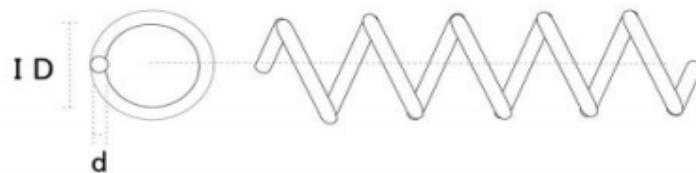
2. 模型诱导步骤

1) 小鼠称重，诱导麻醉采用3%异氟烷，气体流量1000cc/min；维持麻醉2%异氟烷，气体流量1000cc/min。将其固定于显微操作手术台上，使用体温维持仪保持其直肠温度（37±0.5）℃，利用碘伏或70%的乙醇对其颈部皮毛进行消毒，手术剪去其颈部皮毛；

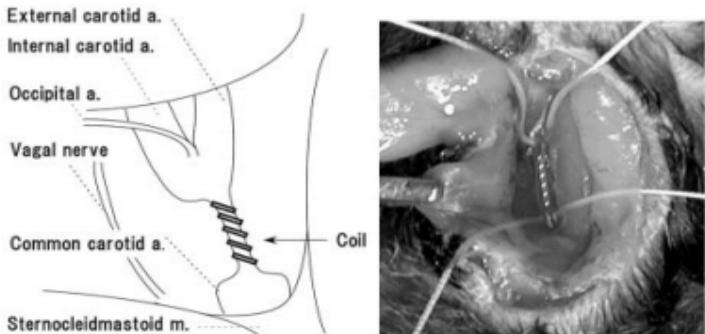
2) 行颈部前正中切开皮肤，约1cm大小，利用维纳斯颤钝性分离皮下组织，暴露出右侧颈总动脉（Common Carotid Artery, CCA）并分离出鞘，分离过程中要保护动脉和迷走神经不受损伤，在分离出来的颈总动脉下方放置1条缝线，然后轻轻地提起缝合线，放在颈总动脉分叉下方的内径0.18mm的微线圈袢之间，将颈总动脉旋转缠绕在微线圈上。30分钟后，按照上述步骤分离左侧颈总动脉并缠绕在另一个相同大小的内径0.18mm的微线圈上。

确认伤口无渗血，缝合肌肉与皮肤，碘伏消毒手术切口，术后注意保温及切口的护理，保持鼠笼干燥清洁，保证食物和水分供应，密切观察。

通过造成双侧颈总动脉管腔狭窄而引起大脑慢性低灌注损伤。其中直径0.18mm的弹簧圈最为经典和常用



A

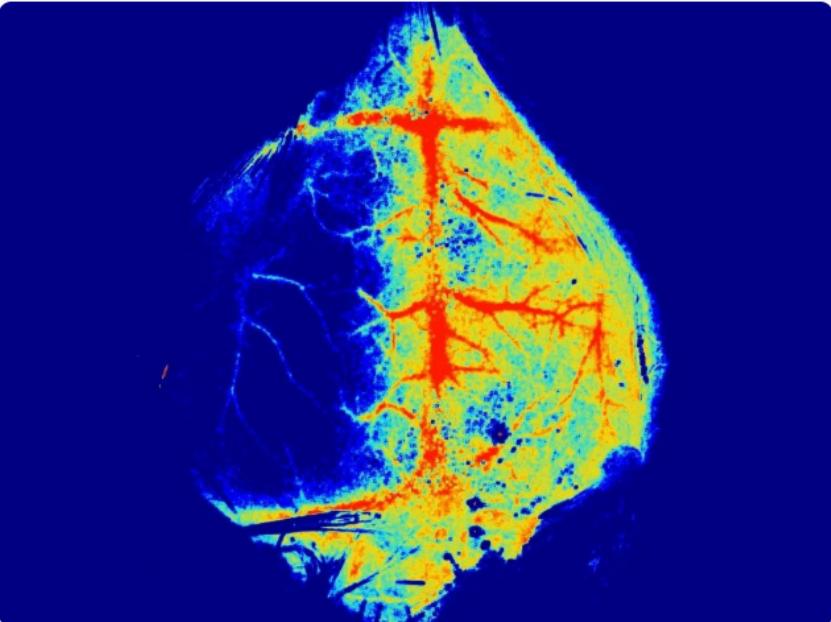
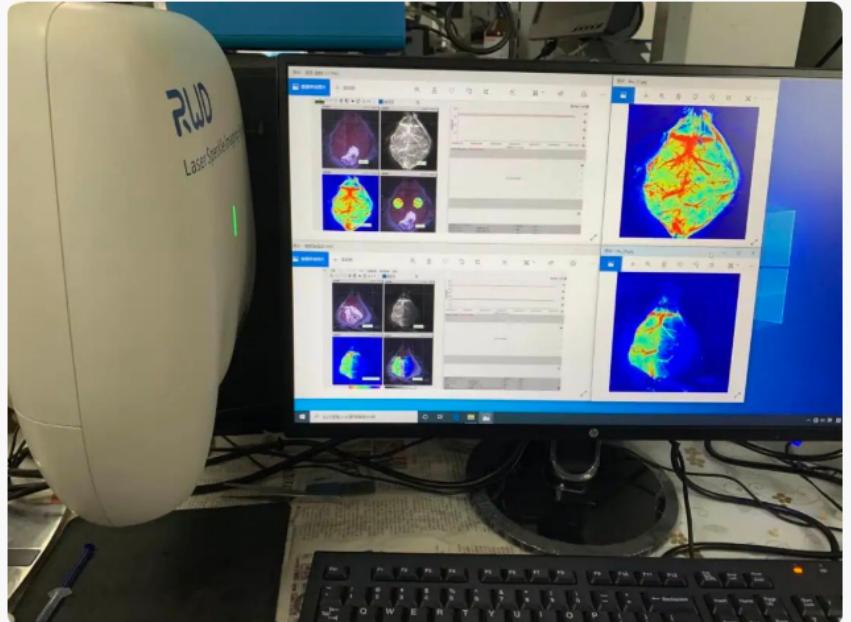


B



C

激光散斑血流成像判断模型是否成功



模型构建后急性期可造成60% ~ 70%的急性脑血流减少

提高模型存活率



- ▶ 死亡大部分是由于术后并发症所导致
- ▶ 颈总动脉和迷走神经分离不清，误伤迷走神经导致动物呼吸困难。
- ▶ 手术时间过长和手术过程中的不仔细同样会引起功能修复困难。
- ▶ 过度麻醉会引起动物在手术时死亡
- ▶ 熟练操作，仔细分离颈总动脉是提高生存率的重要因素。

病理生理机制



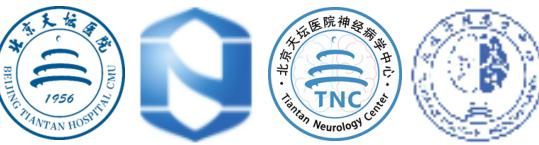
► **免疫炎性损伤** 免疫炎性损伤与**小胶质细胞 (microglia, MG)** 和**星形胶质细胞增殖、活化**有关。MG是脑白质中常驻免疫细胞，慢性脑缺血时MG增殖、活化产生细胞毒性因子和炎性介质，如肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 、白介素-1 β (IL-1 β)，介导少突胶质细胞死亡，在慢性脑缺血状态下反应性星形胶质细胞生成，促进炎性介质表达，并参与神经炎症过程，从而形成恶性循环。反应性星形胶质细胞失去了大部分正常的细胞功能，增加了神经毒性，可迅速杀死神经元和成熟的少突胶质，加重脑白质变性。

► **氧化应激损伤** 长期慢性脑缺血可激活无氧酵解途径，破坏氧自由基与抗氧化酶之间的平衡，自由基过量蓄积，导致蛋白质氧化和DNA氧化受损等广泛损害。氧化应激时产生的活性氧损伤线粒体，线粒体功能受损引起Ca²⁺稳态失调、细胞变性和功能障碍。

► **血管内皮功能障碍** 缺血缺氧时，血管内皮细胞功能紊乱，**内源性一氧化氮 (NO)** 产生减少，脑血流调节功能障碍，加重微循环障碍。而氧化应激产生的活性氧会氧化NO生成所必需的酶，进而加重NO合成障碍。

► **脑内神经递质改变** 神经细胞损伤导致神经突触减少、突触前膜成分改变、突触蛋白减少等，白质区胶质细胞对神经递质的清除和生成有重要作用，上述机制会引起递质“质”或“量”的改变，如肾上腺素递质、乙酰胆碱递质和多巴胺递质等，神经递质含量下降或生物活性降低，与情绪、睡眠、行为、认知等功能障碍的发生有关。例如，相关研究认为食欲刺激素与睡眠之间有着密切关系，慢性脑缺血伴睡眠障碍可能的机制之一为食欲刺激素的表达模型改变。目前认为患者出现情绪障碍与大脑中去甲肾上腺素 (NE) 和5-羟色胺 (5-HT) 等神经递质水平下降关系密切。

脑组织病理改变



- ▶ 动物模型研究发现慢性脑缺血的脑组织病理学改变包括**肉眼观皮质萎缩，镜下可见皮质和海马神经元变性丢失、白质疏松和毛细血管床的改变**等。
- ▶ **血脑屏障破坏** 慢性脑缺血引起血脑屏障破坏的机制包括因缺血缺氧引起的血管内皮细胞损伤、基质合成分解代谢紊乱和胶质细胞功能障碍等。
- ▶ **皮质、海马区神经元丢失** 大鼠双侧颈总动脉结扎实验中，应用尼氏染色检测神经元损害，发现皮质、海马区神经元凋亡增加，变性与坏死加重。免疫炎性反应在缺血性脑病病理生理学中具有重要作用，**神经胶质细胞的激活和随后的促炎介质释放**引发一系列复杂的生化和分子事件，这些事件被认为是导致神经元细胞凋亡的关键因素。海马区是对缺血最敏感的区域，缺血引起海马区神经元损伤，进而导致认知功能障碍。
- ▶ **脑白质病变 (WML)** 慢性脑缺血是引起WML的重要因素。脑白质主要由软脑膜穿支动脉供血，属于终末动脉，缺少侧支循环代偿，这种特殊的解剖结构决定了脑白质区最先受低灌注影响。**轴突髓鞘**是由少突胶质细胞及其他胶质细胞构成的，对缺血敏感，慢性脑缺血容易造成脑组织的白质变性即脱髓鞘改变。

- 该模型可引起脑白质血脑屏障通透性的增加（术后3-14d）、白质损伤（术后14d）、白质星形胶质细胞和小胶质细胞激活（术后3-14d）。
- 术后1个月至半年，小鼠出现皮层下微梗死、出血和白质血脑屏障破裂等CSVD特征，伴随记忆功能的显著下降。

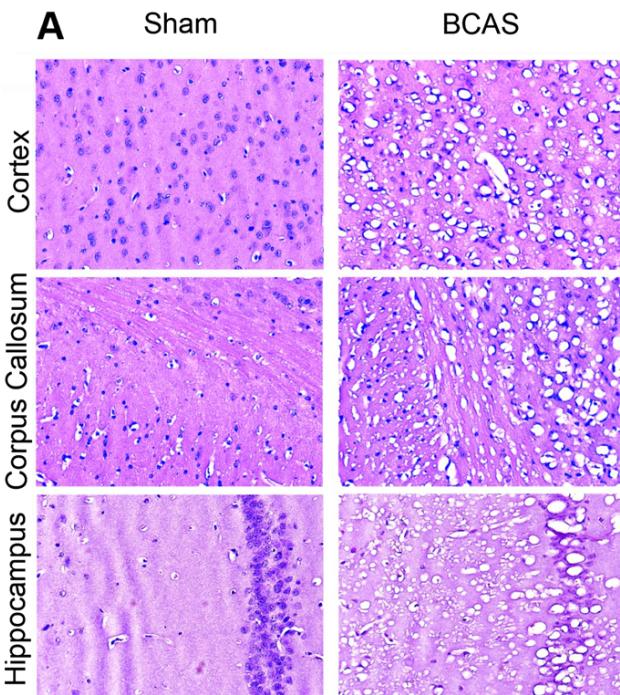
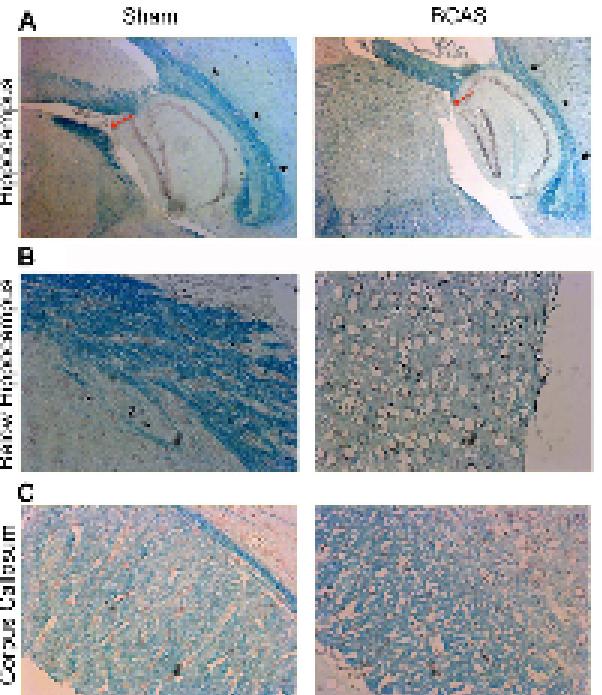
病理染色



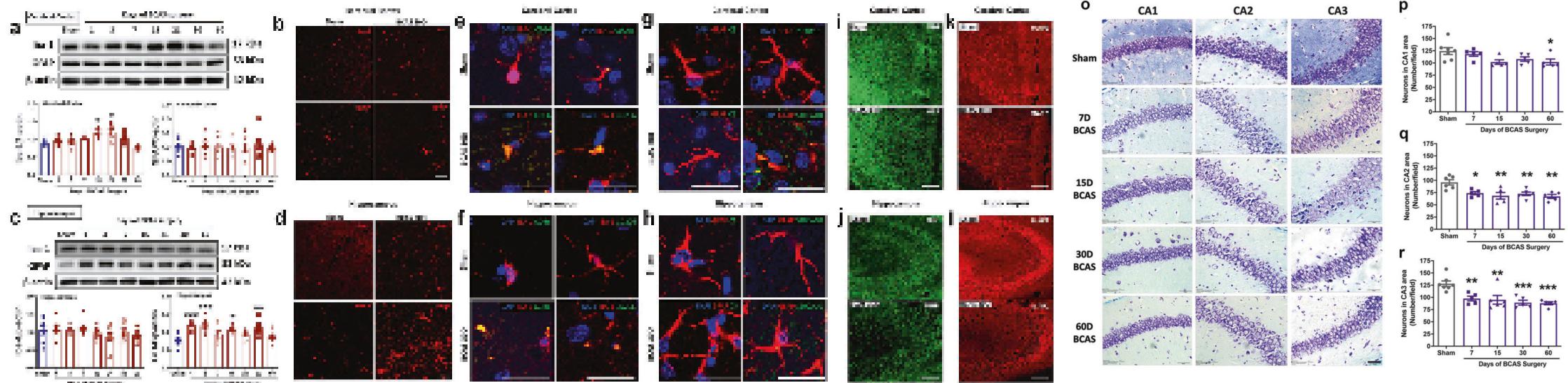
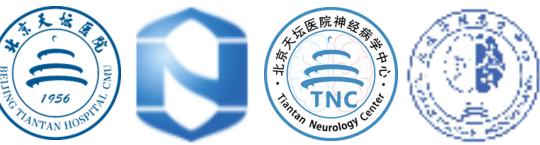
► HE染色：皮质、海马等部

位细胞核固缩、减少，出现
大量空泡

► Fast Blue: 神经纤维出现疏 松、弥散性空泡形成及有髓 神经纤维的消失



免疫荧光染色



MBP (髓鞘碱性蛋白)：是构成髓鞘的主要蛋白成分，髓鞘脱失严重

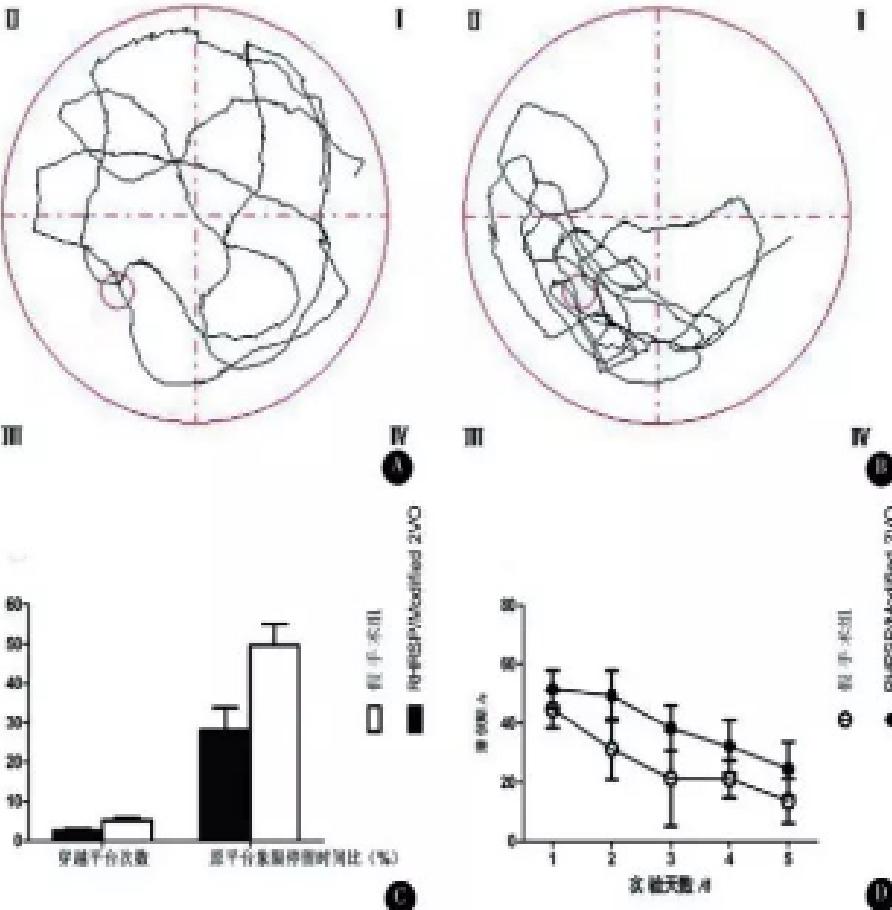
Ibal：大多数小胶质细胞胞体变大、突触回缩，为激活形态，这表明长期的低灌注不足引起小胶质细胞增生活化

GFAP：星形胶质细胞增生较多，星形胶质细胞胞体粗大，从胞体发出许多长分支

NEUN：神经元数量下降

行为学检测

- ▶ 行为学检测：水迷宫、Y迷宫、旷场、新物体识别、平衡木等
- ▶ 水迷宫：在潜伏期测定中模型组明显会比假手术组消耗更长的时间，而经过学习后，将平台撤走，假手术组在游泳过程中目的性较强，穿越原有平台位置次数对比模型组明显较多，模型组呈现无定向轨迹性运动。



- 双侧颈总动脉狭窄动物模型主要通过线圈造成的双侧颈总动脉管腔狭窄而引起大脑慢性低灌注损伤
- 血管性认知障碍
- 脑白质损伤
- 脑小血管病

血管性认知障碍动物模型对比



模型 Model	品系 Strain	手术部位 Surgical site	机制 Mechanism	损伤部位 Diseased 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	双侧颈动脉、双侧椎动脉 Bilateral vertebral artery (BVA) and bilateral carotid arteries (BOCA)	脑组织缺血坏死,缺血再灌注损伤 Ischemic necrosis of brain tissue and reperfusion ischemic reperfusion injury (IRI)	海马,新皮质,纹状体 Hippocampal, neocortex and striatum	记忆功能障碍, 感觉功能障碍 Memory dysfunction, sensory function 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	双侧颈动脉、左侧椎动脉 BVA,BOCA	脑组织缺血坏死,缺血再灌注损伤 Ischemic necrosis of brain tissue and IRI	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	双侧颈动脉、左侧椎动脉 BVA,BOCA	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 Reversible amnesia
两血管闭塞法 2-VO in rats	SD 大鼠 SD rats	右侧颈动脉 BOCA	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
改良四血管闭塞法 Modified 2-VO in rats	SD 大鼠 SD rats	右侧颈动脉 BOCA	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 一侧颈总动脉缺血 的皮质旁法 MCOP in rats	SD 大鼠 SD rats	右侧颈总动脉 BOCA	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 节段 MCAS in rats	CTBL/6 小鼠 CTBL/6 mice	右侧颈总动脉 BOCA	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 locomotor function 认知记忆障碍, 执行功能障碍, 运动功能障碍 Cognitive memory disorder, executive function disorder, motor function disorder
不对称双侧颈动脉 狭窄法	CTBL/6 小鼠 CTBL/6 mice	双侧颈总动脉 BOCA	脑组织缺血坏死 Ischemic necrosis of brain tissue	白质,海马 White matter	不会发生微血管病变化; 微线圈会对血管内皮产生不利影响; 手术难度高花费大

模型 Model	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
大鼠四血管闭塞法	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	阻断脑部供血血管较多,动物死亡率较高
大鼠四血管闭塞改良模型	不导致食管或气管损伤或过度出血	阻断脑部供血血管较多,动物死亡率较高
3-阶段四血管闭塞法	避免了因眼部的不完全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	阻断脑部供血血管较多,动物死亡率较高
两血管闭塞法	手术简单,花费小,术后动物表现出持续受损的空间学习能力	死亡率高,因眼部的不完全缺血造成的动物视觉功能障碍而影响行为学的准确性
一侧颈总动脉闭塞-一侧狭窄法	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	4-8周脑白质损伤出现一定逆转
双侧颈总动脉狭窄法	感觉/运动缺陷缺陷,表现出的海马病变与患者相似,不涉及视神经损伤	感觉/运动缺陷出现时间交晚,术后30天并未出现皮质下病变相关的其他表型;微线圈会对血管内皮产生不利影响
不对称双侧颈总动脉狭窄法	实现颈总动脉的进行性狭窄,更符合VCI的疾病进展	不会发生微血管病变化;微线圈会对血管内皮产生不利影响;手术难度高花费大

脑小血管病



- ▶ 脑小血管病 (CSVD) 是临床常见的一类年龄相关脑血管疾病，由各种因素影响脑内小动脉、微动脉、毛细血管、微静脉和小静脉导致的一系列临床、影像、病理综合征。主要表现为腔隙性脑梗死、脑出血、皮质下白质病变、脑微出血和微梗死。
- ▶ CSVD可急性起病，表现为脑实质出血或者缺血性卒中；多数则隐匿起病，缓慢发展，临
床上通常缺乏特异性表现，患者可出现认知功能下降（血管性痴呆）、平衡步态异常、精
神情感改变、尿失禁及生活能力下降等，影像学检查常可发现腔隙病灶、脑白质高信号、
脑微出血、近期皮层下小梗死灶及脑萎缩等异常信号。

脑小血管模型



►栓塞模型

►低灌注模型

●血管阻塞模型

●双侧颈总动脉狭窄模型

►高血压模型

●易卒中型自发性高血压大鼠

●诱导性高血压大鼠

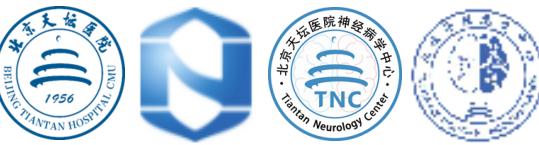
►表达人肾素和人血管紧张素原转基因小鼠(R/A)模型

►灵长动物主动脉缩窄模型

►高同型半胱氨酸血症的啮齿类动物模型

动物模型	特征	CSVD 无关
狗	一侧颈总动脉高 血压	·CSVD 与慢性高血压无关，但与年龄相关 ·与颈动脉狭窄无关
兔	CSVD	
大鼠		
NOT	·模仿 CAD ·ASD, 炎症	·NOTICED RISCS 小鼠模型，内膜增厚，内腔狭窄 ·ASD, 炎症
CH3	ASD, 炎症	
转基因	·遗传, 代谢	
因小鼠	·表达 CSVD ·O	
BCC	·遗传代谢 ·ASD, 炎症	·白质纤维密度降低, 红色斑块的形成 ·内膜增厚, 内腔狭窄, 血管壁增厚, 血管壁增厚, 血管壁增厚
AO的患者	·遗传 ·遗传	
Ihy1-GFP 转基因小鼠	·可视化 ·微血管 ·神经元 ·标记的免疫 染色	·CSVD 的病因是通过血管内注射荧光染料产生的 ·脊髓灰质炎小鼠的半胱氨酸基团，白蛋白，合成标记的半胱氨酸

动物模型选择



- ▶ 研究CSVD **白质损伤** 可选用双侧颈总动脉结扎模型、双侧颈总动脉狭窄模型、双侧颈总动脉渐进性狭窄模型、卒中易感型自发性高血压大鼠模型和微小栓子血管栓塞模型，但是由于双侧颈总动脉结扎模型引起海马神经元缺血性损伤，因此更符合临床慢性脑缺血的病理表现。
- ▶ 研究 **血脑屏障损伤** 可选用双侧颈总动脉狭窄和渐进性狭窄模型、卒中易感型自发性高血压大鼠模型。
- ▶ 研究 **认知损伤** 可选用双侧颈总动脉狭窄和渐进性狭窄模型、卒中易感型自发性高血压大鼠模型、高血压恒河猴模型、颅内内皮素-1注射模型、微小栓子血管栓塞模型。
- ▶ 研究 **皮层下或白质梗死** 可选用6个月双侧颈总动脉狭窄模型、双侧颈总动脉渐进性狭窄模型、高血压恒河猴模型、微小栓子血管栓塞模型。
- ▶ 研究 **CADASIL** 应选用 Notch3 转基因小鼠模型。
- ▶ 双侧颈总动脉狭窄模型制作容易，重复性好，能够模拟CSVD患者的部分病理特征和认知障碍，因此近年得到广泛认可。

总结



- ▶ BCAS动物模型构建难度稍大，通过线圈造成的双侧颈总动脉管腔狭窄而引起大脑慢性低灌注损伤
- ▶ 脑组织病理学改变包括**肉眼观皮质萎缩，镜下可见皮质和海马神经元变性丢失、白质疏松和毛细血管床的改变**等
- ▶ 病理生理机制主要是小胶质细胞激活和星形胶质细胞增生等免疫炎性反应、血管内皮细胞功能障碍、氧化应激障碍等
- ▶ 术后1个月至半年，小鼠出现皮层下微梗死、出血和白质血脑屏障破裂等CSVD特征，伴随记忆功能的显著下降
- ▶ 主要用于研究脑小血管病、血管性痴呆的相关研究
- ▶ 需要根据自己的研究目的选择合适的动物模型



天坛神经免疫治疗中心

谢谢收听！